

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA DE SOJA VIA BIOBALÍSTICA**

Roberta Borges dos Santos

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA DE SOJA VIA BIOBALÍSTICA**

Roberta Borges dos Santos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janete Ap. Desidério

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Unêda-Trevisoli

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2012

Santos, Roberta Borges dos
S237e Embriogênese somática e transformação genética de soja via
 biobalística / Roberta Borges dos Santos. – – Jaboticabal, 2012
 xii, 60f. : il. ; 28 cm

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
 Orientadora: Janete Aparecida Desidério
 Banca examinadora: Sonia Marli Zingaretti, Newton Cavalcante de
 Noronha Junior
 Bibliografia

 1. Cultura de tecidos. 2. Gene *gusA*. 3. Transformação de soja
 (*Glycine Max*). I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias
 e Veterinárias.

 CDU 633.34:631.52

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: arnold@cnpso.embrapa.br

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ROBERTA BORGES DOS SANTOS – nascida em 30 de novembro de 1980, em Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Bióloga formada em junho de 2006 pela Faculdade de Americana – FAM. Realizou estágio no Departamento de Tecnologia – (FCAV/UNESP) entre janeiro de 2000 a dezembro de 2002. Trabalhou na empresa de Biotecnologia – Alellyx, de janeiro de 2003 a março de 2009. Ingressou em março de 2010 no curso de Mestrado (Genética e Melhoramento de Plantas, FCAV/UNESP). Desde 2009 trabalha no Fundecitrus atuando em projetos de pesquisa relacionados à Biotecnologia Vegetal.

"Disciplina é liberdade, compaixão é fortaleza,
ter bondade é ter coragem..."

Renato Russo

Esta Dissertação é dedicada
à minha querida família:

Meus pais, Mário Roberto dos Santos e Maria José da Silva B. Santos;
meu irmão, Ramon Roberto dos Santos;
meu sobrinho Gabriel;
e meu esposo Maycon.

Por vocês...

“...eu dançaria tango no teto,
eu limparia os trilhos do metrô,
eu iria a pé do Rio a Salvador...”

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a DEUS que me proporcionou saúde todos os dias da minha vida para que eu pudesse levantar da cama e agradecer: “muito obrigada Senhor por mais um dia”, por ter iluminado minha difícil caminhada até aqui.

A Prof^a Dr^a. **Janete Ap. Desidério**, pela orientação e pela confiança depositada em mim por todo este tempo, mesmo sendo uma aluna distante.

A Prof^a Dr^a. **Sandra Helena Unêda-Trevisoli** pela co-orientação e dedicação ao trabalho, conselho pessoal e profissional.

A **minha família** e meu esposo **Maycon**, pela paciência e compreensão em tantas horas difíceis.

Um agradecimento especial a minha eterna e fiel amiga **Viviane Viana**, por tudo que ela fez por mim e pelo meu trabalho, sem ela seria difícil ter chegado até aqui.

Sem ser menos importante quero agradecer meus amigos: **Mateus**, pelos toques e por toda paciência comigo, **Newton**, por toda sua sabedoria e tranquilidade, **Ana Claudia**, pela sua ajuda indispensável, **Janaynna**, pelas correções e companheirismo lá do início, **Dani**, pela preocupação e pela oferta de ajuda sempre, **Fabício** (Jaci), por passar pelos mesmos apertos que eu e mesmo assim estar lembrando-me o tempo todo dos prazos, **Juliana** (Embrapa), por me acolher com tanto carinho em sua casa e me dar tanto apoio, pessoal do laboratório de **Produção Vegetal**, pelos socorros mesmo que por telefone, **Rodrigo Toloy**, pelos finais de semana na Faculdade abdicando do seu tempo para me ajudar. O meu muito obrigado a todos que participaram diretamente ou indiretamente deste trabalho.

Meu muito obrigado pelo aprendizado de todo este tempo e pela amizade de cada um que, diretamente ou indiretamente, participou da realização de um sonho, lembrando que sem eles este sonho seria muito mais difícil.

SUMÁRIO

	Página
I.INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 A cultura da soja.....	2
2.2 A Biotecnologia vegetal	3
2.3 Embriogênese somática e regeneração.....	5
2.4 Transformação genética de soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill).....	8
2.5 Genes marcadores de seleção.....	11
2.6 O sistema do gene repórter.....	12
III. OBJETIVOS.....	14
3.1 Geral.....	14
3.2 Específicos.....	14
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Material vegetal.....	14
4.2 Preparo do material vegetal.....	15
4.2.1 Indução de embriogênese somática em embriões	15
4.2.2 Indução de embriogênese somática em cotilédones.....	16
4.3 Regeneração.....	17
4.3.1 Regeneração dos embriões pós co-cultivo com diferentes concentrações de BAP.....	17
4.3.2 Regeneração dos calos oriundos dos cotilédones de soja.....	17
4.4 Curva de morte dos embriões.....	18
4.5 Transformação genética de <i>Nicotiana benthamiana</i>	18
4.5.1 Obtenção das plantas.....	18
4.5.2 Preparo do material vegetal.....	19
4.5.3 Obtenção do DNA para bombardeamento.....	19
4.5.4 Preparo do tungstênio (TG).....	21
4.5.5 Transformação genética de <i>Nicotiana benthamiana</i>	21

4.6 Transformação genética de soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill).....	22
4.6.1 Transformação de embriões maduros de soja.....	22
4.6.2 Transformação de calos oriundos dos cotilédones.....	24
4.7 Análise do material vegetal – ensaio histoquímico (GUS).....	26
V. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	26
5.1 Embriogênese somática e regeneração dos embriões.....	26
5.2 Embriogênese somática e regeneração dos cotilédones.....	28
5.2.1 Regeneração dos cotilédones.....	31
5.3 Regeneração dos embriões pós co-cultivo com diferentes concentrações de BAP.....	35
5.4 Curva de morte em embriões.....	36
5.5 Preparo do tungstênio.....	38
5.5.1 Avaliação dos diferentes protocolos.....	38
5.6 Transformação genética de <i>Nicotiana benthamiana</i>	40
5.6.1 Obtenção e preparo das plantas.....	40
5.7 Transformação genética de soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill).....	42
5.7.1 Transformação genética em embriões.....	42
5.7.2 Transformação genética em calos.....	46
VI. CONCLUSÃO.....	48
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

EMBRIOGÊSE SOMÁTICA E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA VIA BIOBALÍSTICA

RESUMO — Os objetivos do presente trabalho foram (i) identificar uma cultivar de soja (*Glycine max*) com melhor resposta *in vitro* para indução de calos e regeneração; (ii) otimizar o processo de transformação genética via biobalística em embriões oriundos de cotilédones maduros de soja. Os experimentos de indução de calos e transformação genética foram realizados com as cultivares IAS-5, BR16 e MSOY6101. Para indução de calos foram utilizadas altas doses de auxinas [5 mg/L 2,4D (2,4-diclorofenoxiacético-2,4D), 5 mg/L 2ip (2-isopenteniladenina) e 10 mg/L ANA (ácido-naftalenacético)] e para regeneração de 0 a 2 mg/L de BAP (6-benzylaminopurine), adicionando-se 0,5 mg/L de ANA em todos os tratamentos. Vários parâmetros foram testados na transformação: concentração do tungstênio; BAP (0 a 5 mg/L) no co-cultivo e a concentração de canamicina para seleção de plantas. A construção utilizada foi constituída pelo vetor pCAMBIA 2301, contendo o gene repórter GUS, regulado pelo promotor constitutivo 35SCaMV e adição do gene de seleção NPTII que confere resistência a canamicina. Foram observadas diferenças para a indução e regeneração via embriogênese somática entre as cultivares de soja, resultando na seleção da cultivar 'IAS-5' para avaliação do potencial embriogênico quanto à diferenciação e regeneração de plantas. Essa cultivar apresentou alta taxa de indução, proliferação e regeneração estável. Os resultados mostraram que a adição de 0,5 mg/L de BAP ao meio de regeneração e 5 mg/L de 2,4D ao meio de indução aumentaram as taxas de diferenciação dos embriões de 0 para 27,77%. A partir dos resultados observados na transformação genética em *N. benthamiana*, adotou-se 24 mg/μL de tungstênio por membrana para as três cultivares de soja. Para regeneração em embrião maduro de soja o melhor resultado foi obtido sem a presença de BAP no co-cultivo. Apenas no bombardeamento com a cultivar BR16 foi detectada uma planta com expressão de GUS nestas condições.

Palavras chaves: Cultura de tecidos, gene *gusA*, transformação de soja (*Glycine max*)

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND GENETIC TRANSFORMATION OF SOYBEAN AND BIOBALLISTIC

ABSTRACT - The present work aimed to (i) identify the best soybean (*Glycine max*) cultivar for *in vitro* response for callus induction and plant regeneration; (ii) optimize genetic transformation of soybean mature cotyledon embryo *via* biobalistic. The callus induction and genetic transformation experiments were performed using IAS-5, BR16 and MSOY6101 soybean cultivars. High auxin levels (5 mg/L 2,4-dichlorofenoxyacetic, 5 mg/L 2-isopenteniladenine and 10 mg/L acid-naftalenacetic) were used for callus induction and to regeneration, adding 0,5 mg/L of acid-naftalenacetic and 0 to 2 mg/L of 6-benzylaminopurine (BAP), in all the treatments of regeneration. The following parameters were tested in order to optimize the transformation: tungsten concentration; BAP concentration (0 to 5 mg/L) in the co-cultivation medium and Kanamycin concentration in the selection medium. The genetic construction used was comprised of pCAMBIA2301 vector, containing *gusA* gene reporter, under the regulation of 35SCaMV constitutive promoter and *NPTII* selection gene that provides resistance to Kanamycin. Some differences were observed at the induction and regeneration of somatic embryogenesis among the three cultivars and only IAS-5 cultivar was selected for the assessment of embryogenic potential regarding plant differentiation and regeneration. This cultivar presented high level of callus induction, stable proliferation and stable regeneration. The results showed that the addition of 5 mg/L of 2,4D to the induction medium and 0,5 mg/L of BAP to the regeneration medium increased the levels of differentiation of the IAS-5 soybean embryos from 0 to 27,77%. Based on the results observed in the genetic transformation in *N. benthamiana*, 24 mg/μL of tungsten per membrane is now being used in the bombardment for the three soybean cultivars. The best result for the regeneration of mature soybean embryo was obtained without the presence of BAP in the co-cultivation medium. Only one plant presenting GUS expression was detected after the bombardment of BR16 cultivar in these conditions.

Keywords: tissue culture, gene *gusA*, soybean transformation (*Glycine max*)

I. INTRODUÇÃO

A soja cultivada (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma espécie vegetal anual, diplóide ($2n=40$), autógama, originada na China e explorada no oriente há mais de cinco mil anos. No Brasil, o primeiro relato sobre o surgimento da soja e seu cultivo foi em 1882, no estado da Bahia.

Em seguida, a soja foi levada por imigrantes japoneses para São Paulo (SP), e em 1914, introduzida no estado do Rio Grande do Sul (RS), onde as variedades trazidas dos Estados Unidos, melhor se adaptaram às condições climáticas, principalmente em relação ao fotoperíodo. O crescimento da produção e o aumento da capacidade competitiva da soja brasileira sempre estiveram associados aos avanços científicos e à disponibilização de tecnologias ao setor produtivo.

A fonte de recursos genéticos representada por espécies afins é inacessível para a soja, devido à incompatibilidade sexual dos cruzamentos interespecíficos e intergenéticos. Assim sendo, a biotecnologia moderna permitiu por meio da obtenção da soja transgênica a atualização de material biológico para fins industriais.

Os principais objetivos da obtenção de plantas geneticamente modificadas (PGM) consistem em aumentar a resistência vegetal a herbicidas, patógenos, a insetos-praga, aumentar a tolerância a estresse abiótico, melhorar a qualidade nutricional do produto vegetal e produzir proteínas e biopolímeros de interesse técnico e farmacêutico.

A soja é considerada uma cultura de importância mundial e muitos esforços na área de biotecnologia têm sido realizados para complementar os métodos de melhoramento convencional desta espécie. Um componente essencial da biotecnologia para a soja é a transferência exógena de genes para explantes com alto potencial de regeneração, principalmente nas cultivares elite. Um dos métodos que tem sido mais eficiente na transferência destes genes na soja é a biobalística. Através desta técnica, várias cultivares tem sido lançadas no mercado

apresentando genes exógenos de importância agronômica como resistência a insetos, fitopatógenos ou herbicidas.

No entanto, uma das grandes dificuldades da transformação genética via biobalística tanto em soja quanto em outras culturas, está no fato de somente uma pequena fração da população total de células ser atingida pelas partículas contendo o DNA exógeno e destas, nem todas irão expressar o gene introduzido.

Para contornar esta baixa eficiência faz-se necessário a busca de protocolos eficientes de seleção e regeneração de plantas transformadas. A frequência desfavorável entre o total de células bombardeadas e o total de células que são estavelmente transformadas é, provavelmente, a maior limitação desta técnica.

Assim sendo, os principais objetivos do presente trabalho foram identificar uma cultivar de soja com melhor resposta *in vitro* para regeneração e otimizar o processo de transformação genética de soja via biobalística.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1A cultura da Soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das mais importantes plantas cultivadas na economia mundial. Seus grãos são muito usados pela agroindústria (produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal), indústria química e de alimentos (COSTA NETO et al., 2000).

A soja possui como centro de origem e domesticação o nordeste da Ásia (China e regiões adjacentes) (CHUNG & SINGH, 2008) e a sua disseminação do Oriente para o Ocidente ocorreu através de navegações.

No Brasil, o primeiro relato sobre o surgimento da soja cultivada data de 1882, no estado da Bahia (BLACK, 2000). Em seguida, foi levada por imigrantes

japoneses para São Paulo, e somente, em 1914, a soja foi introduzida no estado do Rio Grande do Sul, sendo este por fim, o lugar onde as variedades trazidas dos Estados Unidos melhor se adaptaram às condições climáticas, principalmente em relação ao fotoperíodo (BONETTI, 1981).

O crescimento da produção e o aumento da capacidade competitiva da soja brasileira sempre estiveram associados aos avanços científicos e à disponibilização de tecnologias ao setor produtivo. Até o final dos anos 60, a pesquisa com a cultura da soja no Brasil era incipiente e concentrava-se na Região Sul do País, atuando, fundamentalmente, na adaptação de variedades introduzidas dos Estados Unidos (EUA). O primeiro programa consistente de pesquisa com a soja estabeleceu-se na década de 1950, no Instituto Agrônomo de Campinas, SP.

Somente no estado do Rio Grande do Sul, uma década mais tarde, que a cultura encontrou condições para se estabelecer e expandir como lavoura comercial, para tal, necessitava uma adaptação que as cultivares introduzidas dos EUA não possuíam para as condições do sul do Brasil.

O rápido desenvolvimento do cultivo da soja no País, a partir dos anos 60, fez surgir um novo e agressivo setor produtivo com alta demanda de tecnologias ainda não disponíveis na quantidade e qualidade desejadas.

Consequentemente, os poucos programas de pesquisa com soja existentes na região foram fortalecidos e novos núcleos de pesquisa foram criados no sudeste e centro oeste, principalmente como o advento da Biotecnologia moderna (EMBRAPA, 2012).

2.2 A Biotecnologia Vegetal

Em 1953, quando Francis Crick e James Watson, descobriram a estrutura de espiral dupla do ácido desoxirribonucléico, o DNA, surgiram novas perspectivas para importantes conquistas científicas.

Algumas décadas mais tarde, foi possível o desenvolvimento da biotecnologia moderna, que trouxe a fertilização *in vitro*, os testes de paternidade, a clonagem, o sequenciamento de genomas de animais, plantas e humanos, o tratamento de doenças através de células-tronco e, também, os alimentos geneticamente modificados (transgênicos) (FIGUEIREDO et al., 2006).

Os organismos geneticamente modificados (OGMs) podem ser definidos como organismos cujo material genético (DNA) foi alterado de modo artificial. A tecnologia geralmente é denominada “biotecnologia moderna” ou tecnologia genética, ou também, tecnologia de DNA recombinante, ou ainda, engenharia genética. Nesta técnica transferem-se genes selecionados individualmente de um organismo a outro, também entre espécies não relacionadas (VARZAKAS et al., 2007).

Uma razão para o desenvolvimento dos OGMs é aumentar o fornecimento dos alimentos pelo aumento da produtividade dos cultivos. Várias empresas de Biotecnologia têm desenvolvido plantas com características agrônômicas superiores, tais como resistência a fatores bióticos e abióticos, além de caracteres relacionados à qualidade nutricional e de mercado (NEWELL, 2000).

Na década passada, em um primeiro estágio, também denominado de primeira geração dos transgênicos, as plantas geneticamente modificadas foram desenvolvidas com o objetivo principal de reduzir os custos de produção na agricultura e ampliar os ganhos na agroindústria, mediante o desenvolvimento de vegetais resistentes a pragas ou tolerantes a herbicidas.

Nesta primeira geração priorizou-se os benefícios aos produtores. Foi o caso da soja *Roundup Ready*, tolerante ao herbicida do mesmo nome, desenvolvida pela empresa Monsanto (KUNISAWA, 2001).

A soja *Roundup Ready* (RR) da Monsanto foi a primeira planta transgênica a ser aprovada pela Comissão Técnica de Biossegurança (CTNBio) para alimentação humana, animal e para cultivo no Brasil, no ano de 1998. Neste mesmo ano houve a proibição em virtude da alegação da inexistência de estudos sobre impacto ambiental e de normas de segurança alimentar, comercialização e

rotulagem de alimentos transgênicos, por parte de algumas organizações, entretanto, vale ressaltar que o seu cultivo comercial só foi liberado efetivamente a partir da safra 2006/07 (VENCATO, 2010).

Realizado o primeiro passo para o avanço da Biotecnologia, no ano de 2010 o Brasil chegou a cultivar 25,4 milhões de hectares de soja, milho e algodão transgênicos. Um aumento quase 20% em relação à área plantada em 2009 (21,4 milhões de ha).

Com isso, o Brasil se consolidou na segunda posição do ranking dos países que mais cultivaram alimentos transgênicos, atrás apenas dos Estados Unidos, que em 2010 cultivou 66,8 milhões de hectares. Na lista dos cinco países que mais produziram transgênicos em 2010, encontram-se ainda a Argentina (22,9 milhões de ha), a Índia (9,4 milhões de ha) e o Canadá (8,8 milhões de ha).

Os dados são de um estudo divulgado pelo Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações Agro-Biotecnológicas (ISAAA), fornecendo informações que no mundo foi cultivado, em 2010, 148 milhões de hectares de plantas transgênicas, apresentando um crescimento de 10% em relação ao ano anterior (134 milhões de hectares).

De acordo com o estudo, a soja foi a cultura transgênica mais cultivada no Brasil. Atualmente, 75% da área cultivada com o grão (17,8 milhões de ha) possui cultivares transgênicos. A cultura do milho ocupa o segundo lugar, com 7,3 milhões de hectares cultivados (55% do total). Por último se encontra a cultura do algodão, cuja área transgênica cultivada foi de 250 mil hectares, o equivalente a um quarto do total cultivado (ISAAA, 2012).

2.3 Embriogênese somática e regeneração

A embriogênese somática consiste no desenvolvimento de embriões a partir de micrósporo ou tecido somático, dando origem a uma planta, sem que ocorra fusão de gametas (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1996). Este processo envolve

uma série de mudanças morfológicas que são semelhantes, em vários aspectos àquelas associadas com o desenvolvimento dos embriões zigóticos.

Embora para algumas espécies vegetais a embriogênese somática tenha sido descrita há bastante tempo e possa ser considerada rotineira (STEWART, 1958), em soja, o primeiro registro de embriogênese foi atribuído a pouca eficiência na organogênese dos poucos embriões produzidos. (BEVERSDORF & BINGHAM, 1977).

CHRISTIANSON et al. (1983) foram os primeiros pesquisadores a regenerar plantas de soja *in vitro* via embriogênese somática. Vários trabalhos posteriores relataram a obtenção de embriões somáticos, por via direta ou indireta, a partir de cotilédones de embriões imaturos de soja (LIPPMANN & LIPPMANN, 1984; LAZZERI et al., 1985; BARWALE et al., 1986). Contudo, a maioria destes protocolos apresentaram baixa eficiência para a transformação. Em parte, essa limitação era decorrente da incapacidade de produzir um grande número de embriões.

Este obstáculo foi superado com a descoberta do uso de altas concentrações do regulador de crescimento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nas etapas de indução e proliferação dos embriões somáticos. Uma desvantagem desta metodologia é que seu emprego para a transformação originava plantas quiméricas (PARROTT et al., 1989), consequência da origem multicelular dos embriões somáticos primários a partir de células superficiais da epiderme do explantes (FINER, 1988).

Entretanto, este autor demonstrou que a proliferação dos embriões somáticos secundários ocorria a partir de células únicas da superfície dos embriões primários, e que a embriogênese secundária poderia ser obtida com a manutenção do tecido em meio de cultivo com alta concentração de 2,4-D.

A origem unicelular dos embriões secundários faz deste tecido o principal alvo para a transformação genética, afastando o problema do quimerismo (FINER, 1988).

Um procedimento simples foi desenvolvido por SANTAREM et al. (1997), utilizando um meio semi-sólido descrito por WRIGHT et al. (1991) para o estabelecimento e proliferação de embriões somáticos de cotilédones imaturos, mais rápido e menos laborioso do que as culturas embriogênicas em suspensão. Seguindo este procedimento, SANTAREM et al., (1999) e DROSTE et al. (2002) produziram plantas transgênicas de soja das cultivares “Jack” e “IAS-5”, respectivamente, expressando o gene repórter *gusA*.

As plantas transgênicas obtidas em ambos os trabalhos eram férteis, indicando que esta estratégia é bastante promissora para a recuperação de plantas transgênica de soja.

Inúmeros trabalhos têm indicado que a regeneração de soja é genótipo-específica e que a grande maioria das cultivares permanece recalcitrante à cultura *in vitro* e à transformação. Não existe um sistema de transformação eficiente para a maior parte das cultivares de soja (TRICK et al., 1997; HOFMANN et al., 2004 e KO et al., 2004). Isto explica, em parte, a escassez de publicações relacionadas à transformação genética de cultivares comerciais desta cultura.

De acordo com MEURER et al. (2001), existem dois caminhos para otimizar a regeneração das cultivares embriogênicas e os protocolos de transformação de soja: 1) Testar um grande número de novas cultivares, para identificar aquelas com potencial embriogênico; 2) Utilizar protocolos estabelecidos para cultivares como “Jack”, que tem sido a mais empregada em trabalhos de transformação de soja nos EUA.

Neste caso, a obtenção de plantas geneticamente modificada deve estar associada a programas de melhoramento tradicional, com o objetivo de introgreir os traços transgênicos em outros genótipos. Esta segunda opção foi utilizada por STEWART et al. (1996) e YAN et al. (2000) para a transformação de soja visando resistência a insetos e a modificação de proteínas, respectivamente.

A cultivar IAS-5 ainda tem sido, frequentemente, utilizada em programas de melhoramento genético e é recomendada para o cultivo nos estados do Rio

Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Goiás (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007).

Esta cultivar tem mostrado uma boa resposta em sistemas embriogênicos, onde estudos preliminares relativos à herança da capacidade embriogênica em soja evidenciaram que tal característica é de natureza quantitativa (DI MAURO et al., 1995). BODANESE-ZANETTINI et al. (1993) mostraram que ocorre grande influência do genótipo na capacidade das cultivares de soja sofrerem embriogênese somática. Os mesmos autores relataram a boa capacidade embriogênica da cultivar IAS-5.

2.4 Transformação genética de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

A combinação de técnicas de biologia molecular, cultura de tecidos *in vitro* e transferência exógena de genes representa uma ferramenta poderosa para introduzir novas características em uma determinada planta.

Genes oriundos de diferentes espécies vegetais, animais ou microrganismos podem ser introduzidos de forma controlada em um genoma vegetal receptor, de modo independente da fertilização. O gene responsável pela característica de interesse deve ser localizado, isolado, caracterizado e introduzido em vetores para a transformação de plantas (GANDER et al., 1996).

Um marco importante na cultura da soja foi a soja *Roundup Ready* (RR) da Monsanto, a primeira planta transgênica a ser aprovada pela Comissão Técnica de Biossegurança (CTNBio) para alimentação humana e animal e para cultivo no Brasil, no ano de 1998. Desde então, muitas variedades continuaram sendo lançadas pela Monsanto como a BRS245RR, REC 301, REC302, BRS294RR, entre outras (EMBRAPA, 2012).

A transformação genética de soja tem sido um grande desafio, devido à variabilidade genética das cultivares e as diferenças nas respostas à cultura *in vitro* e procedimentos de transformação (DROSTE et al., 2002). A eficiência de

transformação que é relatada nessa leguminosa é geralmente baixa e, como outras culturas de interesse, os protocolos criados são normalmente genótipos específicos (SOMERS, 2003).

Existem dois métodos que têm sido empregados na transformação de soja: O primeiro é o método de biobalística em tecidos embriogênicos (DROSTE et al., 2002) e o segundo é a transformação de tecidos cotiledonares por meio da bactéria, *Agrobacterium tumefaciens* (OLHOFT et al., 2001).

Apesar dos dois métodos serem viáveis, os mesmos possuem algumas limitações. Plantas transgênicas derivadas do bombardeamento de micropartículas tendem a possuir integração de múltiplas cópias do transgene em seu genoma ou a fragmentação do DNA exógeno antes que isso aconteça. Existem relatos em soja, de eventos de inserção de até 100 cópias de um transgene. A interação entre múltiplas cópias pode causar silenciamento gênico e dificultar o desenvolvimento de variedades comerciais geneticamente estáveis (REDDY et al., 2003).

Como vantagem, pode-se citar um procedimento rápido e simples além da facilidade na transformação de tecidos totipotentes como pólen, embriões, meristemas e culturas de células, além de ser um método viável para a transformação de organelas (SANFORD, 1990).

O aumento da eficiência de transformação tanto para biobalística quanto para *A. tumefaciens* em soja, só poderá ser alcançado por otimizações mais aprofundadas do sistema de seleção para ambas as técnicas, aumento da interação explante-patógeno, no caso de *A. tumefaciens* e aprimoramento das condições de cultura para promover uma melhor regeneração e recuperação das plantas transformadas no caso de biobalística (PAZ et al., 2004).

O processo de biobalística foi inicialmente proposto por SANFORD et al. (1987), com o objetivo de introduzir material genético no genoma nuclear de plantas superiores. Desde então, sua universalidade de aplicações tem sido avaliada, demonstrando ser um processo também efetivo e simples para a introdução e expressão de genes em bactérias, fungos, protozoários, algas,

insetos e tecidos animais (KLEIN et al., 1992; SANFORD et al., 1993 e ARAGÃO et al., 1992).

A biobalística utiliza microprojéteis impulsionados em alta velocidade para projetar o DNA dentro das células. Este bombardeamento é feito em equipamento apropriado capaz de acelerar as partículas (de 0,2 – 4 μm de diâmetro) cobertas com sequência de DNA a velocidades maiores de 1500 Km/h.

Foi demonstrado que estes microprojéteis (de ouro ou tungstênio) penetram a parede e a membrana celular de maneira não letal, alojando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Posteriormente, o DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular e integrado no genoma nuclear do organismo receptor (ARAGÃO et al., 1992).

A principal vantagem do método de bombardeamento de partículas é a possibilidade de transferência de genes, independente do genótipo, para qualquer tipo de tecido ou célula, sem a necessidade de compatibilidade de bactéria/hospedeiro, exigida pelo sistema via *A. tumefaciens*. Os materiais mais utilizados para bombardeamento são: calos, embriões e segmentos foliares.

O passo seguinte a transformação é a obtenção de plantas e sementes das células que incorporam o gene de interesse através de cultura de tecidos. Durante esta fase, várias análises são realizadas para selecionar plântulas que incorporaram o gene escolhido.

O uso de um bom marcador de seleção é fundamental para a recuperação *in vitro* eficiente de plantas transgênicas. O marcador de seleção confere caráter dominante às células transformadas, resultantes da incorporação de nova característica, que não está presente nas células não transformadas. Essa nova característica permite a sobrevivência da célula vegetal transformada na presença de um agente de seleção que é, geralmente, um antibiótico ou um herbicida (BOWEN, 1993).

2.5 Genes marcadores de seleção

Existem basicamente dois tipos de genes marcadores: os que conferem resistência a determinados antibióticos e os que conferem tolerância a herbicidas. Estes genes são usados para a identificação de células transformadas em relação as não transformadas nos primeiros estágios após a transformação.

Um dos genes marcadores mais utilizados é o NPTII, que confere resistência a canamicina e outros antibióticos derivados da neomicina, como a paranomicina. A Calgene foi a primeira empresa de biotecnologia a relatar o uso deste marcador em uma variedade de tomate, o Flavr. Savr, também conhecido como CGN-89564-2.

Em 17 de maio de 1994, o FDA (Food and Drug Administration) concluiu que este tomate era tão seguro quanto os tomates produzidos pelos meios convencionais, emitindo um documento assegurando tal fato. Segundo este documento, o ser humano ingere por dia $1,2 \times 10^6$ microrganismos resistentes à canamicina, vindos basicamente da salada crua (FLAWELL et al., 1992).

Desta forma a ingestão de vegetais com gene NPTII não acarretaria resistência a microrganismos do trato digestivo, pois eles já são resistentes. Ainda fica claro que o gene NPTII não é responsável pela produção de produtos tóxicos pelos organismos que o possuem ou que ingerem. Isto foi comprovado em testes realizados em roedores e seres humanos voluntários (FLAWELL et al., 1992).

O mesmo que ocorre no trato digestivo dos humanos acontece quanto ao aumento de bactérias resistentes no solo sob intenso cultivo de plantas portadoras do gene NPTII.

A Calgene chegou a um percentual menor que 0,0001 de acréscimo destas bactérias resistentes no solo. Além disso, a probabilidade de uma bactéria obter um gene de uma planta é muito baixa, comparando com o caso de recebê-lo de outra bactéria (FLAWELL et al., 1992).

Os estudos realizados até o presente momento não demonstram que os genes marcadores possuem efeitos nocivos. Além disso, eles auxiliam o processo

de transformação e podem ajudar os melhoristas a detectar de forma relativamente fácil quais as progênies que mantêm os genes da planta transformada originalmente. Contudo, cada novo marcador deve ser bastante estudado e testado para garantir a segurança que o gene NPTII e outros marcadores já comprovaram.

2.6 O sistema do gene repórter

O gene *gusA* (β -glucuronidase) é o gene repórter mais utilizados para desenvolvimento de protocolo de transformação genética.

Este sistema está sendo amplamente utilizado como um gene repórter em estudo de biologia molecular de plantas. Este gene oxida o substrato “X-glucA” (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo) e pode ser facilmente monitorado, usando uma grande variedade de glucuronídeos, fornecendo como produto um composto insolúvel de cor azul (JEFFERSON et al., 1987).

O gene *gusA* (também designado como gene *uidA*) foi originalmente isolado de *Escherichia coli* (JEFFERSON et al., 1986). Em *E.coli*, a atividade β -glucuronidase não é expressa constitutivamente e o gene *gusA* é parte de um operon (WILSON et al., 1995).

Recentemente, um novo gene repórter (*celB*), análogo ao gene *gusA*, mas que usa o substrato de menor custo, tem sido usado como marcador em estudos de ecologia de rizóbio. O substrato “Magenta-glucA” (5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo) resulta em precipitados de cor magenta (WILSON, 1995).

O sistema de fusão do gene *gus* (β -glucuronidase) é amplamente utilizado como um gene repórter em estudo de biologia molecular de plantas (JEFFERSON et al., 1987), uma vez que a atividade GUS não se encontra presente no tecido vegetal.

Além disso, o sistema tem se mostrado altamente adequado aos estudos de interação entre plantas e microorganismos, devido à ausência de atividade

endógena de GUS em muitas bactérias de importância agrícola, como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Azospirillum* e *Pseudomonas* (WILSON et al., 1996).

A ampla aceitação do GUS é devida principalmente, à simplicidade, rapidez e a versatilidade dos métodos de detecção da atividade enzimática e ao fato que a maioria das plantas não apresenta atividade endógena significativa. Além disso, o GUS não requer cofator, é bastante estável, resistente a diversos solventes e detergentes, e é ativado em uma ampla faixa de pH (5,0 a 9,0).

O GUS pode ser fusionado a sequencias tanto na região N-terminal como na extremidade C-terminal, podendo ser transportado para o cloroplasto e outras organelas (JEFFERSON & WILSON, 1991).

O uso do plasmídio TI de genes codificadores da nopalina sintetase (DEPICKER et al., 1982; BEVAN et al., 1983) e octopina sintetase (DeGREVE et al., 1982) prometeu superar problemas associados com atividade endógena por causa das opinas produzidas por estes genes que não são encontradas normalmente em células de planta.

Entretanto, estes genes repórteres não são amplamente usados porque as análises são difíceis de quantificar, e não é possível demonstrar a localização da enzima (OTTEN & SCHILPEROORT, 1978), e octopinas sintetase não podem ser tolerantes a fusões amino-terminal (JONES et al., 1985).

Os dois genes repórteres mais usados até o momento são: o gene bacteriano Cloranfenicol acetil transferase (CAT) e neomicina fosfotransferase (NPTII) que codificam enzimas com especificidades que não são normalmente encontrados nos tecidos em plantas (BEVAN et al., 1983; FRALEY et al., 1983 e HERRERA-ESTRELLA et al., 1983). Entretanto, o NPTII pode ser tolerante a fusões amino-terminal e permanecer enzimaticamente ativo tornando-se útil para estudo de transporte de organelas em plantas (VAN DEN BROECK et al., 1985).

Por este motivo, foi desenvolvido o gene de *Escherichia coli* β -glucoronidase (GUS, EC 3.2.1.31) como um sistema de gene repórter para transformação de plantas (VAN DEN BROECK et al., 1985).

III. OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente trabalho teve como objetivo otimizar os processos de transformação genética de soja via biobalística, visando aumentar a eficiência de transformação.

3.2 Específicos

- Desenvolver um sistema via embriogênese somática em embriões e cotilédones maduros de soja com diferentes hormônios vegetais;
- Utilizar a *Nicotiana benthamiana* como modelo para padronizar os parâmetros da transformação genética via biobalística;
- Aumentar os padrões de regeneração pós-transformação para recuperação de plantas geneticamente transformadas.

IV - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

As cultivares utilizadas nos experimentos foram: cultivar BR16, cedido pela Embrapa Soja – Londrina , a cultivar M-SOY6101 cedida pela Monsanto e a cultivar IAS-5 que foi cedida pelo banco de sementes do Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Produção Vegetal, UNESP- Jaboticabal.

4.2 Preparo do material vegetal

As sementes foram separadas em lotes de 100 unidades/saquinho de papel e armazenadas a 4°C. Para propagação foram semeadas quatro sementes por vaso contendo uma mistura de solo, areia e vermiculita (1:1:1) sendo adicionado adubo granulado NPK (40-20-20), com irrigação por gotejamento três vezes ao dia por 5 minutos. No 20º dia as plântulas foram estaqueadas e amarradas para condução. Após a finalização do ciclo da cultura na casa de vegetação, as vagens foram colhidas, retiradas as sementes e armazenadas, sendo mantidas em refrigeração a 4°C dentro de caixas com agentes dessecantes (sílica gel).

O material foi retirado da refrigeração aproximadamente 12 horas antes da utilização. Em fluxo laminar, as sementes foram submetidas à assepsia com imersão em etanol 70% por cinco minutos e enxaguadas com água ultra pura autoclavada. Posteriormente, as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio a 1% por 15 minutos, sendo lavadas após este período por mais três vezes com água ultra pura autoclavada.

Antes da utilização, as sementes foram mantidas em repouso em um frasco vedado com filme plástico contendo 300 ml de água ultra pura autoclavada por aproximadamente 16 horas.

4.2.1 Indução de embriogênese somática em embriões

Inicialmente, embriões da cultivar IAS-5 foram submetidos a testes para formação de calos embriogênicos na presença do hormônio 2,4-D-diclorofenoxiacético (2,4-D) nas concentrações de 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mg L⁻¹.

O preparo e assepsia do material decorreram como descritos no item 4.2. Em fluxo laminar, os embriões foram separados dos cotilédones com auxílio de pinça e bisturi e mantidos em placas de Petri com água ultra pura autoclavada. Posteriormente, os embriões foram secos e acomodado em placa de Petri

contendo meio de cultura semi-sólido Murashige & Skoog (MS) (1962) (sais MS, sacarose 30 g.L⁻¹, phytigel 6 mg.L⁻¹ e pH 5,7), suplementado com hormônios 2,4D que foi previamente filtrado com filtro com membranas de 0.22 µM, diâmetro de 33 mm e adicionado em meio de cultura, após o processo de autoclavagem à 121° C por 15 minutos.

4.2.2 Indução de embriogênese somática em cotilédones

As sementes das três cultivares foram submetidas à assepsia como descrito no item 4.2. Em fluxo laminar, os cotilédones foram separados dos embriões com auxílio de pinça e bisturi. Posteriormente, os cotilédones foram secos e acomodados em placa de Petri contendo meio de cultura semi-sólido Murashige & Skoog (1962) (sais MS, sacarose 30 g/L, phytigel 6 mg/L, suplementado com 10 ml de água de coco e pH 5,7), e adicionado diferentes hormônios que foram previamente filtrados com filtro com membrana 0.22 µM, diâmetro de 33 mm e adicionados em meio de cultura após o processo de autoclavagem à 121° C por 15 minutos.

Os cotilédones foram dispostos sobre o meio de cultura, mantendo a parte abaxial orientada para cima. Para os testes de indução de embriões somáticos foi utilizado o tratamento A (MI-0) – sais MS, sacarose 30 g/L, phytigel 6 mg/L e pH 5,7 como controle. Os demais tratamentos foram compostos de MI-0 mais os seguintes hormônios: Tratamento B (MI-1) ácido-naftalenacético (ANA) 10 mg/L; tratamento C (MI-2) - 2,4-D 5 mg/L; tratamento D (MI-3) 2-isopenteniladenina (2ip) 5 mg/L ; tratamento E (MI-4) - ANA 10 mg/L, 2,4-D 5mg/L, 2ip 5 mg/L . As placas contendo os cotilédones foram mantidas em caixas fechadas na ausência completa de luz sendo mantidas em sala de crescimento com temperatura de 26° C e umidade de aproximadamente 60% por um período de 15 dias.

4.3 Regeneração

4.3.1 Regeneração dos embriões pós co-cultivo com diferentes concentrações de BAP

Para o teste de regeneração dos embriões pós-transformação foi acrescentado ao meio de cultura semi-sólido Luria Bertani (LB) (peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 5 g/L, agar 6 g/L e pH 7,0) diferentes concentrações de 6-benzylaminopurine (BAP) na fase de co-cultivo nas respectivas concentrações 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mg/L.

As sementes foram submetidas à assepsia como descrito no item 4.2. Os embriões foram isolados e acomodados em placas de Petri contendo meio semi-sólido LB conjuntamente com as referidas concentrações de BAP. Os embriões foram acomodados em meio de cultura com a região meristemática voltada para baixo, com o meio recobrimdo toda sua extensão.

Após três dias de co-cultivo, os embriões foram repicados para recipientes plásticos previamente autoclavados contendo meio MS (sais MS, 30 g/L de sacarose; 1 ml/L vitamina White (Ácido nicotínico 100 mg/L, Piridoxina 100 mg/L, Tiamina 20 mg/L) 8 g/L de phytigel, pH 5,7 , mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 26°C, iluminação de 20 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e com fotofase de 16 horas/luz.

4.3.2 Regeneração dos calos oriundos dos cotilédones de soja

Para regeneração dos calos, em cada tratamento, foi acrescentado ao meio de cultura diversas concentrações de BAP (0 mg/L; 0,5 mg/L; 1mg/L e 2 mg/L) somado a 0,5 mg/L de ácido-naftalenacético (ANA) e 10 ml/L de água de coco. Após o estágio de escuro por 15 dias, posteriormente a formação de calos, o

material foi repicado para copos plásticos previamente autoclavados contendo meio MS acrescido de BAP e ANA, respectivamente e acomodados em sala de crescimento para regeneração com temperatura controlada de 26°C, iluminação de 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e com fotofase de 16 horas/luz.

4.4 Curva de Morte dos embriões

Para realizar a curva de morte com a canamicina foram utilizados embriões obtidos das 3 cultivares: IAS-5, BR16 e M-SOY6101, todas com as referidas concentrações de 0, 50, 100, 200, 300 e 400 mg/L. Os embriões foram acomodados em recipientes plásticos contendo meio de cultura semi-sólido MS (sais MS, sacarose 30 g/L, phytigel 6 mg/L, pH 5,7) conjuntamente com as respectivas concentrações de canamicina. Estes embriões foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 26°C, iluminação de 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e com fotofase de 16 horas/luz.

4.5 Transformação genética de *Nicotiana benthamiana*

4.5.1 Obtenção das plantas

A transformação genética de *Nicotiana benthamiana* via biobalística, foi realizada com objetivo de padronizar alguns parâmetros tais como a concentração de tungstênio e os parâmetros do bombardeador, sendo repassados posteriormente para a transformação genética de soja.

Sementes de *N. benthamiana* foram cedidas pelo Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, UNESP/JABOTICABAL.

As sementes foram armazenadas em tubos de 1,5 ml e acondicionadas em

geladeira a 4°C. Em fluxo laminar, foi realizada a assepsia das sementes sendo imersas em etanol 70% por 3 minutos, posteriormente lavadas 1 vez com água ultra pura estéril. Após, as sementes foram submetidas à assepsia com hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos, sendo lavadas após este período por 3 vezes com água ultra pura estéril. Em seguida, com auxílio de uma pinça de ponta fina as sementes foram semeadas em copos plásticos previamente autoclavados contendo meio MS (sais MS, inositol 100 mg/L, sacarose 30 g/L, vitamina White 1 ml/L, Agar 6 g/L e pH 5,7). Os copos contendo as sementes foram mantidos em sala de crescimento para o desenvolvimento das plantas com temperatura de 26 °C e fotofase de 16 horas/luz e iluminação de 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ por aproximadamente 2 meses.

4.5.2 Preparo do material vegetal

Em fluxo laminar, folhas de *N. benthamiana* foram coletadas (após, aproximadamente, 2 meses em sala de crescimento) e acomodadas em placa de Petri com meio MS (sais MS, inositol 100 mg/L, sacarose 30 g/L, agar 6 g/L e pH 5,7) com a parte abaxial voltada para cima. Logo após, foi realizado o procedimento de transformação via biobalística. Posteriormente ao processo, as placas foram vedadas com parafilme e submetidas ao co-cultivo por 1 dia. Após co-cultivo, as folhas foram submetidas ao teste histoquímico de *gusA* para avaliação transiente da transformação e avaliar os parâmetros testados.

4.5.3 Obtenção do DNA para bombardeamento

Para a transformação genética via biobalística utilizou-se o DNA plasmidial que consiste do vetor de expressão pCAMBIA 2301 (CAMBIA, Brisbane, Queensland, Australia) (Figura 1) que foi extraído de células de *E.coli* com auxílio

do Kit da Promega (wizard ® plus SV minipreps DNA purification system), conforme descrito pelo fabricante. Este vetor possui 11.633 bp sendo muito utilizado para detecção de células transformadas contendo o gene repórter GUS que está sob a regulação do promotor constitutivo 35SCaMV. Em adição, também possui o gene de seleção NPTII que confere resistência a canamicina. A qualidade do DNA extraído foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 1X (Tris base 1M; ácido bórico anidro 0,9M; Na₂EDTA2H₂O 10 mM; água deionizada, pH 8,3), corado com brometo de etídeo (0,1 µg/ml) e visualizado em fotodocumentador gel Doc. A concentração e a pureza das amostras obtidas foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific).

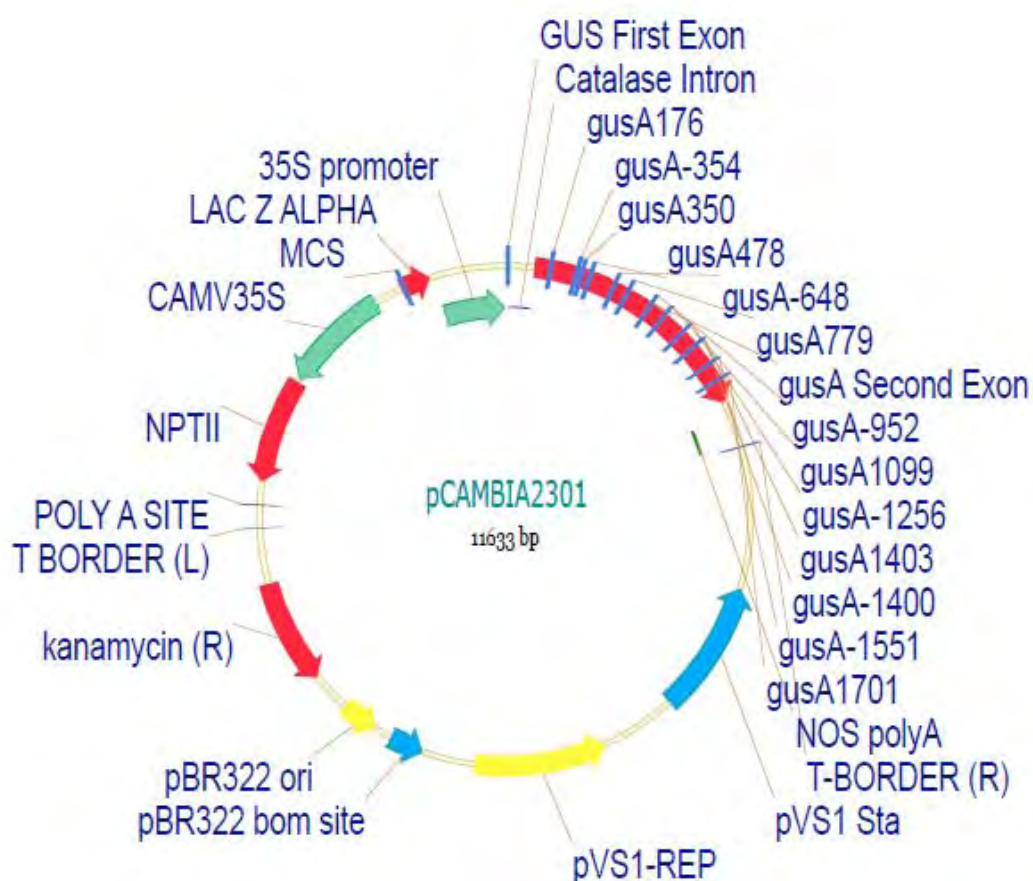


Figura 1. Mapa do vetor pCAMBIA 2301 utilizado na transformação de tabaco e soja.

4.5.4 Preparo do tungstênio (TG)

Foram realizados dois métodos de preparo de tungstênio (TG). A primeira preparação do TG (TGI) foi realizada na concentração de 60 mg/mL, ressuspendido em glicerol 50%. Pesou-se 60 mg de tungstênio, adicionou-se 1 ml de etanol 70%, em seguida misturou-se vigorosamente com auxílio do vortex por 15 minutos. Após a agitação, centrifugou-se a 3000xg por 5 minutos, sendo descartado o sobrenadante, adicionou-se 1 ml de água ultra pura estéril, agitando com auxílio do vortex vigorosamente por 15 minutos. Centrifugou-se novamente a 3000xg por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante, repetindo o passo anterior por mais duas vezes. Após a última lavagem, descartou-se o sobrenadante e o tungstênio foi ressuspendido em 1 ml de Glicerol 50%.

A segunda preparação do TG (TGII) foi realizada na concentração de 25 mg/0,5 mL, sendo ressuspendido em água ultra pura estéril. Pesou-se 25 mg de tungstênio, adicionou-se 500 µL de etanol absoluto, gelado, homogeneizando vigorosamente com auxílio do vortex por 3 vezes de 2 minutos cada. Inoculou-se em banho-maria a 95°C durante 1 hora. Posteriormente, foi centrifugado a 8000xg por 2 minutos, descartou-se cuidadosamente o sobrenadante sendo lavado por 3 vezes com água estéril gelada. Após terceira lavagem, o tungstênio foi ressuspendido em 500 µL de água ultra pura gelada.

4.5.5 Transformação genética de *Nicotiana benthamiana*

Para o bombardeamento de *N. benthamiana* foi utilizado tungstênio com o preparo das duas metodologias, TGI e TGII. Para cada preparação de micropartículas foi adicionado o equivalente a 6,0 µg de DNA, 110 µL de CaCl₂ 2,5 M, sendo a mistura homogeneizada suavemente. Em seguida acrescentou-se 40 µL de espermidina 0,1 M sendo novamente homogeneizado. A mistura foi incubada a temperatura ambiente sob a agitação lenta durante aproximadamente

25 minutos. Após centrifugação em velocidade máxima por 10 segundos, foi adicionado ao pellet 150 µL de etanol absoluto, gelado sendo vigorosamente agitado e centrifugado em velocidade máxima por 10 segundos. Adicionou-se 25 µL de etanol absoluto e homogeneizou-se vigorosamente, sendo sonificado com a frequência de 40 KHz e potência de 100 W durante 3 segundos. Alíquotas em diferentes concentrações de tungstênio dos dois preparos (TGI e TGII) foram distribuídas na região central de cada membrana carreadora, previamente posicionada no suporte de membrana. Os discos contendo as micropartículas cobertas com DNA foram colocados em uma placa de Petri com sílica e alocadas dentro de um dessecador por 10 minutos. Em seguida, foi realizado o bombardeamento através de um acelerador de partículas com pressão de gás hélio de aproximadamente 1500 psi com aparelho PDS-1000 (Bio-Rad).

Após um dia de co-cultivo na ausência de luz e temperatura controlada de 26°C, o material foi submetido ao teste histoquímico de GUS para verificar a expressão gênica transiente (pontos azuis) e avaliar os parâmetros testados.

4.6 Transformação genética de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

4.6.1 Transformação de embriões maduros de soja

Para transformação genética de embrião o material vegetal foi preparado como descrito no item 4.2. Como fonte inicial do material para transformação foram utilizadas sementes maduras das cultivares IAS-5, BR16 e M-SOY6101.

Em fluxo laminar, após a retirada dos embriões das sementes maduras, estes foram mantidos em placa de Petri contendo 30 mL de água estéril. Os primórdios foliares foram retirados com auxílio de bisturi e lupa para a exposição da região meristemática do embrião (Figura 2).

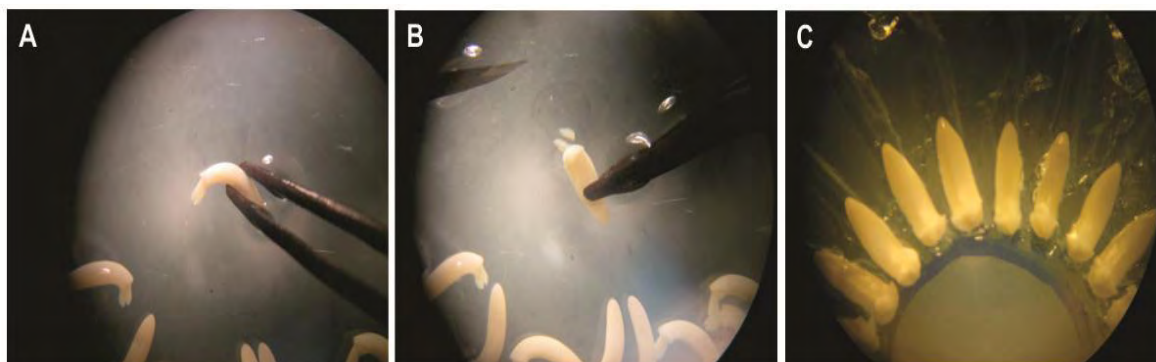


Figura 2. Preparo dos embriões de soja a para bombardeamento. **A:** Embrião excisado de semente madura de soja; **B:** Retirada dos primórdios foliares do embrião; **C:** Posicionamento do embrião com o ápice meristemático voltado para cima (pré-transformação).

Posteriormente, os embriões foram secos em papel filtro estéril sendo acomodados em sulcos no meio de cultura em placas de Petri contendo meio de bombardeamento (sais MS, 30 g/L de sacarose, 8 g/L de phytigel, pH 5,7). Os sulcos eram dispostos em forma de um círculo de 16 mm de diâmetro centralizado na placa, tendo a região meristemática apical direcionada para cima e para o centro. A seguir, o DNA foi preparado seguindo o protocolo descrito no item 4.5.5. Com base nos resultados de *N. Benthamiana*, o bombardeamento foi realizado com o preparo de tungstênio TGI com concentração final de 25 mg/μL do tungstênio por membrana carreadora.

Após o processo de transformação, os embriões foram transferidos para LB semi-sólido (peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 5 g/L, Agar 7 g/L e pH 7,0) sendo acomodados com a região meristemática voltada para baixo, com toda a extensão do corpo sendo recoberto com o meio de cultura. Após 1 dia de co-cultivo, os embriões foram repicados para recipientes contendo meio semi-sólido de regeneração (sais MS, sacarose 30 g/L, vitamina White 1 ml/L, phytigel 6 g/L, phytigel 6g/L e pH 5,7), adicionando canamicina nas respectivas concentrações para cada cultivar testada.

O material permaneceu em sala de crescimento com temperatura

controlada de 26°C, iluminação de 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e com fotofase de 16 horas/luz. Após desenvolvimento das plântulas, amostras foram retiradas e o teste histoquímico de GUS realizado.

4.6.2 Transformação de calos oriundos dos cotilédones

Para a transformação genética de calos, a assepsia das sementes decorreu-se com descrito no item 4.2.2. Para a avaliação de embriogênese somática em cotilédones, foram utilizadas três cultivares: IAS-5, BR16 e M-SOY6101.

Após a indução de calos por um período médio de 15 dias na ausência completa de luz, os calos foram acomodados no centro da placa de Petri na forma circular com diâmetro de 16 mm contendo meio de bombardeamento (sais MS, 30 g/L de sacarose, 8 g/L de phytigel, pH 5,7) (Figura 3).

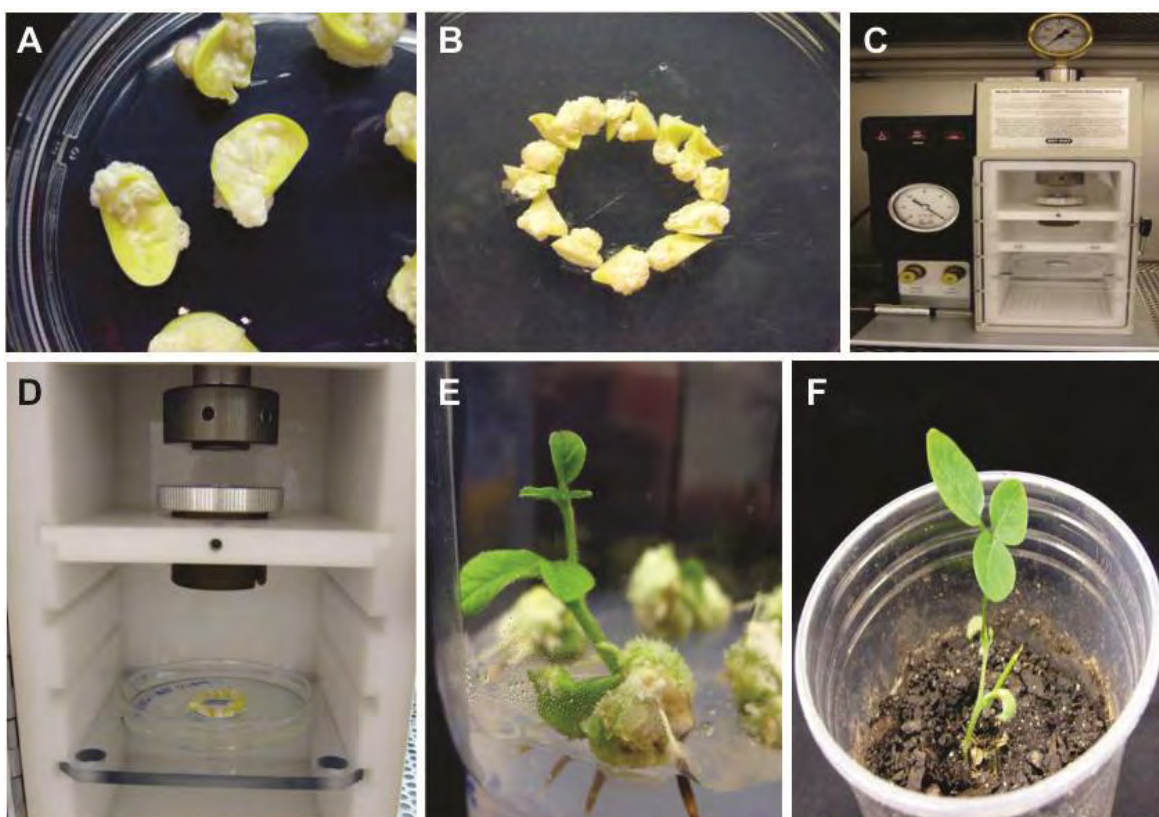


Figura 3. Processo de bombardeamento para calos. **A:** Fase de indução de calos (escuro) em cotilédones; **B:** Preparo do material para bombardeamento após 15 dias de indução de calos; **C:** Aparelho PDS-1000 Biorad; **D:** Material vegetal apto para bombardeamento; **E:** Fase de regeneração em meio seletivo com canamicina; **F:** Fase de desenvolvimento da planta (planta climatizada).

Posteriormente, o bombardeamento foi realizado como descrito no item 4.5.5, com o preparo de tungstênio TGI na concentração final de 25 mg/ μ L de tungstênio por membrana carreadora. Após o bombardeamento, os calos permaneceram na placa de Petri contendo o meio de bombardeamento por um período de 1 dia em co-cultivo com temperatura controlada de 26 C° na ausência completa de luz.

Decorrendo o período de descanso (co-cultivo), o material foi repicado para copos contendo meio semi-sólido de regeneração (saís MS, sacarose 30 g/L, vitamina White 1 ml/L, phytigel 6 g/L e pH 5,7) adicionando canamicina nas respectivas concentrações para cada cultivar testada, permanecendo em sala de

crescimento com temperatura de 26°C, iluminação de 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotofase de 16 horas/luz. Após desenvolvimento das plântulas, amostras de folhas foram retiradas para o teste histoquímico de GUS.

4.7 Análise do material vegetal - Ensaio histoquímico (GUS)

Após um período em fase de regeneração as plântulas obtidas a partir da transformação de embriões ou calos, foram avaliadas pelo teste histoquímico de GUS de acordo com o método de JEFFERSON et al. (1987).

O teste foi realizado aproximadamente 15 dias após a transformação para embriões e 21 dias para calos, ou seja, quando as folhas já apresentavam um estágio bem desenvolvido para a realização do teste.

Após este período as folhas desenvolvidas foram excisadas e incubadas em solução X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid) – (Fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4.\text{H}_2\text{O}$) 100 mM, Ferro Cianeto potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6.3\text{H}_2\text{O}$) 0,5 mM, EDTA ($\text{Na}_2\text{EDTA}.2\text{H}_2\text{O}$) 10 mM, Triton X-100 0,1%, X-Gluc (50 mg/ml) 1mM, pH 7,0) a temperatura de 37 °C, durante 16 horas. O tecido que foi transformado com o gene GUS, ou seja, o *uidA* reagiu com o substrato X-gluc, e resultou na formação de um produto de cor azulada, indicando reação positiva e, conseqüentemente, a ocorrência da transformação.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Embriogênese somática e regeneração em embriões

Diferentes concentrações de hormônios vegetais foram testadas com intuito de aumentar o número de células meristemáticas na região apical do embrião. O

teste possuía o objetivo de diminuir o longo tempo de indução decorrente em cotilédones e promover a embriogênese em um tecido mais direcionado (meristema apical). No entanto, os resultados não foram favoráveis para esta metodologia.

Notou-se em 100% dos embriões testados que não houve desenvolvimento de calos embriogênicos na região meristemática, somente calos friáveis, ou seja, massa desuniforme e coloração transparente por toda a extensão do corpo do embrião (Figura 4).

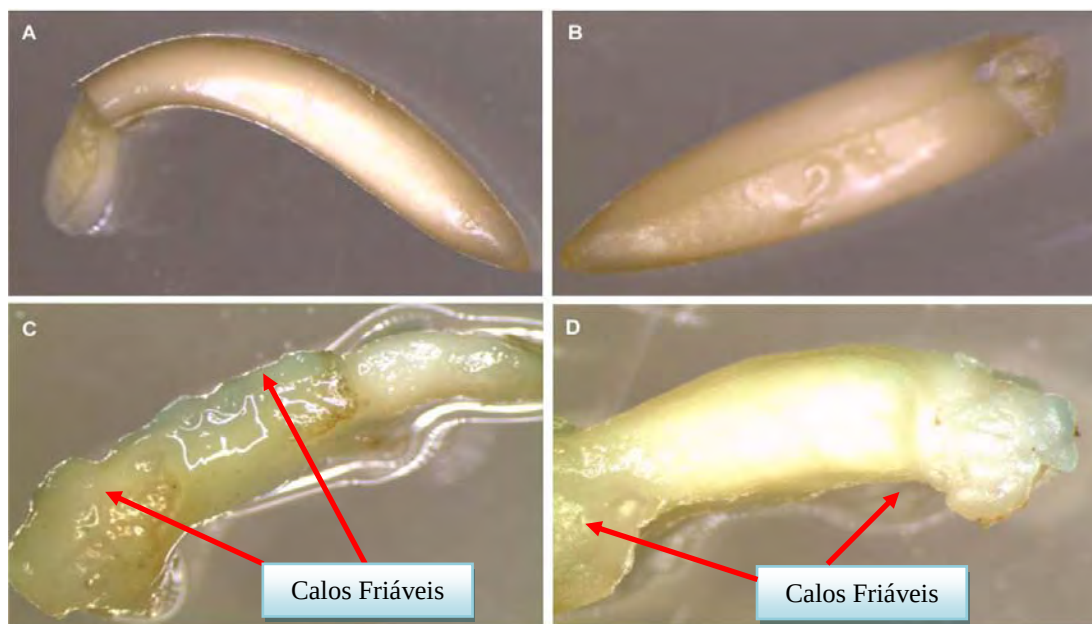


Figura 4. **A:** Embrião retirado do cotilédone; **B:** Embrião sem os primórdios foliares; **C e D:** Embrião apresentando calos friáveis após indução com o hormônio 2,4D em todas as concentrações testadas.

Inicialmente, foram testadas as concentrações de 0 a 6 mg/L com o hormônio 2,4D. Não foi observada embriogênese somática no meristema apical do embrião e consequentemente nenhuma plântula foi regenerada.

Esta ocorrência pode se explicar pelo fato de que os hormônios naturais atuam sobre o crescimento ou diferenciação do tecido vegetal, entretanto, seus

efeitos dependem além da concentração disponível no meio, também da quantidade absorvida no tecido vegetal. Além disso, o efeito das interações pode ocorrer diferenciando o resultado final.

Este fato deve ser levado em consideração quando se compara o comportamento da cultivar frente ao hormônio testado, sugerindo que a concentração hormonal endógena seja diferente, pois podem ocorrer interações entre eles que determinam efeitos aditivos ou antagônicos, dependendo de suas concentrações. Na fase de indução e iniciação, o processo é regulado pela relação quantitativa entre os níveis de auxina e citocinina, como também pela participação de outras substâncias (GASPAR & HOFINGER, 1988; ONO & RODRIGUES, 1996 e ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Não foi encontrada nenhuma referência na literatura que relatasse sobre embriogênese somática diretamente em embrião de soja. Foram encontrados trabalhos sobre embriogênese somática em tecidos como cotilédones, folhas, caules, entre outras partes da planta.

5.2 Embriogênese somática e regeneração dos cotilédones

Três cultivares foram testadas para a indução de calos em cotilédones, IAS-5, MSOY-6101 e BR16. O desenvolvimento de calos a partir de cotilédones foi observado somente para a cultivar IAS-5, do total de três genótipos avaliados.

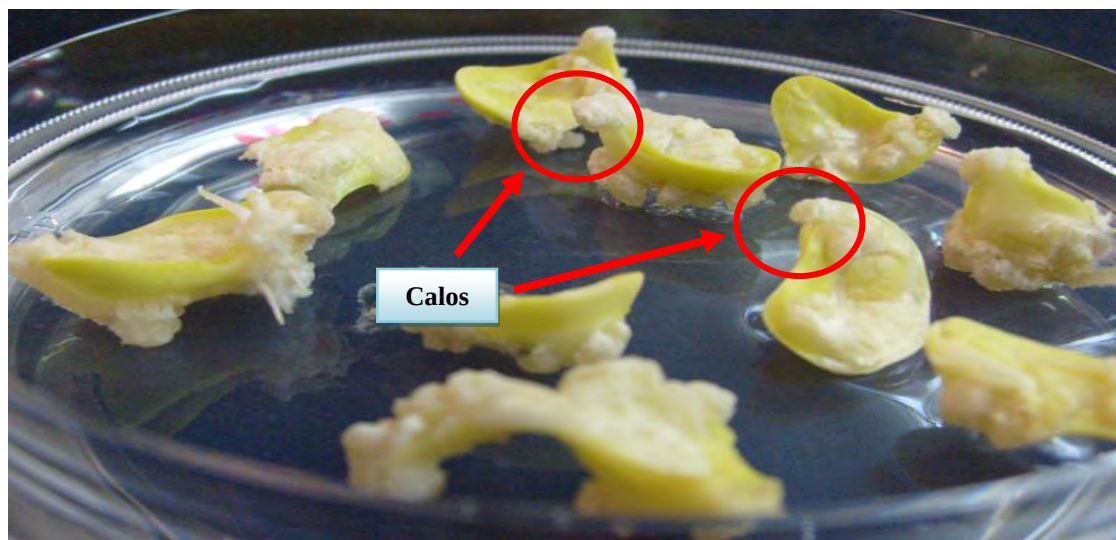
Foram testados três hormônios: 2,4D, 2ip, ANA e todos conjuntamente. Somente o meio de cultura MS suplementado com 2,4D (5 mg/L) - (tratamento C) foi observado uma desdiferenciação celular (calos) em aproximadamente 60% dos cotilédones, ressaltando que no tratamento A (controle) não foi observado o surgimento de calos (Tabela 1).

Tabela 1. Indução de calos para cultivar IAS-5 com diferentes hormônios.

Tratamento ^a	Número de placas	Total de cotilédones	Formação de calos (%)
A - MI-0	5	75	0
B - MI-1	5	75	0
C - MI-2	5	75	60%
D - MI-3	5	75	0
E - MI-4	5	75	0

^aTratamento: **MI-0**: Controle; **MI-1**: 10mg/L ANA; **MI-2**: 5mg/L 2,4D; **MI-3**: 5mg/L 2ip; **MI-4**: 5 mg/L 2,4D + 5mg/L 2ip + 10mg/L ANA.

Este resultado não foi observado nas outras duas cultivares (BR16 e MSOY-6101). Os calos responsivos eram formados na região cotiledonar, local onde o embrião era disposto antes de sua retirada (Figura 5). Os calos formados não eram friáveis e apresentavam desdiferenciação celular favorável a regeneração, ou seja, apresentavam formato regular e consistente, diferentemente dos calos formados nos embriões oriundos de semente madura de soja.

**Figura 5.** Calos formados na região onde os embriões eram dispostos antes da retirada.

Resultado similar foi descrito por BRAR et al. (1997), que conseguiram induzir a formação de calos em ápices caulinares de feijão de corda (*V. unguiculata*) cultivados na presença do 2,4D, combinado ou não com outros reguladores.

Na indução de calos com os hormônios 2ip (5 mg/L), ANA (10 mg/L) e na combinação de (ANA 10 mg/L + 2ip 5 mg/L + 2,4D 5 mg/L), foi notado que os cotilédones apresentavam desenvolvimento desordenado de raízes (rizogênese) no período em que o material se manteve no escuro (Figura 6).



Figura 6. Cotilédones de soja em fase de indução de calos. **A:** Indução de calos com 5 mg.L⁻¹ de 2ip; **B:** Indução de calos com 10 mg.L⁻¹ de ANA; **C:** Controle (sem adição de hormônio).

Segundo KULESCHA (1988), o nível de auxina endógena está totalmente relacionado com este fato. O alto nível de auxinas endógenas pode ocasionar a iniciação de raízes adventícias primordiais.

Existe uma relação intrínseca entre os níveis de auxina endógena e a habilidade para iniciar raízes. Em geral, após aplicação da auxina sintética, ocorre um aumento imediato no nível endógeno de auxina natural e, conseqüentemente, há o início da formação de raízes (GASPAR & HOFINGER, 1988). A ação das auxinas ocorre, inicialmente, em nível celular nos meristemas primário e secundário, estimulando a divisão celular e o subsequente alongamento das células, sendo que, essa ação inicial das auxinas culmina com a formação das raízes (FORD et al., 2001).

Para as outras duas cultivares (BR16 e MSOY-6101) os resultados não foram satisfatórios quanto à formação de calos em nenhuma das condições hormonais testadas.

Devido a esta constatação, podemos entender tal fato ocorrido em todos os tratamentos com doses altas de auxinas (ANA 10 mg/L, 2ip 5 mg/L, 2,4D 5 mg/L e a somatória destes (ANA 10 mg/L + 2ip 5 mg/L + 2,4D 5 mg/L), juntamente com água de 10 ml/L de coco que se caracteriza como uma rica fonte de auxina natural, resultou em alta porcentagem de formação de raiz, independente do tratamento aplicado. Tratamentos com meios de cultivo contendo maiores concentrações de citocininas e menores de auxinas poderiam ter resultados mais satisfatórios quanto à regeneração (FLICK et al.,1983).

A partir dos resultados observados para estas duas cultivares, somente a cultivar IAS-5 continuou sendo utilizada para indução de calos.

5.2.1 Regeneração dos cotilédones

Os tratamentos iniciais (indução) com 2ip, ANA e todos os hormônios conjuntamente, não apresentaram formação de calos e posteriormente regeneração. Desta forma, os cotilédones induzidos inicialmente com os estes hormônios não obtiveram resultado satisfatório quanto ao desenvolvimento de calos. Para a cultivar IAS-5, a única cultivar a responder ao tratamento para indução de calos, o melhores resultados para regeneração foram os tratamentos C-MR1 e C-MR2, ressaltando que estes resultados foram obtidos somente quando o hormônio inicial (indução de calos) foi o 2,4D suplementado com 10 ml/L de água de coco.

Diante dos tratamentos para regeneração, o conjunto de hormônios que melhor respondeu foi 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L ANA , apresentando 27,77% de regeneração do tecido, seguindo de 0 BAP + 0,5 mg/L ANA apresentando 11,11%, sendo estes os únicos tratamentos a apresentarem regeneração (Figura 7).

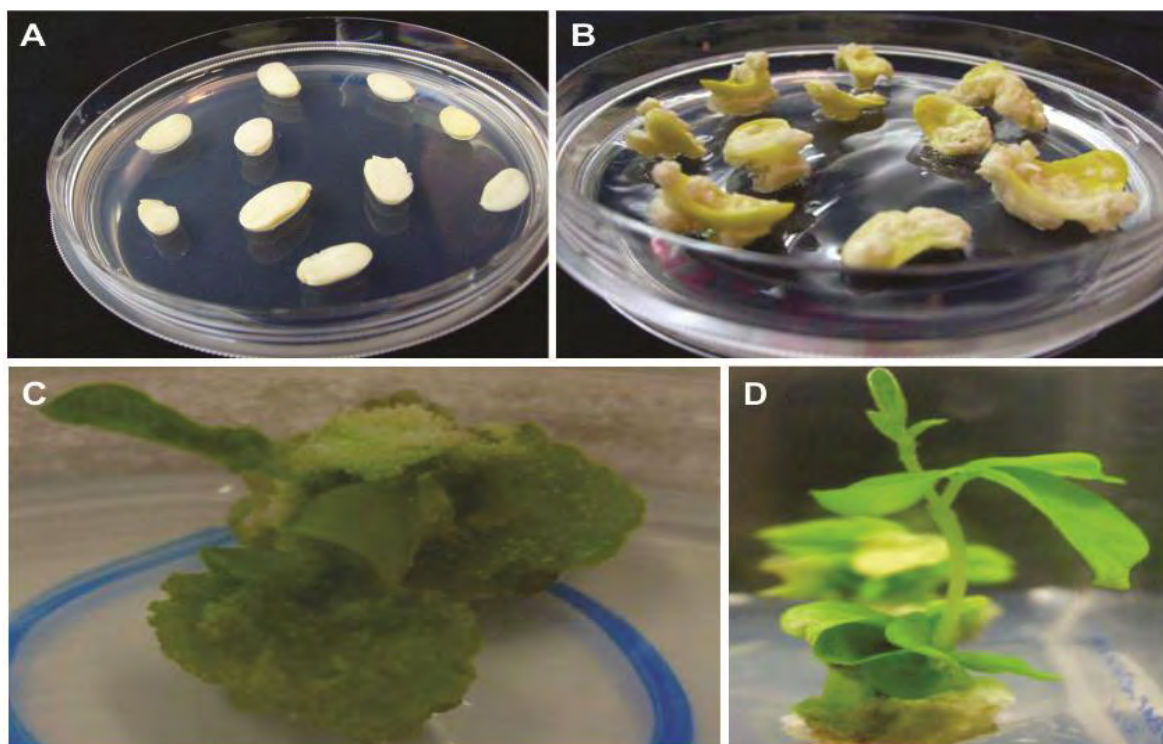


Figura 7. **A:** Cotilédones da cultivar de soja IAS-5 (escuro) em meio MS suplementado com $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4D (T0); **B:** Cotilédones de soja (escuro) em meio MS suplementado com $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4D (15 dias); **C:** Regeneração de calos (luz) em meio MS suplementado com $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BAP e $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ANA; **D:** Plântula de soja em desenvolvimento (fase regeneração).

CHO et al. (2002), avaliando o efeito da aplicação de BAP no crescimento de sementes de soja, observaram que 1 mmol/L de BAP incrementou a massa seca das sementes. O efeito estimulatório de BAP sobre a massa seca das sementes de soja ocorreu sempre nas concentrações acima de 10^{-6} mol/L . Possivelmente, a citocinina atue no estímulo da atividade do dreno das sementes, no entanto isso parece depender da concentração de BAP presente nos órgãos, como também foi observado por BARRAT (1986) em ervilha. Em um sistema artificial de cultivo de ervilhas, este autor verificou também, que 10^{-4} mol/L de BAP foi a concentração que proporcionou o maior crescimento das sementes.

Os resultados foram avaliados pelo teste T, $P \leq 0,05$, e as porcentagens de regeneração seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tabela 2).

Tabela 2. Regeneração de plantas (cultivar IAS-5).

Tratamento	Meio de indução de calos	Meio de regeneração*	Regeneração (%)
A	MI-0 (controle)	MR1	0
		MR2	0
		MR3	0
		MR4	0
B	MI-1 (10 mg/L ANA)	MR1	0
		MR2	0
		MR3	0
		MR4	0
C	MI-2 (5 mg/L 2,4D)	MR1	11,11(± 1) a
		MR2	27,77(± 1) a
		MR3	0
		MR4	0
D	MI-3 (5 mg/L 2ip)	MR1	0
		MR2	0
		MR3	0
		MR4	0
E	MI-4 (todos conjuntamente)	MR1	0
		MR2	0
		MR3	0
		MR4	0

***Meios de regeneração:** **MR1:** MS + 0 mg/L BAP + 0,5 mg/L ANA; **MR2:** MS + 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L ANA; **MR3:** MS + 1,0 mg/L BAP + 0,5 mg/L ANA; **MR4:** MS + 2,0 mg/L BAP + 0,5 mg/L ANA.

Não foi aplicado teste estatístico para avaliação entre tratamentos, pois, não houve necessidade de avaliar resultados de regeneração vs. sem regeneração, sendo interessante avaliar somente respostas onde foi detectada brotação dentro do tratamento.

Observou-se que, nesta fase de diferenciação celular vegetativa (regeneração), a disposição do cotilédone foi muito importante, sendo a região abaxial sempre disposta para cima no meio de cultura.

Provavelmente, esta orientação exerce um papel fundamental na absorção de hormônios e nutrientes e diferenciação do tecido vegetal. Além disso, esta orientação é extremamente necessária para posterior transformação e/ou regeneração, uma vez que, as células possivelmente transformadas, respeitam a condição de tropismo, buscando o seu desenvolvimento na orientação da luz.

Nas cultivares BR16 e M-SOY6101, não foi possível observar indução de calos nem tampouco regeneração nos tratamentos, entretanto, foi observada uma quantidade de rizogênese de 100% dos cotilédones avaliados ao longo de todo período em que o experimento permaneceu no escuro. FLICK et al. (1983) afirmam que as auxinas, isoladamente ou em combinação com uma baixa concentração de citocinina, são importantes na indução dos primórdios radiculares e GEORGE & SHERRINGTON (1984) apontam que a rizogênese é decorrente do tratamento com altas concentrações de auxina em relação à de citocinina, em cultivo *in vitro*.

Talvez, se o balanço hormonal presente no meio de cultura estivesse em uma concentração maior de citocinina e menor de auxina o resultado poderia ser satisfatório. Estes fatos, estão de acordo com os resultados apresentados por LEGRAND et al. (1984), utilizando explantes de *Theobroma cacao*. Os autores verificaram que a calogênese e rizogênese eram originadas por ANA ou água de coco, de acordo com o tipo de explante. Já PENCE et al. (1980), em experimentos com embriões zigóticos imaturos de cacaueiro, concluíram que a combinação de auxinas (ANA, AIA e 2,4D) e água de coco estimularam a embriogênese, porém a

adição de cada um dos hormônios separadamente apresentou baixo efeito em tal processo.

5.3 Regeneração dos embriões pós co-cultivo com diferentes concentrações de BAP

O teste de BAP no co-cultivo foi realizado com objetivo de melhorar a regeneração no intuito de unificar as plantas na fase de regeneração pós-transformação. A concentração utilizada inicialmente de 5 mg/L de BAP, estabelecida em alguns protocolos de transformação com embriões, favorecia o aparecimento de multibrotações no ápice dos embriões (Figura 8), dificultando a análise das plantas individualmente.



Figura 8. **A:** Embrião de soja da cultivar IAS-5 passado um dia em de co-cultivo com 5 mg/L de BAP; **B:** Embrião de soja da cultivar IAS-5 passado um dia em co-cultivo sem BAP.

O BAP é uma potente citocinina promotora de brotação, o que parece ter grande influência no crescimento ou diferenciação das plantas. Nos testes com hormônios vegetais, tais como o BAP, o efeito final desejado vai depender não só da concentração que está sendo aplicada, mas também da capacidade que cada

tecido possui de absorvê-lo. Entretanto, o efeito destas interações pode causar diferença no resultado final esperado, como por exemplo, ter em único embrião muitas brotações ou somente uma brotação por embrião. Um ponto importante a ser lembrado é que a concentração hormonal endógena de cada cultivar em particular responde diferencialmente em cada condição testada.

Observou-se no teste do co-cultivo com BAP que em todas as concentrações utilizadas (0 a 5 mg/L), quanto maior a concentração em meio de cultura, maior o número de brotações por embriões. Contudo, acredita-se que quanto maior a quantidade de brotações no ápice dos embriões maiores as chances de detectar uma planta positiva, por outro lado, uma grande quantidade de brotações, maior dificuldade de unificar e identificar cada uma delas.

5.4 Curva de morte em embriões

Após avaliação do desenvolvimento das plantas em cada tratamento foram definidas as seguintes concentrações de canamicina para cada uma das cultivares: IAS-5 200 mg/L, M-SOY6101 100 mg/L e BR16 200 mg/L. A dose foi definida diante a sensibilidade apresentada para cada cultivar quanto a regeneração, sumarizando nestas condições um total de 50% de regeneração para cultivares IAS-5 e BR16 e aproximadamente 20% para a cultivar MSOY-6101.

O NPTII (gene responsável pela codificação da neomicina fosfotranferase II) já foi utilizado como marcador de seleção em diversas espécies vegetais, pertencentes a diferentes famílias (RITCHIE & HODGES, 1993).

A enzima NPTII atua transferindo o grupamento γ fosfato do ATP para grupo 3-hidroxil da porção amino-hexose dos antibióticos aminoglicosilados, como canamicina, neomicina e paromomicina, que são assim detoxificados por fosforilação (BENVENISTE & DAVIES, 1973). Quando ativos estes antibióticos inibem a síntese de proteínas nas células eucariotas, ligando-se às subunidades

30S e 50S dos ribossomos, e impedindo, conseqüentemente, o início da tradução (DAVIS, 1988).

Na célula vegetal, esses antibióticos interferem da mesma maneira na síntese protéica em mitocôndrias e cloroplastos, que possuem ribossomos semelhantes aos das bactérias, resultando na clorose e inibição do crescimento do tecido vegetal (WEIDE et al., 1989).

Assim, plantas transgênicas que expressam o NPTII podem tolerar dosagens tóxicas dos antibióticos aminoglicosilados que, em plantas não transformadas são letais. Fato este observado com o aumento gradativo da concentração de canamicina no meio de cultura em plantas não transformadas. Supõe-se que a canamicina seja transportada através do tecido vegetal, a curta distância, pelos espaços intracelulares (WEIDE et al., 1989), facilitando a seleção do tecido vegetal transformado não anulando a hipótese de haver escapes. Os resultados da curva de morte com canamicina para cada cultivar estão descritos na Figura 9.

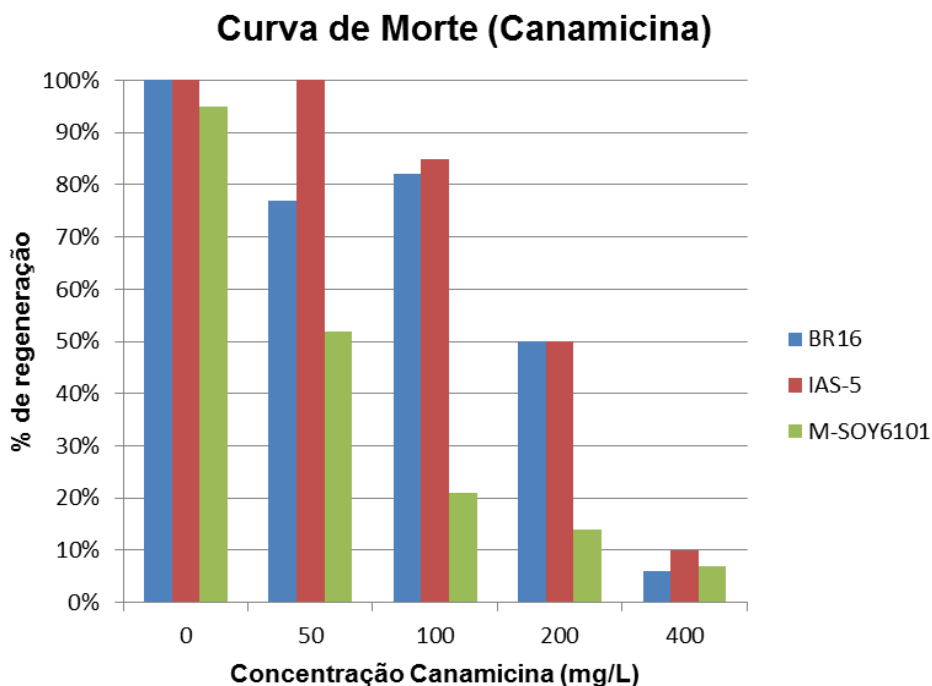


Figura 9. Curva de morte com canamicina nas cultivares BR16, IAS-5 e M-SOY6101.

Um dos problemas com a atividade de antibióticos em cultura de tecidos reside na ausência de absorção pelos órgãos vegetais (ROMEIRO, 1995). Para um antibiótico ser considerado um bom agente seletivo, ele deveria apresentar características como, por exemplo: estabilidade frente às variações de pH, ser sistêmico, não apresentar efeitos colaterais (afetar à germinação, síntese de clorofila, etc.), ser solúvel em água e não ser afetados por íons, ânions ou cátions (FALKINER, 1990).

5.5 Preparo do tungstênio (TG)

5.5.1 Avaliação dos diferentes protocolos

Conforme verificado na Tabela 3, o preparo TGI na concentração de tungstênio de 24 mg/μL apresentou um maior número de pontos do que TGII na concentração de 20 mg/μL.

Tabela 3. Expressão de GUS transiente em folhas de *N. benthamiana*.

Preparo de TG	Concentração de TG (mg/μL)	Número de Pontos
TGI	9,6	2
	14,4	7
	24	37
TGII	8	6
	12	1
	20	6

Foi observado que o número de pontos foi aumentando de acordo com o aumento da concentração do tungstênio chegando a atingir no máximo 37 pontos no preparo de TGI. No tratamento TGII esse fato não se repetiu, e a concentração intermediária de tungstênio (12 mg/μL) apresentou apenas 1 ponto de expressão

transiente e nas concentrações de 8 mg/μL e 20 mg/μL os resultados foram os mesmos apresentando 6 pontos.

Sendo assim, podemos afirmar que quanto maior a concentração de tungstênio no preparo de TG+DNA, maior será a densidade de partículas por área na membrana carreadora, demonstrando que a concentração de tungstênio interfere diretamente na eficiência de transformação. É importante ressaltar que a concentração do DNA foi a mesma em todas as condições testadas (6 ng por preparo).

Para a confirmação dos resultados acima (Tabela 3), o teste com preparo TGI foi repetido nas mesmas concentrações de tungstênio e os resultados foram persistentes (Tabela 4).

Tabela 4. Expressão de GUS transiente em folhas de *N. benthamiana*.

Preparo TG	Concentração de TG (mg/μL)	Número de pontos
TGI	Repetição 1 – 9,6	3
	Repetição 2 – 9,6	0
	Repetição 1 – 14,4	15
	Repetição 2 – 14,4	4
	Repetição 1 – 24	66
	Repetição 2 – 24	68

Novamente, foi constatado que quanto maior a concentração de tungstênio por preparo na membrana carreadora, maior a eficiência de transformação genética, reafirmando os resultados anteriores. É interessante ressaltar que alguns parâmetros devem ser levados em consideração para este resultado de eficiência como, por exemplo, o tipo de preparo do protocolo e o veículo (água ou glicerol 50%), os quais também diferem entre os preparos de TGI e TGII.

5.6 Transformação genética de *Nicotiana benthamiana*

5.6.1 Obtenção e preparo das plantas

As sementes de *N. benthamiana* foram preparadas como descrito no item 4.5.1 e a transformação decorreu como descrito no item 4.5.5 com o preparo de TGI e com a concentração de 24 mg/ μ L de tungstênio. Para a realização da transformação genética utilizou-se folhas germinadas *in vitro* com desenvolvimento aproximado de 40 dias (Figura 10).

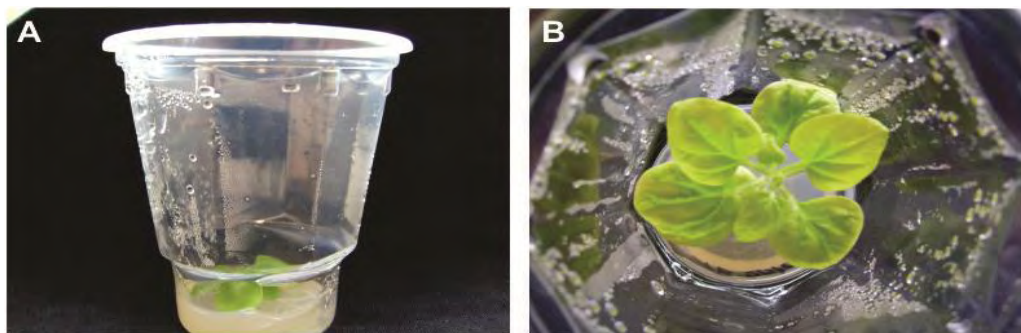


Figura 10. A e B: Planta de *N. benthamiana* com 20 e 40 dias de germinação em sala de crescimento com temperatura e fotofase 18h/luz controlados.

Com base nos resultados obtidos na transformação genética de *N. benthamiana* o preparo do DNA foi realizado seguindo o protocolo como descrito no item 4.5.4 com o preparo de TGI com a concentração 24 mg/ μ L de tungstênio por membrana para as subseqüentes transformações de soja tanto para embrião, quanto para calos cotiledonares.

Pode-se observar grande diferença de expressão transiente entre os preparos de TG. Esta diferença foi observada não somente em números de pontos, mas também na intensidade da expressão observada nas folhas (Figura 11).

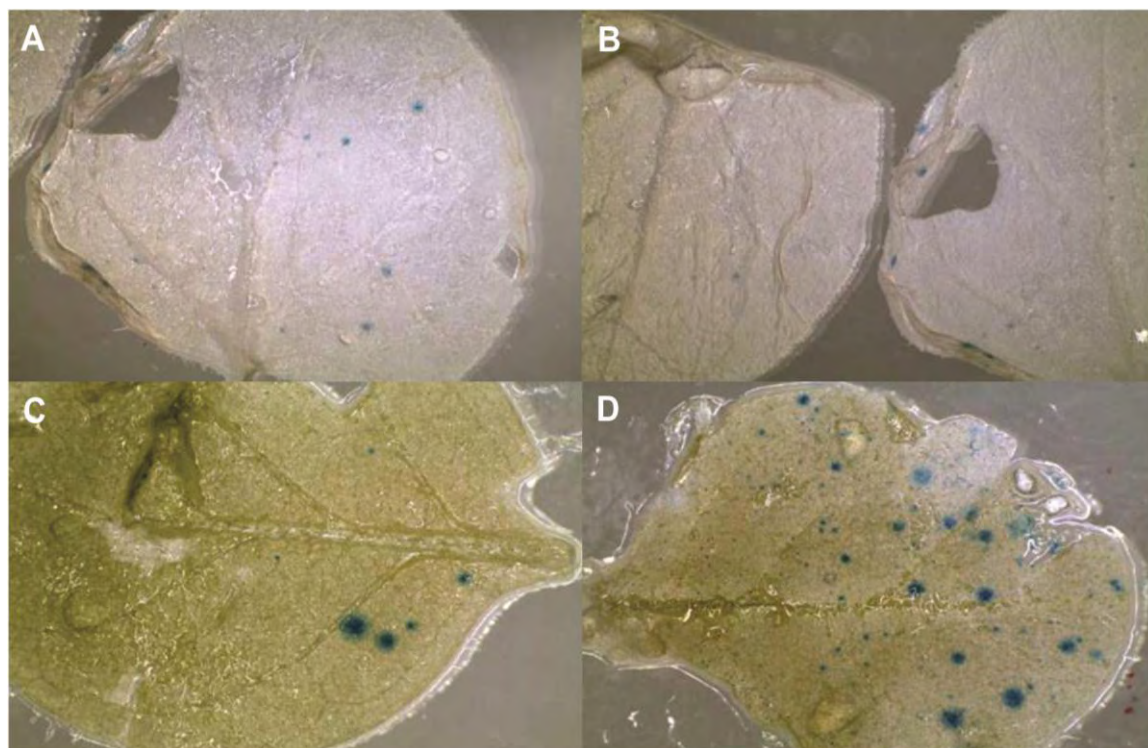


Figura 11. **A e B:** Expressão transitente em folhas de *N. benthamiana* com baixa expressão de GUS (TGII) 20 mg/μL ; **C e D:** Expressão transitente em folhas de *N. benthamiana* com alta expressão de GUS (TGI) 24 mg/μL.

De maneira geral, o tabaco é uma planta que possui métodos de transformação, regeneração e cultivo *in vitro* bem estabelecidos, sendo por isso, muito utilizado como planta teste em diferentes experimentos. Assim como no presente trabalho, vários autores obtiveram êxito quando utilizaram tabaco como receptor de transgene.

ZHANG et al. (2009) promoveram a super expressão do gene *GmERF3* de soja em plantas de tabaco, e observaram que as plantas transgênicas desenvolveram tolerância aos estresses salinos e hídricos, além de se tornarem resistentes à infecção por *Ralstonia solanacearum*, *Alternaria alternata* e ao vírus do mosaico do tabaco (TMV) (KERN et al., 2010).

Além de considerada uma planta modelo em experimentos de transformação genética, por não ser uma planta comestível, o tabaco pode ser utilizado para produção de proteínas de interesse, consolidando ser uma planta de

fácil manejo e também versátil. COLGAN et al. (2009) utilizaram o tabaco para otimizar condições de cultivo de plantas transgênicas.

KHALAFALLA et al. (2005) relatou em seu trabalho de otimização de protocolo com expressão transiente de GFP em soja que a concentração de DNA afetou significativamente o nível de expressão de GFP quando aumentou-se a quantidade de plasmídeo por bombardeamento de 0,4 para 0,8 µg, embora, o aumento adicional de DNA de 1,6 ou 3,2 µg não foi significativo na expressão. Efeito similar foi observado em embriões somáticos de cassava (*Manihol esculenta Crantz*), no qual o aumento de expressão transiente foi alcançado com 0,5 µg de DNA (SCHOPKE et al., 1997).

5.7 Transformação Genética de Soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

5.7.1 Transformação genética em embriões

Diante dos resultados observados na Tabela 5 podemos ressaltar a grande dificuldade de obtermos uma planta geneticamente modificada em cultivar de soja no sistema via biobalística. Na transformação genética de embrião foi obtida uma única planta positiva da cultivar BR16.

Tabela 5. Total de embriões bombardeados e resultado de GUS.

Cultivar	Embriões Bombardeados	Embriões Regenerados	N. Plantas transformadas (GUS+)
IAS-5	241	124	0
M-SOY6101	450	280	0
BR16	738	459	1
Total	1429	863	1

Em todas as transformações de soja, tanto para embrião, quanto calo embriogênico utilizou-se placas com folhas de *N. benthamiana* como controle, podendo-se afirmar que o sistema de bombardeamento foi efetivo, pois, em todas as transformações foi detectada expressão transiente de GUS. Esta expressão foi detectada com maior ou menor número de pontos azuis em todas as transformações onde foram utilizadas como controle.

Nesta fase, foi possível verificar a eficácia do aparelho de bombardeamento e dos parâmetros utilizados para padronização de protocolo, entretanto, a eficiência de transformação em soja, tanto para embrião quanto para calos foi muito baixa ou quase inexistente.

Esta baixa eficiência de transformação pode estar relacionada com o agente seletivo utilizado para selecionar as plantas transformadas. De acordo com RECH et al. (2008), o imazapir seria o agente seletivo mais indicado para soja. Foi constatado também que a utilização do gene AHAS como gene de seleção aumentou a eficiência significativamente, pois este herbicida é capaz de translocar sistematicamente e concentrá-lo na região meristemática da planta, onde, por sua vez ocorre a transformação genética.

Segundo os autores, apesar do uso de outros agentes seletivos como higromicina, canamicina, fosfonotricina e glifosinato serem utilizados para selecionar células transformadas como cotilédones, embriões, calos embriogênicos e suspensão celular, estes não são apropriados para serem utilizados efetivamente como agentes seletivos depois do bombardeamento. Isto se deve ao fato de que as células do meristema apical (região receptora do DNA) não estão em contato com o agente seletivo do meio de cultura.

O gene marcador de seleção *ahas*, foi isolado de *Arabidopsis thaliana*, contendo mutação que confere resistência imidazolinone específico. Como consequência, depois do bombardeamento as células transgênicas da região apical dos embriões podem ser efetivamente selecionadas entre as células não transformadas.

Assim sendo, outros problemas tais como: tipo de cultivar, má qualidade das sementes, posição do embrião no momento do bombardeamento, fina camada de água na região apical (impedindo a penetração das partículas), alta umidade do laboratório (sendo $<40\%$) podem também estar diretamente ligados à baixa eficiência de transformação, sendo parâmetros a serem considerados (RECH, 2008).

Uma ocorrência bastante notável neste tipo de transformação (embriões) é o aparecimento de plantas quiméricas. Este fato foi detectado em uma planta avaliada em teste histoquímico de GUS (Figura 12C). Também foi detectada uma única planta expressando GUS em folhas que foram excisadas a partir de embrião (Figura 12B).

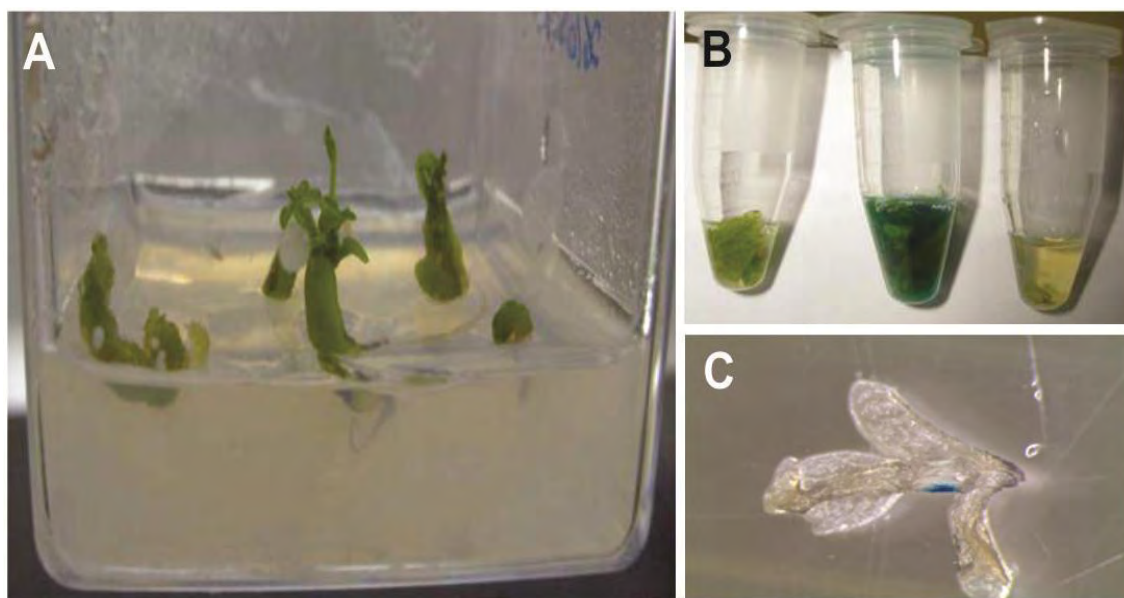


Figura 12. **A:** Regeneração dos embriões em meio de cultura com agente seletivo (canamicina); **B:** Resultado do teste histoquímico de GUS positivo (folha); **C:** Expressão de GUS em folha apresentando quimera.

Uma tentativa de evitar o problema do quimerismo é transformar tecidos embriogênico oriundos de cotilédones de soja via embriogênese somática. Porém, existe uma desvantagem nesta metodologia, ela também poderá apresentar plantas quiméricas (PARROTT et al., 1989), consequência da origem multicelular

dos embriões somáticos primários a partir de células superficiais da epiderme do explante (FINER, 1988).

Entretanto, este autor demonstrou que a proliferação dos embriões somáticos secundários ocorria a partir de células únicas da superfície dos embriões primários, e que a embriogênese secundária poderia ser obtida com a manutenção do tecido em meio de cultivo com alta concentração de 2,4-D. A origem unicelular dos embriões secundários faz deste tecido o principal alvo para a transformação genética, afastando o problema do quimerismo (FINER, 1988).

O sistema de bombardeamento de partículas em soja pode ser uma técnica bastante eficiente se associada à transformação via *A. tumefaciens*. Este sistema poderia ser utilizado para causar ferimentos no tecido vegetal que, posteriormente facilitaria a infecção pela bactéria aumentando a tentativa de infecção celular.

Mesmo nos melhores sistemas experimentais, apenas uma pequena fração da população total de células é atingida por uma partícula, e destas, nem todas irão expressar o gene introduzido. Devido a esta baixa eficiência, torna-se necessário o uso de um protocolo eficiente de seleção e regeneração de plantas transformadas.

A frequência desfavorável entre o total de células bombardeadas e o total de células que foram estavelmente transformadas, é provavelmente, a maior limitação desta técnica (HUNOLD et al., 1994). Segundo estes autores, apenas 7 a 10% das partículas bombardeadas penetram na célula, e a maior parte destas atinge apenas as células epidérmicas.

Estes mesmos autores observaram que apenas 0,04% de todas as células utilizadas no experimento, feito com o aparelho de *Particle Inflow Gun*, haviam sido transformadas de forma estável. Esta baixa eficiência de transformação foi atribuída ao fato de que a maioria das células que recebe uma partícula, seja esta de ouro ou tungstênio, morre nas primeiras 48 horas após o bombardeamento. Foi observado também que, em geral, as células que recebem uma partícula e sobrevivem, incorporam estavelmente o transgene.

5.7.2 Transformação genética em calos

Após a transformação genética, observou-se que houve regeneração estável em todas as transformações, entretanto, na análise do teste histoquímico (GUS) em folhas, de aproximadamente 283 calos submetidos ao bombardeamento, nenhum resultado positivo foi detectado (Tabela 6).

Tabela 6. Bombardeamento de calos da cultivar IAS-5.

Cultivar	Calos Bombardeados	Calos Regenerados	% Regeneração	N. plantas transformadas (GUS +)
IAS-5	43	7	16,27	0
IAS-5	63	10	15,87	0
IAS-5	80	21	26,25	0
IAS-5	97	15	15,46	0
Total	283	53	18,72	

FINER & McMULLEN (1991) foram os primeiros a relatarem resultados positivos com plantas transgênicas de soja através de embriões somáticos. SATO et al. (1993) demonstraram que as células embriogênicas são as mais adequadas para a produção de plantas de soja geneticamente modificadas, através de biobalística. A vantagem de utilizar culturas embriogênicas como alvo na transformação de soja é a origem unicelular das plântulas. Assim uma única célula transformada de um embrião primário é capaz de originar, por embriogênese secundária, uma planta completamente transgênica (FINER, 1988).

Alguns fatores acabam colaborando com a grande dificuldade de obtenção de plantas transgênicas em soja em sistemas embriogênicos tal como a baixa regeneração e recuperação de plantas (TRICK et al., 1997; DROST et al., 2002).

Segundo TRICK et al.(1997), o ideal seria utilizar plantas com menos de um ano de idade. Culturas mais velhas, também tenderiam a originar plantas transgênicas estéreis (HADI et al., 1996; LIU et al., 1996). DROSTE et al. (2002)

fizeram um experimento transformando duas culturas embriogênicas, com diferença entre cinco meses entre elas e fizeram a comparação.

Foi observado ao final do experimento uma diminuição de aproximadamente 60% número de expressão de gene repórter GUS, para a cultivar Bragg nas culturas mais antigas. A explicação para tal resultado seria que os tecidos se tornariam menos responsivos e mais sensíveis ao processo de cultura e transformação genética.

Segundo TRICK et al. (1997), a transformação não será bem sucedida se os processos de regeneração e transformação forem ineficientes, ou se ambos não estiverem associados. É necessário o procedimento dos dois processos e grande habilidade para torná-los ligados concomitantemente (TRICK et al., 1997; BODANESE-ZANETTINI & PASQUALI, 2004).

Outros parâmetros foram observados por FURITANI & HIDAKA (2004). Observou-se que o material se tornava mais eficiente na transformação quando o bombardeamento era realizado depois de 7 ou 14 dias após a transferência de meio de cultura, período de maior atividade de proliferação dos embriões.

Estes mesmos autores, também observaram que a pressão de 1100 psi resultou em aumento da taxa de transformação e expressão de GFP, observando que as injúrias causadas no tecido vegetal eram responsáveis tanto pela integração do DNA as células como também pela recuperação de plantas transgênicas.

Isto ressalta quantos parâmetros devemos otimizar antes de iniciarmos um processo de transformação genética de plantas. Um número razoável de explantes deve ser levado em consideração na hora da transformação, já que a taxa de conversão de plantas transgênicas é muito baixa (0,8%) (FURUTANI & HIDAKA, 2004).

Para o presente trabalho, pode-se ressaltar que o número total de calos bombardeado (283 calos) é considerado um número pequeno para recuperação de plantas transgênicas por todos os fatos que foram relatados anteriormente. Finalizando, é importante ressaltar que, atualmente existem poucos laboratórios

que obtém sucesso com transformação de soja e que todos os procedimentos descritos na literatura têm problemas com a baixa reprodutibilidade, baixa eficiência e limitada especificidade de cultivares (TRICK et al., 1997).

VI. CONCLUSÕES

A metodologia desenvolvida para embriogênese somática e regeneração em cotilédones maduros foi eficiente na recuperação de plântulas para cultivar IAS-5;

A retirada da citocinina [BAP (5mg/L)] do meio de co-cultivo promoveu maior recuperação de regeneração de plantas únicas facilitando a avaliação para teste de GUS;

Os melhores resultados obtidos no teste de concentração de canamicina para a curva de morte foram: IAS-5: 200 mg/L, M-SOY6101: 100 mg/L e BR16: 200 mg/L;

A indução de embriogênese somática em embriões maduros de soja (cultivar IAS-5) não respondeu satisfatoriamente;

Na transformação genética de *N. benthamiana* via biobalística, a concentração de tungstênio que apresentou melhor resultado foi 24 mg/ μ L por membrana carreadora e para o protocolo de preparo de tungstênio foi o TGI (60 mg/ml) conservado em glicerol 50%, permitindo estabelecer alguns parâmetros para a transformação genética de soja.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAGÃO, F. J. L.; SÁ, M. F. G. de.; ALMEIDA, E. R.; GANDER, E. S.; RECH, E. L. Particle bombardment mediated expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Plant Molecular Biology**, Tucson, v. 20, p. 357–359, 1992.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 261–96.

BARRAT, D. H. P. *In vitro* pod culture of *Pisum sativum*. **Plant Science**, Limerick, v. 43, p. 223–228, 1986.

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

BENVENISTE, R.; DAVIES, J. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. **Annual Review Biochemistry**, Palo Alto, v. 42, p. 471–506, 1973.

BEVAN, M.; BARNES, W.; CHILTON, M. D. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 11, p. 369–385, 1983a.

BEVAN, M. W.; FLAVELL, R. B.; CHILTON, M. D. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. **Nature**, London, v. 304, p. 184–187, 1983b.

BEVERSDORF W. D.; BINGHAM E. T. Degrees of differentiation obtained in tissue cultures of Glycine species. **Crop Science**, Madison, v. 17, p. 307–311, 1977.

BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). **Soja: tecnologia de produção II**. Piracicaba: ESALQ, 2000, p. 1–18. .

BODANESE-ZANETTINI M. H.; PAQUALI G. Plantas transgênicas. In: MIR, L. (Ed.). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 721–736.

BODANESE-ZANETTINI, M. H.; ORTOLAN, M. G. S.; HU, C. Somatic embryoid induction from Brazilian soybean cultivars. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 1, p. 129–134, 1993.

BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo: origem, história e distribuição. In: Miyasaka, S.; Medina, J.C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 1–6.

BOWEN, B. A. Markers for plant gene transfer. In: KUNG, S.; WU, R. (Ed.). **Transgenic plants**. San Diego: Academic Press, 1993. v. 1, p. 89–123.

BRAR, M. S.; AL-KHAYRI, J. M.; SHAMBLIN, C. E.; MCNEW, R. W.; MORELOCK T. E. ; ANDERSON, E. J. In vitro shoot tip multiplication of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **In vitro cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 33, p. 114–118, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Molecular Applied Genetics**, v.1, p. 561-575, 1998. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/item/37AA90446961F63E040A8C07502416D>> Acesso em: 15 out. 2007.

CHO, Y.; SUH, S. K.; PARK, H. K.; WOOD, A. Impact of 2,4-DP and BAP upon pod set and seed yield in soybean treated at reproductive stages. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 36, p. 215–221, 2002.

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

CHUNG, G.; SINGH, R. J. Broadening the Genetic Base of Soybean: A Multidisciplinary Approach. **Critical Reviews in Plant Sciencies**, Boca Raton, v. 27, n. 5, p. 295–341, 2008.

COLGAN, R.; ATKINSON, C. J.; PAUL, M.; HASSAN, S.; DRAKE, P. M.; SEXTON, A. L.; SANTA-CRUZ, S.; JAMES, D.; HAMP, K.; GUTTERIDGE, C.; MA, J. K. Optimisation of contained *Nicotiana tabacum* cultivation for the production of recombinant protein pharmaceuticals. **Transgenic Research**, London, v.19, n.2, p.241-256, 2010.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de Biocombustíveis Alternativo ao Óleo Diesel Através da Transesterificação de Óleo de Soja Usado em Frituras. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 531–537, 2000.

DAVIS, B. D. The letal action of aminoglycosides. **Journal of Antimicrobial Chemotnerapy**, Leeds, v. 22, p. 1–3, 1988.

DeGREVE, H.; DHAESE, P.; SEURINCK, J.; LEMMERS, M.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene. **Journal Molecular Applied Genetics**, Non-U.S. Gov't , v. 1, p. 499–511, 1982.

DEPICKER, A.; STACHEL, S.; DHAESE, P.; ZAMBRYSKI, P.; GOODMAN, H. M. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. **Journal of Molecular and Applied Genetics**, New York, v. 1, p. 561–573, 1982.

DI MAURO, A. O.; NÓBREGA, J. C.; COLLINS, G. B. Screening soybean genotypes regarding to their ability to produce somatic embryos. **Científica**, Jaboticabal, v. 23, p. 218–223, 1995.

DROST, 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, p. 367–376, 2002.

EMBRAPA. Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em: <http://www.embrapa.com.br>. Acesso em: 10 de abril, 2012.

FALKINER, F. R. The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. **IAPTC Newsletter**, Ireland, n. 60, p. 13-23, 1990.

FIGUEIREDO, L. H. M.; PENTEADO, M. I. O; MEDEIROS, P. T. Patentes em biotecnologia: patenteamento em biotecnologia agropecuária-cenário brasileiro. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 9, n. 36, 2006.

FINER, J. J.; NAGASAWA, A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 15, p. 125–136, 1988.

FINNER, J. J. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.)Merril]. **Plant cell**, Rockville, v. 7, p. 238–241,1988.

FINNER, J. J.; McMULLEN, M. D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. **In Vitro cellular Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 27, p. 175–182, 1991.

FLAWELL, R. B.; DART, E.; FUCHS, L.; FRALEY R. T. Selectable marker genes: safe for plants? **Biotechnology**, New York, v. 10, p. 141–144, 1992.

FLICK, C. E.; EVANS, D. A.; SHARP, W. R. Techniques for propagation and breeding: organogenesis. In: **HANDBOOK of plant cell culture**. Mac Millan, New York 1983. v. 2, p. 13–68.

FORD, Y. Y.; BONHAM, E. C.; CAMERON, R. W. F.; BLAKE, P. S.; JUDD, H. L.; HARRISON-MURRAY, R. S. Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 10, p. 1–11, 2001.

FRALEY, R. T.; ROGERS, S. G.; HORSCH, R. B.; SANDERS, P. R.; FLICK, J. S.; ADAMS, S. P.; BITTNER, M. L.; BRAND, L. A.; FINK, C. L.; FRY, J. S.; GALLUPPI, G. R.; GOLDBERG, S. B.; HOFFMANN, N. L.; WOO, S. C. Expression of bacterial genes in plants cells. **Proceedings National Academy Science**, Calcutta, v. 80, p. 4803–4807, 1983.

FURUTANI, N.; HIDAKA, S. Efficient production of transgenic soybean using a Co-tranformation Method. **Breeding Science**, Tokyo, v. 54, p. 91–98, 2004.

GANDER, E.S.; MARCELLINO, L.H.; ZUMSTEIN, P. **Biotechnologia para pedestres**. Brasília: Embrapa - SPI, 1996. 66p.

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v. 2, p. 117–31.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984. p.9.

HADI, M. Z. McMULLEN, M. D.; FINER J. J. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 500–505, 1996.

HERRERA-ESTRELLA, L.; De BLOCK, M.; MESSENS, E.; HERNALSTEENS, J. P.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. **EMBO Journal**, Oxford, v. 2, p. 987–995, 1983b.

HERRERA-ESTRELLA, L.; DEPICKER, A.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. **Nature**, London, v. 303, p. 209–213, 1983a.

HOFMANN, N.; NELSON, R. L.; KORBAN, S. S. Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, p. 157–163, 2004.

HUNOLD, R.; BRONNER, R.; HAHNE, G. Early Events in Microprojectile Bombardment: cell viability and particle location. **The Plant Journal**, Oxford, v. 5, p. 593–604, 1994.

ISAAA. Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em: <http://www.isaaa.org>. Acesso em: 14 de fevereiro, 2012.

JEFFERSON, R. A.; BURGESS, S. M.; HIRSCH, D. beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. **Proceedings National Academy Science**, Calcutta, v. 83, p. 8447–8451, 1986.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 6, p. 3901–3907, 1987.

JEFFERSON, R. A.; WILSON, K. J. The GUS gene fusion system. In S. B. Gelvin and R.A. Schilperoort (Ed.). **Plant molecular biology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991v. B14, p. 1–33.

JONES, J. D. G.; DUNSMUIR, P.; BEDBROOK, J. High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 4, p. 2411– 2418, 1985.

KERN, M. F.; MARASCHIN, S. D.; ENDT D. D.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; PASQUALIL, G. Expression of a chitinase gene from *Metarhizium anisopliae* in tobacco plants confers resistance against *Rhizoctonia solani*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.160, n.7, p.1933-46, 2010.

KHALAFALLA, M. M.; RAHMAN, S. M.; EL-SHEMY, H. A.; NAKAMOTO, Y.; WAKASA, K.; ISHIMOTO, M. Optimization of particle bombardment conditions by monitoring of transient sGFP(S65T) expression in transformed soybean. **Breeding Science**, Tokyo, v. 55, p. 257–263, 2005.

KLEIN, T. M.; FITZPATRICK-McELLIGOTT, S. Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues. **Current Opinion Biotechnology**, London, v. 4, p. 583–590, 1992.

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 cotyledons. **Crop Science**, Madison, v. 44, p. 1825–1831, 2004.

KULESCHA, Z. Recherches sur l'élaboration de substances de croissance of micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 230, p. 63–71, 1988.

KUNISAWA, V. Y. M. Os transgênicos e as patentes em biotecnologia. **Revista da Associação Brasileira da Propriedade Intelectual**, n.70, maio/junho, 2001. 55p.

LAZZERI, P. A.; HILDEBRAND, D. F.; COLLINS, G. B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 3, p. 160–167, 1985.

LEGRAND, B.; CILAS, C.; MISSISSO, E. Comportement des tissus de *Theobroma cacao* L. var. Amelonado cultivés in vitro. **Café Cacao Thé**, Paris, v. 4, p. 245–250, 1984.

LIPPMANN, B.; LIPPMANN, G. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean [*Glycine max* L. Merr.] **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 3, p. 215–218, 1984.

LIU, W.; TORISKY, R. S.; McALLISTER, K. P.; AVDIUSHKO, S.; HILDEBRAND, D.; COLLINS, G. B. Somatic embryo cycling: evaluation of a novel transformation and assay system for seed- specific gene expression in soybean. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, p. 33–42, 1996.

MEURER, C. A.; DINKINS, R. D.; REDMOND, C. T.; McALLISTER, K. P.; TUCKER, D. T.; WALKER, D. R.; PARROTT, W. A.; TRICK, H. N.; ESSIC, J. S.; FRANTZ, H. M.; FINER, J. J.; Collins, G. B. Embryogenic response of multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars across three locations. **In Vitro Cellular Developmental Biology- Plant**, Columbia, v. 37, p. 62–67, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A resied medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, 1962.

NEWELL, C. A. Plant transformation technology. Developments and applications. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 16, p. 53–65, 2000.

NOVELI, G.; NOVEL, M. Mutants d'Escherichia coli K 12 affectés pour leur croissance sur methyl-beta-D-glucuronide: localisation of gène de structure de la beta-D-glucuronidase (uid A. Mol Gen Genet). **Molecular General Genetics**, New York, v. 120, p. 319–335, 1973.

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

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 83p.

ORATI, R. A. **Conhecimento, envolvimento e intenções de compra em relação a alimentos transgênicos: um estudo exploratório com consumidores brasileiros**. Monografia (Trabalho de Graduação em Economia) - Faculdade de Economia Administração e Contabilidade, Universidade Estadual Paulista, Ribeirão Preto, 2006

OTTEN, L. A.; SCHILPEROORT, R. A. A rapid micro scale method for the detection of lysopine and nopaline dehydrogenase activities. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 527, p. 497–500, 1978.

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

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, p. 167–179, 2004.

PENCE, V. C.; HASEGAWA, P. M.; JANICK, J. Initiation and developement of asexual embryos of *Theobroma cacao* L. *in vitro*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 1, p. 1–14, 1980.

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

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

RITCHIE, S. W.; HODGES, T. k. Cell culture and regeneration of transgenic plants. In: KUNG, S.; WU, R. (Ed.). **Transgenic plants**. London: Academic Press, 1993. v. 1, p. 147–178.

ROMEIRO, R. S. Posicionamento sistemático. In: ROMERO R. da S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: UFV, 1995.

SANFORD, J. C. Biolistic plant transformation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 79, p. 06–209, 1990.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Journal of Particle Science Technology**, New York, v. 5, p. 27–37, 1987.

SANFORD, J. C.; SMITH, F. D.; RUSSEL, J. A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzimology**, San Diego, v. 217, p. 483–510, 1993.

SANTARÉM, E. R.; FINER, J. J. Transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. **In vitro Cell Dev Biol Plant**, Columbia, v. 35, p. 451–455, 1999.

SANTARÉM, E. R.; PELISSIER, B.; FINER, J. J. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. **In Vitro Cellular Developmental Biology**, Columbia, v. 33, p. 13–19, 1997.

SATO, S.; NEWELL, C.; KOLACZ, K.; TREDO, L.; FINNER, J. J.; HINCHEE M. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 408–413, 1993.

SCHOPKE, C.; TAYLOR, R; CARCAMANO AND BEACHY. Optimization of parameters for particle bombardment of embryogenic suspension cultures of

cassava (*Manihol esculenta Crantz*) using computer images analysis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 526–530, 1997.

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

STEWART, C. N.; ADANG, M. J.; ALL, J. N.; BOERMA, H. R.; CARDINEAU, G.; TUCKER, D.; PARROTT, W. A. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 112, p. 121–129, 1996.

STEWART, F. C. Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of growth from free cell to carrot plant. **American Journal Botany**, Columbus, v. 45, p. 709–713, 1958.

TRICK, H. N.; DINKINGS, R. D.; SANTARÉM, E. R.; SAMOYLOV, V.; MEURER, C. A.; WALKER, D. R.; PARROTT, W. A.; FINER, J. J.; COLINS G. B. Recent advances in soybean transformation. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v. 3, p.9–24, 1997.

VAN DEN BROECK, G.; TIMKO, M. A. P.; CASHMORE, A. R.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELLA, L. Targetingby of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. **Nature**, London, v. 313, p. 358–363, 1985.

VARZAKAS, T. H.; ARVANITOYANNIS, I. S.; BALTAS, H. The politics and science behind GMO acceptance. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 47, p. 335–361, 2007.

VENCATO, A. Z. **Anuário brasileiro da soja 2010**. Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta Santa Cruz, 2010. p.144.

WEIDE, R. KOORNNEEF, M.; ZABEL, P. A simple, non-destructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 78, p. 169–172, 1989.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals Botany**, London, v. 57, p. 443–462, 1996.

WILSON J. K. ; SESSITSCH, A.; CORBO J. C., GILLER K. E., AKKERMANS A. D. L. AND JEFFERSON R. A. β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. **Microbiology**, New York, v.141, p.1691-1705, 1995.

WILSON, K. J.; SESSITSCH, A.; PARRA, A.; BECK, D. Biología molecular en el campo: genes marcadores para la visualización rápida y precisa de la competencia entre cepas rizobianas y la colonización por bacterias de raíces de plantas. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE RHIZOBIOLOGÍA, 18., 1996, Santa Cruz de la Sierra. **Anais...** p.147–162.

WRIGHT, S. W., JEFFREY, R. F. C.; MANTOURA, C. A.; LIEWELLYN, T.; BJORNLAND, D. Repeta and N. Welschmeyer : Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 77, p. 183–196, 1991.

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

ZHANG, G.; CHEN, M.; LI, L.; XU, Z.; CHEN, X.; GUO, J.; MA, Y. Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 2–16, 2009.