

ANDREIA BARCELOS PASSOS LIMA

**CONSTRUÇÃO DE CASSETE PARA A CO-SUPRESSÃO DO GENE
DA OLEOIL DESSATURASE E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA
DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA**

Tese apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L732c
2005

Lima, Andreia Barcelos Passos, 1976-

Construção de cassete para a co-supressão do gene da
oleoil dessaturase e transformação genética de embriões
somáticos de soja / Andreia Barcelos Passos Lima. –
Viçosa : UFV, 2005.

xi, 103f. : il. ; 29cm.

Orientador: Maurilio Alves Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia. 2. Soja - melhoramento genético.
3. Transformação genética. 4. Embriogênese somática.
5. Regulação de expressão gênica. 6. Ácidos graxos
Ômega-6. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 660.6

ANDREIA BARCELOS PASSOS LIMA

**CONSTRUÇÃO DE CASSETE PARA A CO-SUPRESSÃO DO GENE
DA OLEOIL DESSATURASE E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA
DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA**

Tese apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de setembro de 2005.

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)

Prof. Wagner Campos Otoni
(Conselheiro)

Prof. Valterley Soares Rocha

Dr. Ivan Schuster

Prof. Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

DEDICATÓRIA

À minha família pelo amor, carinho e dedicação:

Aos meus pais Adalcino (*in memoriam*) e Ilda

Aos meus irmãos Aline e Paulo Sérgio

e

Aos meus amados sobrinhos Hudson, Felipe e Pedro Paulo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter traçado os projetos da minha vida e ter permitido a realização de mais de uma conquista.

A minha mãe, pelo seu amor incondicional e por todo o seu apoio e incentivo demonstrado diariamente em cada pequeno gesto. Obrigada por cuidar de mim até hoje.

Ao meu pai, pelos exemplos de amor, caráter, honestidade e profissionalismo.

Aos meus irmãos e sobrinhos, pelo incentivo e compreensão nos momentos de ausência e por torcerem sempre pelo meu sucesso.

Ao Ricardo, pelo carinho, apoio, dedicação e cuidado constante.

A Universidade Federal de Viçosa e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, prof. Maurilio, pela oportunidade de aprendizado concedida, pela confiança e liberdade de trabalho e por ter contribuído para o meu crescimento intelectual e profissional.

Ao prof. Everaldo, pela amizade, apoio, confiança, incentivo e por toda ajuda nos momentos difíceis.

Ao prof. Wagner, pela amizade, confiança, sugestões do trabalho e pela oportunidade de executar grande parte do meu trabalho no seu laboratório.

À Ana Cristina Lanna pelo auxílio e amizade quando cheguei em Viçosa.

Às colegas do laboratório pelo apoio, amizade e companheirismo.

À Cíntia e ao Gustavo pela ajuda no desenvolvimento de parte da minha tese e pela oportunidade de orientação.

Às amigas Ana, Andréa e Mariana, pelo apoio, incentivo, compreensão e pelas palavras de carinho e otimismo.

À Inês pela amizade e auxílio nos ensaios de cromatografia.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos II pelo companheirismo.

À Maurecilne pelo apoio, amizade e auxílio na confecção das pranchas de fotos.

À Francismar, pela amizade, incentivo e por toda ajuda e torcida durante o desenvolvimento do meu trabalho.

À Elizonete (Lili), pelo seu carinho, amizade, paciência e ensinamentos.

Aos funcionários, Aloísio, Fausto, Gláucia e Márcio, pela amizade, atenção e presteza.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ANDREIA BARCELOS PASSOS LIMA, filha de Adalcino dos Passos Lima e Ilda Barcelos Lima, nasceu em 11 de junho de 1976, em Brasília, DF.

Em 1995, iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Uberlândia, MG, concluindo a Licenciatura em fevereiro de 1999 e o Bacharelado em janeiro de 2000.

Em março de 1999, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica na Universidade Federal de Uberlândia, MG, em nível de mestrado, submetendo-se à defesa de tese em janeiro de 2001.

Em agosto de 2001, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de doutorado, na Universidade Federal de Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese em setembro de 2005.

CONTEÚDO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5

CAPÍTULO 1

Construção de cassetes de expressão para o silenciamento do gene da oleoil dessaturase em soja

RESUMO	7
1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1. Material genético	13
2.2. Purificação de RNA total e RT-PCR	13
2.3. Desenho de <i>primers</i> e isolamento de fragmento do gene da ω 6-dessaturase	15
2.4. Clonagem em vetores pCAMBIA	16
2.5. Transformação de <i>E. coli</i> e análise de transformantes	18
2.6. Seqüenciamento do DNA	18
2.7. Transformação de <i>A. tumefaciens</i> por eletroporação	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

CAPÍTULO 2

Transformação genética de embriões somáticos de soja via *Agrobacterium* mediada por sonicação (SAAT) e análise molecular dos transformantes

RESUMO	37
--------	----

1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1. Material vegetal e indução de embriogênese somática	43
2.2. Curva de sobrevivência para o herbicida	44
2.3. Condições de cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	44
2.4. Transformação genética de embriões somáticos	44
2.5. Etapas de aclimação das plantas	45
2.6. Análise molecular dos transformantes por PCR	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

CAPÍTULO 3

Estabelecimento de metodologias para a análise da composição de ácidos graxos da fração óleo de embriões somáticos de soja

RESUMO	70
1. INTRODUÇÃO	72
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1. Determinação da composição de ácidos graxos em sementes maduras de soja	78
2.2. Determinação da composição de ácidos graxos em embriões somáticos de soja	79
2.3. Extração de RNA total de embriões somáticos de soja	80
2.4. Ensaio de RT-PCR para análise da expressão do gene Fad2-1 durante o desenvolvimento embrionário	81
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4. CONCLUSÕES GERAIS	99
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

RESUMO

LIMA, Andreia Barcelos Passos, D.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2005. **Construção de cassete para a co-supressão do gene da oleoil dessaturase e transformação genética de embriões somáticos de soja.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e Wagner Campos Otoni.

A introdução de características agronomicamente importantes em soja pode ser realizada por transformação genética de plantas como um método alternativo ao melhoramento tradicional. Alterações nas proporções relativas dos ácidos graxos na fração óleo podem ser alcançadas por meio do silenciamento gênico de enzimas dessaturases, responsáveis pela síntese de ácidos graxos polinsaturados. Os objetivos deste trabalho foram: isolar um fragmento do gene da oleoil dessaturase de soja, construir cassete de expressão para a co-supressão deste gene e estabelecer metodologias para a extração e quantificação de ácidos graxos de embriões somáticos. A análise por RT-PCR mostrou que o gene *Fad2-1* é expresso em todos os estádios de desenvolvimento da semente. A expressão desse gene aumentou a partir dos estádios iniciais de desenvolvimento e diminuiu em sementes maduras. Um fragmento de cDNA de cerca de 1 kb foi clonado nos vetores binários pCAMBIA 3301 e 1304, cujos T-DNAs apresentam genes para resistência a herbicida e antibiótico, respectivamente. A clonagem foi confirmada por meio de PCR, restrição enzimática e seqüenciamento. A construção clonada no vetor pCAMBIA 3301 foi utilizada para a transformação de soja via *Agrobacterium*. Embriões somáticos foram originados a partir de cotilédones imaturos cultivados na presença de 40 mg/L de 2,4-D. Agregados de embriões globulares foram transformados com suspensão bacteriana mediante sonicação e adição de acetoseringona e mantidos em meio seletivo com 3 mg/L e 5 mg/L do herbicida Finale[®]. A maioria dos embriões germinou normalmente em meio sem regulador de crescimento, embora alguns não tenham sido capazes de regenerar plantas. Apenas cinco plantas foram aclimatadas em casa de vegetação, mas não eram transgênicas. As análises moleculares com plântulas e/ou embriões somáticos cotiledonares permitiram a detecção de vários eventos de transformação. O conteúdo de ácidos graxos dos diferentes estádios

de desenvolvimento embrionário foi determinado por cromatografia gasosa. Foram observadas mudanças na composição de ácidos graxos no estágio globular, com aumento dos conteúdos de ácido oléico (18:1) e linoléico (18:2) e diminuição de ácido linolênico (18:3). A partir do estágio torpedo, a composição de ácidos graxos não variou significativamente até o final do desenvolvimento, apresentando resultados similares aos de sementes maduras. A análise por RT-PCR mostrou um aumento no acúmulo de transcritos do gene *Fad2-1* do estágio globular para torpedo. A expressão desse gene permaneceu relativamente constante até o estágio cotiledonar maduro, com redução da expressão após o processo de dessecação. Os dados quanto aos perfis de ácidos graxos de 138 embriões cotiledonares transformados foram analisados por meio de estatística descritiva para verificar a frequência dos diferentes eventos de transformação. Oitenta e quatro embriões apresentaram conteúdo de 18:1 semelhante ao controle não transformado (13-21%), 18 apresentaram níveis inferiores (9-13%) e 36 apresentaram níveis aumentados (22-61%), provavelmente como possível consequência de silenciamento gênico. Em relação ao conteúdo de 18:2, 88 embriões apresentaram conteúdo semelhante ao controle não transformado (49-59%), 17 apresentaram níveis superiores (59-64%) e 33 apresentaram níveis inferiores de 18:2 (6-49%). Em 101 embriões o conteúdo de 18:3 foi semelhante ao controle não transformado (8-15%), 30 mostraram níveis superiores (15-27%) e 7 mostraram níveis inferiores (4-8%). Os resultados mostraram a existência de modificação na composição de ácidos graxos nos embriões cotiledonares analisados, mas não se pode afirmar que essas alterações sejam causadas por fenômenos de silenciamento gênico. Estes resultados podem ter sofrido a influência de variações somaclonais ou da auxina 2,4-D.

ABSTRACT

LIMA, Andreia Barcelos Passos, D.S., Universidade Federal de Viçosa, September 2005. **Construction of co-suppression cassettes for the oleoil desaturase gene and genetic transformation of somatic soybean embryos.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Committee members: Everaldo Gonçalves de Barros and Wagner Campos Otoni.

The introduction of agronomically important traits into soybean may be accomplished by genetic transformation of the plants as an alternative method to traditional breeding. Alterations in the relative proportions of the fatty acids in the oil fraction may be reached through gene silencing of desaturase enzymes that are responsible for the synthesis of the polyunsaturated fatty acids. The objectives of this work were: to isolate a fragment of the soybean oleoil desaturase gene; to construct expression cassettes for co-suppression of this gene; and to establish methodologies for the extraction and quantification of fatty acids in soybean somatic embryos. The analysis based on RT-PCR showed that the *Fad2-1* gene is expressed in all developmental stages of the seed. The expression of the gene increases after the first stages of development and decreases in the dry seeds. One cDNA fragment around 1 kb was cloned in the binary vectors pCAMBIA 3301 and 1304, in which the T-DNAs harbor genes for resistance to herbicide and antibiotic, respectively. Cloning was confirmed through PCR, enzymatic restriction and sequencing. The constructs cloned in pCAMBIA 3301 were used for the soybean transformation via *Agrobacterium*. Somatic embryos were obtained from immature cotyledons cultivated in the presence of 2,4-D (40 mg/L). The globular embryo clusters were transformed with bacterial suspension using sonication and addition of acetosyringone and kept in selective medium with 3 mg/L and 5 mg/L of the Finale[®] herbicide. Most embryos germinated in medium without growth regulator, however, some of them were not able to regenerate plants. Only five plants were acclimated in the greenhouse, but they were not transgenic. The molecular analyses of seedlings and/or cotyledone somatic embryos allowed the detection of several transformation events. Fatty acid content at different stages of the embryonic development was determined by gas chromatography. Changes in the fatty acid

compositions at the globular stage were observed. There was an increase on oleic (18:1) and linoleic (18:2) acids contents and a decrease on linolenic acid (18:3) content. From the torpedo stage, the composition of the fatty acids did not vary significantly until the end of the development. The values obtained were similar to those of the dry seeds. The RT-PCR analysis showed an increase on the accumulation of transcripts for the Fad2-1 gene from globular to the torpedo stage. The expression of this gene remained relatively constant until the ripe cotyledonal stage, but there was a reduction on expression after the desiccation process. The data relative to the fatty acid profiles of 138 cotyledonal transformed embryos were analyzed by descriptive statistics in order to verify the frequency of the different transformation events. Eighty-four embryos showed a content of 18:1 similar to the non-transformed control (13-21%), 18 presented lower levels (9-13%) and 36 presented increased levels (22-61%), probably a possible consequence of gene silencing. In relation to 18:2, 88 embryos presented a content similar to that of the non-transformed control (49-59%), 17 presented higher levels (59-64%) and 33 presented lower levels of 18:2 (6-49%). In 101 embryos, the content of 18:3 was similar to the non-transformed control (8-15%), 30 showed higher levels (15-27%) and 7 showed lower levels (4-8%). The results show that the cotyledonal embryos analyzed had a modified fatty acid composition, but one cannot state that these alterations were caused by the gene silencing phenomenon. These results might have been affected by the influence of either somaclonal variations or the auxin 2,4-D

1. INTRODUÇÃO GERAL

No mundo já se comercializa, em grande escala, produtos transgênicos e os chamados organismos geneticamente modificados (OGMs) têm gerado grandes polêmicas e reações diversas por parte da população. Mas é certo que, no futuro, isso será uma prática normal e corriqueira, depois de conhecidos os seus efeitos e utilidades, além de maior compreensão por parte da sociedade.

A capacidade de produzir vegetais transgênicos acelerou grandemente o progresso de muitas áreas da biologia celular vegetal, abrindo muitas possibilidades na agricultura. Com a utilização dessa nova tecnologia, tornou-se possível modificar a qualidade de lipídios, amido e proteínas armazenadas em sementes e conferir a determinados vegetais, resistência a fungos, vírus e insetos ou tolerância a herbicidas (Dunwell, 2000).

Portanto, a Engenharia Genética representa, na verdade, uma ferramenta a mais à disposição do melhoramento genético e que pode ser utilizada juntamente com as técnicas de melhoramento tradicional, pois a manipulação genética de organismos possibilita que genes de qualquer organismo sejam isolados em laboratório e transferidos a outro organismo, quebrando a barreira intra-específica e levando ao desenvolvimento de novas variedades (Nodari e Guerra, 2001).

A liberação dessas plantas geneticamente modificadas (PGMs) para o cultivo e para o consumo humano e animal, ou de seus derivados, atrai cada vez mais a atenção das pessoas, sendo um dos temas que predominam nas discussões científicas, éticas, econômicas e políticas na atualidade.

No entanto, o processo de transformação de plantas não se encerra com a obtenção de plantas transgênicas expressando a característica-alvo. Para que a planta transgênica seja efetivamente considerada uma tecnologia e possa integrar-se aos sistemas produtivos é necessário que não represente riscos à saúde e ao ambiente, sendo esta uma condição essencial para que a comercialização seja realizada sem restrições.

Assim, o processo de transformação de plantas deve incluir etapas para o estudo de possíveis interferências a respeito do produto transgênico final. Esses estudos devem ser capazes de evidenciar, quantificar e determinar a intensidade de prováveis restrições

ao seu uso por parte de qualquer um dos componentes do sistema de produção (Fontes e Melo, 1999).

Em 2004, a área global estimada das lavouras GMs autorizadas foi de 81 milhões de hectares e estas lavouras geradas pela biotecnologia foram cultivadas por aproximadamente 8,25 milhões de agricultores em 17 países. As quatro lavouras GMs mais comercializadas em escala mundial são: soja (60% da área total com lavouras transgênicas), milho (23%), algodão (11%) e canola (6%) (James, 2004).

Entre os países que apresentam as maiores áreas cultivadas estão: Estados Unidos com 47,6 milhões de hectares (59% da área total cultivada com PGMs), seguidos de Argentina com 16,2 milhões (20%), Canadá com 5,4 milhões (6%), Brasil com 5,0 milhões (6%), China com 3,7 milhões (5%), Paraguai com 1,2 milhão (2%) – que registrou plantio de lavouras GMs pela primeira vez em 2004 – Índia com 0,5 milhão (1%), África do Sul com 0,5 milhão (1%), Uruguai com 0,3 milhão (<1%), Espanha com 0,1 milhão (<1%) e Filipinas com 0,1 milhão (<1%) (James, 2004).

A utilização de técnicas de engenharia genética para a introdução de genes responsáveis por características agrônômicas pode facilitar o desenvolvimento de novas variedades de interesse comercial, como a soja. De fato, nas últimas duas décadas tem ocorrido um aumento significativo no desenvolvimento de tecnologias de transformação de plantas e muitas espécies vegetais transgênicas estão sendo agora liberadas para produção comercial. Os avanços têm ocorrido em função do aperfeiçoamento das metodologias de liberação do DNA, como a mediada por *Agrobacterium* ou por métodos diretos, associadas com técnicas apropriadas de cultura *in vitro* para regenerar uma planta completa a partir de células ou tecidos de um grande número de espécies (Aragão, 2002).

No Brasil, a Lei 8.974 de Janeiro de 1995 e o Decreto 1.752/95 estabeleceram as regras iniciais para as atividades com engenharia genética, incluindo os requisitos para o trabalho em contenção e para liberações ambientais de OGMs. Esse fato possibilitou dar início a incorporação da biotecnologia nos processos agrícolas no país.

Com a aprovação da nova Lei de Biossegurança nº 11.105 em março de 2005, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), órgão técnico federal responsável pela regulamentação das pesquisas e testes com OGMs, passa a dividir seu

poder de decisão com o Conselho Nacional de Biossegurança, formado por 11 ministérios e presidido pelo ministro-chefe da casa Civil que, após o parecer da CTNBio, permitirá ou não a comercialização do produto transgênico. Desde sua criação em junho de 1996, a CTNBio já autorizou mais de 800 ensaios de campo com PGMs, sendo 80% desses ensaios com milho geneticamente modificado, 30% com soja geneticamente modificada e 10% desses ensaios com outras culturas. As principais características genéticas e agronômicas introduzidas nessas culturas são de resistência a herbicidas e de tolerância a insetos. O primeiro produto agrícola geneticamente modificado que obteve parecer favorável da CTNBio para comercialização foi a soja *Roundup Ready*, em setembro de 1998, desenvolvido pela empresa Monsanto.

A soja constitui um bom alvo para o melhoramento genético via transformação, por representar uma cultura de grande interesse econômico, sendo o principal produto brasileiro de exportação e por constituir uma importante fonte de óleo e proteína. Modificações usando técnicas de engenharia genética poderiam facilitar o rápido desenvolvimento de novas variedades com características como resistência a herbicidas e doenças, melhoramento da qualidade do óleo e teor de proteína, que por meio dos métodos tradicionais não seria possível.

Os óleos vegetais são constituídos principalmente por triacilgliceróis, que apresentam três moléculas de ácidos graxos esterificadas aos grupos hidroxilas dos três carbonos da molécula de glicerol. O conteúdo médio dos ácidos graxos constituintes do óleo de soja de variedades comerciais é de 11% de ácido palmítico, 4% de ácido esteárico, 24% de ácido oléico, 54% de ácido linoléico e 7% de ácido linolênico, sendo que os polinsaturados perfazem um total de cerca de 61%, o que excede o requerimento diário humano (Yadav, 1996).

A composição e a distribuição desses ácidos graxos na molécula de triacilglicerol determinam a qualidade do óleo, o valor nutricional, o sabor e propriedades físicas como estabilidade oxidativa e ponto de fusão. O alto teor de ácidos graxos polinsaturados tem sido correlacionado com a redução da estabilidade oxidativa e da qualidade (sabor e odor) do óleo de soja, gerando compostos de baixo peso molecular, voláteis, que produzem "*off-flavor*", rancidez e desempenho reduzido do óleo (Yadav, 1996).

Como o conteúdo de ácidos graxos polinsaturados é o mais importante determinante da qualidade do óleo, existe um considerável interesse em se modificar a composição do óleo por melhoramento tradicional ou pelo uso da biotecnologia, com objetivo de produzir óleos com atributos nutricionais e funcionais desejáveis (Wang e Hildebrand, 1988; Osório et al., 1995; Kinney, 1996; Bruner et al., 2001).

Portanto, a obtenção de cultivares de soja que apresentem níveis reduzidos do teor de ácidos graxos saturados e polinsaturados representa um grande atrativo econômico para as indústrias e o comércio, por proporcionarem melhor qualidade ao produto final.

O Programa de Melhoramento Genético da Qualidade do Óleo e Proteína da Soja, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa, visando à obtenção de linhagens especiais de soja para a agroindústria, desenvolveu um valioso germoplasma que inclui, dentre outras, linhagens com baixos teores de ácido linolênico. Dentro desse contexto, a principal meta desse programa é aumentar a estabilidade oxidativa do óleo pela redução do conteúdo de ácido linolênico e pelo aumento do conteúdo do ácido oléico (Moreira, 1999).

Uma maneira de se obter cultivares de soja com tais características é a modificação genética de enzimas do tipo dessaturases, que são responsáveis pela síntese de ácidos graxos polinsaturados, por meio de técnicas de silenciamento gênico associada à transformação genética de plantas.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAGÃO, F. J. L. 2002. Development of transformation methods toward producing transgenic plants with abiotic stress tolerance. **JIRCAS Working Reports**, p. 35-42

BRUNER, A. C.; JUNG, S.; ABBOTT, A. G.; POWELL, G. L. 2001. The naturally occurring high oleate oil character in some peanut varieties results from reduced oleoyl-PC desaturase activity from mutation of aspartate 150 to asparagines. **Crop Science**, v. 41, p. 522-526

DUNWELL, J. M. 2000. Transgenic approaches to crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 487-496

FONTES, E. G.; MELO, P. E. 1999. Avaliação de riscos na introdução no ambiente de plantas transgênicas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, v. 2, p. 815-822

JAMES, C. 2004. Preview: Global of Commercialized Biotech/GM Crops: 2004. **ISAAA Briefs**, n. 32. ISAAA: Ithaca, NY, p. 3-11

KINNEY, A. J. 1996. Development of genetically engineered soybean oils for food applications. **Journal of Food Lipids**, v. 3, p. 273-292

MOREIRA, M. A. 1999. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Soja**. Embrapa - Soja, Londrina-Paraná, p. 99-104

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. 2001. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Caderno de Ciência & Tecnologia**, v. 18, n. 1, p. 81-116

OSÓRIO J.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ J.; MANCHA M.; GARCÉS R. 1995. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. **Crop Science**, v. 35, p. 739-742

WANG, X. M.; HILDEBRAND, D. F. 1988. Biosynthesis and regulation of linoleic acid higher plants. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 26, p. 777-792

YADAV, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. 1996. In: VERMA, D. P. S., SHOEMAKER, R. C. (Eds) **Soybean genetics, molecular biology and biotechnology**. USA: CAB INTERNATIONAL, p. 127-188

CAPÍTULO 1

CONSTRUÇÃO DE CASSETES DE EXPRESSÃO PARA O SILENCIAMENTO DO GENE DA OLEOIL DESSATURASE EM SOJA

RESUMO

A transformação de plantas via silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) representa uma ferramenta poderosa aos melhoristas para manipular a composição de produtos da planta. Dessa forma, torna-se possível a alteração das proporções relativas dos ácidos graxos presentes na fração óleo de sementes oleaginosas, por meio de modificação genética de enzimas dessaturases. Esse PTGS pode ser induzido por construções *antisense*, *sense* (co-supressão) e por construções que expressam um RNA *hairpin* autocomplementar. O presente trabalho teve como objetivos isolar um fragmento de cDNA do gene *Fad2-1* que codifica a enzima oleoil dessaturase em soja e construir cassetes de expressão visando a co-supressão deste gene em embriões somáticos de soja transformados via *Agrobacterium tumefaciens*. Inicialmente, foi realizada a análise de expressão do gene *Fad2-1* por meio de RT-PCR, durante todo o período de enchimento do grão. Os resultados mostraram que ele é expresso em todos os estádios de desenvolvimento da semente. A expressão desse gene aumentou a partir dos estádios iniciais de desenvolvimento e diminuiu em sementes maduras. As amostras de cDNA sintetizadas por PCR usando *primers* específicos, contendo sítios de restrição para as enzimas *BgIII* e *BstEII*, foram purificadas e submetidas à reação de restrição para posterior clonagem em vetores pCAMBIA. Para as construções gênicas foram utilizados os vetores binários pCAMBIA 3301 e 1304 que também foram clivados com as mesmas enzimas de restrição. Esses vetores diferem no gene marcador de seleção em plantas. O pCAMBIA 3301 apresenta o gene *bar*, que permite a seleção com herbicidas contendo glufosinato de amônio como componente ativo e o pCAMBIA 1304 apresenta o gene *hpt*, que permite a seleção com o antibiótico higromicina. Após a transformação de células competentes de *Escherichia coli*, as colônias recombinantes foram detectadas por meio de PCR e os clones isolados foram analisados por reações de restrição enzimática, que resultaram na liberação de um fragmento de cerca de 1 kb. Após o seqüenciamento

de ambos os clones e comparação com seqüências depositadas em banco de dados, foi determinado 965 pb da seqüência de cDNA clonado, apresentando alta homologia com o cDNA total de soja. Posteriormente, ambos os clones foram eletroporados para *A. tumefaciens* e a construção clonada no pCAMBIA 3301 foi utilizada nos ensaios de transformação genética.

1. INTRODUÇÃO

O silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) é um mecanismo de degradação de RNA seqüência-específica herdado em eucariotos, que tem sido utilizado com sucesso para o silenciamento da expressão de genes e produção de características desejáveis em plantas (Singh et al., 2000; Vaucheret et al., 2001).

O PTGS pode ser induzido em plantas por meio do uso de construções *antisense*, *sense* (co-supressão) e, mais recentemente, por construções que expressam um RNA *hairpin* autocomplementar (Kiney, 1996; Singh et al., 2000; Wesley et al., 2001; Liu et al., 2002a). A vantagem principal dessa técnica é a habilidade para evitar efeitos indesejáveis do silenciamento total do gene-alvo, restringindo a supressão gênica ao tecido específico ou órgão na planta, por meio da utilização de um promotor tecido-específico para dirigir a construção gênica (Kinney, 1996; Buhr et al., 2002; Tang and Galili, 2004).

Independente da forma que o transgene é introduzido na planta, o PTGS é induzido por um dsRNA (RNA dupla-fita), que pode ativar diretamente a via básica do RNAi (RNA de interferência) pela expressão de um dsRNA na forma de repetições-invertidas do gene de interesse (hpRNA) ou a partir da ação de uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) que sintetiza um dsRNA a partir de transgenes *sense* ou *antisense* (Novina e Sharp, 2004; Kusaba, 2004).

No processo de silenciamento, o dsRNA é clivado dentro da célula em pequenos fragmentos de 21-23 nucleotídeos, chamados de pequenos RNAs de interferência (siRNAs) pela enzima Dicer, homóloga à RNase III de *E. coli* e que apresenta domínios de ligação a dsRNAs e helicases. Esses siRNAs são correspondentes às fitas *sense* e *antisense* do RNA alvo e se associam a proteínas celulares formando o complexo de indução de silenciamento (RISC – *RNA Interference Specificity Complex*). Uma helicase presente no complexo abre a dupla fita dos siRNAs, de forma que a fita *antisense* do duplex guia o complexo até o mRNA, degradando-o (Waterhouse e Helliwell 2002; Kusaba, 2004).

Para o melhoramento de espécies vegetais, o PTGS induzido por construções hpRNA apresenta vantagens em relação às construções *antisense* ou co-supressão em termos de sua eficiência e estabilidade (Wesley et al., 2001; Sasaki e Christou, 2004).

As possibilidades de melhoramento têm sido ampliadas por extensiva manipulação e identificação de genes, sequenciamento do genoma de plantas modelo e o desenvolvimento de tecnologias de transferência de genes. Grandes esforços têm sido empregados para utilizar a engenharia genética de vias metabólicas para alterar os nutrientes de plantas. Isso depende do conhecimento detalhado dessas vias metabólicas em plantas e suas enzimas constituintes.

Em soja, a biossíntese de ácidos graxos inicia-se com a formação dos ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e oléico (C18:1) e uma vez sintetizados nos plastídios, eles podem ser exportados para o citosol associados à proteína carreadora de grupos acil (ACP) e serem utilizados na produção do óleo de reserva e lipídios estruturais de membranas extracloroplastídicas (Yadav, 1996; Los e Murata, 1998).

A biossíntese de ácido linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3) é catalisada pelas enzimas oleoil e linoleoil dessaturases, respectivamente. O principal substrato dessas dessaturases microsossomais é a fosfatidilcolina, sendo a via do retículo endoplasmático predominante durante a biossíntese do óleo em sementes em desenvolvimento e em outros tecidos não-fotossintetizantes (Yadav, 1996).

Além das dessaturases microsossomais, as enzimas colinafosfotransferase (CPT) e lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT) também atuam na biossíntese de lipídios no retículo endoplasmático. A CPT tem a função de converter reversivelmente DAG (diacilglicerol) em fosfatidilcolina para a formação de lipídios de membrana e a LPCAT tem a função de repor o estoque de ácidos graxos polinsaturados do *pool* de acil-CoA no citoplasma (Yadav, 1996).

Em relação aos ácidos graxos polinsaturados, os níveis de C18:2 e de C18:3 no óleo dependem das taxas de biossíntese e de suas disponibilidades para a biossíntese do óleo. Essa disponibilidade de ácidos graxos polinsaturados para a incorporação em triacilgliceróis de reserva pode se dar por meio de dois mecanismos: 1) reação reversível da CPT, a qual converte fosfatidilcolina contendo ácidos graxos em DAG, que por sua vez, pode ser utilizado para a biossíntese de óleo via diacilglicerol aciltransferase e 2)

reação reversível da LPCAT levando ao enriquecimento do *pool* de acil-CoA com ácidos graxos polinsaturados para uso na biossíntese do óleo (Yadav, 1996).

No caso do metabolismo de lipídios, o isolamento de um gene chave que dirige a síntese de um ácido graxo particular, pode fornecer o meio para se alterar, geneticamente, espécies oleaginosas de interesse econômico.

A composição dos ácidos graxos da fração óleo pode ser modificada por expressão de uma seqüência de DNA específica de semente que é complementar a parte ou a todo mRNA do gene-alvo envolvido na biossíntese de ácidos graxos. A seqüência de DNA introduzida é inserida no genoma de tal forma que a sua transcrição leve à formação de uma molécula de dsRNA. Esse evento desencadeia a degradação do dsRNA e também de cópias de mRNAs complementares ao gene-alvo endógeno. Isso leva ao bloqueio da síntese da proteína correspondente, neste caso uma enzima da biossíntese de ácido graxo, alterando assim, a composição de ácidos graxos presentes na fração óleo (Kinney et al., 2002; Liu et al., 2002a).

De acordo com Alonso e Maroto (2000), a expressão do transgene em tecido específico é de fundamental importância, pois a expressão constitutiva de alguns transgenes de ácidos graxos tem sido prejudicial para o desempenho do organismo, especialmente em certas condições, como por exemplo, a capacidade da planta em resistir a baixas temperaturas. Nessas condições, a maioria das espécies vegetais poderia aumentar a síntese de ácidos graxos polinsaturados, especialmente 18:3, para aumentar a fluidez das membranas. A diminuição da fluidez das membranas provavelmente acarreta perda de sua permeabilidade e diminuição da atividade de enzimas associadas a ela. Pelo fato das dessaturases apresentarem formas microsossomais e plastidiais, o efeito pode ser amenizado por silenciamento semente-específico, produzindo alterações da composição de ácidos graxos apenas em lipídios de reserva da fração óleo.

Kinney (1996) obteve linhagens de soja transgênicas usando construções *sense* e/ou *antisense* com cDNA do gene que codifica a enzima ω -6 dessaturase microsossomal, semente-específica e do gene que codifica a enzima ω -3 dessaturase microsossomal.

Atualmente, a *DuPont Agricultural Products* é a detentora dessas linhagens de soja transgênicas (G94-1, G94-19 e G168) produzidas por supressão do gene *Fad2-1*, cujo óleo apresenta um total de ácidos graxos polinsaturados menor que 5% e conteúdo

de ácido oléico que excede a 80%. Pesquisas mostraram que essas linhagens não exibem propriedades patogênicas para a planta, são improváveis de causar danos caso cruzem com outras plantas ou espécies nativas e apresentam o seu produto bruto (óleo) semelhante ao da soja convencional, não exigindo nenhum tipo de processamento especial.

As técnicas de melhoramento tradicionais têm sido utilizadas para produzir variedades de soja com alto conteúdo de ácido oléico. Contudo, a instabilidade ambiental desse fenótipo constitui-se em um grande problema. As variedades obtidas produzem óleos com conteúdo muito variado de oléico (35-55%). As linhagens transgênicas, por outro lado, produzem óleo com cerca de 82-85% de ácido oléico, independente do local e condição climática de cultivo (Kinney, 1994).

Portanto, a transformação de plantas via silenciamento gênico representa uma ferramenta poderosa aos melhoristas para manipular a composição de produtos de plantas. Em sementes oleaginosas, isso estendeu significativamente a capacidade para alcançar alterações principais nas proporções relativas dos ácidos graxos presentes no óleo, com a finalidade de melhorar o seu valor nutricional sem comprometer sua funcionalidade.

A introdução em grande escala destes óleos modificados tem o potencial de fornecer à saúde pública benefícios significativos para diminuir o nível de LDL-colesterol no sangue e conseqüentemente, reduzir a incidência de doenças cardiovasculares. Esses óleos com alto valor nutricional seriam um dos primeiros produtos alimentícios a serem modificados geneticamente com o objetivo de fornecer benefícios ao consumidor, além de constituir um exemplo de que alimentos derivados de espécies GMs podem ser obtidos para benefícios agrícolas (Liu et al., 2002b).

O presente trabalho teve como objetivos isolar um fragmento de cDNA do gene *Fad2-1* que codifica a enzima oleoil dessaturase em soja e construir cassetes de expressão visando a sua co-supressão em embriões somáticos de soja transformados via *A. tumefaciens*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

Foram utilizadas sementes de soja da variedade comercial CAC-1 cultivada em casa de vegetação sob aquecimento controlado e fotoperíodo de 14 horas de luz.

As sementes foram coletadas em um período de aproximadamente três meses (plantio escalonado), separadas em oito estádios de desenvolvimento, que compreenderam praticamente todo o período de enchimento do grão, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Esses estádios foram determinados com base no peso de matéria fresca da semente: 1^o – 0 a 75 mg; 2^o – 76 a 150 mg; 3^o – 151 a 225 mg; 4^o – 226 a 300 mg; 5^o – 301 a 375 mg; 6^o – 376 a 450 mg; 7^o – 451 a 525 mg e 8^o – representado por sementes maduras (Lanna, 2002).

2.2 Purificação de RNA total e RT-PCR

A extração de RNA total das sementes foi conduzida de acordo com Sambrook et al. (1989), com algumas adaptações ao protocolo original. Todas as etapas de extração do RNA total foram realizadas a 4°C e em condições livres de RNases.

Foram macerados cerca de 4 g de sementes na presença de nitrogênio líquido e a cada amostra foram adicionados 18 mL de tampão NTES (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5; EDTA 1mM e SDS 1%), 6 mL de fenol e 6mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados vigorosamente em agitador vórtex por 15 minutos e centrifugados a 4°C por 10 minutos a 8.000 g. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e nele foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 2M e 2 volumes de etanol 96% e, em seguida, a mistura foi incubada por 1 hora a -20°C. Foi realizada uma nova centrifugação a 8.000 g por 15 minutos e o precipitado resultante foi lavado com etanol 70% e ressuscitado em 2,5 mL de água DEPC (água deionizada tratada com dietil pirocarbonato). Após uma centrifugação de 5 minutos a 5.000 g, o

sobrenadante foi transferido para novo tubo onde foram adicionados 2,5 mL de cloreto de lítio 4M. O tubo foi incubado por cerca de 12 horas a 4°C para promover a precipitação do RNA. A amostra foi então centrifugada a 8.000 g por 30 minutos e o precipitado foi ressuscitado em 1,8 mL de água DEPC e acrescido de 0,2 mL de acetato de sódio 2M e 3,6 mL de etanol 96%. Após precipitação por cerca de 6 horas a -20°C, a solução foi centrifugada a 8.000 g por 10 minutos e em seguida, o precipitado foi lavado em etanol 70% e depois de seco, ressuscitado em água DEPC.

As amostras de RNA total foram quantificadas a 260 nm e a sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de corrida TBE 1X (Tris-borato 90mM e EDTA 1mM, pH 8,0) contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas do RNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com o sistema de fotodocumentação *Eagle Eye II* (STRATAGENE).

Para as reações de RT-PCR todas as amostras foram tratadas com *RQ1 RNase-free DNase* (PROMEGA), conforme as recomendações do fabricante. As amostras foram incubadas em tampão da DNase 1X (Tris-HCl 40 mM, pH 8,0; MgSO₄ 10 mM e CaCl₂ 1 mM) por 45 minutos a 37°C e extraídas com igual volume de fenol e de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) após centrifugação a 11.000 g por 2 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e realizada uma outra extração com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa foi submetida à precipitação com acetato de sódio 3M e etanol 96% por 1 hora a -20°C e depois centrifugada a 12.000 g por 15 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e ressuscitado em água DEPC. As amostras foram novamente quantificadas em espectrofotômetro.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando o kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis System* (INVITROGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA total (3 µg) foram incubadas com 1 µL de oligo (dT)₁₂₋₁₈ a 70°C por 10 minutos e em seguida, incubadas no gelo. Foram adicionados tampão de PCR 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 5 mM, os quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,5 mM cada e DTT 5 mM, e estas foram incubadas a 42°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionadas 200 U da enzima transcriptase reversa e as amostras foram incubadas a 42°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos. Após a síntese da primeira fita de cDNA, o RNA foi degradado

pela adição de 2 U de RNase H sob incubação a 37°C por 20 minutos. Para cada amostra foi feito um controle negativo que continha todos os reagentes menos a transcriptase reversa.

Inicialmente, as reações de síntese da segunda fita e amplificação por PCR foram realizadas com um par de *primers* de actina de soja (F 5' – CCC CTC AAC CCA AAG GTC AAC AG – 3' e R 5' – GGA ATC TCT CTG CCC CAA TTG TG – 3') com a finalidade de verificar possíveis contaminações com DNA genômico e normalizar a quantidade de cDNA molde.

2.3 Desenho de *primers* e isolamento de fragmento do gene da ω 6-dessaturase

Os oligonucleotídeos específicos foram desenhados a partir de uma seqüência de nucleotídeos do cDNA total correspondente ao gene que codifica a enzima microsomal oleoil dessaturase de *Glycine max* (número de acesso L43920), depositada em banco de dados público – *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI).

O programa utilizado para o desenho dos oligonucleotídeos foi o *Primer3 Input Program* (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>). Foi desenhado um par de *primers* contendo em suas extremidades 5' os sítios de restrição para as enzimas *Bgl*III e *Bst*EII. As seqüências dos *primers* estão mostradas abaixo:

Dessaturase F: GGC **AGA TCT** CAT CGA ATA ATA CAA GCC ACT AGG

Dessaturase R: **GGT GAC** CGA AAG CTA TAA GCA GAA CAC TTT CC

As letras em negrito nos *primers forward* e *reverse* indicam os sítios de restrição das enzimas *Bgl*III e *Bst*EII, respectivamente.

O fragmento do gene foi isolado por meio de reações de síntese da segunda fita de cDNA sintetizado a partir do RNA total do segundo estágio de desenvolvimento. Cada reação de amplificação de 25 μ L continha 2 μ L da reação de síntese da primeira fita, Tris-HCl 10 mM pH8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,0 mM, os quatro dNTPs, 0,2 mM cada, 0,8 μ M de *primers* e 1 U de Taq DNA polimerase (PROMEGA).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador *Perkin-Elmer*, modelo 9600 (APPLIED BIOSYSTEMS). Os ciclos de amplificação foram constituídos por uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos constituídos por: uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento dos *primers* ao cDNA molde a 56°C por 1 minuto e 30 segundos e uma etapa de extensão a 72°C por 2 minutos. Posteriormente, foi realizada uma última etapa de extensão a 72°C por 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 1X contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas do DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

Após a confirmação da amplificação, os produtos da reação de PCR foram purificados com o kit *QIAquick PCR Purification (Qiagen)* e utilizados em reações de restrição enzimática com as enzimas *Bgl*III e *Bst*EII.

A clivagem inicial dos produtos de PCR foi realizada com 5 U da enzima *Bgl*III, cerca de 500 ng de PCR e tampão de clivagem 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; MgCl₂ 10 mM e NaCl 100 mM) a 37°C por 1 hora. A reação foi parada a 70°C por 5 minutos e submetida à precipitação por cerca de 12 horas com 10% de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de etanol 96% gelado. Após centrifugação a 11.000 g por 15 minutos a 4°C, o DNA precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em água. Foi realizada a segunda reação de restrição com 5 U da enzima *Bst*EII e tampão de clivagem 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; MgCl₂ 10 mM e NaCl 50 mM) a 60°C por 1 hora. A reação foi parada a 70°C por 5 minutos e analisada em gel de agarose 0,7%. Os fragmentos clivados foram purificados do gel com o kit *QIAquick Gel Extraction (QIAGEN)* e utilizados para a clonagem nos vetores pCAMBIA para construção dos cassetes de expressão.

2.4 Clonagem em vetores pCAMBIA

A construção dos cassetes de expressão foi realizada nos vetores binários pCAMBIA 3301 e 1304. O tamanho do vetor 3301 é de 11.307 pb e o seu T-DNA

(5.077 pb) apresenta o promotor 35SCaMV (vírus-do-mosaico-da-couve-flor) dirigindo a expressão do gene que codifica a enzimas β -glucuronidase (GUS), o terminador de transcrição do gene que codifica a enzima nopalina sintase (NOS), além do gene *bar* para seleção em plantas. Este gene codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase que confere resistência a herbicidas contendo glufosinato de amônio como composto ativo.

O tamanho do vetor 1304 é de 12.361 pb e o seu T-DNA (6.128 pb) apresenta o promotor 35SCAM, uma fusão com dois genes repórter, um da proteína verde fluorescente (GFP) e outro da β -glucuronidase (GUS), o terminador da nopalina sintase (NOS) e o gene *hpt*, que codifica a enzima higromicina fosfotransferase, utilizado para a seleção em plantas com o antibiótico higromicina.

Os vetores pCAMBIA também apresentam o gene *nptII*, que codifica a enzima neomicina fosfotransferase, utilizado para a seleção em bactérias com o antibiótico canamicina.

Células de *E. coli* contendo os vetores pCAMBIA 3301 e pCAMBIA 1304 foram inoculadas em meio LB contendo canamicina 50 μ g/mL e incubadas por cerca de 12 horas a 37°C e 180 rpm em agitador orbital (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC). A extração de DNA plasmidial foi feita utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN).

A clivagem inicial do DNA plasmidial foi realizada com 5U da enzima *BstEII* a 60°C por 1 hora. Em seguida, a reação foi parada a 70°C por 5 minutos. Foram adicionados 50 mM de cloreto de sódio e 5U da enzima *BglIII* e a reação foi incubada a 37°C por 1 hora e em seguida, parada a 70°C por 5 minutos. Após a confirmação da clivagem em gel de agarose 0,7%, o DNA plasmidial foi submetido aos passos de desproteínização e desfosforilação. A desproteínização do DNA plasmidial foi realizada por adição de fenol:clorofórmio (1:1), centrifugação a 11.000 g por 5 minutos a 4°C e precipitação da fase superior com 2,5 volumes de etanol 96% e 10% de acetato de sódio 3M por 40 minutos a -20°C. Após centrifugação a 11.000 g por 15 minutos a 4°C, o precipitado foi ressuscitado em 45 μ L de água e desfosforilado com 5U da enzima fosfatase alcalina. A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos, sendo posteriormente adicionados 5 μ L de EDTA 0,5 M, 2,5 μ L de SDS 10% e 2,5 μ L de proteinase K 20 μ g/ μ L e incubada novamente a 56°C por 30 minutos. Após a desfosforilação foi

realizada uma nova etapa de desproteíntização e o DNA foi ressuspendido em 10 µL de TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0 e EDTA 1mM, pH 8,0).

As reações de ligação foram feitas para um volume final de 10 µL, utilizando 1 U da enzima T4 DNA ligase e a relação de 5:1 de DNA (50 ng) e vetor (10 ng).

2.5 Transformação de *E. coli* e análise de transformantes

As células de *E. coli* DH5α foram transformadas por choque térmico segundo Sambrook et al. (1989). Foram adicionados 5 µL da reação de ligação a 200 µL de células ultracompetentes em um microtubo e este foi incubado por 30 minutos no gelo. Após o choque térmico a 42°C por 45 segundos, as células foram mantidas no gelo por 2 minutos e, em seguida, foram adicionados 800 µL de meio SOC (extrato de levedura 0,5%, triptona 2%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM e glicerol 10%). Após a incubação a 37°C por uma hora a 150 rpm, as células foram concentradas por centrifugação a 13.000 g por 1 minuto, ressuspendidas em 100 µL de SOC e plaqueadas em meio LB sólido contendo canamicina 50 µg/µL. As placas foram incubadas por cerca de 12 horas a 37°C.

A análise dos transformantes foi feita por meio de extração de DNA plasmidial de colônias isoladas. As amostras de DNA plasmidial foram utilizadas em reações de PCR com os *primers* para oleoil dessaturase e também em reações de restrição enzimática. Após a confirmação de clones positivos, as amostras foram seqüenciadas e as bactérias aliqüotadas em glicerol 40% e armazenadas a -80°C.

2.6 Seqüenciamento do DNA

O seqüenciamento dos clones recombinantes foi realizado em seqüenciador automático ABI PRISM 377 *Genetic Analyzer* (PE APPLIED BIOSYSTEMS), utilizando o kit ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*. As

reações basearam-se na técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs), descrita por Sanger et al. (1977).

As reações foram conduzidas por meio de amplificação linear por PCR, utilizando os seguintes iniciadores: *primer* reverso da nopalina sintase “NOS-R” (TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA), os *primers* “dessaturase F” e “dessaturase R” usados para isolamento do cDNA e *primers* desenhados para regiões internas do gene (interno F: 5' TTC TCT TCT CGT CAC ACT CAC 3' e interno R: 5' CCC CGA TCG TTC AAA C 3'), a partir do seqüenciamento parcial dos clones. Além disso, também foram realizados os seqüenciamentos dos produtos de PCR do DNA plasmidial usando os *primers* “dessaturase F” e “dessaturase R” e também o seqüenciamento dos fragmentos de restrição dos clones isolados. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis no *GenBank* (*blast analysis*) e posteriormente alinhadas no programa *Clustal W*.

2.7 Transformação de *A. tumefaciens* por eletroporação

Células de *A. tumefaciens* LB 4404 (GIBCO) foram crescidas em meio MYA sólido (cloreto de sódio 85,5 mM, sulfato de amônio 15 mM, manitol 44 mM, 250 mg de extrato de levedura, 25 mg de caseína e 16 g/L de ágar, pH 6,6) (Tepfer e Casse-Delbart, 1987), contendo estreptomicina 100 mg/L. A placa foi incubada por aproximadamente 30 horas a 28°C. Colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio MYA líquido contendo estreptomicina 100 mg/L e mantidas sob agitação por cerca de 12 horas a 28°C e 220 rpm. Quando as células atingiram uma OD de 0,5 a 1, foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos a 4°C. O precipitado formado foi lavado quatro vezes com volume igual de água deionizada autoclavada e gelada. Após esse tratamento, as células foram ressuspensas em 2 mL de meio GYT (glicerol 10%, extrato de levedura 0,125% e triptona 0,25%) e aliqüotadas em volume de 40 µL. As aliqüotas foram congeladas a -80°C.

Para eletroporação, foram utilizadas cubetas de 0,2 cm de espessura contendo 40 µL de células descongeladas e 1 µL de DNA plasmidial diluído. A eletroporação ocorreu

nas condições de 2.500 volts, 25 mFD de capacitância e 200 OHM's (*Gene Pulser* da BIO-RAD). Logo após a transformação, foi adicionado 1 mL de meio MYA às células e estas ficaram sob agitação a 150 rpm por 2 horas a 28°C. As células foram concentradas por centrifugação a 9000 g por 30 segundos e ressuspensas em 100 µL de meio MYA. Foram plaqueados 10 µL de células em meio MYA contendo estreptomicina 100 mg/L e canamicina 50 mg/L. As placas foram incubadas por três dias a 28°C. Posteriormente, foram selecionadas colônias de *Agrobacterium* transformadas para a extração do DNA plasmidial e PCR para confirmação da clonagem.

Para a extração do DNA plasmidial, colônias isoladas foram inoculadas em meio MYA líquido seletivo e incubadas a 28°C por 12 a 16 horas a 150 rpm. As células foram centrifugadas a 9000 g por 2 minutos. O precipitado foi ressuspendido em 100 µL de solução I (Tris-HCl 25 mM pH 8, glicose 50 mM, EDTA 10 mM e lisozima 50 mg/mL) e as amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL da solução II (SDS 10% e NaOH 0,2 M) e os tubos foram invertidos 8 vezes e incubados 5 minutos no gelo. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução III (acetato de sódio 5 M pH 4,8) e os tubos foram incubados por mais 5 minutos no gelo. As amostras foram centrifugadas a 9000 g por 5 minutos. Aproximadamente 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, adicionados 400 µL de fenol:clorofórmio (1:1), agitados em vórtex por 2 minutos e submetidos a uma nova centrifugação a 9000 g por 5 minutos. Esse passo de desproteinização foi repetido duas vezes. O sobrenadante resultante foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol 96% gelado e as amostras foram incubadas por 2 horas a -20°C. Após este período, foi realizada uma centrifugação a 9000 g por 10 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70% e após estar completamente seco, foi ressuspendido em 20 µL de TE e 1 µL de RNase 10 mg/ml e incubado a 37°C por 30 minutos. Os ensaios para confirmação da clonagem seguiram os procedimentos já descritos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes do isolamento do fragmento do gene *Fad2-1* para a construção dos cassetes de expressão, foram realizados ensaios de RT-PCR para a análise da expressão deste gene em sementes de soja correspondentes a todo o período de enchimento do grão (Figura 1). O tamanho do cDNA amplificado correspondeu ao tamanho esperado para o produto amplificado pelos *primers* sintetizados para este trabalho (1,39 kb).

Embora a utilização da técnica de RT-PCR como método para análise quantitativa de expressão gênica seja discutível (Bustin, 2000), este foi o método de escolha devido à facilidade da sua execução. Como controle interno foi utilizado o gene de actina de soja que apresenta expressão constitutiva.

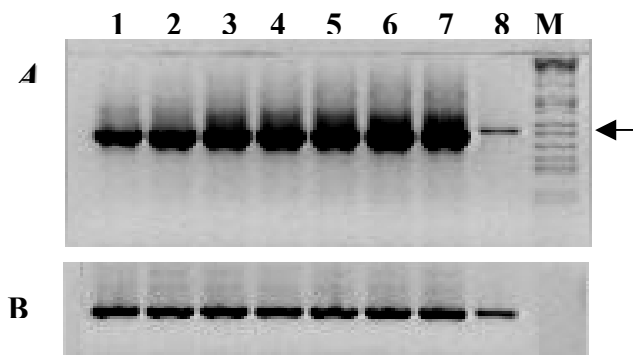


Figura 1 - Ensaio de RT-PCR para o gene da enzima oleoil dessaturase durante o desenvolvimento de sementes de soja. (A) representa as amostras de cDNA amplificadas para o gene *Fad2-1* e (B), o controle interno com actina. Os números de 1 a 8 correspondem aos oito estádios de desenvolvimento da semente. A seta indica o tamanho do fragmento amplificado (1,39 kb). (M) refere-se ao DNA do fago λ clivado com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI e *Hind*III, utilizado como marcador de tamanho.

A análise por RT-PCR mostrou que o gene *Fad2-1* é expresso em todos os estádios de desenvolvimento da semente, com um padrão de expressão crescente a partir dos estádios iniciais de desenvolvimento e diminuição no nível de transcritos em

sementes maduras. Neste estágio existe uma baixa expressão de genes e grande acúmulo de produtos de reserva sintetizados durante o desenvolvimento do grão.

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os obtidos por Heppard et al. (1996), que verificaram que a expressão do gene *Fad2-1* em soja aumenta durante o desenvolvimento da semente, período que corresponde a biossíntese de lipídio de reserva.

Esses autores analisaram o padrão de expressão dos genes *Fad2-1* e *Fad2-2* em folhas, caule, raiz e diferentes estágios de desenvolvimento da semente de soja. Os resultados mostraram que os dois genes são expressos durante o desenvolvimento da semente. No entanto, o nível de expressão de *Fad2-2* foi maior que o de *Fad2-1* nos estágios iniciais de desenvolvimento, quando grandes quantidades de lipídios de membrana são sintetizadas. Contudo, o nível de transcritos de *Fad2-1* rapidamente aumentou durante o desenvolvimento embrionário, apresentando um pico na fase de maturação e gradualmente diminuiu quando a semente se tornava mais madura. Portanto, a expressão de *Fad2-1* coincide com a biossíntese de ácidos graxos e deposição de óleo durante o desenvolvimento de sementes.

A clonagem do fragmento correspondente ao cDNA do gene de interesse foi feita a partir de cDNA de sementes do segundo estágio de desenvolvimento. As amostras de cDNA sintetizadas por PCR foram purificadas e submetidas à reação de restrição enzimática com *Bgl*III e *Bst*EII, para posterior clonagem em vetores pCAMBIA. Apesar deste cDNA apresentar um sítio interno da enzima *Bst*EII, na posição 417 de sua sequência, em todos os ensaios de restrição enzimática foi feita clivagem total do fragmento de cDNA, na presença de cada uma das enzimas, já que a clivagem parcial não foi capaz de impedir ou diminuir a eficiência de clivagem deste sítio interno.

Após a transformação de células competentes de *E. coli* com o vetor pCAMBIA 3301, as colônias recombinantes foram detectadas por meio de PCR, usando *primers* para a oleoil dessaturase (Figura 2A). Oito colônias das dez analisadas apresentaram o fragmento clonado. O clone positivo correspondente ao DNA plasmidial amplificado na canaleta 3 foi denominado de clone 1.30. Após a confirmação por PCR, foi realizada reação de restrição enzimática com o DNA plasmidial deste clone, utilizando as

enzimas *Bg*III e *Bst*EII para analisar o tamanho do fragmento clonado (Figura 2B). De acordo com este resultado, foi clonado um fragmento de cerca de 1 kb, indicando ser um fragmento do gene da oleoil dessaturase. Esse resultado foi confirmado por seqüenciamento.

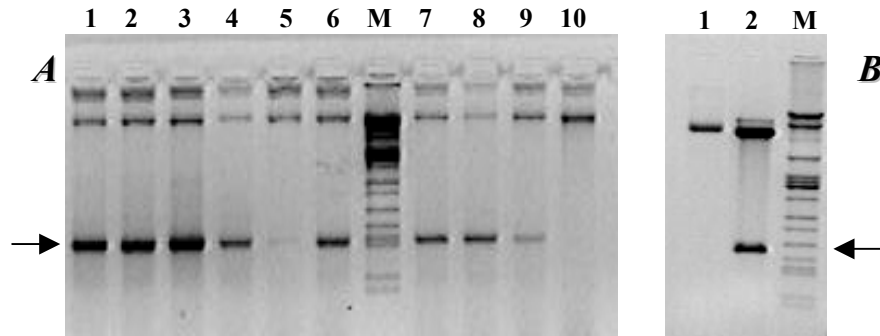


Figura 2 - Ensaio para a confirmação da clonagem do fragmento de Fad2-1 no vetor pCAMBIA 3301. (A) representa a reação de PCR com DNA plasmidial de colônias transformadas e (B), a restrição enzimática do clone 1.30. Os números 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, e 9 em A correspondem aos DNAs amplificados a partir de colônias positivas. Os números 1 e 2 em B representam, respectivamente, o clone 1.30 não clivado e clivado com *Bg*III e *Bst*EII. A seta em A corresponde a amplificação de um fragmento de cerca de 800 pb e a seta em B, a um fragmento excisado de aproximadamente 1 kb. M refere-se ao DNA do fago λ clivado com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI e *Hind*III, utilizado como marcador de tamanho.

Posteriormente à obtenção deste clone, foi realizada a transformação de células de *E. coli* com o vetor pCAMBIA 1304, seguindo o mesmo processo para a análise dos transformantes (Figura 3A). Todas as colônias analisadas indicaram a presença do fragmento clonado e o clone correspondente ao DNA plasmidial amplificado na canaleta 4 foi denominado de clone dessaturase A4 (dessat A4). A reação de restrição enzimática deste clone também liberou um fragmento de cerca de 1 kb (Figura 3B).

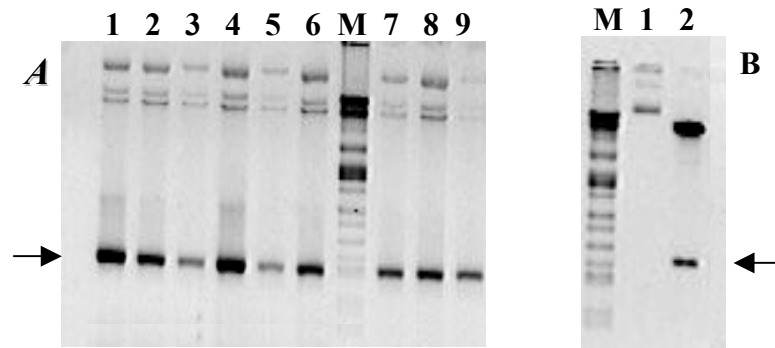


Figura 3 - Ensaio para a confirmação da clonagem do fragmento de Fad2-1 no vetor pCAMBIA 1304. (A) representa a reação de PCR com DNA plasmidial de colônias transformadas e (B), a restrição enzimática do clone dessat A4. Os números de 1 a 9 em A correspondem aos DNAs amplificados a partir de colônias positivas. Os números 1 e 2 em B representam, respectivamente, o clone dessat A4 não clivado e clivado com *Bg*III e *Bst*EII. A seta em A corresponde a amplificação de um fragmento de cerca de 800 pb e a seta em B, a um fragmento excisado de aproximadamente 1 kb. M refere-se ao DNA do fago λ clivado com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI e *Hind*III, utilizado como marcador de tamanho.

A Figura abaixo mostra as representações esquemáticas dos cassetes de expressão clonados nos vetores pCAMBIA.

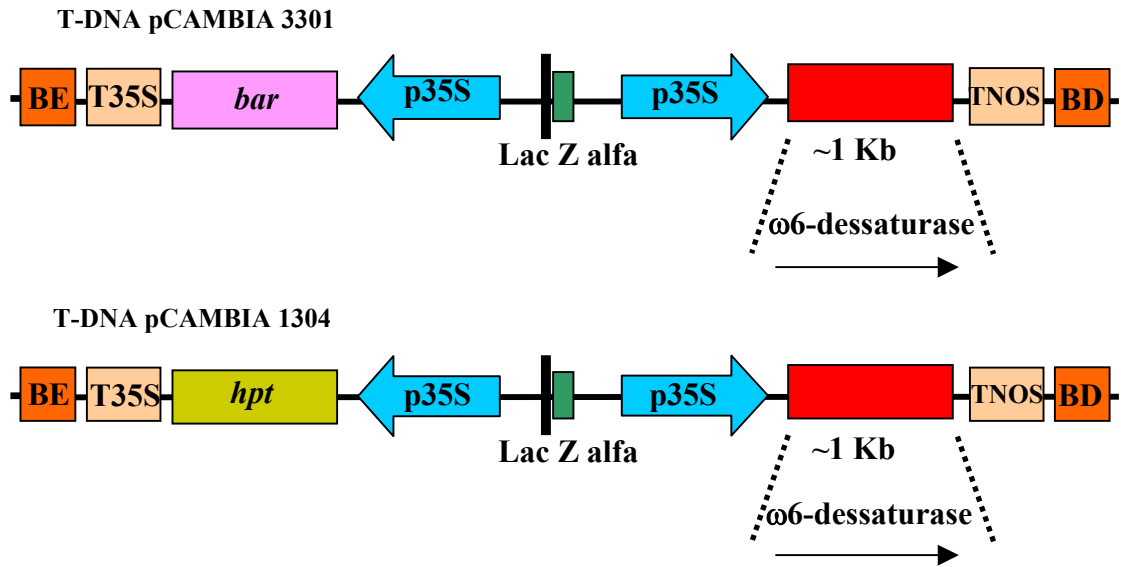


Figura 4 - Representação esquemática das construções gênicas com o fragmento do gene Fad2-1 em vetores pCAMBIA. São mostrados apenas os T-DNAs dos vetores pCAMBIA 3301 e 1304. BE - borda esquerda; BD - borda direita; p35S - promotor 35S; T35S – terminador poli A de 35S; TNOS – terminador do gene da nopalina sintase; *bar* – gene *bar* e *hpt* – higomicina. A seta indica a orientação da clonagem.

Após os ensaios de restrição enzimática, ambos os clones foram submetidos a várias reações de seqüenciamento para confirmar se a seqüência clonada se referia ao gene da oleoil dessaturase microssomal de soja e determinar, com maior segurança, o tamanho do fragmento clonado.

As seqüências obtidas foram analisadas no programa *Seqman* (DNASTAR Inc.) e comparadas com as seqüências depositadas no *GenBank*, confirmando que o fragmento de cDNA clonado realmente correspondia ao cDNA do gene Fad2-1 de soja. A Figura 5 mostra o resultado do alinhamento entre a seqüência clonada nos vetores pCAMBIA e a seqüência de cDNA total do gene Fad2-1 da oleoil dessaturase microssomal de soja.

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
CCATATACTAATATTTGCTTGATTGATAGCCCCTCCGTTCCCAAGAGTATAAAACTGCA

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
TCGAATAATACAAGCCACTAGGCATGGGTC TAGCAAAGGAAACAACAATGGGAGGTAGAG

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
GTCGTGTGGCCAAAGTGAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTCTCAAGGGTCCAAACACAA

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
AGCCACCATTCACTGTGGCCAACTCAAGAAAGCAATCCACCACACTGCTTTCAGCGCT

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
CCCTCCTCACTTCATTCTCCTATGTTGTTTATGACCTTTCATTTGCCTTCATTTTCTACA

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
TTGCCACCACCTACTTCCACCTCCTTCTCAACCCTTTTCCCTCATGTCATGGCCAATCT

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
ATTGGGTTCTCCAAGTTGCCTTCTCACTGGTGTGTGGGTGATTGCTCACGAGTGTGGTC
-----GGTC

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
ACCATGCCTTCAGCAAGTACCAATGGGTTGATGATGTTGTGGGTTTGACCCTTCACTCAA
ACCATGCCTTCAGCAAGTACCCATGGGTTGATGATGTTGTGGGTTTGACCCTTCACTCAG
***** * *****

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
CACTTTTAGTCCCTTATTTCTCATGGAAAATAAGCCATCGCCGCCATCACTCCAACACAG
CACTTTTAGTCCCTTATTTCTCATGGAAAATAAGCCATCGCCGCCACCCTCCAACACGG
***** * *****

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
GTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTGTTGTCCAAAACCAAATCCAAAGTTGCATGGTTTT
GTTCCCTTGACCGTGATGAAGTGTGTTGTCCAAAACCAAATCCAAAGTTGCATGGTACA

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
CCAAGTACTTAAACAACCCTCTAGGAAGGGCTGTTTCTCTTCTCGTCACACTCACAAATAG
CCAAGTACCTGAACAACCCTCTAGGAAGGGCTGCTTCTCTCTCATCACACTCACAAATAG
***** * *****

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
GGTGGCCTATGTATTTAGCCTTCAATGTCTCTGGTAGACCCTATGATAGTTTTGCAAGCC
GGTGGCCTTTGTATTTAGCCTTCAATGTCTCTGGCAGACCCTATGATGGTTTTGCTAGCC
***** * *****

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
ACTACCACCCTTATGCTCCCATATATTCTAACCGTGAGAGGCTTCTGATCTATGTCTCTG
ACTACCACCCTTATGCTCCCATATATTCAAATCGTGAGAGGCTTTTGATCTATGTCTCTG
***** * *****

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
ATGTTGCTTTGTTTTCTGTGACTTACTCTCTACCGTGTGCAACCCTGAAAGGGTTGG
ATGTTGCTTTGTTTTCTGTGACTTACTTGTCTCTACCGTGTGCAACTATGAAAGGGTTGG
***** * *****

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
TTTGGCTGCTATGTGTTTATGGGGTGCCTTTGCTCATGTTGAACGGTTTTCTGTGACTA
TTTGGCTGCTATGTGTTTATGGGGTGCCTTTGCTCATGTTGAACGGTTTTCTGTGACCA
***** * *****

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
TCACATATTTGCAGCACACACTTTGCCTTGCCCTCATTACGATTCATCAGAATGGGACT
TCACATATCTGCAGCACACACTATGCCTTGCCCTCACTATGATTATCAGAATGGGACT
***** * *****

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
GGCTGAAGGGAGCTTTGGCAACTATGGACAGAGATTATGGGATTCTGAACAAGGTGTTTC
GGCTGAAGGGAGCTTTGGCAACTATGGACAGAGATTATGGGATTCTGAACAAGGTGTTTC
***** * *****

cDNAtotalFAD2-1
CloneFAD2-1
ATCACATAACTGATACTCATGTGGCTCACCATCTCTCTTCTCTACAATGCCACATTACCATG
ACCACATAACTGATACTCATGTGGCTCACCATCTCTCTTCTCTACAATGCCACATTACCATG
* *****

```

cDNAtotalFAD2-1      CAATGGAGGCAACCAATGCAATCAAGCCAATATTGGGTGAGTACTACCAATTTGATGACA
CloneFAD2-1          CAACGGAGGCAACCAATGCAATGAAGCCAATATTGGGTGAGTACTACCGATTTGATGACA
*** *****
cDNAtotalFAD2-1      CACCATTTTACAAGGCACTGTGGAGAGAAGCGAGAGAGTGCCTCTATGTGGAGCCAGATG
CloneFAD2-1          CACCATTTTACAAGGCACTGTGGAGAGAAGCAAGAGAGTGCCTCTATGTGGAGCCAGATG
*****
cDNAtotalFAD2-1      AAGGAACATCCGAGAAGGGCGTGTATTGGTACAGGAACAAGTATTGATGGAGCAACCAAT
CloneFAD2-1          AAGGAACATCCGAGAAGGGCGTGTATTGGTACAGGAACAAGTATTGATGAACCAAGCAAT
***** * **
cDNAtotalFAD2-1      GGGCCATAGTGGGAGTTATGGAAGTTTTGTCATGTATTAGTACATAATTAGTAGAATGTT
CloneFAD2-1          GGGCCATAGTGGGAGTTATGGAAGTTTTGTCACCTTATCACT--TAATTAGTAGAAGCTT
***** ** *
cDNAtotalFAD2-1      ATAAATAAGTGGATTTGCCCGTAATGACTTTGTGTGTATTGTGAAACAGCTTGTTCGCA
CloneFAD2-1          ATAAATAAGTGGATTTGCCCGTAATGACTT-GTGTGTATTGTGAAACAGCTTGTAGCGA
*****
cDNAtotalFAD2-1      TC-ATGGTTATAATGTAAAAATAATTCTGGTATTAATTACATGTGCAAAGTGTCTGCCTT
CloneFAD2-1          TCCAT-----
** **
cDNAtotalFAD2-1      ATAGCTTTCTGCCT
CloneFAD2-1          -----

```

Figura 5 – Alinhamento entre a seqüência clonada nos vetores pCAMBIA e a seqüência do cDNA total do gene Fad2-1 de soja. As setas em azul indicam as seqüências dos *primers* utilizados para a amplificação do cDNA de sementes de soja e a seqüência marcada em cinza refere-se ao sitio interno da enzima *BstEII*.

Foi possível determinar 965 pb da seqüência de cDNA clonado nos vetores pCAMBIA. Esta seqüência apresentou alta homologia com o cDNA total do gene fad2-1 de soja. Devido às falhas de sequenciamento da região inicial do fragmento clonado, novos *primers* internos já foram desenhados para permitir o fechamento da seqüência clonada.

Após o alinhamento de todas as seqüências disponíveis no *GenBank* para o gene Fad2-1 de soja, incluindo clones de DNA genômico e cDNA, foi possível verificar que o *primer forward* (contendo o sítio de restrição para *BgIII*) foi desenhado dentro de uma região não conservada, de cerca de 85 pb do início da seqüência de cDNA total. Comparando a seqüência do gene Fad2-1 com essa seqüência de cDNA total, pode-se sugerir a existência de possíveis erros de sequenciamento nesta região, uma vez que esses 85 pb do início da seqüência de cDNA total variam consideravelmente entre todas as seqüências analisadas.

Como descrito em material e métodos, foram inseridos sítios de restrição diferentes nos *primers* para permitir a clonagem do cDNA nos vetores binários. Também foi informada a existência de um sítio interno da enzima *BstEII* na posição 417 da seqüência do cDNA total. A clivagem do cDNA com as enzimas *BgIII* e *BstEII* produzia, na maioria das vezes, três bandas quando analisado em gel de agarose: a primeira de cerca de 1,39 kb referente ao fragmento completo (*BgIII-BstEII*), a segunda de cerca de 1,032 kb referente ao fragmento intermediário com extremidades iguais (*BstEII-BstEII*) e a terceira de aproximadamente 365 pb, referente à porção inicial do cDNA (*BgIII-BstEII*). O fragmento referente à banda de 1,39 kb de interesse era sempre o menos clivado e por isso, foram realizadas várias reações de restrição na tentativa de conseguir quantidades suficientes deste fragmento para excisão do gel e purificação.

Após a clonagem, a análise dos clones 1.30 e dessat A4 por meio de PCR e restrição enzimática, mostrou tamanhos de fragmentos diferentes. O fragmento amplificado por PCR foi de aproximadamente 800 pb e o tamanho do fragmento liberado a partir da reação de restrição foi de cerca de 1 kb. Provavelmente, essas diferenças possam ser devidas à ligação inespecífica de *primers* na seqüência clonada, originando fragmentos menores que os esperados. Em alguns casos, os padrões de amplificação e restrição eram semelhantes aos do cDNA, embora nem sempre os resultados fossem consistentes, o que impediu uma análise mais detalhada. Possivelmente, isso tenha sido a causa principal da impossibilidade de finalização do seqüenciamento dos clones. Uma sugestão para novos trabalhos seria a construção de cassetes utilizando um fragmento menor de cDNA, já que relatos da literatura mostram que a utilização da região codificadora completa para induzir PTGS pode levar a uma freqüência bem maior de eventos de superexpressão do gene alvo do que co-supressão (Cartea et al., 1998; Stoutjesdijk et al., 2002).

As duas construções gênicas foram clonadas em vetores binários que apresentam genes seletivos diferentes em seus T-DNAs, permitindo avaliar o efeito diferencial desses dois tipos de sistema de seleção *in vitro*, sobre os explantes transformados. Essas construções inicialmente clonadas em *E. coli* foram transferidas para *A. tumefaciens* para serem utilizadas em ensaios de transformação de embriões somáticos de soja.

Após a eletroporação, foram realizadas extrações de DNA plasmidial de colônias isoladas e esse DNA foi utilizado para novamente transformar células de *E. coli*. Como o rendimento da extração de DNA plasmidial de *Agrobacterium* é muito baixo, este procedimento adotado garante quantidade e concentração suficientes de DNA plasmidial para confirmação de transformantes por PCR e restrição enzimática. Os ensaios de confirmação da clonagem foram realizados nas mesmas condições descritas anteriormente.

Todas as colônias analisadas continham o fragmento do gene clonado e após as reações de restrição com as enzimas *Bgl*III e *Bst*EII, o fragmento liberado era o mesmo dos ensaios iniciais em *E. coli* (Figura 6).

A transformação genética via *Agrobacterium* tem sido bastante utilizada para transformação de várias espécies vegetais. Entre as principais vantagens para sua ampla utilização estão a alta frequência de transformação e o baixo número de cópias inseridas, protocolos relativamente simples de transformação e seleção e baixo custo da utilização deste sistema (Brasileiro, 1998).

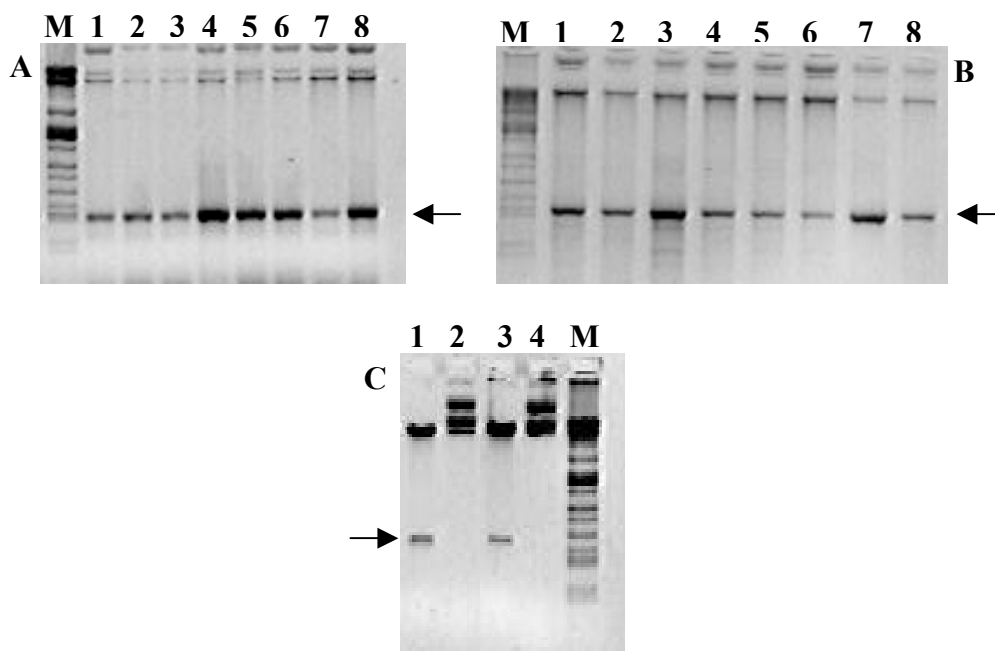


Figura 6 – Ensaio para confirmação da presença dos clones 1.30 e dessat A4 em *A. tumefaciens*. (A) e (B) representam, respectivamente, reações de PCR com DNA plasmidial de colônias transformadas com os clones 1.30 e dessat A4. Os números de 1 a 8 em A e B correspondem aos DNAs amplificados a partir de colônias positivas. (C) representa a restrição enzimática com *Bgl*III e *Bst*EII para ambos os clones. Os números 1, 2, 3 e 4 em C representam, respectivamente, o clone 1.30 clivado e não clivado e o clone dessat A4 clivado e não clivado. As setas em A e B correspondem ao produto de amplificação (800 pb) e a seta em C, ao fragmento excisado (cerca de 1 kb). M refere-se ao DNA do fago λ clivado com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI e *Hind*III, utilizado como marcador de tamanho.

Para assegurar que o PTGS ocorra de forma mais eficiente, dois pontos importantes podem ser destacados: a escolha do promotor e o tipo de construção gênica utilizada. Para garantir que ocorra um silenciamento gênico restrito ao órgão de interesse na planta e também que este fenômeno possa ser regulado de forma mais eficiente, é indicada a utilização de promotores órgão-específicos para regular a expressão do transgene (Kusaba, 2004). Em soja, por exemplo, os promotores das subunidades α ou

α' da proteína de reserva β -conglucina têm sido muito utilizados para silenciamento semente-específico (Kinney et al., 1996; Cahoon et al., 1999; Cahoon et al., 2000; Buhr et al., 2002).

Vários trabalhos da literatura também relatam o efeito de diferentes tipos de construções gênicas para alterar a composição de lipídios em espécies vegetais oleaginosas. Em soja, óleo com mais de 88% de conteúdo de ácido oléico foi obtido pela introdução de uma cópia *sense* do gene *Fad2-1* para suprimir a atividade da enzima ω -6 dessaturase microsomal (Kinney, 1996). Variedades de canola com alto conteúdo de ácido oléico também foram produzidas por estratégias semelhantes (Stoutjesdijk et al., 2000).

Cartea et al. (1998) mostraram o efeito do silenciamento deste mesmo gene em *Arabidopsis*, usando construções *antisense* e co-supressão. A construção *sense* para co-supressão promoveu uma frequência de silenciamento de 10% entre as 41 plantas transgênicas obtidas. A construção *antisense* produziu aproximadamente 15% de plantas transgênicas exibindo silenciamento. Esses resultados ficam bem abaixo daqueles obtidos por Singh et al. (2000), utilizando construções tipo hpRNA e ihpRNA. Quando estas construções foram expressas em *Arabidopsis*, cerca de 69% das plantas transgênicas mostraram silenciamento e quando o espaçador entre as repetições invertidas foi substituído por um intron, 100% dos regenerantes mostraram silenciamento do gene da ω 6-dessaturase.

Liu et al. (2000) também mostraram que construções tipo hpRNA são superiores na indução de silenciamento em relação a supressão *antisense* convencional. Esses pesquisadores utilizaram esta técnica para o desenvolvimento de óleo de algodão com alto conteúdo de ácido oléico (cerca de 78%) e esteárico (cerca de 40%), silenciando os genes das enzimas oleoil dessaturase (ω 6-dessaturase) e estearoil dessaturase (Δ 9-dessaturase), respectivamente. Esse trabalho representa a primeira aplicação deste tipo de silenciamento para o desenvolvimento de óleos modificados.

Embora o silenciamento mediado por co-supressão envolvendo genes da biossíntese de ácidos graxos tenha mostrado frequência relativamente baixa de recuperação de plantas silenciadas, ainda pode ser utilizado em ensaios de transformação genética. Nesse caso é fundamental a produção de uma grande população

de plantas transgênicas para se obter um número aceitável de linhagens exibindo grau suficiente de supressão do gene alvo (Kinney 1996; Liu et al., 2002a).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, D. L.; MAROTO, F. G. 2000. Plant as chemical factories for the production of polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advance**, v. 18, p. 481-497

BRASILEIRO, A. C. M. 1998. Co-cultura com linhagens desarmadas de *Agrobacterium* In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. ed. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 111-125

BUHR, T.; SATO, S.; EBRAHIM, F.; XING, A.; ZHOU, Y.; MATHIESEN, M.; SCHWEIGER, B.; KINNEY, A.; STASWICK, P.; CLEMENTE, T. 2002. Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean. **The Plant Journal**, v. 30, n. 2, p. 155-163

BUSTIN, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169-193

CAHOON, E. B.; CARLSON, T. J.; RIPP, K. G.; SCHWEIGER, B. J.; COOK, G. A.; HALL, S. E.; KINNEY, A. J. 1999. Biosynthetic origin of conjugated double bonds: production of fatty acid components of high-value drying oils in transgenic soybean embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, n. 22, p. 12935-12940

CAHOON, E. B.; MARILLIA, E. F.; STECCA, K. L.; HALL, S. E.; TAYLOR, D. C.; KINNEY, A. J. 2000. Production of fatty acid components of meadowfoam oil in somatic soybean embryos. **Plant Physiology**, v. 124, p. 243-251

CARTEA, M. E.; MIGDAL, M.; GALLE, A. M.; PELLETIER, G.; GUERCHE, P. 1998. Comparison of sense and antisense methodologies for modifying the fatty acid composition of *Arabidopsis thaliana* oilseed. **Plant Science**, v. 136, p. 181-194

HEPPARD, E. P.; KINNEY, A. J.; STECCA, K. L.; MIAO, G. H. 1996. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal ω -6 desaturase genes in soybeans. **Plant Physiology**, v. 110, p. 311-319

KINNEY, A. J. 1994. Genetic modification the storage lipids of plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 5, p. 144-151

KINNEY A. J. 1996. Development of genetically engineered soybean oils for food application. **Journal of Food Lipids**, v. 3, p. 273-292

KINNEY, A. J.; CAHOON, E. B.; HITZ, W. D. 2002. Manipulating desaturase activities in transgenic crop plants. **Biochemical Society**, v. 30, p. 1099-1103

KUSABA, M. 2004. RNA interference in crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 139-143

LANNA, A. C. 2002. Efeito da temperatura sobre a regulação da síntese de ácidos graxos polinsaturados em soja. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, MG, 84p

LIU, Q.; SINGH, P. S.; GREEN, A. G. 2000. Genetic modification of cotton seed oil using inverted-repeat gene-silencing techniques. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, p. 927-929

LIU, Q.; SINGH, P. S.; GREEN, A. G. 2002a. High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1732-1743

LIU, Q.; SURINDER, S.; GREEN, A. 2002b. High-oleic and high-stearic cottonseed oils: nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, p. 205S-211S

LOS, D. A.; MURATA, N. 1998. Structure and expression of fatty acid desaturases. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1394, p. 3-15

NOVINA, C. D.; SHARP, P. A. 2004. The RNAi revolution. **Nature**, v. 430, p. 161-164

SAMBROOK, T.; FRITSSCH, E. F. & MANIATIS, T. Extraction, purification and analysis of mRNA from eukaryotic cells. In: **Molecular cloning, a Laboratory Manual**, 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 187-210

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. 1977. DNA Sequence with chain-termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.74, p. 5463-5467

SASAKI, T.; CHRISTOU, P. 2004. Plant Biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 117-119

SINGH, S.; GREEN, A.; STOUTJESDIJK, P.; LIU, Q. 2000. Inverted-repeat DNA: a new gene-silencing tool for seed lipid modification. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, p. 925-927

STOUTJESDIJK, P. A.; HURLESTONE, C. J.; SINGH, S. P.; GREEN, A. G. 2000. High-oleic acid Australian *Brassica napus* and *B. juncea* varieties produced by co-suppression of endogenous $\Delta 12$ – desaturases. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, p. 938-940

STOUTJESDIJK, P. A.; SINGH, S. P.; LIU, Q.; HURLESTONE, C. J.; WATERHOUSE, P. A.; GREEN, A. G. 2002. hpRNA-mediated targeting of the *Arabidopsis* FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1723-1731

TANG, G.; GALILI, G. 2004. Using RNAi to improve plant nutritional value: from mechanism to application. **TRENDS in Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 463-469

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. 2001. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, v. 114, p.3083-3091

WATERHOUSE, P. M.; HELLIWELL C. A. 2002. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, p. 29-38

WESLEY, S. V.; HELLIWELL, C. A.; SMITH, N. A., WANG, M.; ROUSE, D. T., LIU, Q.; GOODING, P. S.; SINGH, S. P.; ABBOTT, D.; STOUTJESDIJK, P. A.; ROBINSON, S. P.; GLEAVE, A. P.; GREEN, A. G.; WATERHOUSE P. M. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. **The Plant Journal**, v. 27, n. 6, p. 581-590

YADAV, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. 1996. In: VERMA, D. P. S., SHOEMAKER, R. C. (Eds) **Soybean genetics, molecular biology and biotechnology**. USA: CAB INTERNATIONAL, p. 127-188

CAPÍTULO 2

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA VIA *Agrobacterium* MEDIADA POR SONICAÇÃO (SAAT) E ANÁLISE MOLECULAR DOS TRANSFORMANTES

RESUMO

Os sistemas de transformação genética via *Agrobacterium* têm sido bastante utilizados para transformar várias espécies vegetais. Entre as principais vantagens para sua ampla utilização estão a alta eficiência de transformação e o baixo número de cópias inseridas, protocolos relativamente simples de transformação e seleção e o baixo custo desse sistema. Atualmente, o uso da sonicação tem aumentado substancialmente a eficiência de transformação mediada por essa bactéria. O presente trabalho teve como objetivos induzir embriões a partir de cotilédones imaturos de soja, utilizar os agregados de embriões globulares em ensaios de transformação genética via *Agrobacterium* mediada por sonicação e realizar ensaios moleculares para a detecção de transformantes. Foi induzida embriogênese somática a partir de cotilédones imaturos de soja na presença de 40 mg/L de 2,4-D. Agregados de embriões globulares foram transformados com suspensão bacteriana de *A. tumefaciens* mediante sonicação e adição de acetoseringona 100 µM. Os agregados foram mantidos em meio seletivo com concentrações iniciais de 3 mg/L e posteriormente, de 5 mg/L do herbicida Finale[®], no entanto, esta seleção não se mostrou muito eficiente. Embriões cotiledonares maduros foram submetidos à dessecação e posteriormente, transferidos para meio de germinação. O fato dos embriões transformados terem sido submetidos a longo período de exposição em meio com 2,4-D parece ter afetado o seu potencial embriogênico. Alguns embriões não se recuperaram após a dessecação, adquirindo um aspecto escuro e necrosado. A maioria dos embriões germinou normalmente em meio sem regulador de crescimento, com emissão de raízes e desenvolvimento da parte aérea, embora alguns não tenham sido capazes de regenerar plantas. Outros germinaram, mas apresentaram um sistema radicular pronunciadamente alongado, quase sem nenhum desenvolvimento da parte aérea, não conseguindo originar plântulas. Após vários testes, foram padronizados alguns procedimentos para garantir

condições ideais para a aclimação de plantas regeneradas de soja. Ao final de todo o processo foi possível regenerar e aclimatar em casa de vegetação apenas cinco plantas. A análise molecular por PCR para a detecção de transgênicos com os *primers* 35S e NOS comprovou que as plantas não eram transgênicas. Também foram realizadas análises moleculares com plântulas e/ou embriões cotiledonares isolados de diferentes agregados embriogênicos, representando diferentes eventos de transformação. Do total de 120 amostras de DNA, foram realizadas reações de PCR com 66 e dessas, 39 apresentaram resultado positivo. No entanto, essas 120 amostras analisadas representam apenas uma pequena parcela de toda a população dos possíveis eventos transgênicos ocorridos.

1. INTRODUÇÃO

A introdução de características agronomicamente importantes em soja pode ser realizada via transformação de plantas como um método alternativo ao melhoramento convencional.

Os primeiros trabalhos de transformação de soja surgiram nos anos 80, embora ainda fosse uma técnica de melhoramento genético limitada devido à incapacidade de sistemas de regeneração de plantas férteis e à especificidade de alcance de hospedeiros por *Agrobacterium*. As duas primeiras publicações de sucesso envolveram o uso de *Agrobacterium* para obter plantas regeneradas a partir de nós cotiledonares (Hinchee et al., 1988) e o sistema de biobalística (ou aceleração de partículas), que introduziu micropartículas cobertas com DNA em regiões meristemáticas apicais do eixo embrionário (McCabe et al., 1988).

Estes dois métodos têm sido utilizados na transformação genética dessa leguminosa, ambos apresentando características distintas. Problemas associados ao bombardeamento de partículas incluem a integração de múltiplas cópias ou cópias fragmentadas do DNA introduzido no genoma (Trick et al., 1997). O uso de transformação mediada por *Agrobacterium* geralmente integra um baixo número de cópias do transgene dentro do genoma do hospedeiro, sendo usualmente transmitido para progênie na proporção mendeliana (Santarém et al., 1998; Luo et al., 2004).

No entanto, independente do método de transformação escolhido, é fundamental que o DNA exógeno seja introduzido em células totipotentes, o que não é um processo muito fácil (Finer, 1994). Além disso, quando as células competentes à regeneração são transformadas, as plantas regeneradas podem ser estéreis, provavelmente como consequência do longo tempo de manipulação *in vitro* (Santarém e Ferreira, 1997).

Para que as técnicas de transformação tenham sucesso, também é necessária uma metodologia eficiente para regeneração *de novo* de plantas: embriogênese somática e organogênese (Barwale et al., 1986). Essas duas vias regenerativas mostram que as respostas morfológicas *in vitro* ocorrem de modo genótipo-específico (Santarém e Ferreira, 1997). A regeneração via embriogênese somática em soja tem sido bastante

estudada (Lazzeri et al., 1985; Ranch et al., 1985; Finer e Nagasawa, 1988), com reconhecido potencial para produção de grande quantidade de embriões de plantas independentemente transformadas (Finer e McMullen, 1991).

Vários trabalhos de otimização do sistema embriogênico mostram que entre os fatores que influenciam a embriogênese somática em soja estão o tipo de explante, o pH do meio e o genótipo da planta (Hartweck et al., 1988; Buchheim et al., 1989; Komatsuda e Ko, 1990; Bailey et al., 1993; Komatsuda et al., 1992; Meurer et al., 2001).

Um número limitado de cultivares de soja tem mostrado respostas embriogênicas satisfatórias (Simmonds e Donaldson, 2000; Meurer et al., 2001). Gesteira (2002) avaliou o potencial genético de nove cultivares de soja em relação a respostas a embriogênese somática utilizando 2,4-D como agente indutor. Os cultivares VMax, CAC-1 e COODETEC 201 apresentaram as melhores respostas, mostrando médias de produção de embriões/cotilédones de 32,6; 27,6 e 26,8, respectivamente. Na fase de proliferação, os cultivares CAC-1 e VMax apresentaram altas frequências de formação de agregados de embriões secundários, 90,6% e 91,6%, respectivamente, o que indica que estes dois cultivares são excelentes candidatos para trabalhos de transformação de soja.

Os sistemas de transformação via *Agrobacterium* tem sido utilizados para transformar várias espécies vegetais. As maiores razões para sua ampla utilização são a alta eficiência de transformação, simplicidade dos protocolos de transformação e seleção e o baixo custo da utilização deste sistema, em relação aos outros métodos de transformação (Brasileiro, 1998).

O sucesso desse tipo de sistema depende de vários fatores incluindo infecção bacteriana, reconhecimento do hospedeiro e transformação competente do tecido-alvo (Trick e Finer, 1998). Outros parâmetros importantes incluem as características da linhagem de *Agrobacterium* utilizada para inoculação do tecido-alvo, o vetor que a linhagem bacteriana carrega, o período de co-cultivo e a disponibilidade de um sistema de seleção combinado com explantes adequados que contenham células competentes para transformação (Ko et al., 2003).

Pelo fato de ser um método amplamente utilizado, vários esforços têm sido feitos para otimizar a transformação mediada por *Agrobacterium* (Trick et al., 1997; Zhang et

al., 1999; Yan et al., 2000). Foi desenvolvido um método para transformação via *Agrobacterium* chamado SAAT (*Sonication Assisted Agrobacterium-mediated Transformation*), que substancialmente aumenta a eficiência de transformação mediada por esta bactéria para espécies vegetais tolerantes ou de baixa susceptibilidade. Este procedimento consiste em expor os explantes por breve período de tempo ao ultrassom, na presença de *Agrobacterium*, o que provoca microferimentos na superfície do tecido. Esses microferimentos possibilitam a *Agrobacterium* atingir camadas de células potencialmente regenerativas em locais mais internos dos tecidos, aumentando a probabilidade de infecção das células do explante, o que tem proporcionado aumento na frequência da expressão em cotilédones imaturos de soja (Santarém et al., 1998).

Qualquer processo que vise a obtenção de PGMs depende também, da utilização de um sistema gene marcador/agente seletivo que permita a seleção de células transformadas (Souza-Júnior et al., 2001). O uso de um gene marcador no processo de transformação de plantas fornece uma vantagem seletiva para as células transformadas, permitindo o seu crescimento e desenvolvimento e geralmente, a morte das células não transformadas. Em alguns casos, o próprio gene marcador é o gene de interesse que poderia expressar uma característica agrônômica, como resistência a herbicida (Aragão e Brasileiro, 2002).

De modo geral, os agentes seletivos são utilizados nos estádios iniciais de transformação para uma seleção precoce das células transformadas (Sawahel, 1994). No entanto, alguns trabalhos mostram o uso de uma pressão de seleção até as fases de regeneração dos explantes e posterior comprovação em plantas adultas.

Uma análise dos principais genes de seleção utilizados em variedades transgênicas comerciais mostrou que os mais comumente empregados são os que conferem resistência a canamicina, higromicina ou fosfinotricina (PPT) (Miki e McHugh, 2004). Para a soja, especialmente, a maioria das variedades geneticamente modificadas aprovadas para a comercialização constitui eventos nos quais se utiliza o gene *bar*, que confere resistência a PPT, como gene de seleção.

O gene *bar* foi isolado de *Streptomyces higroscopicus* e codifica a enzima PAT (fosfinotricina N-aciltransferase). Esta enzima inativa herbicidas contendo fosfinotricina (PPT) como componente ativo, tal como Basta[→], Liberty[→] e Finale[→]. O herbicida é

inativado por meio da acetilação do grupo amino livre do PPT usando acetil coenzima A como cofator, evitando que o PPT se ligue a enzima glutamina sintase (GS).

O PPT é similar ao substrato glutamato da enzima GS e atua como um inibidor competitivo de GS. Esta enzima catalisa a conversão de glutamato em glutamina, removendo a amônia tóxica da célula. A GS tem papel essencial no metabolismo de nitrogênio e regulação da assimilação de amônia. Quando GS é inibida, ocorre acúmulo de amônia e um rompimento da estrutura do cloroplasto que leva a inibição da fotossíntese e morte da célula. Assim, o gene *bar* se tornou um marcador de seleção amplamente utilizado para as principais espécies de cereais como trigo, milho, arroz, sorgo, cevada, aveia e centeio, sendo um dos mais amplamente empregados pela engenharia genética no desenvolvimento vegetais GMs (Souza-Júnior et al., 2001).

O presente trabalho teve como objetivos induzir embriogênese somática a partir de cotilédones imaturos de soja, utilizar os agregados de embriões globulares em ensaios de transformação genética via *Agrobacterium* mediada por sonicação e realizar ensaios moleculares para a detecção de transformantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e indução de embriogênese somática

Foram utilizadas plantas de soja das variedades CAC-1 e VMax cultivadas em casa de vegetação com fotoperíodo de 14 horas de luz e temperatura de 27⁰C. Aproximadamente 15 a 20 dias após o florescimento, foram coletadas vagens com sementes entre 4 a 6 mm de comprimento.

As vagens foram desinfestadas por imersão em etanol 70% (v/v) por 2 minutos, seguido de água sanitária comercial (2,5% de hipoclorito de sódio), acrescido de Tween 20 0,01% por 20 minutos. Após três lavagens em água destilada estéril, as vagens foram dissecadas com auxílio de pinças e bisturi para remoção do eixo embrionário e separação dos pares cotiledonares. Os pares cotiledonares foram, então, transferidos para o meio de indução com a face abaxial em contato com o meio (Santarém et al., 1997). Todos os procedimentos relatados foram realizados sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar.

No processo de indução de embriogênese somática, os explantes foram cultivados em placa de Petri estéril (90 x 15mm) com meio MSD40 (Finer e Nagasawa, 1988), contendo sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), sacarose 3%, Gelrite[→] 0,2% e 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético) 40 mg/L, pH 7,0. As culturas foram incubadas à temperatura de 27 ± 1⁰C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de 24-36 μmol m⁻² s⁻¹. Os explantes permaneceram nesse meio por 30 dias até o aparecimento de embriões globulares primários.

O isolamento de agregados de embriões globulares foi feito a partir de regiões bem próximas do explante original, sendo posteriormente transferidos para o meio de proliferação para permitir a multiplicação dos agregados embriogênicos (*clusters*). Nessa fase foi utilizado o meio MSD20 (Wright et al., 1991) contendo sais MS, vitamina B5, sacarose 3%, Gelrite[→] 0,2% e 2,4-D 20 mg/L, pH 5,8. As culturas foram mantidas sob subcultivos quinzenais, sob as mesmas condições descritas.

2.2 Curva de sobrevivência para o herbicida

Para determinar a concentração adequada do herbicida Finale[→] para a seleção dos transformantes, foi realizado o ensaio de curva de sobrevivência com diferentes concentrações do herbicida, usando agregados embriogênicos como explantes. Foram utilizadas as concentrações de 0, 3, 5, 8, 10 e 13 mg/L em meio MSD20. Cada tratamento continha 3 repetições, cada uma constituída por 5 agregados de embriões globulares.

2.3 Condições de cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Para a transformação genética dos agregados embriogênicos foi utilizada *A. tumefaciens* LB4404 contendo a construção gênica clonada no vetor pCAMBIA 3301.

As células de *A. tumefaciens* foram crescidas em 50 mL de meio MYA contendo estreptomicina 100µg/mL e canamicina 50µg/mL, por 14-16 horas a 28⁰C e 180 rpm. As bactérias foram centrifugadas a 3000 g por 5 minutos a 4⁰C. O precipitado foi ressuspensionado em meio líquido MSD20 e a densidade óptica (OD_{600nm}) foi ajustada para 0,2. Antes do uso, foi acrescentado acetoseringona 100µM à suspensão bacteriana.

2.4 Transformação genética de embriões somáticos

Dez agregados embriogênicos foram colocados em microtubos de 1,5 mL estéreis juntamente com 0,5 mL de suspensão bacteriana. Os microtubos foram colocados em suporte de isopor e submetidos a 5 segundos de sonicação (*Branson Ultrasonic Cleaner*, modelo B1210E-Mt, potência de 80W). Após esse período, os agregados permaneceram por mais 5 minutos na suspensão bacteriana e em seguida, foram transferidos para papel-filtro estéril para a retirada do excesso de bactéria e transferidos para o meio MSD20 contendo acetoseringona 100 µM, permanecendo neste meio por 3 dias. Após os 3 dias de co-cultivo com *Agrobacterium*, os agregados foram cultivados em meio MSD20 contendo Timentin 400 mg/L por duas semanas. Em

seguida, foram transferidos para meio seletivo contendo Timentin 400 mg/L e herbicida Finale[→] 3 mg/L. Os agregados foram transferidos semanalmente para meio recém-preparado durante 4 semanas. Posteriormente, os agregados foram transferidos para as mesmas condições de seleção, porém na presença de Finale[→] 5 mg/L.

Após esse período de seleção, os embriões foram transferidos para o meio de histodiferenciação MSM6AC (sais MS, vitamina B5, maltose 6%; carvão ativado 0,5%, Gelrite[→] 0,2%, pH 5,8) (Bailey et al., 1993), onde permaneceram por cerca de 10 dias ou até atingirem o estágio cotiledonar. Posteriormente, os embriões cotiledonares foram transferidos para o meio MSM6 (meio MSMAC sem carvão ativado) para sua maturação (Finer e McMullen, 1991).

Quando os embriões cotiledonares atingiram a maturidade fisiológica, foram submetidos a um período de três dias de dessecação na presença de KCl saturado (4,5 M). O sistema foi montado em magenta (Sigma) contendo 50 mL de solução de KCl sobre a qual foi colocada uma placa de Petri estéril (60 X 15 mm) contendo os embriões cotiledonares individualizados.

Após a dessecação, os embriões cotiledonares foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo o meio MS0 (sem regulador de crescimento) para germinação. Quando iniciou a emissão de raízes, os embriões foram transferidos para tubos de ensaio ou magentas contendo este mesmo meio para alongamento e conversão em plântulas.

Foram realizados dois experimentos de transformação com as duas variedades de soja. Os controles da transformação foram constituídos por agregados de embriões que não receberam suspensão bacteriana, mas que passaram por todas as etapas pós-transformação. Em cada experimento, 10 agregados de embriões por microtubo equivalia a uma repetição. No total foram utilizadas 10 repetições para CAC-1 e 36 repetições para VMax.

2.5 Etapas de aclimação das plantas

Quando as plântulas apresentavam sistema radicular bem desenvolvido, foram retiradas do meio de cultura e mantidas em água por 3 dias, cobertas com plástico e sob

condições da sala de cultivo. Em seguida, foram transferidas para copos de plástico de 100 mL contendo substrato agrícola (Bioplant) estéril e mantidas por mais 5 dias nas mesmas condições.

Após esse período, o material foi aclimatado em condições de laboratório em um sistema de prateleiras sob iluminação e com fotoperíodo de 12 horas de luz, utilizando lâmpadas fluorescentes de 40W. Inicialmente, as plantas foram mantidas por um período de aproximadamente duas semanas em irradiância de 32-46 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e posteriormente, mantidas em irradiância de 54-86 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plantas permaneceram no laboratório por cerca de 30 dias, até estarem bem adaptadas às condições ambientais.

Posteriormente, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, sendo mantidas sobre um sistema de irrigação artificial tipo nevoeiro, coberto com sombrite, com intervalos de pulverização de água de 1 minuto a cada 1 hora, por aproximadamente 5 dias.

Após esse período, o sombrite foi retirado, as plantas foram transplantadas para vasos com solo, permanecendo ainda sob o sistema de nevoeiro por cerca de 5 dias. Finalmente, os vasos passaram a ser mantidos nas mesmas condições de cultivo da casa de vegetação.

2.6 Análise molecular dos transformantes por PCR

A confirmação dos transformantes foi feita por PCR e as amostras de DNA foram extraídas de folhas jovens de plantas regeneradas mantidas em casa de vegetação, de plântulas aclimatadas em laboratório ou de embriões cotiledonares. A extração foi feita segundo a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990).

Após a maceração em almofariz na presença de nitrogênio líquido, o pó resultante foi transferido para microtubos de 2 mL e adicionados 800 μL de tampão de extração CTAB (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; cloreto de sódio 1,4 M; EDTA 20 mM; CTAB 2%; polivinilpirrolidona 2%) aquecido a 65⁰C e β -mercaptoetanol 0,2%. As amostras foram então incubadas a 65⁰C por 5 minutos. A seguir, foram adicionados 700

μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), os tubos foram agitados por 1 minuto no vórtex e centrifugados a 13.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e precipitado com o mesmo volume de isopropanol gelado a -20°C por cerca de 12 horas. Após centrifugação a 13.000 g por 10 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuscitado em 200 μL de TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 8,0) acrescido de RNase na concentração final de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos, sendo posteriormente precipitadas com acetato de amônio 7,5M na proporção 1:10 (acetato:DNA ressuscitado) e 2/3 do volume de isopropanol gelado a -20°C por 3 horas. Após centrifugação a 13.000 g por 10 minutos, o precipitado foi lavado uma vez com etanol 70% e uma vez com etanol 95% e ressuscitado em 50-60 μL de TE.

As extrações de DNA de embriões somáticos foram realizadas com este mesmo protocolo, porém, os embriões foram macerados em nitrogênio líquido utilizando o pistilo do aparelho politron até a máxima pulverização do material vegetal e o precipitado final foi ressuscitado em 20-30 μL de TE.

As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8% para verificação da qualidade do DNA e fotodocumentadas.

Para as reações de PCR, foram utilizados os *primers* do promotor 35S e do terminador da nopalina sintase (NOS). As seqüências dos *primers* estão listadas a seguir:

35S-F: 5' - CCA CGT CTT CAA AGC AAG TGG – 3'

35S-R: 5' - TCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC TTC C – 3'

NOS-F: 5' - GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT GGG – 3'

NOS-R: 5' - GAC ACC GCG CGC GAT AAT TTA TCC – 3'

Cada reação de amplificação de 25 μL continha 100 ng de DNA, Tris-HCl 10mM pH8.3; KCl 50 mM; MgCl_2 2 mM; 0,2 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,5 μM de *primer* e 1 U de Taq DNA polimerase.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador *Perkin-Elmer*, modelo 9600 (*Applied Biosystems*) sob as seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação a

95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos e 1 ciclo de extensão final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas do DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embriões somáticos de soja foram obtidos por cultivo de cotilédones imaturos na presença de 40 mg/L de 2,4-D. Essa alta concentração de auxina no meio de indução se mostrou bastante eficiente na indução de embriões somáticos nos dois cultivares de soja analisados, obtendo-se um grande número de embriões globulares por cada cotilédone imaturo (Figura 1A e B), como já havia sido relatado anteriormente por Gesteira (2002) para esses mesmos cultivares.

Após a transferência dos embriões globulares para meio sem auxina e na presença de carvão ativado, o desenvolvimento dos embriões somáticos seguiu o mesmo padrão geral de desenvolvimento de um embrião zigótico. Os embriões no estágio globular se diferenciaram, assincronicamente, passando pelos estádios cordiforme, torpedo e cotiledonar (Figura 1C e D). Eventualmente, surgiram embriões morfológicamente anormais principalmente nos estádios torpedo e cotiledonar, mesmo em embriões submetidos à transformação genética. Entre os diferentes tipos morfológicos identificados estão: embriões monocotiledonares, multicotiledonares, com cotilédone vestigial ou cotilédones fundidos, embriões somáticos tipo trompete ou embriões totalmente irregulares (Figura 1E).

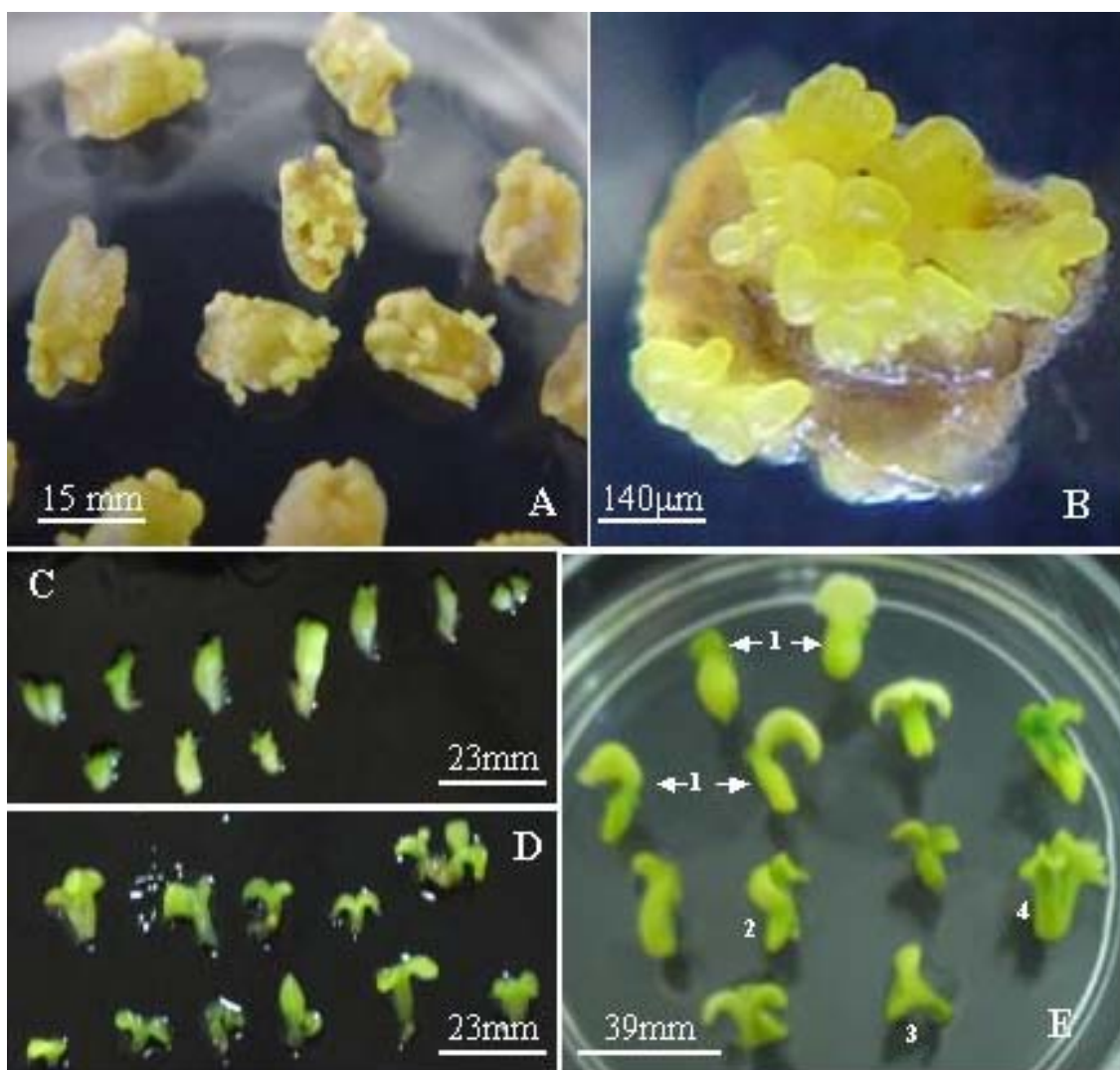


Figura 1 – Estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de soja obtidos a partir de cotilédones imaturos cultivados por 30 dias em meio MSD40. A – embriões somáticos originados na face adaxial de pares cotiledonares; B – detalhe de embriões globulares; C – embriões em estádios intermediários de torpedo; D – embriões no estágio cotiledonar; E – embriões morfologicamente anormais: 1 - monocotiledonares; 2 - embrião irregular; 3 - embrião tipo trompete; 4 - cotilédones fundidos.

Portanto, após a indução de embriões somáticos, o seu desenvolvimento subsequente só ocorre em meio com baixa concentração de auxina ou desprovido desta substância (Buchheim et al., 1989; Guerra et al., 1999). Alguns trabalhos mostram que compostos com alta atividade de auxina, como o 2,4-D, efetivamente inibem o desenvolvimento de embriões somáticos e anormalidades desenvolvimentais e morfológicas têm estado relacionadas à exposição a este agente. O uso de carvão ativado diminui o efeito residual de 2,4-D, pois adsorve este composto e também outros tipos de compostos produzidos pelos tecidos cultivados, que são inibitórios para o crescimento e desenvolvimento (Buchheim et al., 1989).

Nos experimentos de transformação genética via *A. tumefaciens* foi utilizada a sonicação como forma de aumentar a eficiência de transformação. Neste processo, o tempo de sonicação é crítico, pois longos períodos tendem a provocar danos na parede celular de forma irreversível (Santarém et al., 1998).

Dois fatores tiveram grande influência nestes experimentos de transformação: a forma de isolamento dos embriões globulares e o sistema de seleção com herbicida.

A idéia principal de utilizar embriões somáticos para a transformação de soja com *Agrobacterium* é a possibilidade de conduzi-los até os estádios mais avançados do seu desenvolvimento e no estágio cotiledonar maduro, poder prever a composição de ácidos graxos de sementes de plantas transgênicas regeneradas a partir destes embriões, uma vez que a composição de ácidos graxos em embriões cotiledonares de soja equivale ao da semente madura (Kinney 1996; Cahoon et al., 2000).

Após o surgimento de embriões globulares na face adaxial do cotilédone imaturo, esses foram isolados de locais bem próximos uns dos outros, para garantir que os agregados formados no meio de proliferação fossem constituídos por embriões de mesma origem. Contudo, a forma mais correta seria talvez o isolamento individual de cada embrião globular primário para que após a formação dos agregados e transformação com *Agrobacterium*, um único embrião de um determinado agregado embriogênico pudesse representar o evento transgênico de todos os indivíduos daquele agregado. Mas devido ao tamanho muito pequeno de um embrião globular (menos de 1 mm), essa prática não foi adotada. Os resultados das análises de ácidos graxos presentes

no terceiro capítulo indicam que cada embrião isolado de um agregado embriogênico representaria um possível evento de transformação diferente.

O outro fator está relacionado ao sistema de seleção com herbicida. A escolha desse tipo de seleção se deve à utilização da construção gênica clonada no vetor binário pCAMBIA 3301, que possui o gene *bar* para a seleção em plantas. Se considerarmos que o objetivo inicial proposto para este trabalho foi a obtenção de plantas GMs para serem usadas no Programa de Melhoramento de Soja conduzido pelo BIOAGRO/UFV, o desenvolvimento de uma linhagem que apresentasse tanto modificação de ácidos graxos na fração óleo de semente quanto tolerância a um herbicida seria de grande interesse. No entanto, esse tipo de seleção não se mostrou muito eficiente e adequada para embriogênese somática de soja.

Como agente seletivo foi utilizado o produto comercial Finale[®], que contém glufosinato de amônio como componente ativo da formulação. Ele é considerado um agente seletivo de contato, ou seja, tem a capacidade de selecionar apenas os tecidos que estão em contato direto com o meio (Monteiro, 2005). Aragão et al. (2002) mostraram que em ensaios de transformação de feijão a partir de ápices embriogênicos, houve a formação de um grande número de brotos não transgênicos em meio contendo PPT ou fosfínotricina. De acordo com estas informações, nos agregados de embriões somáticos de soja apenas aqueles que estivessem em contato direto com o meio contendo herbicida estariam sujeitos à sua ação. Como cada repetição utilizada para transformação continha 10 agregados e cada agregado continha aproximadamente 8 a 15 embriões, o efeito seletivo se mostrou muito pequeno. Associado a esse fato está o resultado da curva de sobrevivência que não permitiu determinar uma dose eficiente para a seleção dos transformantes. Após 40 dias, as diferentes doses testadas não mostraram efeitos significativos quanto à inibição da divisão celular, não sendo possível determinar uma dose seletiva adequada. Optou-se por utilizar as menores concentrações do herbicida, 3 e 5 mg/L para garantir que no mínimo, não houvesse morte de possíveis transformantes.

Vários trabalhos têm sido realizados com o intuito de estabelecer as concentrações de fosfínotricina capazes de inibir a morfogênese *in vitro* em diversos explantes. Souza-Júnior et al. (2001) relataram o desenvolvimento de embriões somáticos primários e secundários de mamão em meio suplementado com concentrações

de PPT variando de 0 a 30 mg/L. A produção de novos embriões foi afetada somente em concentrações de PPT maiores ou iguais a 5 mg/L. Em concentrações de 25 mg/L ou concentrações superiores, foi observada a paralisação total no desenvolvimento de novos embriões, o que sugere o uso desta concentração para seleção de embriões transgênicos de mamoeiro.

Takahashi (2002) observou que o desenvolvimento de brotos a partir de explantes foliares de maracujá amarelo var. Sul Brasil foi inibido quando 2 mg/L de fosfínotricina foram aplicadas ao meio de cultura. Monteiro (2005) mostrou que pode ser utilizado 0,3 mg/L de fosfínotricina para a seleção de células transformadas putativas de maracujá, após a segunda semana de cultivo, embora seja sugerida uma dosagem ainda maior a ser aplicada ao meio de cultura para que a seleção *in vitro* de explantes foliares de maracujá seja eficiente (esta dose levou a uma taxa de escape de 60%).

Zheng et al. (2004) tiveram sucesso utilizando um agente antioxidante (L-cisteína 400 mg/L) durante o período de co-cultivo com *Agrobacterium* para aumentar a infecção em explantes de nós cotiledonares de soja, associado com o uso de glufosinato de amônio como agente seletivo. O glufosinato foi usado para seleção durante a iniciação e alongamento dos brotos. Estes autores utilizaram níveis variados de glufosinato (de 3 a 10 mg/L) durante os dois estádios de iniciação de formação do broto seguido pelo co-cultivo na presença do agente antioxidante. A melhor seleção foi alcançada nos níveis de 3-4 mg/L nos dois primeiros estágios de iniciação; neste caso, dos 1318 explantes infectados com a bactéria, foram regenerados 578 explantes e recuperadas 139 plantas completamente estabelecidas em casa de vegetação, após confirmação por pulverização de uma solução de 0,1% de glufosinato em folhas jovens e expandidas.

Em dois outros trabalhos também com transformação de nós cotiledonares de soja via *Agrobacterium*, a seleção de transformantes foi feita com concentrações de herbicida próximas às citadas anteriormente. Zhang et al. (1999) utilizaram 3,3 ou 5 mg/L de glufosinato de amônio em meio de iniciação e 1,7 e 2 mg/L na fase de alongamento dos brotos transformados. Já Buhr et al. (2002) conseguiram selecionar os transformantes com 5 e 3 mg/L de fosfínotricina durante a iniciação e alongamento dos brotos, respectivamente.

Praticamente em todos os trabalhos discutidos acima, a seleção *in vitro* com herbicida contendo glufosinato de amônio foi confirmada ao nível de plântula ou planta regenerada e estabelecida em casa de vegetação por meio de pulverização com o herbicida. No entanto, para este tipo de ensaio é fundamental a existência de um sistema adaptado e bastante eficiente de regeneração e aclimatação de plantas transformadas.

A maioria dos trabalhos de transformação genética de soja utilizando o glufosinato de amônio como agente seletivo são conduzidos usando nós cotiledonares como explantes para a transformação e organogênese como via de regeneração (Hinchee et al., 1987); os eventos de transformação via embriogênese somática são selecionados com o antibiótico higromicina (Finer e McMullen, 1991; Trick e Finer, 1998; Cahoon et al., 2000; Yan et al., 2000; Droste et al., 2000; Cahoon et al., 2001; Ko et al., 2004).

Portanto, com base nos resultados do presente trabalho, a seleção com glufosinato de amônio não se mostrou muito eficiente utilizando o processo de embriogênese somática como via de regeneração. Provavelmente, a ineficiência do sistema seletivo permitiu o escape de falsos transformantes.

Apesar dos problemas mencionados, os experimentos foram conduzidos até a etapa de regeneração. Devido às observações relatadas quanto aos agregados embriogênicos, neste caso, o fato de que cada embrião pudesse representar um evento diferente após a transformação, cada agregado depois de transferido para o meio de diferenciação foi desmembrado e cada embrião cotiledonar isolado foi considerado um possível evento transgênico.

Os ensaios de transformação foram realizados com 10 repetições para CAC-1 (100 agregados de embriões) e 36 repetições para VMax (360 agregados de embriões). Após a adoção desta nova estratégia, o número de embriões cotiledonares aumentou consideravelmente, já que a maioria dos agregados diferenciou e originou vários embriões. Cada embrião recebeu uma nova identificação, sendo transferido para o meio de maturação. Embriões cotiledonares maduros são caracterizados por mudanças de sua coloração de verde para amarelo creme e em média, os embriões de soja levam de 6 a 8 semanas a partir do momento em que atingem o estágio cotiledonar para se tornarem fisiologicamente maduros (Figura 2A). Nesta fase, grandes quantidades de substâncias de reserva se acumulam no embrião como carboidratos, lipídios e proteínas, ocorrendo

redução do conteúdo de água e muitas vezes, um declínio do metabolismo (Blackman et al., 1991; Kinney, 1996; Koehler, 2004). Embora a maturação completa não seja absolutamente necessária para a obtenção de plantas a partir de embriões somáticos, é requerida para alcançar altas taxas de recuperação de plantas (Buchheim et al., 1989).

Posteriormente, os embriões cotiledonares fisiologicamente maduros foram desidratados na presença de KCl e transferidos para o meio de germinação. Embora embriões somáticos de soja sejam morfológicamente similares ao embrião zigótico, a sua frequência de germinação é geralmente bem menor (Liu et al., 1994). A dessecação constitui uma forma de aumentar a frequência de germinação desses embriões (Figura 2B). A dessecação em regime de umidade controlada ou não controlada tem resultado em grande aumento na frequência de germinação em soja (Buchheim et al., 1989).

O fato dos embriões transformados terem sido submetidos a um longo período de exposição em meio com 2,4-D parece ter afetado o seu potencial embriogênico. Alguns embriões não conseguiram recuperar-se do processo de dessecação, tornando-se incapazes de germinar e adquirindo o aspecto escuro e necrosado (Figura 3A). A maioria dos embriões germinou normalmente após a dessecação e em meio sem regulador de crescimento (Figura 3B e C), podendo ser observada a emissão de raízes e posteriormente, o desenvolvimento da parte aérea (Figura 3D, E e F), no entanto, alguns não foram capazes de regenerar plantas. Outros germinaram, mas apresentaram um sistema radicular pronunciadamente alongado, quase sem nenhum desenvolvimento da parte aérea, não conseguindo originar plântulas (Figura 4). Assim, a taxa de regeneração foi extremamente baixa e possivelmente, esse fato se deve muito mais aos efeitos residuais de 2,4-D do que como consequência da transformação.

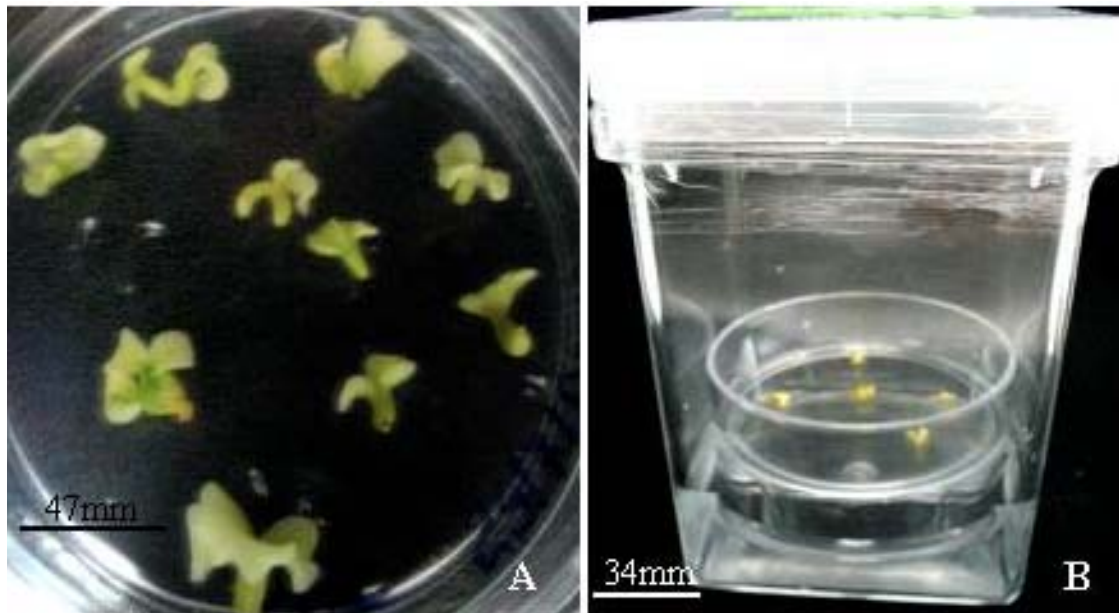


Figura 2 – Maturação e dessecação de embriões somáticos de soja. A – embriões cotiledonares maduros com coloração amarelo-creme característica; B – sistema utilizado para dessecação de embriões cotiledonares na presença de solução de KCl saturada.



Figura 3 – Germinação de embriões somáticos de soja e desenvolvimento de plantas. A – embriões inviáveis após o processo de dessecação; B e C – embriões germinados com sistema radicular desenvolvido; D – embrião com parte aérea desenvolvida; E – plântula regenerada *in vitro*; F – planta aclimatada em condições de laboratório.



Figura 4 – Embriões somáticos de soja apresentando desenvolvimento interrompido. A e B – embriões com sistema radicular bastante alongado e praticamente sem desenvolvimento da parte aérea.

Em relação às duas variedades de soja utilizadas, não foi possível recuperar nenhum embrião viável de CAC-1, provavelmente por causa do pequeno número de amostras utilizadas.

Também ocorreram muitos problemas relacionados à aclimação das plantas regeneradas, com grandes perdas nessa etapa. Vários testes foram realizados quanto ao tipo de substrato mais adequado e condições de aclimação em laboratório e casa de vegetação. Ao final deste trabalho foi possível padronizar alguns procedimentos para garantir condições ideais para a aclimação de plantas regeneradas de soja. As etapas estão listadas a baixo:

- retirada das plântulas do meio de cultura e transferência para água (manter por três dias). Elas devem ser mantidas cobertas com plástico e sob condições de sala de cultivo (temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $24\text{-}36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$);

- transferência das plântulas para copos de plástico de 100 mL com substrato agrícola autoclavado, ainda mantidas cobertas com plástico e sob condições de sala de cultivo (temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $24\text{-}36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$);

- transferência do material para condições de laboratório, em um sistema de prateleiras sob iluminação e com fotoperíodo de 12 horas de luz, inicialmente com irradiância de $32\text{-}46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e posteriormente, mantidas em irradiância de $54\text{-}86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O plástico só deve ser retirado quando as plantas estiverem bem adaptadas. O tempo é variável para cada indivíduo, geralmente de 10 a 20 dias;

- transferência das plantas para casa de vegetação sob sistema de irrigação artificial tipo nevoeiro, coberto com sombrite, com intervalos de pulverização de água de 1 minuto a cada 1 hora, por aproximadamente 5 dias;

- transferência das plantas para vasos com solo, permanecendo ainda sob o sistema de nevoeiro por cerca de 5 dias;

- manutenção dos vasos sob as mesmas condições de cultivo da casa de vegetação.

Ao final de todo o processo de transformação e regeneração de plantas, foi possível regenerar e aclimatar em casa de vegetação apenas cinco plantas. No entanto, a análise molecular por PCR comprovou que não eram transgênicas (Figura 5).

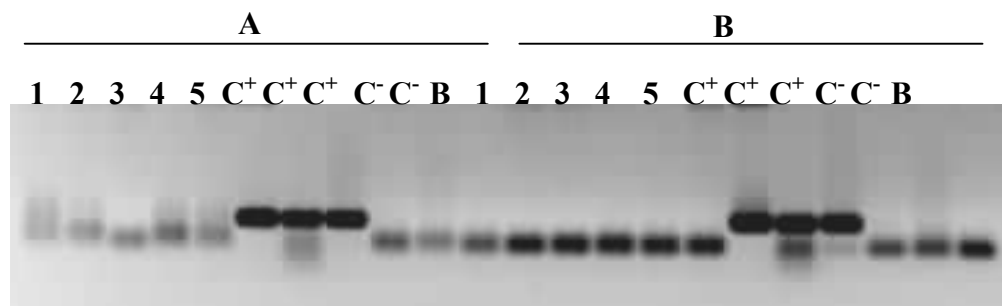


Figura 5 – Análise eletroforética de produtos de amplificação para detecção de transgênicos. Em A foi utilizado o *primer* 35S e em B o *primer* NOS. Como controles positivos (C⁺) para ambos os ensaios foram utilizados o DNA plasmidial do vetor 3301, DNA de soja transgênica e DNA de milho transgênico, respectivamente. Como controles negativos (C⁻) foram utilizados DNAs de soja e milho normais. As canaletas indicadas pelos números de 1 a 5 em A e B, correspondem às cinco plantas regeneradas. As bandas nos controles positivos em A e B correspondem aos fragmentos amplificados, 195 pb (35S) e 180 pb (NOS), respectivamente.

Durante o isolamento de embriões para a maturação também foram coletadas amostras de diferentes agregados embriogênicos, representando diferentes eventos de transformação para uma análise antecipada quanto a transgenia. Os resultados podem ser observados nas Figuras 6 e 7. Foram realizadas extrações de DNA de 110 embriões e 10 plântulas, entretanto, muitas amostras foram descartadas devido à qualidade do DNA. Do total de 120 amostras, foram realizadas reações de PCR com 66 e dessas, 39 apresentaram resultado positivo. No entanto, essas 120 amostras analisadas representam apenas uma pequena parcela de toda a população dos possíveis eventos transgênicos ocorridos.

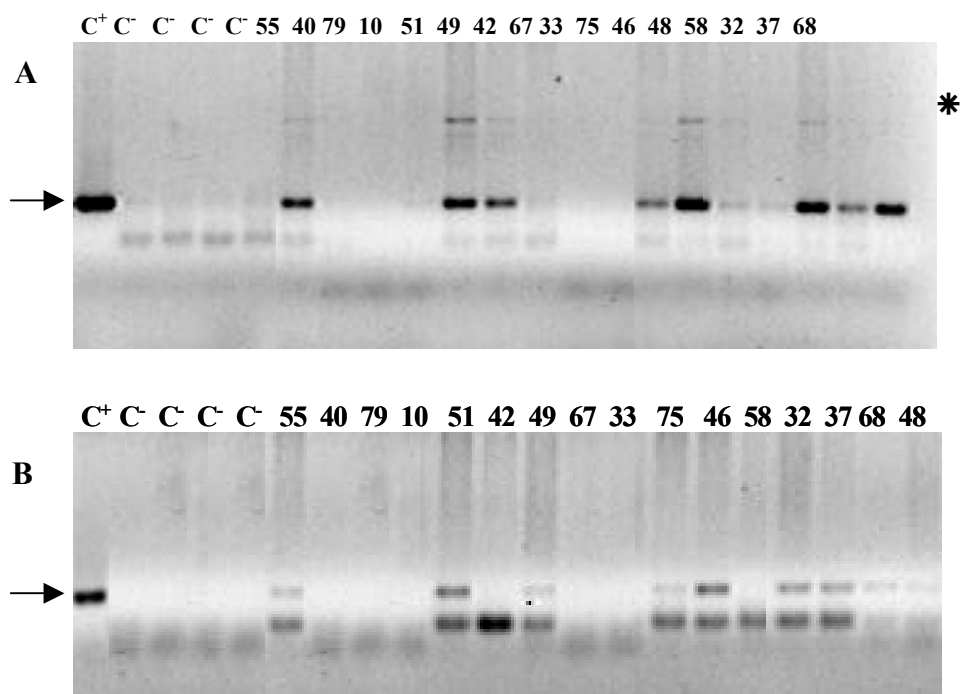


Figura 6 – Análise eletroforética de produtos de amplificação para detecção de transgênicos. Em A foi utilizado o *primer* 35S e em B o *primer* NOS. Como controle positivo (C⁺) foi utilizado o DNA plasmidial do vetor 3301. Como controles negativos (C⁻) foram utilizados, respectivamente, DNAs de algodão, soja e de dois embriões não transformados. As canaletas indicadas por números representam os diferentes eventos analisados. As setas em A e B correspondem aos fragmentos amplificados, 195 pb (35S) e 180 pb (NOS), respectivamente. O asterisco (*) em A indica o fragmento amplificado correspondente ao outro promotor 35S presente no clone 1.30, que dirige a expressão do gene *bar*.

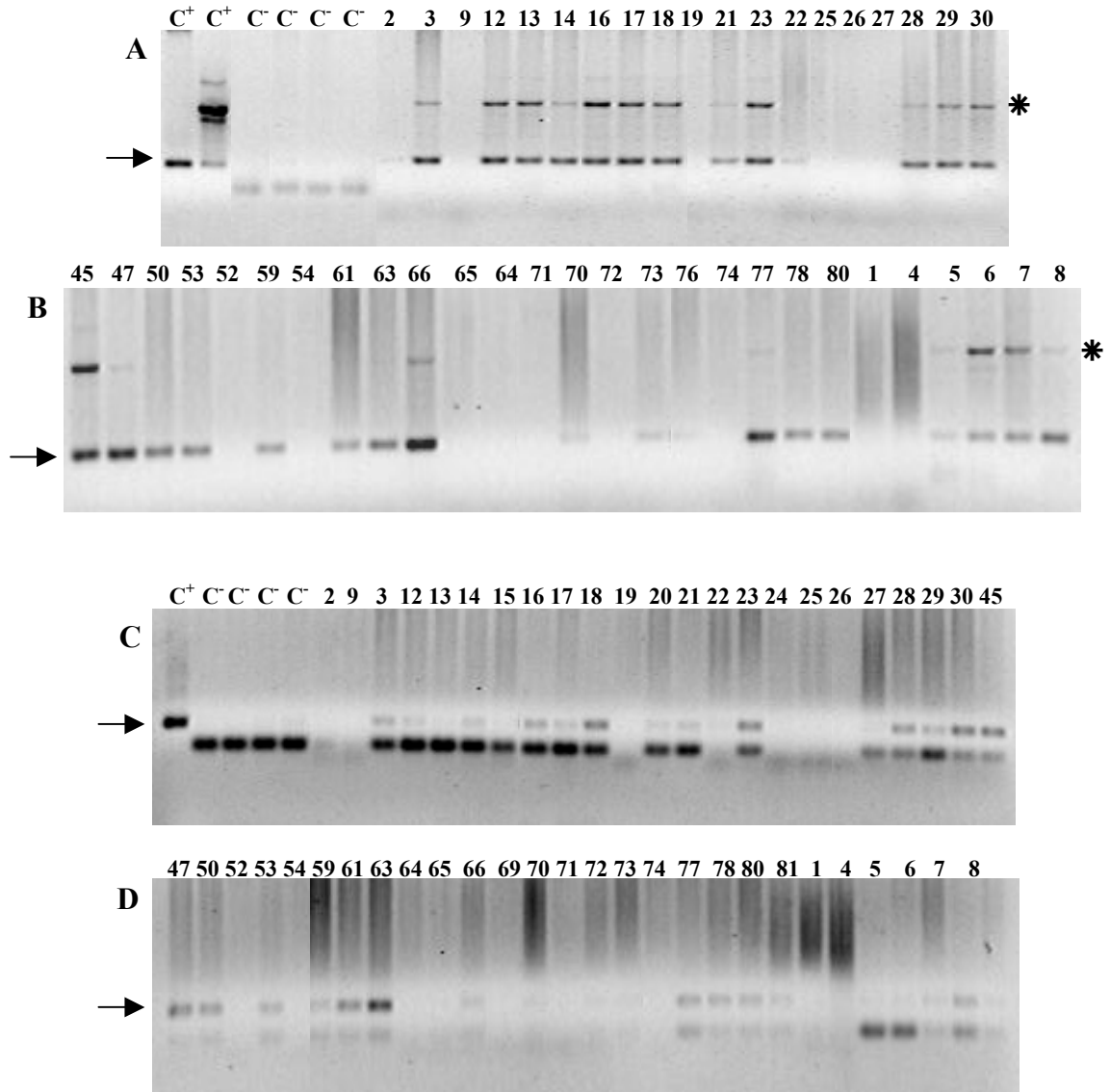


Figura 7 – Análise eletroforética de produtos de amplificação para detecção de transgênicos. Em A e B foram utilizados o *primer* 35S e em C e D o *primer* NOS. Como controles positivos (C^+) foram utilizados o DNA plasmidial do vetor 3301 (para NOS e 35S) e do vetor pstblue (apenas para 35S). Como controles negativos (C^-) foram utilizados, respectivamente, DNAs de algodão, soja e de dois embriões não transformados. As canaletas indicadas por números representam os diferentes eventos analisados. As setas em A e B correspondem ao fragmento amplificado de 195 pb (35S) e em C e D, ao fragmento de 180 pb (NOS). Os asteriscos (*) em A e B indicam o fragmento amplificado correspondente ao outro promotor 35S presente no clone 1.30, que dirige a expressão do gene *bar*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R.; ALBINO, M. M. C.; RECH, E. L. 2002. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. **Crop Science**, v. 42, p. 1298-1302

BAILEY, M. A.; BOERMA, H. R.; PARROTT, W. A. 1993. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, v. 29, p. 102-108

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

BLACKMAN, S. A.; WETTLAUFER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. 1991. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, v. 96, p. 868-874

BRASILEIRO, A. C. M. 1998. Co-cultura com linhagens desarmadas de *Agrobacterium* In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. ed. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 111-125

BUCHHEIM, J. A.; COLBURN, S. M.; RANCH, J. P. 1989. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. **Plant Physiology**, v. 89, p. 768-775

BUHR, T.; SATO, S.; EBRAHIM, F.; XING, A.; ZHOU, Y.; MATHIESEN, M.; SCHWEIGER, B.; KINNEY, A.; STASWICK, P.; CLEMENTE, T. 2002. Ribozyme

termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean. **Plant Journal**, v. 30, n. 2, p. 155-163

CAHOON, E. B.; MARILLIA, E. F.; STECCA, K. L.; HALL, S. E.; TAYLOR, D. C.; KINNEY, A. J. 2000. Production of fatty acid components of meadowfoam oil in somatic soybean embryos. **Plant Physiology**, v. 124, p. 243-251

CAHOON, E. B.; RIPP, K. G.; HALL, S. E.; KINNEY, A. J. 2001. Formation of conjugated Δ^8 , Δ^{10} - double bonds by Δ^{12} - oleic-acid desaturase-related enzymes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 4, p. 2637-2643

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

DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BONADESE-ZANETTINI, M. H. 2000. Integrated bombardment and *Agrobacterium* transformation system: an alternative method for soybean transformation. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 18, p. 51-59

FINER, J. J.; MCMULLEN, M. D. 1991. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension tissue culture. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**, v. 27, p. 175-182

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

FINER, J. J. 1994. Plant regeneration via embryogenic suspension culture. In: Dixon, R.A. and Gonzales, R.A. (eds.). **Plant Cell Culture: a practical approach**. Oxford University Press, Oxford, p. 67-102

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158

GESTEIRA, A. S. 2002. **Avaliação do potencial embriogênico de cultivares de soja e transformação com o gene da citrato sintase**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, MG, 65p

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. 1999. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, v. 2, p. 533-568

HARTWECK, L. M.; LAZZERI, P. A.; CUI, D.; COLLINS, G. B.; WILLIAMS, E. G. 1988. Auxin-orientation effects and histological analysis of soybean somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**, v. 24, p. 821-828

HINCHEE, M. A.W.; CONNOR-WARD, D. V.; NEWELL, C. A.; MCDONNELL, R. E.; SATO, S. J.; GASSER, C. S.; FISCHHOFF, D. A.; RE, D. B; FRALEY, R. T.; HORSCH, R. B. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. **Bio/Technology**, v. 6, p. 916-922

KINNEY A. J. 1996. Development of genetically engineered soybean oils for food application. **Journal of Food Lipids**, v. 3, p. 273-292

KO, T. S.; LEE, S.; KRASNYANSKKI, S.; KORBAN, S. S. 2003. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p. 439-447

KO, T. S.; LEE, S.; FARRAND, S. K.; KORBAN, S. S. 2004. A partially disarmed *vir* helper plasmid, pKYRT1, in conjunction with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid promotes emergence of regenerable transgenic somatic embryos from immature cotyledons of soybean. **Planta**, v. 218, p. 536-541

KOEHLER, A. D. 2004. **Embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC, AVG e STS e pulsos de 2,4-D**. Tese (Mestrado em Botânica), Universidade Federal de Viçosa, MG, 72p

KOMATSUDA, T.; KO, S. W. 1990. Screening of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] genotypes for somatic embryo production from immature embryo. **Japanese Journal of Breeding**, v. 40, p. 249-251

KOMATSUDA, T.; LEE, W.; OKA, S. 1992. Maturation and germination of somatic embryo in soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v. 28, p. 103-113

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

LIU, W.; HILDEBRAND, D. F.; MOORE, P. J.; COLLINS, G. B. 1994. Expression of desiccation-induced and lipoxygenase genes during the transition from the maturation to the germination phases in soybean somatic embryos. **Planta**, v. 194, p. 69-76

LUO, H.; HU, Q.; NELSON, K.; LONGO, C.; KAUSCH, A. P.; CHANDLEE, J. M.; WIPFF, J. K.; FRICKER, C. R. 2004. *Agrobacterium tumefaciens* – mediated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) transformation using phosphinothricin selection results in a high frequency of single-copy transgene integration. **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 645-652

MCCABE, D. E.; SWAIN, W. F.; MARTINELL, B. J.; CHRISTOU, P. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. **Bio/Technology**, v. 6, p. 923-926

MEURER, C. A.; DINKINS, R. D.; REDMOND, C. T.; MCALLISTER, K. P.; TUCKER, D. T.; WALKER, D. R.; PARROT, W. A.; TRICK, H. N.; ESSIG, J. S.; FRANTZ, H. M.; FINER, J. J.; COLLINS, G. B. 2001. Embryogenic response of

multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars across three locations. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, v. 37, p. 62-67

MIKI, B.; MCHUGH, S. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. **Journal of Biotechnology**, v. 107, p. 193-232

MONTEIRO, M. 2005. **Transformação genética de maracujá amarelo visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae***. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 134p

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-479

RANCH, J. P., OGLESBY, L., ZIELINSKI, C. 1985. Plant regeneration from embryo derived tissue cultures of soybeans. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**, v. 21, p. 653-658

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

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

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

SAWAHEL, W. A. 1994. Transgenic plants: performance, release and containment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 139-144

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

SOUZA JÚNIOR, M. T.; VENTUROLI, M. F.; COELHO, M. C. F.; RECH FILHO, E. L. 2001. Análise de sistemas gene marcador/ agente seletivo alternativos para seleção positiva de embriões somáticos transgênicos de mamoeiro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 365-372

TAKAHASHI, E. K. 2002. **Transferência do gene *atacinaA* para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 137p

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

TRICK, H. N.; DINKINS, R. D.; SANTARÉM, E. R.; DI, R.; SAMOYLOV, V.; MEURER, C. A.; WALKER, D. R.; PARROTT, W. A.; FINER, J. J.; COLLINS G. B. 1997. Recent advances in soybean transformation. **Plant Tissue Culture Biotechnology**, v. 3, p. 9-27

WRIGHT, M. S.; LAUNIS, K. L.; DUESING, R. J. H.; HARMS, C. T. 1991. A simple method for the recovery of multiple fertile plants from individual somatic embryos of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, v. 27, p. 153-157

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

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

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

CAPÍTULO 3

ESTABELECIMENTO DE METODOLOGIAS PARA A ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DA FRAÇÃO ÓLEO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA

RESUMO

A obtenção de cultivares de soja com níveis reduzidos dos teores de ácidos graxos saturados e polinsaturados representa um grande atrativo econômico para a indústria, pois aumenta a estabilidade oxidativa do óleo. O efeito do silenciamento gênico de enzimas da biossíntese de ácidos graxos polinsaturados pode ser avaliado ainda em condições *in vitro*, por meio da dosagem de ácidos graxos de embriões somáticos transformados, prevendo este fenótipo em sementes obtidas de plantas regeneradas. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia para extração de ácidos graxos de embriões somáticos de soja por meio de cromatografia gasosa e utilizá-la na análise da composição de embriões transgênicos. Foram analisadas amostras de embriões nos estádios globular, torpedado, cotiledonar, cotiledonar maduro e dessecado. Foi verificado que a partir do estágio torpedado já existe coincidência entre a composição de ácidos graxos do embrião em relação à semente madura. No entanto, como já relatado na literatura, recomenda-se utilizar o estágio cotiledonar maduro para prever a composição de sementes obtidas de plantas regeneradas a partir desses embriões. A análise por RT-PCR mostrou um aumento no acúmulo de transcritos do gene *Fad2-1* do estágio globular para torpedado. A expressão desse gene permaneceu relativamente constante até o estágio cotiledonar maduro, com redução da expressão após o processo de dessecação. A metodologia adaptada foi capaz de detectar alterações da composição de ácidos graxos de possíveis embriões transgênicos. Os perfis de ácidos graxos de 138 embriões foram analisados por meio de estatística descritiva, sendo agrupados em classes de concentrações de ácidos graxos para verificar a frequência dos diferentes eventos de transformação, sendo os ácidos oléico, linoléico e linolênico os principais alvos de modificação. Quanto ao conteúdo de 18:1, dos 138 embriões analisados, cerca de 61% (84 embriões) apresentaram conteúdo semelhante ao controle

não transformado e semente madura (13-22%), 13% (18) apresentaram níveis inferiores (9-13%) e 26% (36) apresentaram níveis aumentados de 18:1 (22-61%), provavelmente como possível consequência de silenciamento gênico. Em relação ao conteúdo de 18:2, 64% dos embriões (88) apresentaram conteúdo semelhante aos controles não transformados (49-59%), 12% (17) apresentaram níveis superiores (59-64%) e 24% (33) apresentaram níveis inferiores de 18:2 (6-49%). Para o conteúdo de 18:3, cerca de 73% dos embriões (101) apresentaram conteúdo semelhante ao controle não transformado e semente madura (8-15%), 22% (30) apresentaram níveis superiores (15-27%) e 5% (7) apresentaram níveis inferiores (4-8%). Os resultados mostraram claramente a existência de modificação na composição de ácidos graxos nos embriões cotiledonares analisados. Entretanto, não se pode afirmar que essas alterações sejam devidas a fenômenos de silenciamento gênico. Esses resultados podem ter sofrido a influência de variações somaclonais ou da auxina 2,4-D.

1. INTRODUÇÃO

O óleo de soja, como alguns outros óleos vegetais, é composto quase exclusivamente por triacilgliceróis. Esses compostos possuem três moléculas de ácidos graxos esterificadas aos grupos hidroxila da molécula de glicerol. Os principais ácidos graxos encontrados no óleo de soja comercial e as suas respectivas proporções são: o ácido palmítico (C16:0) - 11%, o ácido esteárico (C18:0) - 4%, o ácido oléico (C18:1, delta⁹) - 21%, o ácido linoléico (C18:2, delta^{9,12}) - 53% e o ácido linolênico (C18:3, delta^{9,12,15}) - 8% (Yadav, 1996). Os ácidos graxos polinsaturados (C18:2 e C18:3) disponíveis após a hidrólise das moléculas de triacilgliceróis, são essenciais na dieta dos mamíferos, entretanto, são facilmente oxidáveis, diminuindo a qualidade nutricional do óleo (Murphy, 1999; Yadav, 1996).

O conteúdo de ácidos graxos polinsaturados é o mais importante determinante da qualidade do óleo (Bruner et al., 2001). Portanto, existe um considerável interesse em se modificar a composição do óleo por melhoramento tradicional ou pelo uso da biotecnologia, com objetivo de produzir óleos com atributos nutricionais e funcionais desejáveis (Wang e Hildebrand, 1988; Osório et al., 1995; Kinney, 1996).

A biossíntese do óleo envolve dois estágios que se sobrepõem: a biossíntese de ácidos graxos e a síntese de triacilgliceróis (Figura 1).

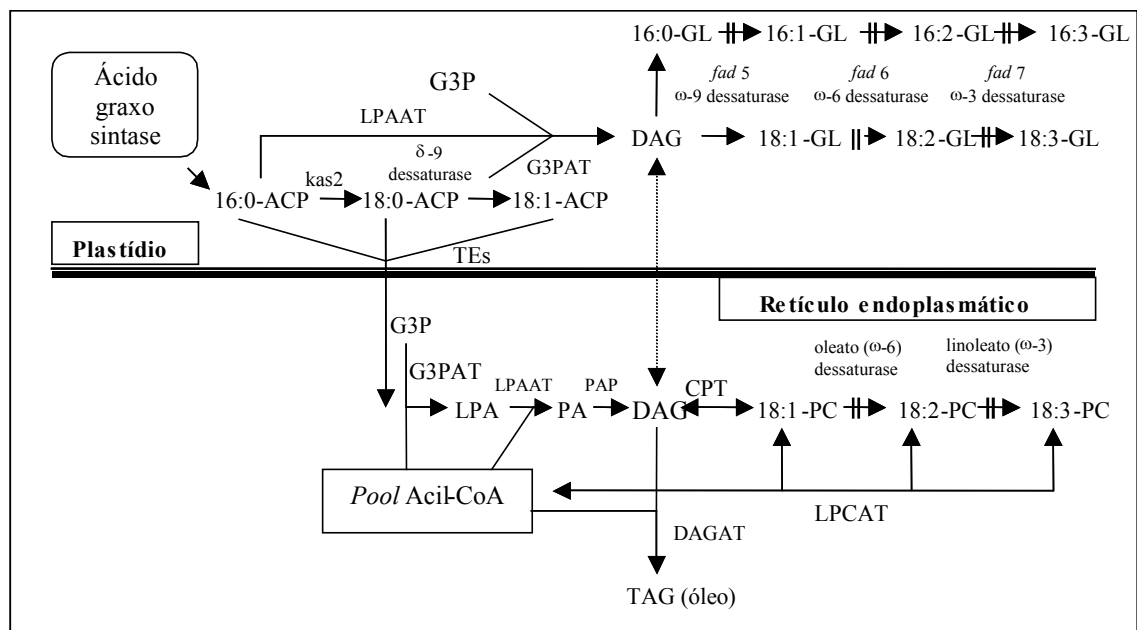


Figura 1 - Representação esquemática da biossíntese do óleo em plantas.

O caminho biossintético de glicerolípídios nos plastídios parece não ser significativo em sementes oleaginosas em desenvolvimento. A linha tracejada entre DAGs (diacilgliceróis) plastidiais e extraplastidiais mostra a troca de glicerolípídios entre os dois compartimentos por mecanismos ainda desconhecidos. São indicados mutantes nos passos de dessaturações em *Arabidopsis*. CPT - colinafosfotransferase, LPCAT - lisofosfatidilcolina aciltransferase e DAGAT - diacilglicerol aciltransferase (Yadav, 1996).

A síntese de ácidos graxos inicia-se nos plastídios, com a carboxilação do acetil-CoA para malonil-CoA via acetil-CoA carboxilase (ACCase). O acetil-CoA é considerado o substrato inicial para a síntese do esqueleto carbônico de todos os ácidos graxos. Um intermediário importante é a proteína ACP (proteína carreadora de grupamento acil), considerada como cofator para a síntese de ácidos graxos.

O malonil-CoA formado é, então, convertido a ácidos graxos por uma seqüência de reações que vão adicionando dois carbonos à cadeia em crescimento, levando à síntese dos três primeiros ácidos graxos: palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e oléico

(C18:1). Essas reações são catalisadas por um complexo multienzimático, denominado ácido graxo sintase.

A elongação do palmitoil-ACP (16:0-ACP) a estearoil-ACP (18:0-ACP) é catalisada pela enzima β -cetoacil sintase II (KAS 2) e a conversão do 18:0-ACP em oleoil-ACP (18:1-ACP) é catalisada pela estearoil-ACP dessaturase (δ -9 dessaturase). Pelo fato desta enzima não dessaturar palmitoil-ACP, o controle da elongação de palmitoil-ACP a estearoil-ACP é um ponto-chave na determinação do conteúdo de ácidos graxos presente nos lipídios de membrana e de reserva (Somerville e Browse, 1991).

Uma vez que palmitoil-, estearoil- e oleoil-ACP tenham sido sintetizados, eles podem sofrer a ação das enzimas transferases, podendo permanecer nos plastídios para a síntese de lipídios de membrana ou serem substratos para as tioesterases, sendo transportados para o citosol na forma de acil-CoA (Coenzima-A) para produção de óleo de reserva no retículo endoplasmático e lipídios estruturais de membranas extraplastidiais (Yadav, 1996).

Assim, os ácidos graxos polinsaturados podem ser sintetizados tanto no retículo endoplasmático quanto no plastídio (Yadav, 1996; Los e Murata, 1998). Em ambos os casos, a biossíntese do ácido linoléico (C18:2) e do ácido linolênico (C18:3) é catalisada pela oleoil e linoleoil dessaturase, respectivamente. O principal substrato das dessaturases microssomais é a fosfatidilcolina, sendo a via do retículo endoplasmático predominante durante a biossíntese do óleo em sementes em desenvolvimento e em outros tecidos não-fotossintetizantes (Yadav, 1996).

Durante a biossíntese de triacilgliceróis no retículo endoplasmático, ocorre adição seqüencial de grupamentos acil nas posições 1 e 2 do glicerol-3-fosfato, catalisada pela glicerol-3-P aciltransferase e produção de ácido fosfatídico. Este sofre a ação da ácido fosfatídico fosfatase e é, então, convertido a diacilglicerol (DAG). Assim, os diacilgliceróis representam o ponto de ramificação para a biossíntese de lipídios de membrana ou de reserva. Para formar lipídios de membrana, os DAGs são reversivelmente convertidos em fosfatidilcolina pela colinafosfotransferase (CPT). Então, a fosfatidilcolina atua como substrato para a biossíntese de ácidos graxos polinsaturados, os quais podem retornar ao *pool* de acil-CoA citoplasmático pela ação da

lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT). O DAG pode também, sofrer acilação final na posição 3 da molécula do glicerol e ser convertido a triacilglicerol (TAG), sendo esta reação catalisada pela diacilglicerol aciltransferase (DAGAT) (Yadav, 1996).

Em relação aos polinsaturados, os níveis de C18:2 e de C18:3 no óleo dependem das taxas de biossíntese e de suas disponibilidades para a biossíntese do óleo. Essa disponibilidade de ácidos graxos polinsaturados para incorporação em triacilgliceróis de reserva pode se dar por meio de dois mecanismos: 1) reação reversível da CPT, a qual converte fosfatidilcolina contendo ácidos graxos em DAG, que por sua vez, pode ser utilizado para a biossíntese de óleo via DAGAT e 2) reação reversível da LPCAT, que catalisa a troca de grupamentos acil, geralmente entre oleoil-CoA e um grupo acil polinsaturado da posição 2 da fosfatidilcolina. Isso resulta no enriquecimento do *pool* de acil-CoA com ácidos graxos polinsaturados para uso na biossíntese do óleo (Yadav, 1996).

A elucidação dos caminhos enzimáticos associados à síntese e degradação de lipídios, a caracterização das enzimas envolvidas e a definição dos mecanismos que regulam a composição de lipídios de reserva e estruturais são de grande interesse para a produção de sementes oleaginosas geneticamente modificadas, que possuam atributos nutricionais e funcionais desejáveis (Somerville e Browse, 1991; Kinney, 1996).

Com o advento das técnicas de biologia molecular tem sido possível a clonagem de genes que codificam algumas destas enzimas, como da oleato e linoleato dessaturases, ácido lisofosfatídico aciltransferase e colinafosfotransferase. Os genes da oleato e linoleato dessaturases foram isolados por T-DNA *tagging* e os cDNAs que codificam LPCAT e CPT foram isolados por meio de complementação em *E. coli* e levedura, respectivamente. Esses isolamentos têm permitido a obtenção de mutantes de soja e de outras culturas economicamente importantes, que apresentam composição de ácidos graxos modificada (Yadav, 1996). O grande avanço dos processos biotecnológicos também tem permitido a utilização destes genes para a criação de novas variedades geneticamente modificadas que estarão disponíveis para o consumo em alguns anos.

Entretanto, uma das limitações para acompanhar a expressão do gene por meio de análise do teor de ácidos graxos do óleo em plantas transformadas, é o tempo

requerido para a planta produzir sementes. Assim, tem-se grande interesse em metodologias para prever a composição de ácidos graxos da semente a partir de outros tecidos da planta (Murphy, 1999).

Segundo Kinney (1996), quando embriões somáticos de soja são transformados com genes que codificam enzimas da via biossintética de ácidos graxos, a composição de ácidos graxos do embrião somático maduro é predita ou equivalente à composição final presente no óleo da semente de plantas regeneradas a partir destes embriões. Isso foi inicialmente demonstrado usando construção *antisense* e *sense* com o cDNA de duas dessaturases de ácidos graxos, a oleoil dessaturase microsomal ou ω 6-dessaturase (Fad2-1) e a linoleoil dessaturase microsomal ou ω 3-dessaturase (Fad3-1). Foi possível regenerar plantas férteis a partir de embriões somáticos transformados com construções gênicas destas duas enzimas sob o controle do promotor da β -conglucina. A construção *antisense* produziu aumento no nível de 18:1 de 20 para cerca de 80% e diminuiu o nível de saturados para menos que 11%. A construção *sense* também foi efetiva no aumento de 18:1 em embriões somáticos devido à co-supressão do gene endógeno.

O Programa de Melhoramento Genético da Qualidade do Óleo e Proteína da Soja, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa, visando desenvolver linhagens especiais de soja para agroindústria, desenvolveu um valioso germoplasma que inclui, dentre outras, linhagens com baixos teores de ácido linolênico. Dentro deste contexto, a principal meta desse programa é aumentar a estabilidade oxidativa do óleo pela redução do conteúdo de ácido linolênico e pelo aumento do conteúdo do ácido oléico (Moreira, 1999).

Portanto, a obtenção de cultivares de soja com níveis reduzidos dos teores de ácidos graxos saturados e polinsaturados representa um grande atrativo econômico para a indústria e comércio, por proporcionarem melhor qualidade ao produto final. Uma das estratégias empregadas para a obtenção de tais características seria a modificação genética da expressão de enzimas-chave da biossíntese de ácidos graxos polinsaturados, através de técnicas de transformação genética de plantas. Nesse sentido, trabalhos visando o silenciamento gênico de algumas destas enzimas por meio de transformação genética de embriões somáticos estão sendo conduzidos pelo programa de melhoramento de soja. Pelo menos três enzimas têm sido relacionadas ao

enriquecimento da composição de triacilgliceróis (oleoil dessaturase, colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase) e constituem os alvos principais para o silenciamento por meio de metodologias como RNA *antisense*, co-supressão e RNAi.

No entanto, é necessário um período de cerca de 24 meses, desde a transformação de células de soja até a regeneração de plantas para se analisar a modificação da composição de ácidos graxos em sementes transgênicas (Kinney, 1996). Dessa forma, o efeito do silenciamento gênico poderá ser analisado ainda em condições *in vitro*, por meio da dosagem de ácidos graxos de embriões somáticos transformados, permitindo selecionar precocemente, embriões que apresentem modificações mais adequadas.

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia para extração de ácidos graxos de embriões somáticos de soja e utilizá-la na análise da composição de embriões transformados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Determinação da composição de ácidos graxos em sementes maduras de soja

A composição de ácidos graxos no óleo das sementes de soja foi determinada por cromatografia gasosa e utilizada como padrão para comparação com os valores encontrados nas amostras de embriões somáticos. Foram realizadas três repetições para cada amostra.

Cerca de 20 mg de semente madura e moída da variedade VMax foram colocadas em tubos de ensaio e a cada amostra foi adicionado 1 mL de hexano. Após agitação em vórtex por 1 minuto, a mistura foi mantida a 4°C por 16 horas no escuro. Após esse período, a solução de óleo em hexano foi transferida para outro tubo e realizada a evaporação do solvente com nitrogênio gasoso. Foram então adicionados 400 µL de uma solução de metóxido de sódio 1 M e a mistura foi mantida em banho-maria a 30°C por 1 hora. A seguir, foram adicionados 1 mL de água deionizada e 1,5 mL de hexano, sendo a mistura novamente agitada em vórtex e mantida em descanso por 1 hora no escuro. Após este período, cerca de 750 µL da fase orgânica contendo os metil-ésteres foram coletados e transferidos para outro tubo, ao qual foi adicionada cerca de 1 mg de sulfato de sódio anidro. Em seguida, as amostras foram transferidas para os tubos do auto-injetor do cromatógrafo.

Alíquotas de 1 µL foram injetadas no cromatógrafo a gás GC-17A (SHIMADZU) equipado com auto-injetor AOC-17, integrador C-R7A e a coluna carbowax (30 m x 0,32 mm), contendo polietilenoglicol como fase estacionária. As temperaturas utilizadas nas análises foram 225°C para a coluna, 245°C para o injetor e 280°C para o detector. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio com um fluxo de 1,1 mL/minuto.

2.2 Determinação da composição de ácidos graxos em embriões somáticos de soja

Foram coletadas amostras de embriões somáticos nos estádios globular, torpedo, cotiledonar, cotiledonar maduro e dessecado, sendo imediatamente pesadas, transferidas para microtubos de 1,5 mL e congeladas a -80°C . A determinação de seus conteúdos de ácidos graxos também foi realizada por cromatografia gasosa.

Os procedimentos de extração e preparo das amostras dos embriões somáticos foram adaptados a partir de metodologias descritas por Hitz et al. (1994) e Cahoon et al. (2000) e também dos protocolos utilizados para análise de sementes maduras. Essas modificações foram necessárias devido à baixa quantidade de lipídios presente nos embriões somáticos e os problemas iniciais com a sensibilidade da detecção no cromatógrafo foram contornados pela introdução dos passos de liofilização dos embriões antes da extração e de concentração das amostras com nitrogênio gasoso antes da injeção.

Para os estádios globular e torpedo, cada amostra foi constituída de cerca de 30 mg de embriões ou agregados de embriões (massa fresca) e para os estádios cotiledonar, cotiledonar maduro e cotiledonar dessecado, cada amostra foi constituída por um único embrião com aproximadamente a mesma massa fresca. As amostras foram analisadas em triplicata. O estádio cordiforme não foi considerado para a análise devido a dificuldades de obtenção de quantidade suficiente de embriões que equivalesse a uma amostra com no mínimo três repetições.

Cada amostra foi transferida para tubos de ensaio e liofilizada por um período de aproximadamente 5 horas. Após esta etapa, foi adicionado 1 mL de hexano, sendo a mistura mantida a 4°C por cerca de 16 horas. A solução de óleo em hexano foi então transferida para outro tubo e realizada a evaporação do solvente com nitrogênio gasoso. Foram adicionados 500 μL de uma solução de metóxido de sódio 1M e a mistura foi mantida em banho-maria a 30°C por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 μL de NaCl 1M e 500 μL de hexano, sendo a mistura novamente agitada em vórtex e mantida em descanso por 1 hora no escuro. Após esse período, a fase orgânica contendo os metil-ésteres foi coletada e transferida para outro tubo, onde foi adicionada cerca de 1

mg de sulfato de sódio anidro. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos do auto-injetor e concentradas para um volume final de 100 μ L pela evaporação do hexano com nitrogênio gasoso. O volume de amostra injetado também foi de 1 μ L.

As análises de ácidos graxos de embriões transformados também foram realizadas seguindo o mesmo procedimento descrito acima, no entanto, foram utilizadas apenas amostras de embriões no estágio cotiledonar maduro.

A composição relativa de ácidos graxos foi calculada como sendo a porcentagem com que cada ácido graxo está representado no perfil total de ácidos graxos determinado para cada amostra.

Foi realizada a análise descritiva dos resultados para os embriões somáticos transformados e controle, determinando-se os seguintes parâmetros: média aritmética, variância, desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação, valor máximo e mínimo e amplitude para os cinco principais ácidos graxos. Também foi determinada a distribuição de frequência para os conteúdos de ácido oléico, linoléico e linolênico extraídos dos embriões somáticos transformados.

2.3. Extração de RNA total de embriões somáticos de soja

A extração de RNA total de embriões somáticos de soja foi realizada com o reagente Trizol (INVITROGEN), seguindo o protocolo do fabricante, porém, com algumas modificações. Todas as etapas de extração foram realizadas a 4⁰C e em condições livre de ribonucleases.

Amostras de embriões globulares, torpedo, cotiledonar, cotiledonar maduro e dessecado foram coletadas das placas de cultura, armazenadas em microtubos de 1,5 mL e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80⁰C até o momento da extração.

Aproximadamente 30 mg de embriões somáticos dos estádios globular e torpedo e embriões individualizados dos demais estádios de desenvolvimento com a mesma massa fresca foram macerados em nitrogênio líquido utilizando o pistilo do aparelho politron até a máxima pulverização do material vegetal. Em seguida, foram adicionados

750 µL do reagente Trizol e as amostras foram novamente homogeneizadas no politron. Após uma incubação de 5 minutos no gelo, foram adicionados 200µL de clorofórmio. As amostras foram agitadas em vórtex por 15 segundos e submetidas a um passo de centrifugação a 13.000 g por 15 minutos a 4⁰C. A fase superior foi transferida para um novo microtubo e submetida à precipitação com 400 µL de isopropanol gelado por 2 horas a -20⁰C. Após centrifugação a 13.000 g por 20 minutos a 4⁰C, o precipitado resultante foi lavado duas vezes com 200 µL de etanol 70% e seco à temperatura ambiente. Cada amostra foi ressuspensa em 20 µL de água DEPC.

As amostras foram quantificadas a 260 nm e analisadas em gel de agarose 1,5%.

2.4. Ensaio de RT-PCR para análise da expressão do gene Fad2-1 durante o desenvolvimento embrionário

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando o kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis System* (INVITROGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA total (5 µg) dos diferentes estádios de desenvolvimento foram incubadas com 1 µL de oligo (dT)₁₂₋₁₈ a 70°C por 10 minutos e em seguida, incubadas no gelo. Foi então adicionado tampão de PCR 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 5 mM, os quatro dNTPs, 0,5 mM cada e DTT 5 mM, e estas foram incubadas a 42°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionadas 200 U da enzima transcriptase reversa e as amostras foram incubadas a 42°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos. Após a síntese da primeira fita de cDNA, o RNA foi degradado pela adição de 2 U de RNase H sob incubação a 37°C por 20 minutos. Para cada amostra foi feito um controle negativo que continha todos os reagentes, à exceção da transcriptase reversa.

Inicialmente as reações de síntese da segunda fita e amplificação por PCR foram realizadas com o *primer* de actina de soja (F 5' – CCC CTC AAC CCA AAG GTC AAC AG – 3' e R 5' – GGA ATC TCT CTG CCC CAA TTG TG – 3') com a finalidade de verificar a contaminação com DNA genômico e normalizar a quantidade de cDNA molde.

As reações de síntese da segunda fita de cDNA foram realizadas com os *primers* Dessaturase F e Dessaturase R (seqüências descritas no primeiro capítulo) para amplificação de um produto de cerca de 1,39 kb, usando a reação de síntese da primeira fita de cDNA dos estádios globular, torpedo, cotiledonar, cotiledonar maduro e maduro dessecado. Cada reação de amplificação de 25 µL continha 2µL da reação de síntese da primeira fita, Tris-HCl 10mM pH8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; 0,2 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,8 µM de *primers* e 1 U de Taq DNA polimerase.

Os ciclos de amplificação da reação de PCR foram constituídos por uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos constituídos por: uma segunda etapa de desnaturação a 94°C por 1 minuto, uma etapa de ligação dos *primers* ao cDNA molde a 56°C por 1 minuto e 30 segundos e uma etapa de extensão a 72°C por 2 minutos. Foi realizado um último passo de extensão a 72°C por 7 minutos, após os 35 ciclos.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 1X contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas do DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de metodologias adaptadas no laboratório, foi possível estabelecer um protocolo de extração e análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa utilizando amostras de embriões somáticos de soja em diferentes estádios de desenvolvimento (globular, torpedado, cotiledonar, cotiledonar maduro e cotiledonar maduro dessecado). Esses procedimentos se mostraram eficientes para determinar a composição dos cinco principais ácidos graxos em amostras a partir de 30 mg de massa fresca. Essa sensibilidade só foi alcançada utilizando a liofilização dos embriões antes da extração e também, a concentração da amostra antes de sua injeção no cromatógrafo.

Os valores obtidos para os cinco principais ácidos graxos da fração óleo de embriões somáticos e sementes maduras da variedade VMax podem ser observados na Tabela 1. A partir do estágio torpedado a composição de ácidos graxos não variou significativamente até o final do desenvolvimento embrionário. Quando comparados com os dados de semente madura, demonstra resultados equivalentes, entretanto, o estágio globular apresentou valores diferentes em relação aos demais estádios de desenvolvimento e também à semente madura.

Tabela 1 - Composição de ácidos graxos de embriões somáticos de soja e semente madura da variedade VMax.

Fase de desenvolvimento	Palmítico		Estearíco		Oléico		Linoléico		Linolênico	
Estádio globular	13,04	a	4,67	a	15,86	b	43,49	b	22,94	b
Estádio torpedado	11,01	ab	3,68	a	21,27	a	54,88	a	9,17	a
Estádio cotiledonar	10,40	b	3,34	a	22,56	a	53,78	a	9,93	a
Estádio cotiledonar maduro	11,10	ab	3,65	a	20,96	a	52,74	a	11,55	a
Estádio cotil. mad. dessecado	10,73	b	3,60	a	21,58	a	56,29	a	7,81	a
Semente madura	10,62	b	3,34	a	20,40	a	57,38	a	8,26	a
C V (%)	7,098		27,720		5,611		5,656		13,274	

As médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Assim, a partir do estágio torpedado já existe uma coincidência na composição de ácidos graxos em relação à semente madura, permitindo prever, já neste estágio, a composição final de ácidos graxos (Figura 2). No entanto, vários trabalhos utilizam o

estádio cotiledonar maduro para analisar a composição de ácidos graxos de embriões somáticos como forma de predizer este fenótipo em sementes obtidas de plantas regeneradas a partir destes embriões (Kinney, 1996; Cahoon et al., 1999 e 2000).

Um único embrião torpedo apresenta massa fresca insuficiente para a análise por cromatografia e o resultado pode não ser equivalente ao de semente madura de uma única planta regenerada. Por isso, é aconselhável analisar e fazer a seleção dos eventos favoráveis no estágio cotiledonar, uma vez que um embrião equivale a uma amostra.

Durante o desenvolvimento de embriões somáticos foram observadas mudanças na composição de ácidos graxos no estágio globular, com aumento nos conteúdos de 18:1 e 18:2 e diminuição do conteúdo de 18:3 (Figura 2 e Tabela 1).

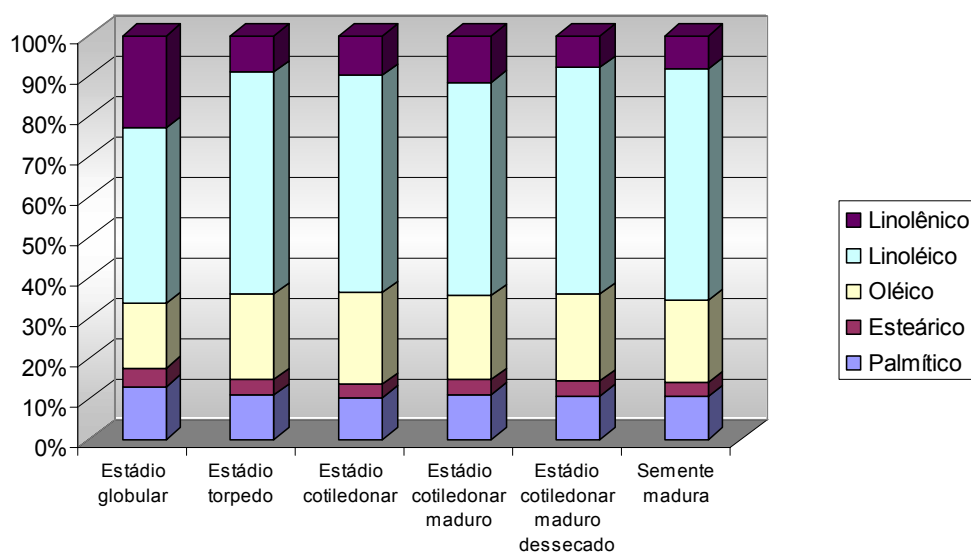


Figura 2 - Composição de ácidos graxos durante o desenvolvimento de embriões somáticos de soja e na semente madura da variedade VMax.

Em cultivo *in vitro*, embriões somáticos de soja começam a se diferenciar em média, após 14 dias sobre a face adaxial do cotilédone em meio contendo auxina e processos relacionados à embriogênese somática começam a ocorrer a partir deste período (Finer, 1988; Thibau-Nissen et al., 2003). Embriões no estágio globular

apresentam uma pequena quantidade de triacilgliceróis e o nível de mRNA de proteínas de reserva quase não é detectável (Kinney, 1996). Isso poderia explicar as diferenças encontradas para a composição de ácidos graxos dos embriões globulares em relação aos demais estádios de desenvolvimento embrionário.

Heppard et al. (1996) avaliaram as mudanças na composição de ácidos graxos durante o desenvolvimento de sementes de soja, mostrando que os níveis de 18:1 e 18:2 aumentam enquanto os de 18:3 diminuem significativamente. O alto nível de 18:3 presente nos lipídios de sementes em desenvolvimento pode estar relacionado ao papel de ácidos graxos polinsaturados na manutenção da fluidez de membranas em embriões jovens, nos quais existe intensa atividade biossintética de membranas. De forma similar, foi observado altos níveis de 18:3 nos embriões globulares no início do desenvolvimento embrionário, provavelmente, desempenhando a mesma função, uma vez que em estádios iniciais de desenvolvimento, grande parte dos ácidos graxos sintetizada está associada a lipídios de membranas. Esses mesmos autores mostraram que o aumento do conteúdo de 18:2 durante o desenvolvimento de sementes foi consistente com o aumento significativo da expressão do gene *Fad2-1*, que codifica a enzima $\omega 6$ – dessaturase. Esse mesmo padrão de modificação foi mostrado durante o desenvolvimento do embrião zigótico em sementes de soja, a partir dos estádios iniciais até o estágio de maturação fisiológica (Dahmer et al. 1991a).

Foi realizado um ensaio de RT-PCR para analisar a expressão do gene *Fad2-1* durante o desenvolvimento de embriões somáticos de soja. Os resultados mostraram um aumento da expressão do gene *Fad2-1* a partir do estágio torpedo, permanecendo relativamente constante até o estágio cotiledonar maduro, sendo observada uma redução da expressão após a dessecação dos embriões cotiledonares (Figura 3).

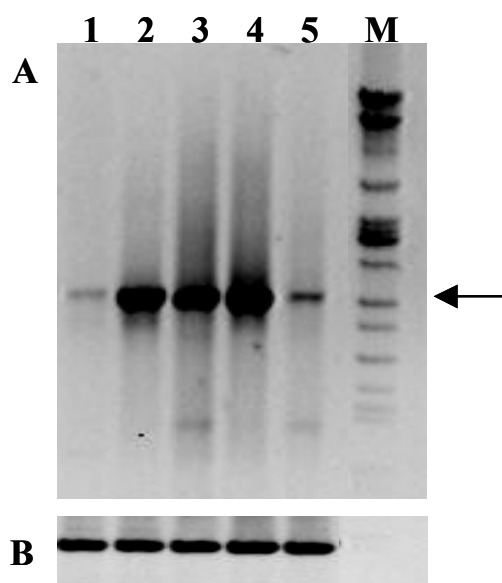


Figura 3 – Ensaio de RT-PCR para o gene que codifica a enzima $\omega 6$ - dessaturase em embriões somáticos de soja. (A) representa as amostras de cDNA amplificadas para o gene Fad2-1 e (B) representa o controle interno com actina. Os números de 1 a 5 representam os estádios globular, torpedo, cotiledonar, cotiledonar maduro e cotiledonar dessecado. A seta indica o tamanho do fragmento amplificado (1,39 kb). (M) refere-se ao DNA do fago λ clivado com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI e *Hind*III, utilizado como marcador de tamanho.

Heppard et al. (1996) analisaram a expressão dos dois genes que codificam a enzima $\omega 6$ – dessaturase em soja, o Fad2-1 semente-específico e o Fad2-2 com expressão constitutiva, em diferentes fases do desenvolvimento de sementes. Ambos os genes foram expressos nas sementes em desenvolvimento. Nos primeiros estádios de desenvolvimento, houve maior expressão do gene Fad2-2 (6-10 dias após o florescimento), período que coincide com grande síntese de lipídios de membrana. Contudo, o transcrito do gene Fad2-1 aumentou significativamente durante o desenvolvimento do embrião, com pico entre 19-21 dias após o florescimento e então, gradualmente diminuiu nas sementes maduras. A expressão do gene Fad2-1 foi coincidente com a biossíntese de ácidos graxos e deposição de óleo na semente.

Provavelmente, as diferenças encontradas na composição de ácidos graxos polinsaturados no embrião globular em relação aos demais estádios de desenvolvimento estejam relacionadas a uma maior taxa de dessaturação de ácidos graxos ligados a lipídios de membrana do que a lipídios de reserva, já que nos primeiros estádios de desenvolvimento existe intensa atividade biossintética de membranas. Esses resultados também poderiam explicar o padrão de expressão encontrado para o gene *Fad2-1* durante o desenvolvimento de embriões somáticos.

Como os genes das principais enzimas biossintéticas de ácidos graxos já estão clonados, é possível superexpressar ou silenciar cada um destes genes e observar o efeito sobre a composição de ácidos graxos em sementes transgênicas. Uma vez que se tenham sistemas adaptados para transformação e seleção de embriões somáticos transformados, além de uma metodologia adaptada para quantificar ácidos graxos destes embriões, é possível prever o fenótipo de ácidos graxos das sementes de plantas transgênicas em poucas semanas, já que os embriões somáticos, como os zigóticos nas sementes em desenvolvimento, produzem ácidos graxos e proteínas.

Embriões somáticos de soja podem ser formados a partir de cotilédones imaturos em meio de indução na presença de altas concentrações de auxina sintética (2,4-D). Embriões no estágio globular contêm uma pequena quantidade de triacilgliceróis e proteínas de reserva típicas da maturação. Neste estágio, o nível de mRNA de proteínas de reserva abundantes como a β -conglícinina também não são detectáveis. Após a transformação, seleção e diferenciação em embriões cotiledonares maduros, o TAG torna-se a classe de lipídios mais abundante. Assim, o perfil de ácidos graxos de embriões somáticos maduros é similar ao da semente madura (Kinney, 1996).

Portanto, quando embriões somáticos de soja são transformados com genes da biossíntese de ácidos graxos, a composição de ácidos graxos do embrião somático maduro é equivalente à composição final presente no óleo da semente de plantas regeneradas a partir destes embriões. Essa correlação entre a composição de ácidos graxos no embrião cotiledonar e a semente madura foi relatada primeiramente por Kinney (1996), usando construções *antisense* com o cDNA de duas dessaturases de ácidos graxos, a enzima ω 6-oleoil dessaturase semente-específica e a enzima microssomal ω 3-linoleoil dessaturase.

Este sistema modelo de embriões somáticos seja, em cultura líquida ou cultura em meio sólido, tem se mostrado eficiente para ser usado como um instrumento de *screening* na determinação de quais genes podem ser manipulados em soja para produzir uma composição desejada de ácidos graxos. Além disso, permite selecionar promotores embrião-específicos mais efetivos, testar se o cDNA total ou parcial é eficiente para silenciar um gene endógeno e a eficiência de diferentes tipos de construções gênicas para desencadear o silenciamento (co-supressão, *antisense* ou hpRNA), além de avaliar o efeito da introdução de genes de outros organismos em embriões de soja (Kinney, 1996).

Alterações na atividade da enzima $\omega 6$ - dessaturase causadas pela ação de um transgene podem ser vistas como mudanças na concentração de ácido oléico da fração óleo em sementes maduras. Um método indireto para avaliar o efeito cumulativo da atividade desta enzima durante a síntese de ácidos graxos em sementes é por meio do parâmetro ODP (parâmetro de dessaturação do ácido oléico), derivado da seguinte fórmula:

$$\text{ODP} = \frac{\% 18:2 + \% 18:3}{\% 18:1 + \% 18:2 + \% 18:3}$$

Este parâmetro representa a taxa de ácidos graxos total contabilizada para os produtos de dessaturação de 18:1 (18:2 e 18:3) pela quantidade total de substrato de ácidos graxos insaturados disponíveis, ou seja, os produtos de modificação de 18:1 mais a quantidade de 18:1 remanescente (Stoutjesdijk et al., 2002; Liu et al., 2002).

Os valores de ODP encontrados para os embriões somáticos foram: torpedo – 0,75; cotiledonar – 0,74; cotiledonar maduro – 0,75 e maduro dessecado – 0,75. Esses índices são equivalentes aos de sementes maduras de soja (0,76), uma vez que as composições de ácidos graxos para essas amostras não variaram significativamente (Tabela 1). Entretanto, para o estádio globular, que apresentou diferenças na composição de ácidos graxos em relação aos demais estádios de desenvolvimento, foi de 0,81. Dessa forma, podemos dizer que em média, para soja, cerca de 75% do ácido oléico (18:1)

formado durante a síntese de ácidos graxos é subseqüentemente convertido a ácidos graxos polinsaturados inicialmente via ação da enzima $\omega 6$ - dessaturase.

O efeito da introdução de um transgene para o silenciamento do gene *Fad2-1* em plantas transgênicas pode ser avaliado por meio desse parâmetro, que ilustra o nível de atividade endógena desta enzima. Dessa forma, quanto maior a eficiência do silenciamento, menor a atividade de dessaturação de 18:1 e menor o valor de ODP, indicando um acúmulo de ácido graxo monoinsaturado (18:1) e diminuição ou redução total de ácidos graxos polinsaturados (18:2 e 18:3) na fração óleo de sementes.

Portanto, a metodologia estabelecida neste trabalho para quantificar a composição de ácidos graxos de embriões somáticos se mostrou eficiente, podendo ser utilizada como metodologia de rotina para a seleção precoce de eventos favoráveis após a transformação genética visando o silenciamento de genes da biossíntese de ácidos graxos em soja.

Análise da composição de ácidos graxos de embriões transformados com *A. tumefaciens*

Para a análise da composição de ácidos graxos foi realizada uma amostragem com 138 embriões cotiledonares maduros representando, inicialmente, 50 eventos de transformação independentes. Esses embriões sobreviveram à seleção com 3 e 5mg/L do herbicida Finale[®] e poderiam ser considerados potencialmente transformantes. Como controle, foram analisadas amostras de 10 embriões cotiledonares maduros que não foram inoculados com suspensão bacteriana.

No entanto, devido aos problemas já mencionados quanto à seleção com herbicida e ao isolamento e formação dos agregados de embriões globulares para a transformação, as 138 amostras foram consideradas como 138 eventos diferentes e os dados quanto aos perfis dos ácidos graxos foram analisados por meio de estatística descritiva, sendo agrupados em classes de concentração de ácidos graxos, com o objetivo de verificar a frequência dos diferentes tipos de eventos ocorridos.

Como a proposta inicial deste trabalho foi a modificação da composição de ácido oléico via introdução de um transgene *sense* da enzima $\omega 6$ – dessaturase, foram

analisados na distribuição de frequência apenas os valores para o ácido oléico (18:1) e os produtos de sua dessaturação, linoléico (18:2) e linolênico (18:3). A tabela abaixo mostra os parâmetros considerados para a estatística descritiva dos 138 eventos analisados. Para efeito de comparação, foram utilizados os mesmos parâmetros para a análise dos embriões-controle (Tabela 3).

Tabela 2 - Estatística descritiva para a composição de ácidos graxos de embriões somáticos transformantes.

Estatística descritiva	Palmítico	Estearico	Oléico	Linoléico	Linolênico
Média	10,72	4,16	20,18	51,84	13,06
Variância	5,84	6,96	58,14	74,31	13,28
Desvio Padrão	2,42	2,64	7,62	8,62	3,64
Erro Padrão	0,21	0,22	0,65	0,73	0,31
Coefficiente de variação	22,55	63,39	37,78	16,63	27,90
Valor máximo	25,34	24,61	60,67	63,66	26,65
Valor mínimo	6,02	1,51	9,09	6,19	3,92
Amplitude	19,32	23,1	51,58	57,47	22,73

Em média, o conteúdo dos ácidos palmítico, estearico, oléico, linoléico e linolênico foram, respectivamente, 10,7; 4,2; 20,2; 51,8 e 13,1. Embora os valores das médias desses cinco ácidos graxos não diferem das médias encontradas nos embriões não transformados, os valores de mínimo, máximo e a amplitude indicam que houve modificação dos conteúdos de ácidos graxos nos embriões analisados, possivelmente relacionada aos eventos de transformação genética.

Os valores mínimo, máximo e a amplitude dos conteúdos de ácido oléico foram, respectivamente, 9,1; 60,7 e 51,6, demonstrando ampla faixa de conteúdo deste ácido graxo, fato este já esperado pois, o objetivo da transformação foi a alteração do nível de expressão de ω -6 dessaturase, envolvida na conversão de 18:1 a 18:2. Esses valores diferem dos resultados obtidos nos embriões não transformados onde os valores mínimo, máximo e amplitude do ácido oléico foram, respectivamente, de 10,2; 27,9 e 17,7, apresentando faixa mais estreita de conteúdo de C18:1 (Tabela 3).

Tabela 3 – Estatística descritiva para a composição de ácidos graxos de embriões somáticos não transformados.

Estatística descritiva	Palmítico	Estearico	Oléico	Linoléico	Linolênico
Média	11,41	4,80	17,44	52,62	13,73
Variância	1,80	0,85	32,32	20,85	16,22
Desvio Padrão	1,34	0,92	5,68	4,57	4,03
Erro Padrão	0,42	0,29	1,80	1,44	1,27
Coefficiente de variação	11,78	19,16	32,60	8,68	29,33
Valor máximo	13,91	6,58	27,94	59,85	19,76
Valor mínimo	9,13	3,51	10,21	45,61	6,88
Amplitude	4,78	3,06	17,73	14,24	12,89

Em relação ao ácido linoléico, os valores mínimo, máximo e a amplitude foram, respectivamente, 6,20; 63,7 e 57,5, indicando também uma ampla faixa deste ácido graxo, uma vez que 18:2 é o produto direto da dessaturação de 18:1 via ω -6 dessaturase. (Tabela 2). Esse espectro de variação nos conteúdos de oléico e linoléico indica possíveis efeitos do silenciamento gênico. Esses valores também diferem daqueles encontrados em embriões não transformados, onde os valores mínimo, máximo e a amplitude foram, respectivamente, 45,6; 59,8 e 14,2, também apresentando faixa mais estreita do conteúdo de 18:2.

Os conteúdos do ácido linolênico apresentaram o mesmo padrão de variação (tabelas 2 e 3), sendo os seus valores mínimo, máximo e a amplitude, respectivamente, 3,9; 26,6 e 22,7.

As amplitudes relativamente altas encontradas para os principais ácidos graxos analisados também podem ser reflexos do efeito do 2,4-D, já que trabalhos da literatura mostram o efeito desta auxina na concentração de ácidos graxos sob condições de cultivo *in vitro* (Pandey e Gadgil, 1984; Dahmer et al., 1991a e 1991b).

A variância obtida para os conteúdos dos ácidos graxos palmítico, estearico, oléico, linoléico e linolênico foi, respectivamente, de 5,8; 6,9; 58,1; 74,3 e 13,3 (Tabela 2). Os maiores valores de variância dos ácidos oléico, linoléico e linolênico poderiam refletir o efeito do silenciamento do gene *Fad2-1*, já que a alteração na expressão de ω -6 dessaturase afeta diretamente o conteúdo de oléico e linoléico e indiretamente de linolênico em embriões submetidos à transformação genética. Nos embriões não

transformados a variância para os conteúdos dos ácidos graxos oléico, linoléico e linolênico foram menores (Tabela 3).

A metodologia utilizada na extração e quantificação de ácidos graxos de embriões somáticos foi adequada, o que pode ser observado pelos valores de desvio padrão, erro padrão e coeficiente de variação baixos, demonstrando a eficiência e confiabilidade dos processos adotados (Tabelas 2 e 3). O coeficiente de variação do ácido esteárico nos embriões somáticos transformados foi de 63,4%, sendo superior aos dos demais ácidos (Tabela 2) possivelmente, porque esse ácido graxo é precursor na formação do ácido oléico, que foi o objeto de alteração nos eventos de transformação genética. Este fato é reforçado pelos resultados observados na Tabela 3, em que o coeficiente de variação para ácido esteárico em embriões não transformados foi de 19,2%, não contrastando com os obtidos para os demais ácidos graxos.

ANÁLISE DO CONTEÚDO DE ÁCIDO OLÉICO

Em mais de 60% dos embriões cotiledonares analisados, o conteúdo de oléico variou entre 13 e 22% (Tabela 4) não diferindo em relação ao valor médio de ácido oléico de embriões controle (Tabela 3) ou de sementes maduras (Tabela 1).

Se considerarmos a ocorrência do silenciamento do gene *Fad2-1*, a atividade da enzima $\omega 6$ – dessaturase seria diminuída e, conseqüentemente, os níveis de ácido oléico (18:1) aumentariam e de ácido linoléico (18:2) diminuiriam, uma vez que 18:1 é o substrato desta enzima para dessaturação a 18:2. Os níveis de ácido linolênico também sofreriam o efeito desse silenciamento, uma vez que haveria menor disponibilidade de 18:2 para dessaturação a 18:3 (Tabelas 4, 5 e 6). Os níveis de 18:3 ainda estariam na dependência da enzima $\omega 3$ – dessaturase, responsável pela conversão de 18:2 a 18:3.

A concentração de ácido oléico variando de 9 a 13% apresentou uma frequência de 13,0%. As demais concentrações, que juntas representam quase 25% do total de embriões analisados, são constituídas por diferentes níveis desse ácido graxo: cerca de 11% dos embriões apresentaram conteúdo de oléico entre 22 e 26%; 6,0% apresentaram valores entre 26 e 30%; 7,0% apresentaram valores entre 30 e 43% e cerca de 0,7% apresentou conteúdo de oléico entre 43 e 48% e 56 e 61%. Essas duas últimas

concentrações de 18:1 possuiriam os valores mais favoráveis para seleção, já que o conteúdo de oléico aumentou mais de duas vezes em cada um desses casos, quando comparado com as amostras controle. Esses resultados podem ser observados na Figura 4.

Tabela 4: Distribuição de frequência para os teores de ácido oléico extraído de embriões somáticos transformantes.

Classe	LI	LS	f_i	fa_i	fr_i	far_i	PM
1	9	13	18	18	0,13	0,13	11
2	13	18	41	59	0,30	0,43	15
3	18	22	43	102	0,31	0,74	20
4	22	26	15	117	0,11	0,85	24
5	26	30	9	126	0,06	0,91	28
6	30	35	4	130	0,03	0,94	33
7	35	39	4	134	0,03	0,97	37
8	39	43	2	136	0,01	0,98	41
9	43	48	1	137	0,007	0,99	46
10	48	52	0	137	0,00	0,99	50
11	52	56	0	137	0,00	0,99	54
12	56	61	1	138	0,007	1,00	58

LI – limite inferior de classe; LS – limite superior de classe; f_i – frequência simples; fa_i – frequência acumulada; fr_i – frequência relativa; far_i – frequência acumulada relativa; PM – ponto médio da classe.

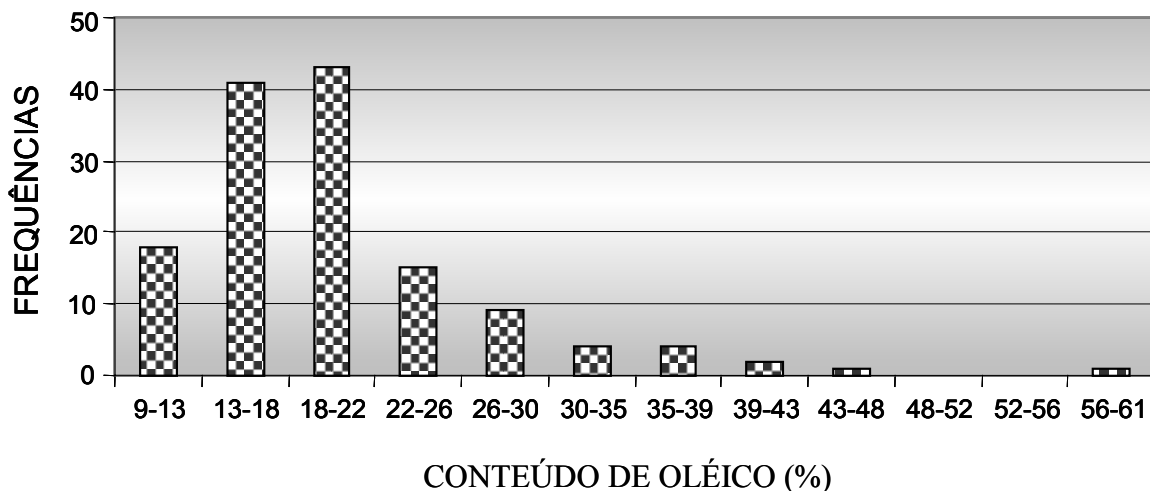


Figura 4 - Distribuição das frequências relativas simples do conteúdo de ácido oléico extraído de embriões somáticos transformantes. Os conteúdos de 18:1 estão representados pelos LI e LS de cada classe de concentração. A concentração de 18:1 foi calculada como sendo a porcentagem com que esse ácido graxo está representado no perfil total de ácidos graxos determinado.

ANÁLISE DO CONTEÚDO DE ÁCIDO LINOLÉICO

Cerca de 64% dos embriões analisados apresentaram níveis de linoléico entre 49 e 59% (Tabela 5), similares aos de embriões controle (Tabela 3) ou de sementes maduras (Tabela 1). As maiores frequências de embriões com esses níveis de linoléico podem ser visualizadas na Figura 5.

A concentração de 18:2 variando entre 59 e 64% apresentou uma frequência de 12%. Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados para a concentração de oléico variando entre 9 e 13%, ou seja, representariam embriões com baixo conteúdo de oléico e alto conteúdo de linoléico.

As demais concentrações estão representadas por embriões que apresentam diferentes níveis de ácido linoléico. Esses níveis são menores em relação às amostras controle. Cerca de 1% dos embriões apresentou conteúdo de linoléico de 6 a 11%; 0,7% apresentou valores entre 16 e 21%; 1,4% apresentaram valores entre 25 e 35%; 2%

apresentaram valores 35 e 40%; 6% apresentaram valores de 18:2 entre 40 e 45% e 12% apresentaram valores entre 45 e 49%.

Tabela 5: Distribuição de frequência para os teores de ácido linoléico extraído de embriões somáticos transformantes.

Classe	LI	LS	f_i	fa_i	fr_i	far_i	PM
1	6	11	2	2	0,01	0,01	8
2	11	16	0	2	0,00	0,01	13
3	16	21	1	3	0,007	0,02	18
4	21	25	0	3	0,00	0,02	23
5	25	30	1	4	0,007	0,03	27
6	30	35	1	5	0,007	0,04	32
7	35	40	3	8	0,02	0,06	37
8	40	45	8	16	0,06	0,12	42
9	45	49	17	33	0,12	0,24	47
10	49	54	42	75	0,30	0,54	51
11	54	59	46	121	0,34	0,88	56
12	59	64	17	138	0,12	1,000	61

LI – limite inferior de classe; LS – limite superior de classe; f_i – frequência simples; fa_i – frequência acumulada; fr_i – frequência relativa; far_i – frequência acumulada relativa; PM – ponto médio da classe.

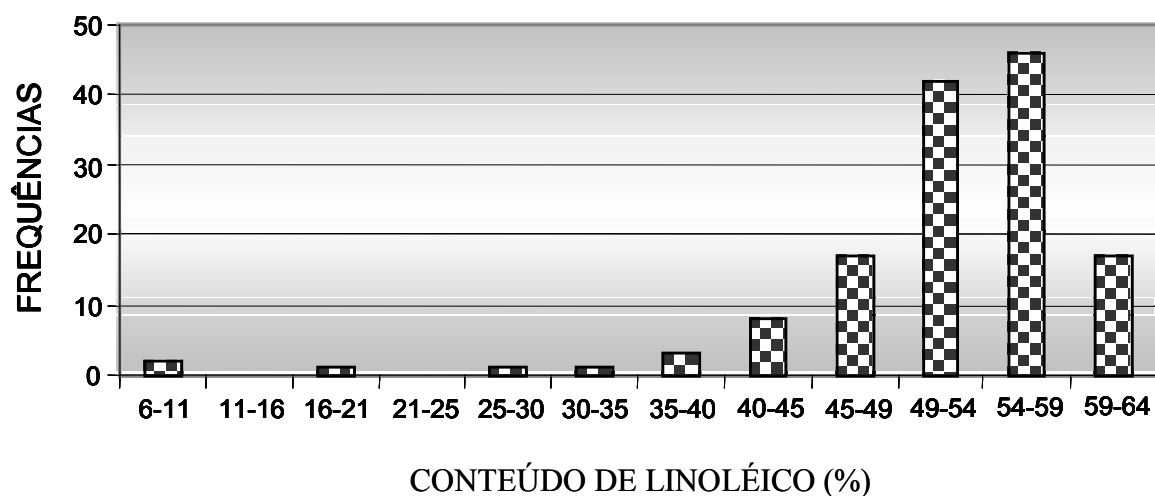


Figura 5 - Distribuição das frequências relativas simples do conteúdo de ácido linoléico extraído de embriões somáticos transformantes. Os conteúdos de 18:2 estão representados pelos LI e LS de cada classe de concentração. A concentração de 18:2 foi calculada como sendo a porcentagem com que esse ácido graxo está representado no perfil total de ácidos graxos determinado.

De forma semelhante ao ácido oléico, eventos mais favoráveis para baixo conteúdo de linoléico foram os que apresentaram as menores frequências. Poderíamos sugerir que a eficiência de silenciamento teria sido baixa, pois os eventos favoráveis de alto conteúdo de oléico e baixo de linoléico teriam frequências em torno de 1% apenas.

ANÁLISE DO CONTEÚDO DE ÁCIDO LINOLÊNICO

Para o ácido linolênico, as maiores frequências foram observadas nas concentrações de 18:3 entre 11 e 13% (frequência de 25%), de 13 e 15% (frequência de 20%) e de 10 e 11% (frequência de 18,1%) (Tabela 6). Cerca de 73% dos embriões apresentam valores de 18:3 variando de 8 a 15%, sendo similares aos de embrião controle (Tabela 3) ou de semente madura (Tabela 1). As maiores frequências de embriões com esses níveis de linolênico podem ser visualizadas na Figura 6.

As concentrações de 18:3 variando entre 15 e 27% representam eventos com níveis aumentados de ácido linolênico em relação ao controle. Cerca de 10% dos embriões apresentaram conteúdo de 18:3 de 15 a 17%; 6% apresentaram valores entre 17 e 19%; 3% apresentaram valores entre 19 e 21%; 1% apresentou valores entre 21 e 23% e 1,4% com valores de ácido linolênico entre 23 e 27%. As menores concentrações de 18:3 variaram de 4 a 6% (frequência de 1%) e de 6 a 8% (frequência de 4%). Assim, as concentrações variando de 4 a 8% (frequência de 5%) representariam as concentrações mais favoráveis para baixo conteúdo de 18:3.

Tabela 6 - Distribuição de frequência para os teores de ácido linolênico extraído de embriões somáticos transformantes.

classe	LI	LS	f_i	fa_i	fr_i	far_i	PM
1	4	6	2	2	0,01	0,01	5
2	6	8	5	7	0,04	0,05	7
3	8	10	14	21	0,10	0,15	9
4	10	11	25	46	0,18	0,34	10
5	11	13	34	80	0,25	0,58	12
6	13	15	27	107	0,20	0,77	14
7	15	17	14	121	0,10	0,88	16
8	17	19	9	130	0,06	0,94	18
9	19	21	4	134	0,03	0,97	20
10	21	23	2	136	0,01	0,98	22
11	23	25	1	137	0,007	0,99	24
12	25	27	1	138	0,007	1,00	26

LI – limite inferior de classe; LS – limite superior de classe; f_i – frequência simples; fa_i – frequência acumulada; fr_i – frequência relativa; far_i – frequência acumulada relativa; PM – ponto médio da classe.

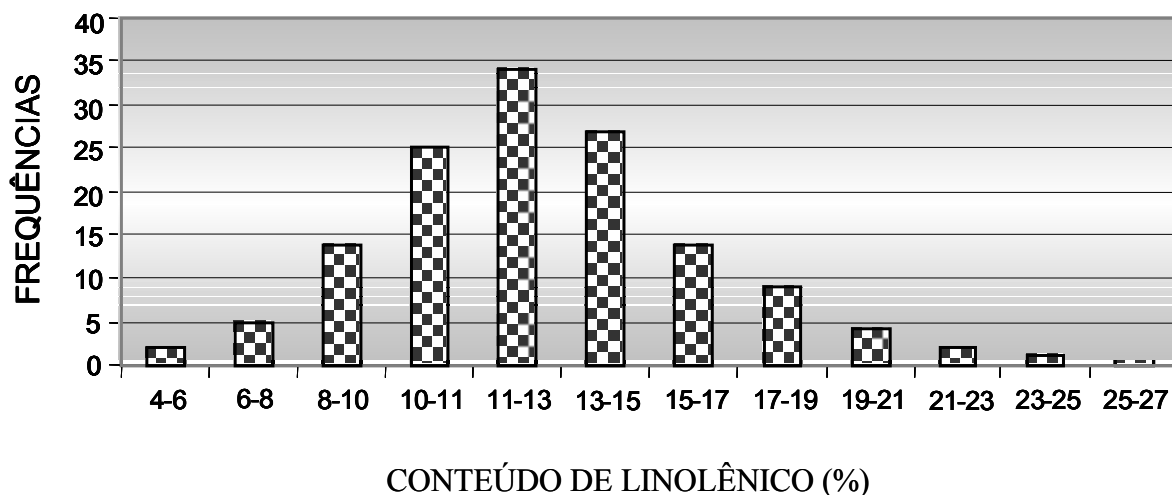


Figura 6 - Distribuição das frequências relativas simples do conteúdo de ácido linolênico extraído de embriões somáticos transformantes. Os conteúdos de 18:3 estão representados pelos LI e LS de cada classe de concentração. A concentração de 18:3 foi calculada como sendo a porcentagem com que esse ácido graxo está representado no perfil total de ácidos graxos determinado.

Portanto, as melhores concentrações de ácido oléico, linoléico e linolênico variaram de 43 a 61%; de 6 a 11% e de 4 a 6%, respectivamente.

Os resultados mostraram claramente a existência de modificação na composição de ácidos graxos nos embriões cotiledonares analisados. No entanto, não se pode afirmar que essas alterações sejam devidas a fenômenos de PTGS pela introdução de um transgene *sense* homólogo ao gene *Fad2-1* endógeno, via transformação genética.

Como mencionado, as análises de ácidos graxos foram realizadas com embriões que sobreviveram à seleção com herbicida, no entanto, podem ter ocorrido escapes a esta seleção. Como não foi possível obter plantas regeneradas que apresentassem os mesmos eventos analisados para, além de comprovar de fato a transgenia destes indivíduos, permitir uma comparação entre os resultados de embriões e sementes maduras, as observações relatadas não serão confirmadas. Além disso, os resultados podem ter sofrido a influência de variações somaclonais originadas pelo próprio cultivo *in vitro* ou ainda da auxina 2,4-D utilizada para indução de embriogênese somática.

Gesteira et al. (2002) utilizaram marcadores RAPD para avaliar a instabilidade genética de plantas regeneradas de soja obtidas via embriogênese somática na presença de 40 mg/L de 2,4-D. Nesse estudo, de 44 plantas regeneradas e avaliadas de VMax, duas apresentaram variação com base nos marcadores RAPD e uma das 28 plantas regeneradas de CAC-1. A taxa de variação somaclonal foi relativamente baixa, menor que 5%, quando comparado às relatadas para outras espécies.

Dahmer et al. (1991b) mostraram que auxinas presentes no meio de indução podem alterar a atividade biossintética de lipídios em embriões somáticos de soja, afetando os processos relacionados a dessaturação.

Assim, os problemas apontados neste trabalho devem ser analisados de forma mais criteriosa para permitir que novos ensaios de transformação genética possam ter sucesso na obtenção e regeneração de PGMs. No entanto, a metodologia estabelecida neste trabalho se mostrou eficiente para a quantificação de ácidos graxos de embriões somáticos de soja, o que permitirá a determinação e a seleção precoce de modificações favoráveis do perfil de ácidos graxos em embriões submetidos a ensaios de transformação genética.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições experimentais deste trabalho, os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- A análise por RT-PCR para o gene *Fad2-1* que codifica a enzima oleoil dessaturase de soja mostrou que este gene é expresso em todos os estádios de desenvolvimento da semente, com um padrão de expressão crescente a partir dos estádios iniciais de desenvolvimento e diminuição no nível de transcritos em sementes maduras;

- Foram obtidas construções gênicas clonadas nos vetores binários pCAMBIA 3301 e 1304, contendo um fragmento de cerca de 1 kb do gene *Fad2-1* alvo para co-supressão;

- Após a indução de embriogênese somática em cotilédones imaturos de soja e transformação genética de agregados embriogênicos via SAAT, foi possível recuperar um pequeno número de plantas, não transgênicas. Embora o trabalho tenha apresentado falhas no sistema seletivo utilizando o herbicida Finale[®], ensaios moleculares com embriões somáticos confirmaram diferentes eventos transgênicos;

- A análise por RT-PCR para o gene *Fad2-1*, durante o desenvolvimento de embriões somáticos, mostrou um aumento de expressão a partir do estágio torpedo, permanecendo relativamente constante até o estágio cotiledonar maduro, sendo observada uma redução da expressão no estágio cotiledonar dessecado;

- Foi estabelecida uma metodologia eficiente para extração e quantificação de ácidos graxos de embriões somáticos de soja. Os resultados confirmaram relatos da literatura mostrando que embriões cotiledonares maduros apresentam composição de ácidos graxos equivalentes ao da semente madura. Esta metodologia foi capaz de

detectar alterações da composição de ácidos graxos de possíveis embriões transformados;

- Em relação ao conteúdo de ácido oléico dos 138 embriões analisados, cerca de 61% (88 embriões) apresentaram conteúdo semelhante ao controle não transformado e semente madura (13-22%), 13% (18 embriões) apresentaram níveis inferiores (9-13%) e 25% (36 embriões) apresentaram níveis aumentados de 18:1 (22-61%), provavelmente como possível consequência de silenciamento gênico. Quanto ao conteúdo de 18:2, 64% dos embriões (88) apresentaram conteúdo semelhante aos controles não transformados (49-59%), 12% (17) apresentaram níveis superiores (59-64%) e 24% (33) apresentaram níveis inferiores de 18:2 (6-49%). Para o conteúdo de 18:3, cerca de 73% dos embriões (101) apresentaram conteúdo semelhante ao controle não transformado e semente madura (8-15%), 22% (30) apresentaram níveis superiores (15-27%) e 5% (7) apresentaram níveis inferiores (4-8%).

- As melhores concentrações obtidas para os ácidos oléico, linoléico e linolênico variaram de 43 a 61%; de 6 a 11% e de 4 a 6%, respectivamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUNER, A. C.; JUNG, S.; ABBOTT, A. G.; POWELL, G. L. 2001. The naturally occurring high oleate oil character in some peanut varieties results from reduced oleoyl-PC desaturase activity from mutation of aspartate 150 to asparagines. **Crop Science**, v. 41, p. 522-526

CAHOON, E. B.; CARLSON, T. J.; RIPP, K. G.; SCHWEIGER, B. J.; COOK, G. A.; HALL, S. E.; KINNEY, A. J. 1999. Biosynthetic origin of conjugated double bonds: production of fatty acid components of high-value drying oils in transgenic soybean embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, n. 22, p. 12935-12940

CAHOON, E. B.; MARILLIA, E. F.; STECCA, K. L.; HALL, S. E.; TAYLOR, D. C.; KINNEY, A. J. 2000. Production of fatty acid components of meadowfoam oil in somatic soybean embryos. **Plant Physiology**, v. 124, p. 243-251

DAHMER, M. L.; COLLINS, G. B.; HILDEBRAND, D. F. 1991a. Lipid concentration and composition of soybean zygotic embryos maturing *in vitro* and *in planta*. **Crop Science**, v. 31, p. 735-740

DAHMER, M. L.; COLLINS, G. B.; HILDEBRAND, D. F. 1991b. Lipid content and composition of soybean somatic embryos. **Crop Science**, v. 31, p. 741-746

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

GESTEIRA, A. S.; OTONI, W. C.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. 2002. RAPD-based detection of genome instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. **Plant Breeding**, v. 121, n. 3, p. 269-271

HEPPARD, E. P.; KINNEY, A. J.; STECCA, K. L.; MIAO, G. H. 1996. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal ω -6 desaturase genes in soybeans. **Plant Physiology**, v. 110, p. 311-319

HITZ, W. D.; CARLSON, T. J.; BOOTH, J. R.; KINNEY, A. J.; STECCA, K. L.; YADAV, N. S. 1994. Cloning of a higher-plant plastid ω -6 fatty acid desaturase cDNA and its expression in a *Cyanobacterium*. **Plant Physiology**, v. 105, p. 635-641

KINNEY A. J. 1996. Development of genetically engineered soybean oils for food application. **Journal of Food Lipids**, v. 3, p. 273-292

LIU, Q.; SINGH, P. S.; GREEN, A. G. 2002. High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1732-1743

LOS, D. A.; MURATA, N. 1998. Structure and expression of fatty acid desaturases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1394, p. 3-15

MOREIRA, M. A. 1999. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Soja**. Embrapa - Soja, Londrina-PR, p. 99-104

MURPHY, D. J. 1999. Manipulation of plant oil composition for the production of valuable chemicals – progress, problems and prospects. In: Shahidi et al. (Eds.). **Chemical via Higher Plant Bioengineering**. New York, p. 21-35

OSÓRIO J.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ J.; MANCHA M.; GARCÉS R. 1995. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. **Crop Science**, v. 35, p. 739-742

PANDEY, B.; GADGIL, V. N. 1984. Fatty acids in callus culture: influence of growth factors on fatty acid composition of total lipids in callus cells. **Phytochemistry**, v. 23, p. 51-53

SOMERVILLE, C.; BROWSE, J. 1991. Plant lipids: metabolism, mutants and membrane. **Science**, v. 252, p. 80-87

STOUTJESDIJK, P. A.; SINGH, S. P.; LIU, Q.; HURLESTONE, C. J.; WATERHOUSE, P. A.; GREEN, A. G. 2002. hpRNA-mediated targeting of the *Arabidopsis* FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1723-1731

THIBAUD-NISSEN, F.; SHEALY, R. T.; KHANNA, A.; VODKIN, L. O. 2003. Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. **Plant Physiology**, v. 132, p. 118-136

WANG, X. M.; HILDEBRAND, D. F. 1988. Biosynthesis and regulation of linoleic acid higher plants. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 26, p. 777-792

YADAV, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. 1996. In: VERMA, D. P. S., SHOEMAKER, R. C. (Eds) **Soybean genetics, molecular biology and biotechnology**. USA: CAB INTERNATIONAL, p. 127-188

