POLYANA KELLY MARTINS

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM NÓS COTILEDONARES DE SOJA VISANDO À CO-SUPRESSÃO DO GENE DA LISOFOSFATIDILCOLINA ACILTRANSFERASE

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
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

POLYANA KELLY MARTINS

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM NÓS COTILEDONARES DE SOJA VISANDO À CO-SUPRESSÃO DO GENE DA LISOFOSFATIDILCOLINA ACILTRANSFERASE

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: 02 de abril de 2007.

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Co-orientador)

Prof. Wagner Campos Otoni
(Co-orientador)

Profª. Andreia Barcelos Passos Lima

Drª. Francismar Corrêa Marcelino

Prof. Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

À minha família pelo amor e pela presença incondicional:
Aos meus pais Gilberto Martins e
Arlete Cassarotti Martins (*in memoriam*)
À minha irmã Janaína Helena Martins

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois se hoje percorro este caminho é porque Ele o trilhou para mim. Obrigada, por ser o que sou e, por hoje, chegar onde estou.

A meu pai, pela eterna dedicação, por me ensinar a viver a vida com dignidade, por estar muito presente mesmo quando a distância tentava impedir, por sempre me apoiar e nunca me deixar desistir por mais difícil que a vida possa parecer. Te amo.

A minha mãe que sempre esteve ao meu lado. Sua garra e seu expemplo sempre terão a continuidade na concretização do meu ideal. E por todo tempo que ainda viver, perpetuarei sua memória, pois uma árvore morre, mas deixa dentro de seus frutos a semente de sua vida. Você estará sempre comigo.

A minha irmã pelo constante incentivo, amizade, apoio, confiança, amor e carinho. Sempre torcendo pelo meu sucesso.

À Universidade Federal de Viçosa, à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela oportunidade de realizar este trabalho.

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

Ao professor Maurílio Alves Moreira, pela orientação, oportunidade de aprendizado, pela confiança e apoio contribuindo para o meu crescimento intelectual e profissional.

Ao professor Everaldo Gonçalves Barros, pela co-orientação, supervisão, incentivo, amizade e por toda ajuda em todos os momentos.

Ao professor Wagner Campos Otoni, pelas sugestões, amizade, apoio, e por dar oportunidade de realizar parte do trabalho em seu laboratório.

A Andréia Barcelos Passos Lima, por ter me ensinado grande parte do meu trabalho, por todo apoio, amizade e pela ajuda em todos os momentos.

A Francismar pela amizade, apoio e paciência nas análises finais do trabalho e por gentilmente aceitar participar da banca.

Ao Erick, pelo companheirismo, carinho, amor e paciência nas horas mais difíceis e por me contagiar sempre com seu entusiasmo e alegria.

Aos colegas do Laboratório de Clonagem e Sequenciamento de DNA (SeqDNA) e dos Laboratórios de Genética Molecular de Plantas I e II (Biomol e Proteína) pela agradável convivência, pela ajuda em todas as ocasiões e pelos churrascos inesquecíveis em casa.

Às grandes amigas Cassiana e Beatriz, por toda ajuda e colaboração, pelos ótimos momentos que passamos juntas dentro e fora do laboratório e pelas muitas risadas.

Aos amigos e amigas Ana Paula, Vanessa, Ana Rossi, Pricila, Márcia, Giselle, Maíra, Valéria, Janaína, Márcia Flores, Pedro Ivo, Newton, Mateus e James que de alguma forma e em algum momento colaboraram para que esse trabalho se tornasse realidade.

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

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

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

BIOGRAFIA

POLYANA KELLY MARTINS, filha de Gilberto Martins e Arlete Cassarotti Martins, nasceu em 31 de março de 1977, em Cornélio Procópio-PR.

Em 1996, iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Londrina, PR, concluindo a Licenciatura em fevereiro de 2000 e o Bacharelado em fevereiro de 2001.

Em março de 2001, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas na Universidade Estadual de Londrina, PR, em parceria com a EMBRAPA – Soja, PR, em nível de mestrado, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2003.

Em março de 2003, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de doutorado, na Universidade Federal de Viçosa, MG.

SUMÁRIO

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

CAPÍTULO 1
Construção do cassete de expressão para a co-supressão do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase em soja

RESUMO..... 7
1. INTRODUÇÃO..... 9
2. MATERIAL E MÉTODOS..... 17
2.1 ISOLAMENTO E CLONAGEM DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE QUE CODIFICA A SUBUNIDADE A DA B-CONGLICININA..... 17
2.1.1 Material genético..... 17
2.1.2 Construção de *primers* específicos..... 17
2.1.3 Extração de DNA genômico..... 18
2.1.4 Isolamento e clonagem em vetor pCAMBIA 1304..... 18
2.1.5 Transformação de E. coli DH5α ultracompetentes e análise dos transformantes..... 20
2.1.6 Seqüenciamento do DNA..... 20
2.2 ISOLAMENTO E CLONAGEM DE UM FRAGMENTO DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA LISOFOSFATIDILCOLINA ACILTRANSFERASE..... 21
2.2.1 Material genético..... 21
2.2.2 Construção de *primers* específicos..... 22
2.2.3 Isolamento de um fragmento do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase (*LPCAT*) 22
2.2.4 Clonagem em vetor pCAMBIA 1304 (VP) 24
2.2.5 Transformação de *E. coli* e análise de transformantes..... 24
2.2.6 Transformação de células de *A. tumefaciens* por eletroporação..... 25

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 27
3.1 Isolamento e clonagem da região promotora do gene que codifica a subunidade α da β-conglicinina..... 27
3.2 Isolamento e clonagem de um fragmento do gene que codifica a enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT) 32
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 43

CAPÍTULO 2

Transformação genética em nós-cotiledonares de soja via *Agrobacterium* Mediada por Sonicação (SAAT) e análise molecular dos transformantes

RESUMO..... 51
1. INTRODUÇÃO..... 52
2. MATERIAL E MÉTODOS..... 57
2.1. Material vegetal e condições para germinação..... 57
2.2. Condições de cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*..... 57
2.3. Preparo dos explantes e transformação genética..... 58
2.4. Seleção e regeneração de plantas..... 59
2.5. Análise molecular dos transformantes por PCR..... 60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 63
4. CONCLUSÕES GERAIS..... 75
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 77

RESUMO

MARTINS, Polyana Kelly, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2007. **Transformação genética de nós cotiledonares de soja visando à co-supressão do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase**. Orientador: Maurilio Alves Moreira. Co-orientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Wagner Campos Otoni.

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma das mais importantes culturas do mundo e a maior do Brasil em área plantada. O Brasil é o segundo maior produtor mundial desta leguminosa atingindo 56,3 milhões de toneladas na safra 2006/2007. (www.conab.gov.br). Assim, modificações usando técnicas de engenharia genética podem facilitar o rápido desenvolvimento de novas variedades com características de interesse agronômico e industrial. Alterações nas proporções relativas dos ácidos graxos na fração óleo podem ser alcançadas por meio do silenciamento gênico de enzimas do tipo aciltransferases, fosfotransferases e dessaturases, envolvidas na biossíntese de ácidos graxos. Os objetivos deste trabalho foram: isolar um fragmento do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT) de soja, construir um cassete de expressão, contendo este fragmento, sob o controle da região promotora do gene da subunidade α da β-conglicinina (promotor semente-específico) e transformar nós cotiledonares de soja com esta construção, visando à co-supressão do gene *LPCAT*. A análise por RT-PCR mostrou que o gene *LPCAT* é expresso em todos os estádios de desenvolvimento da semente. O cassete de aproximadamente 800 pb contendo a seqüência do promotor semente-específico e de parte do gene *LPCAT* foi clonado no vetor binário pCAMBIA 1304, cujo T-DNA apresenta genes para resistência aos antibióticos canamicina, para seleção em bactérias, e Higromicina B para seleção em plantas. A clonagem foi confirmada por meio de PCR, restrição enzimática e seqüenciamento. A construção clonada no vetor pCAMBIA 1304 foi utilizada para a transformação de soja via A*grobacterium tumefaciens* e sonicação. Sementes maduras de soja foram desinfetadas e germinadas em meio B5 durante, aproximadamente, 5 dias. A partir de uma semente, dois explantes foram obtidos, primeiramente removendo-se a raiz, em seguida, a maior parte do hipocótilo e finalmente um corte vertical feito para separar os dois cotilédones. Estes explantes foram transformados com suspensão bacteriana mediante sonicação e adição de acetoseringona. Após 3 dias de co-cultivo, os nós-cotiledonares foram transferidos para meio de indução (SIM) sem

agente seletivo, durante 14 dias. Em seguida, foi adicionado ao meio SIM 5mg/L de Higromicina B para seleção dos transformantes. Os explantes que sobreviveram a essa seleção foram transferidos para o meio de elongação (SEM), ainda com Higromicina B, e depois para o meio de enraizamento (RM) sem o agente seletivo. Dois meses após inoculação com *A. tumefaciens*, múltiplos brotos foram produzidos nas regiões nodais resistentes a Higromicina B que estavam em contato direto com o meio. Análises a partir do DNA de folhas de plantas em fase de aclimatação permitiram a detecção de vários eventos de transformação. Dezessete eventos foram confirmados por reações de PCR com *primers* específicos para seqüências presentes apenas em plantas transformadas.

ABSTRACT

MARTINS, Polyana Kelly, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2007. **Genetic transformation of soybean cotyledonary node seeking the co-suppression of the lysophosphatidycholine acyltransferase**. Adviser: Maurílio Alves Moreira. Co-advisers: Everaldo Gonçalves de Barros and Wagner Campos Otoni.

The soybean (*Glycine max* L. Merrill) is one of the most important crops of the world and the biggest in Brazil in cultivated area. Brazil is the second largest world producer of these grain legumes, producing 56.3 million tons in the harvest year 2006/2007 (www.conab.gov.br). Modifications using techniques of genetic engineering can facilitate the fast development of new varieties with agronomic and industrial characteristics of interest. Alterations in the relative proportions of the fatty acids may be reached through genetic transformation of plants by gene silencing. Among these enzymes are desaturases, phosphotransferases and acyltransferases, involved in the fatty acids biosynthesis. The objectives of this work were to isolate the fragment of the soybean lysophosphatidycholine acyltransferase gene (LPCAT), to construct an expression cassette containing this fragment driven by the gene promoter of the α subunit of soybean storage protein β - conglycinine (seed-specific promoter) and to transform soybean cotyledonary node with this construction, seeking to the co-suppression of the *LPCAT* gene. The RT-PCR analysis showed that the *LPCAT* gene is expressed in all of the stages of seed development. The cassette of approximately 800 pb containing the seed-specific promoter sequence and of part of the gene *LPCAT* was cloned in the binary vector pCAMBIA 1304, whose T-DNA presents genes for resistance to the antibiotics kanamicina, for selection in bacteria, and Hygromycin B for selection in plants. The cloning was confirmed through PCR, enzymatic restriction and sequencing. The construction cloned in the vector pCAMBIA 1304 was used for soybean transformation by sonication using *Agrobacterium tumefaciens*. Mature soybean seeds were sterilized and germinated in B5 medium during, approximately, five days. From a single seedling, two explants were obtained, that were removed the root, followed by most of the hypocotyl and finally separated into two cotyledons. These explants were transformed with bacterial suspension by sonication and acetosyringone addition. After three days of co-cultivation, the cotyledonary node were then transferred to shoot induction medium (SIM) without selective agent, for 14 days. Soon afterwards,

it was added to the medium SIM 5 mg/L of Hygromycin B for selection of transformed shoots. The selected explants were transferred to a shoot elongation medium (SEM), still with Hygromycin B, and later for the rooting medium (RM) without the selective agent. Two months after inoculation with *A. tumefaciens*, multiple shoots were produced in the node area resistant to Hygromycin B that were in direct contact with the medium. Leaf DNA analyses from plants in phase of acclimatization allowed the detection of several transformation events. Seventeen transgenic plants were confirmed by PCR analyses with specific primers for sequences present only in transformed plants.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A biotecnologia tem possibilitado a obtenção de respostas rápidas na resolução de questões importantes, como a susceptibilidade de plantas a pragas e doenças, a estresses ambientais, e também, o desenvolvimento de espécies mais produtivas e com maior valor nutricional. Um dos principais benefícios da biotecnologia é o desenvolvimento dos Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), que passaram a oferecer alternativas importantes para vários problemas de caráter econômico e relacionados à melhoria na qualidade de vida humana e do ambiente.

A primeira variedade vegetal geneticamente modificada a atingir o mercado consumidor foi o tomate "*Flavr savr*", em 1995. Nesta variedade o gene que codifica a proteína poligalactorunase, responsável pela quebra da celulose, foi inativado pela técnica de RNA anti-senso, levando ao amadurecimento tardio do fruto (KRAMMER *et al.*, 1994). Desde então, novas variedades de espécies como a soja, milho, canola, algodão entre outras, vêm sendo desenvolvidas (OPABODE, 2006).

Segundos os dados do *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications* (ISAAA) (JAMES, 2006), houve aumento expressivo com relação à área ocupada com lavouras de soja transgênica ao longo de 11 anos, desde o início de sua comercialização, sendo que o maior aumento no ano de 2006 ocorreu no Brasil, onde foram plantados 2 milhões de hectares com soja transgênica. A soja transgênica está sendo utilizada em número crescente de produtos. Dentre as lavouras geneticamente modificadas mais comercializadas em escala mundial, a soja é a que mais se destaca, apresentando 64% de uma área de 91 milhões de hectares (JAMES, 2006).

As principais espécies transgênicas plantadas foram: a soja e algodão resistentes ao herbicida glifosato, o milho e a canola resistentes a inseto. A soja geneticamente modificada (GM) continuou a ser o principal cultivo desenvolvido pela biotecnologia em 2006, ocupando 58,4 milhões de hectares, seguida pelo milho (21,2 milhões de hectares, 24% da área total), algodão (9,8 milhões de hectares, 11%) e canola (4,6 milhões de hectares, 5% da área) (JAMES, 2006).

No Brasil, o plantio e comércio da soja RR (resistente ao herbicida Roundup Ready®) foram aprovados por três anos consecutivos, 2003, 2004 e 2005 pelas leis Nº 10.688, 10.814 e 11.092, respectivamente, inicialmente editadas via medidas provisórias. Em 2005 foram plantados com soja GM 9,4 milhões de ha; em 2006 o aumento foi altamente expressivo atingindo os onze milhões de ha (JAMES, 2007). Este aumento pode ser inferido pela publicação da nova Lei de Biossegurança (Lei Nº 11.105) em março de 2005, que aprovou a liberação do plantio e comércio da soja RR no país (MARCELINO, 2006).

Neste contexto, a soja constitui um bom alvo para o melhoramento genético, via transformação, por seu grande interesse econômico e nutricional (LIMA, 2005). Com a utilização dessa 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).

Assim, a engenharia genética representa 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 (GUERRA, 2001).

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.

Portanto, 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). Apesar de no Brasil, no setor alimentício, a rotulagem ser obrigatória para produtos embalados, a granel ou *in natura*, que contenham ou que sejam produzidos com OGMs, a partir do limite de

1,0% do produto final (conforme determina o decreto Nº 4.680 de 25 de abril 2003), isso atualmente, ainda não é observado.

Nas últimas duas décadas tem ocorrido aumento significativo no desenvolvimento de tecnologias de transformação de plantas, levando à liberação para produção comercial de muitas espécies vegetais transgênicas. Esses avanços têm ocorrido em função do aperfeiçoamento das metodologias de liberação do DNA, como as mediadas 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).

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.

Assim, a obtenção de cultivares de soja com níveis reduzidos dos teores de ácidos graxos saturados e polinsaturados representa grande atrativo econômico para a indústria, pois promove aumento na estabilidade oxidativa do óleo.

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 considerável interesse em modificar a composição do óleo por melhoramento tradicional ou pelo uso da biotecnologia, com o objetivo de produzir óleos com atributos nutricionais e funcionais desejáveis

(WANG e HILDEBRAND, 1988; OSÓRIO *et al*., 1995; KINNEY, 1996; BRUNER *et al*., 2001).

O Programa de Melhoramento Genético da Qualidade da Soja, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa, que visa 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 por meio da redução do conteúdo de ácidos graxos polinsaturados e aumento do conteúdo do ácido oléico (MOREIRA, 1999).

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

Assim, o presente trabalho teve como objetivos isolar um fragmento de cDNA do gene *LPCAT* que codifica a enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase em soja, construir um cassete de expressão sob controle da região promotora da subunidade α do gene da β-conglicinina visando a co-supressão de LPCAT em nós-cotiledonares de soja transformados via *A. tumefaciens* e sonicação.

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 asparagine. **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-CNPH, v. 2, p. 815-822.

JAMES, C. 2005. Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops:. **ISAAA Briefs***,* nº 34, International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY.

JAMES, C. 2006. Preview: Global of Commercialized Biotech/GM Crops. **ISAAA Briefs,** ISAAA: Ithaca, NY, v. 35, p. 49-51.

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

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

LIMA, A. B. 2005. **Construção de cassete para a co-supressão do gene da oleoil dessaturase e transformação genética de embriões somáticos de soja**. Viçosa: UFV, 117p. Tese (Doutorado Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MARCELINO, F.C. 2006. **Desenvolvimento de metodologias para análise de resíduos de organismos geneticamente modificados em alimentos por PCR convencional e em tempo real**. Viçosa: UFV, 132p. Tese (Doutorado Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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.

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

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 in higher plants. **Plant Physiology and 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 DO CASSETE DE EXPRESSÃO PARA CO-SUPRESSÃO DO GENE DA LISOFOSFATIDILCOLINA ACILTRANSFERASE EM SOJA

RESUMO

O silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), via transformação de plantas, representa uma ferramenta poderosa aos melhoristas para manipular a composição de produtos da planta. Em sementes oleaginosas, é possível a alteração das proporções relativas dos ácidos graxos presentes na fração óleo, por meio de modificação genética de enzimas aciltransferases, dessaturases ou fosfotransferases. A escolha do promotor e o tipo de construção gênica utilizados são pontos importantes a serem analisados objetivando aumentar a eficiência do PTGS. Este trabalho teve como objetivos isolar um fragmento do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT) de soja e construir cassete de expressão sob o controle da região promotora da subunidade α do gene da β-conglicinina (promotor semente-específico) para a co-supressão deste gene. A análise por RT-PCR mostrou que o gene *LPCAT* é expresso durante todo o período de enchimento do grão. Sua expressão aumenta nos estádios iniciais de desenvolvimento mantendo-se constante até os últimos estádios. As amostras de DNA genômico de folhas de soja e de cDNA amplificadas por PCR usando *primers* específicos, contendo sítios de restrição para as enzimas *Eco*RI, *Bam*HI e *Bst*EII, foram purificadas e submetidas à reação de restrição para posterior clonagem no vetor pCAMBIA 1304, também clivado com as mesmas enzimas de restrição. Esse vetor binário apresenta um T-DNA com tamanho de 6.128 pb, o promotor 35SCaMV, 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. Após a transformação de células competentes de *Escherichia coli*, tanto para a clonagem do promotor quanto do fragmento do gene de LPCAT, as colônias recombinantes foram detectadas por meio de PCR e o DNA plasmidial dos clones isolados foi analisado por reações de restrição enzimática, resultando na liberação de um fragmento de cerca de 450 pb e outro de 360 pb, respectivamente. Após o seqüenciamento dos clones, foi feita

comparação e alinhamento com seqüências depositadas em bancos de dados, verificando que o fragmento de 450 pb apresentou alta homologia com a região promotora da subunidade α da β-conglicinina de soja e o fragmento de 360 pb homólogo com proteínas da família das glicerofosfolipídicas aciltransferase. Posteriormente, o clone contendo a construção completa foi eletroporado para *A. tumefaciens* e utilizado em ensaios de transformação genética de nós cotiledonares de soja via SAAT.

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de silenciamento gênico via RNA tem sido empregada em várias culturas para aumentar sua qualidade nutricional. Esforços diretos estão sendo agora empregados na utilização da engenharia de vias metabólicas para alterar a constituição nutricional de plantas. Isto depende de um detalhado conhecimento do metabolismo vegetal e de suas enzimas constituintes.

A principal estratégia empregada que utiliza a transgenia, envolve o aumento da expressão de genes biossintéticos sob o controle de promotores constitutivos. Para a redução dos níveis de produtos gênicos indesejáveis, dois métodos têm sido comumente utilizados: a interrupção (*knockout*) e o silenciamento de genes. Na interrupção de genes, a seqüência alvo é mutada para eliminar sua expressão ou função, enquanto que no silenciamento a destruição do transcrito ou a inibição da transcrição são induzidas. Esta última via apresenta maior facilidade de manipulação genética e análise das plantas transgênicas, além de poder ser ativada de forma temporal e espacial por meio da utilização de promotores específicos (TANG e GALILI, 2004).

O silenciamento gênico por meio de RNA é um fenômeno característico de organismos eucarióticos e tem importante papel em diversos processos biológicos incluindo regulação do desenvolvimento (BAULCOMBE, 2004), defesa antiviral (WATERHOUSE *et al.*, 2001; ZERBINI *et al.*, 2005) e remodelamento da cromatina (LIPPMAN e MARTIENSSEN, 2004; QI e HANNON, 2005).

Em plantas, existem três rotas de silenciamento via RNA (BAULCOMBE, 2004). A primeira compreende um silenciamento gênico pós-transcricional (PGTS) mediado por pequenos RNAs de interferência (siRNAs) que são processados a partir de longos RNAs dupla-fita (dsRNAs). A origem desses dsRNAs inclui a replicação de RNAs intermediários de vírus que infectam plantas, seqüências repetidas invertidas de transgenes e produtos das RNA polimerases dependentes de RNA (RdRps). A segunda via envolve uma classe de pequenos RNAs endógenos conhecidos como micro-RNAs (miRNAs) que são gerados a partir de precursores de RNAs dupla fita em estrutura de grampo, que são transcritos de genes miRNAs. Os miRNAs regulam negativamente a expressão gênica pelo pareamento de bases com o mRNA alvo levando à degradação do mesmo, à inibição da tradução ou a ambos. A terceira via

envolve o silenciamento gênico transcricional (TGS) mediante metilação de histonas e DNA e, conseqüentemente, remodelamento da cromatina (QI e HANNON, 2005).

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 (KINNEY, 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 e 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* (KUSABA, 2004; NOVINA e SHARP, 2004).

No processo de silenciamento, o dsRNA é clivado dentro da célula em pequenos fragmentos de 21-23 nucleotídeos, chamados de siRNAs pela enzima Dicer, homóloga à RNAse III de *E. coli* e que apresenta domínios de ligação a dsRNAs e helicases. Após serem originados, os siRNAs são metilados e transportados ao citosol, por meio de uma proteína transportadora HASTY de maneira Ran-dependente (JONES-RHOADES *et al.*, 2006). Esses siRNAs são correspondentes às fitas *sense* e *antisense* do RNA alvo e, no citosol, são incorporados aos complexos efetores RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA) que induzem a clivagem e posterior degradação do mRNA alvo (MEINS *et al.*, 2005). 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). O mRNA alvo é clivado em um único ponto e liberado, ficando exposto ao ataque de endonucleases endógenas. Em *Arabidopsis*, o terminal 3’ do mRNA clivado é degradado pela AtXRN4 exorribonuclease 5’→3’, enquanto que o fragmento 5’ é clivado por um exossomo contento uma atividade de exonuclease 3’→5’ (SOURET *et al.,* 2004).

Com o objetivo de aumentar a eficiência do silenciamento de um gene de interesse, dois pontos importantes devem ser analisados: o tipo de promotor e da

construção a ser utilizada. 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). Além disso, o fato do cassete de expressão estar sob o controle de promotores específicos pode aumentar a eficiência do silenciamento e constituir parte da resposta para a questão sobre a segurança em relação a plantas geneticamente modificadas (GMs) (POTENZA *et al*., 2004).

A escolha do promotor a ser utilizado em construções depende fundamentalmente dos objetivos que se quer atingir. Muitas vezes é desejável a utilização de promotores que conferem expressão temporal ou tecido-específica, mas promotores que dirigem uma expressão constitutiva e em altos níveis têm sido uma poderosa ferramenta na engenharia genética de plantas. O promotor mais comumente usado para este fim, tanto em dicotiledôneas como em monocotiledôneas, é o promotor CaMV35S do vírus do mosaico da couve-flor (ODELL *et al*., 1985). A desvantagem do promotor constitutivo é a expressão generalizada, que para plantas, pode ser muito desvantajoso dependendo do evento.

É impossível prever se haverá ou não o silenciamento do transgene, mas quando ocorre, ele pode diminuir a atividade gênica em toda a planta ou afetar a especificidade de promotores (KLOTI *et al*., 2002). Um aspecto importante que deve ser considerado quando se utiliza promotores fortes e de expressão constitutiva é que, de forma geral, a expressão constitutiva do transgene pode alterar o metabolismo da planta levando ao aparecimento de fenótipos indesejáveis (TANG e GALILI, 2004). O isolamento e a utilização de promotores que dirijam a expressão temporal ou tecido específica são importantes para o desenvolvimento de cultivares transgênicos com expressão controlada e maior aceitação do público alvo.

A expressão semente-específica de transgenes tem sido usada para aumentar a qualidade nutricional e funcional (KEELER *et al*., 1991; SHINTANI e DELLAPENNA, 1998; GOTO *et al.,* 1999; YE *et al*., 2000; BARRO *et al*., 1997) de grãos e produção de compostos farmacêuticos ou industriais (CAHOON e SHANKLIN, 2000). Em plantas produtoras de grãos, proteínas de reserva são altamente expressas durante o desenvolvimento da semente e os promotores destes genes têm sido isolados e caracterizados para serem utilizados em experimentos de engenharia genética. Em dicotiledôneas, os promotores mais utilizados são o

promotor do gene da β-faseolina de feijão (BUSTOS *et al*., 1989) e os promotores dos genes da β-conglicinina de soja (CHEN *et al.*, 1989). A β-conglicinina, um dos componentes de reserva mais abundantes, é uma proteína trimérica composta pelas subunidades α (72 kDa), α' (76 kDa) e β (53 kDa), que constituem cerca de 30% do teor protéico total desta leguminosa (YOSHINO *et al.,* 2001). Baseados em análises de hibridização, HARADA *et al*. (1989) identificaram uma família de 15 genes distintos de β-conglicinina, designados CG-1 a CG-15, organizados em *tandem*, transcritos de uma maneira coordenada, embrião-específica durante o desenvolvimento da semente e em análises de Northern blot detectaram que os genes CG-2 e CG-3 poderiam representar genes das subunidades α ou α'. YOSHINO *et al*. (2001), sequenciando clones genômicos, demonstraram que o gene CG-3 codifica a subunidade α e que o gene CG-2 codifica uma proteína muito similar à subunidade α, a subunidade α' (YOSHINO *et al.,* 2002).

D)@

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 do 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).

Além das dessaturases microssomais, as enzimas CPT e LPCAT também atuam na biossíntese de lipídios no retículo endoplasmático. A CPT tem a função de converter reversivelmente DAG 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 mostrados: (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) (Figura 1).

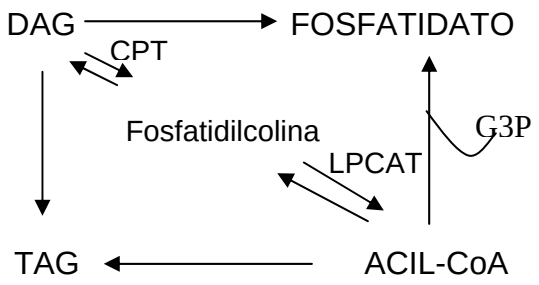


Figura 1 – Esquema do uso de Acil-CoA na síntese de triacilgliceróis em sementes oleaginosas em desenvolvimento. DAG – diacilgliceróis, CPT – colinafosfotransferase, LPCAT – lisofosfatidilcolina aciltransferase e G3P – glicerol-3-fosfato.

O segundo caminho para enriquecer o *pool* de acil-CoA com ácidos graxos polinsaturados envolve a reação catalisada pela acil-CoA: lisofosfatidilcolina aciltransferase (VOGEL e BROWSE, 1996). Como a colinafosfotransferase, a lisofosfatidilcolina aciltransferase é uma proteína integral de membrana do retículo endoplasmático (MOREAU e STUMPF, 1982), prontamente solúvel na forma ativa, não estando associada covalentemente a nenhum complexo protéico na membrana (GENNITY e STUMPF, 1985).

Acil-CoA: lisofosfatidilcolina aciltransferase (EC 2.3.1.23) cataliza a reação reversível entre grupamentos acil do *pool* de acil-CoA citoplasmático e grupamentos acil insaturados ligados à posição 2 da fosfatidilcolina, ou seja, acilação da lisofosfatidilcolina, uma vez que ela resulta na clivagem de uma ligação tioéster, rica em energia (STYMNE e STOBART, 1984). De acordo com STYMNE *et al*. (1983), a LPCAT tem como substrato principal o oleato, preferencialmente ao linoleato e este ao linolenato. STOBART e STYMNE (1985) demonstraram que, na troca, oleoil-CoA entra na posição 2 da fosfatidilcolina e sai linoleato, e este é, preferencialmente, usado na acilação da posição 2 do glicerol-3-fosfato. Portanto essa enzima é de fundamental importância para regular o tipo de grupamentos acil constituintes dos triacilgliceróis que acumulam nas sementes em desenvolvimento. De acordo com STOBART *et al*. (1983), a permuta de grupamentos acil entre grupamentos acil-CoA e fosfatidil colina representa o mecanismo predominante na regulação da qualidade de ácidos graxos polinsaturados no *pool* de acil-CoA para a síntese de óleo, em sementes em desenvolvimento de açafrão.

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).

ALONSO e MAROTO (2000) observaram que 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, em baixas temperaturas. Nessas condições, a síntese de ácidos graxos polinsaturados na maioria das espécies vegetais aumenta, especialmente o 18:3, aumentando 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 da LPCAT e das dessaturases apresentarem formas microssomais e plastidiais, este 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 microssomal, semente-específica e do gene que codifica a enzima ω-3 dessaturase microssomal.

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,que codifica a enzima ω-6 dessaturase, 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 que agridam 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 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).

A composição e a distribuição dos ácidos graxos em uma molécula de triacilglicerol determinam a qualidade do óleo, o valor nutricional, o sabor e a estabilidade oxidativa. O alto teor de ácidos graxos polinsaturados é responsável pela redução da estabilidade à oxidação e da qualidade (sabor e odor) do óleo de soja (ALONSO e MAROTO, 2000). O processamento industrial utilizado para que haja maior estabilidade oxidativa no óleo de soja é a hidrogenação química (KINNEY, 1996). Isso reduz, substancialmente, o conteúdo de ácidos graxos polinsaturados; no entanto, quantidades significativas de isômeros *trans* de ácidos graxos, principalmente o ácido transoléico, aumentam (YADAV, 1996).

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, já que em estudo mais recente (BAYLIN *et al*., 2003) demonstraram que o total de ácidos graxos *trans* do tecido adiposo tem correlação positiva com o infarto do miocárdio. 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).

Esse capítulo teve como objetivos: isolar e clonar a região promotora do gene da subunidade α da β-conglicinina; isolar e clonar um fragmento de cDNA do gene *LPCAT* que codifica a enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase em soja e construir cassetes de expressão visando a co-supressão deste gene.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento e clonagem da região promotora do gene que codifica a subunidade α da β-conglicinina

2.1.1 Material genético

Para o isolamento e clonagem da região promotora do gene que codifica a subunidade α da β-conglicinina, amostras de DNA foram extraídas de folhas jovens de soja da variedade CAC-1. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja para a Agroindústria - Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

2.1.2 Construção de *primers* específicos

Os oligonucleotídeos específicos foram construídos a partir de uma seqüência de DNA genômico depositada no banco de dados público – *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI) (Nº Acesso: AY605542.1). Os *primers* foram desenhados com auxílio do "Primer3 Input Program" (www.genome.wi.mit.edu//cgi-bin/primer/primer3.cgi) e sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas *Eco* RI e *Bam* HI foram adicionados à extremidade 5' dos *primers foward* e *reverse*, respectivamente. Parâmetros que atestam a viabilidade de uso destes oligonucleotídeos foram determinados com o auxílio do programa *QuickPrimer* do pacote DNASTAR (DNASTAR INC.). As seqüências dos *primers* estão mostradas abaixo:

Beta-conglic F: 5' – GGC**GAATTC**GACACCATATCAGCATATCA - 3'

Beta-conglic R: 5' – GGC**GGATCC**GTTCTCGATGATGAAAACCT - 3'

As letras em negrito nos *primers forward* e *reverse* indicam os sítios de restrição das enzimas *Eco* RI e *Bam* HI, respectivamente.

2.1.3 Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico de folhas jovens de soja foi feita de acordo com Doyle e Doyle (1990). A concentração de DNA foi estimado em espectrofotômetro ($A_{260\ nm}$) e a sua qualidade foi verificada por eletroforese em minigéis de agarose 0,8% contendo 0,2 μg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas foi visualizado sob luz ultravioleta, fotodocumentado com o auxílio de equipamento Eagle EyeTM II (STRATAGENE).

2.1.4 Isolamento e clonagem em vetor pCAMBIA 1304

Para o isolamento da região promotora do gene que codifica a subunidade α da β-conglicinina, reações de amplificação foram conduzidas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (APPLIED BIOSYSTEMS), com período inicial de desnaturação de 94 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 1 min; 55 °C por 1h e 30 s; e 72°C por 2 min e um período adicional de extensão a 72°C, por 7 min. Cada reação continha, em 25 μL, 30 ng de DNA genômico, Tris-SO_4 60 mM (pH 8,9), $(NH_4)_2SO_4$ 18 mM, $MgSO_4$ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, 0,4 μM de *primers* e 1U Taq DNA Polimerase pht (PHONEUTRIA).

Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 0,8% em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). 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 *Eco* RI e *Bam* HI.

A clivagem dos produtos de PCR foi realizada com 5 U da enzima *Eco* RI e da enzima *Bam* HI, cerca de 500 ng de PCR e tampão de clivagem 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; $MgCl_2$ 10 mM e NaCl 100 mM) a 37 ^{o}C por 1 h. A reação foi parada a 70 °C por 5 min e analisada em gel de agarose 0,8%. Os fragmentos clivados foram purificados do gel com o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) e utilizados para a clonagem no vetor pCAMBIA para construção do cassete de expressão.

O vetor binário pCAMBIA 1304 utilizado para a construção do cassete de expressão possui 12.361 pb e seu T-DNA que contém 6.128 pb apresenta o promotor 35SCAMV, uma fusão com dois genes repórteres, 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 B.

Os vetor pCAMBIA 1304 também apresenta o gene *nptII*, que codifica a enzima neomicina fosfotransferase, utilizado para a seleção em bactérias com o antibiótico canamicina.

Células de *Escherichia coli* contendo o vetor pCAMBIA 1304 foram inoculadas em meio LB contendo canamicina 50 μg/mL e incubadas por cerca de 12 horas a 37 ºC e 180 rpm em agitador orbital (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC). A extração de DNA plasmidial foi feita utilizando o kit Wizard®Plus SV Minipreps (PROMEGA).

Primeiramente, o DNA plasmidial foi clivado com 5 U da enzima *Bam* HI a 60 °C por 1 h. Em seguida, a reação foi parada a 70 °C por 5 minutos. Foram adicionados 50 mM de cloreto de sódio e 5 U da enzima *Eco* RI e a reação foi incubada a 37 °C por 1 h e, em seguida, parada a 70 °C por 5 min. Após a confirmação da clivagem em gel de agarose 0,8%, o DNA plasmidial foi submetido aos passos de desproteinização e desfosforilação. A desproteinização do DNA plasmidial foi realizada por adição de fenol:clorofórmio (1:1), centrifugação a 11.000 g por 5 min a 4 ºC e precipitação da fase superior com 2,5 volumes de etanol 96% e 10% de acetato de sódio 3M por 40 min a –20 ºC. Após centrifugação, o precipitado foi ressuspendido em 45 μL de água e desfosforilado com 5 U da enzima fosfatase alcalina. A reação foi incubada a 37 ºC por 30 min, sendo posteriormente adicionados 5 μL de EDTA 0,5 M, 2,5 μL de SDS 10% e 2,5 μL de proteinase K 20 μg/μL e incubada novamente a 56 ºC por 30 min. Após a desfosforilação foi realizada uma nova etapa de desproteinização e o DNA foi ressuspendido em 10 μL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM, 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).

2.1.5 Transformação de *E. coli* DH5α ultracompetentes e análise dos transformantes

Células de *E. coli* DH5α ultracompetentes foram transformadas por choque térmico segundo SAMBROOK *et al.* (1989). Em 200 μL de células ultracompetentes foram adicionados 5 μL da reação de ligação e esta mistura foi incubada em gelo por 30 min. O choque térmico foi realizado a 42 ºC por 45 s seguido de uma incubação em gelo por 2 min. Para a recuperação das células, foram adicionados 800 μL de meio SOC (0,5% de extrato de levedura, 2% de triptona, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM) e a cultura foi incubada a 37 °C por 1 h a 150 rpm. Após esse período, as células foram concentradas a 1500 x g por 5 min em centrífuga 5415D (EPPENDORF), ressuspensas em 100 μL de meio SOC e plaqueadas em meio LB sólido contendo canamicina 50 μg/μL. As placas foram incubadas por cerca de 16 h a 37 ºC.

Para a análise dos transformantes, 10 colônias isoladas foram repicadas em meio sólido e analisadas por reações de PCR com *primers* específicos para a região promotora. As colônias que mostraram a amplificação do produto esperado foram inoculadas em meio LB líquido contendo canamicina 50 μg/mL e incubadas a 37 ºC durante 16 h sob agitação. Após o crescimento, as bactérias foram aliquotadas em glicerol 40%, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 ºC. O DNA plasmidial foi extraído com o kit Wizard®Plus SV Minipreps (PROMEGA), de acordo com as recomendações do fabricante. A clonagem foi confirmada utilizando-se amostras de DNA plasmidial em reações de PCR realizadas como descrito anteriormente e por restrição enzimática. Após a confirmação dos clones positivos as amostras foram seqüenciadas.

2.1.6 Seqüenciamento do DNA

O seqüenciamento dos clones recombinantes foi realizado utilizando-se o kit ABI PRISM BigDye® III v 3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (APPLIED BIOSYSTEMS) e o seqüenciador automático ABI PRISM 377 Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS). As reações de seqüenciamento foram conduzidas de acordo com a técnica de seqüenciamento por terminação de cadeia

por dideoxinucleotídeos (ddNTPs), descrita por SANGER *et al.* (1977). As reações de amplificação linear foram realizadas usando o termociclador (APPLIED BIOSYSTEMS), GeneAmp® PCR System 9.700, programado para um período inicial de desnaturação a 96 °C, por 2 min, seguido por 25 ciclos de 96 °C, por 30 s; 55 °C, por 20 s; e 60 °C, por 4 min. Foram utilizados os *primers* "Beta-conglic F" e "Beta-conglic R" específicos para o fragmento da região promotora. Os produtos de extensão, produzidos na reação de seqüenciamento, foram purificados pela adição de 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M (pH 4,8), 2 volumes de etanol 95% (v/v) e incubação à temperatura ambiente por 15 min. Os fragmentos foram coletados por centrifugação (10.000 x g por 20 min) e o precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v), seco à temperatura ambiente e, em seguida, ressuspenso em tampão de corrida Formamida:ROX (5:1). Finalmente, os fragmentos foram desnaturados a 94 ºC por 5 min e separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 4,5%.

As seqüências obtidas foram analisadas pelo Programa Seqman do pacote DNASTAR (DNASTAR Inc.), comparadas e alinhadas com seqüências disponíveis no GenBank (análise *BLAST*).

2.2 Isolamento e clonagem de um fragmento do gene que codifica a enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase

2.2.1 Material genético

Para obtenção de RNA total, foram utilizadas sementes de soja da variedade comercial CAC-1 cultivada em casa de vegetação sob com temperatura variando de 20 – 28 °C e fotoperíodo de 14 h de luz.

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

2.2.2 Construção de *primers* específicos

A partir de um *contig* (gentilmente cedido pelo Dr. Eliseu Binneck – EMBRAPA - Soja), obtido pelo alinhamento de seguimentos de ESTs do gene da LPCAT, depositadas no banco de dados público de *Arabidopsis thaliana* (www.arabidopsis.org), foi possível desenhar oligonucleotídios específicos para *LPCAT*. Foi desenhado um par de *primers* contendo em suas extremidades 5' os sítios de restrição para as enzimas *Bam* HI e *Bst* EII. As seqüências dos *primers* estão mostradas abaixo:

Liso1 F: 5'- GGC **GGA TCC** CTC ATC GTT AAC CTC ATT C – 3'

Liso1 R: 5'- GGC **GGT GAC C**AT ATT CAG AAA ACC ACA TTG – 3'

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

2.2.3 Isolamento de um fragmento do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase (*LPCAT*)

O RNA total de sementes de todos os estádios de enchimento do grão foi obtido por extração com o reagente Trizol (INVITROGEN - *Life Technologies*) segundo instruções do fabricante.

As amostras de RNA total foram quantificadas a 260 nm avaliando sua integridade por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de corrida TBE 1X (Tris-borato 90 mM 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).

Em seguida, as amostras foram tratadas com *RQ1 RNase-free DNase* (PROMEGA) para futuras reações de RT-PCR. Primeiramente, as amostras foram incubadas em tampão da DNase 1X (Tris-HCl 40 mM, pH 8,0; $MgS0_{DNas\ 0o\ qu3'\ CR.}$

DEPC (dietil-pirocarbonato). As amostras foram novamente quantificadas em espectrofotômetro.

Para a síntese da primeira fita de cDNA, foi usando o kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis System* (INVITROGEN - *Life Technologies*). As amostras de RNA total (cerca de 3 μg) foram incubadas com 1 μL de oligo $(dT)_{12-18}$ a 70 ºC por 10 min e em seguida, transferidas para o gelo. Foram adicionados tampão de PCR 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 e KCl 50 mM), $MgCl_2$ 5 mM, os quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,5 mM cada e DTT 5 mM, e esta reação foi incubadas a 42 ºC por 5 min. Em seguida, foram adicionadas 200 U da enzima transcriptase reversa e as amostras foram incubadas a 42 ºC por 50 min e a 70 ºC por 15 min. Após a síntese da primeira fita de cDNA, o RNA foi degradado pela adição de 2 U de RNAse H sob incubação a 37 ºC por 20 min. 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.

Determinadas as quantidades, um fragmento do gene de 358pb foi isolado por meio de reações de síntese da segunda fita de cDNA sintetizado a partir do RNA total do segundo estádio de desenvolvimento, utilizando os *primers* "Liso1 F" e "Liso1 R".

Cada reação de amplificação de 25 μL continha 2μL da reação de síntese da primeira fita, Tris-HCl 10 mM pH8,3, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2,0 mM, os quatro dNTPs, 0,2 mM cada, 0,8 μM de *primers* e 1 U de Taq DNA polimerase (PROMEGA).

Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 0,8% em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) contendo 0,2 μg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado. Após a confirmação da amplificação, os produtos da reação de PCR foram purificados e utilizados em reações de restrição enzimática com as enzimas *Bam* HI e *Bst* EII.

A clivagem dos produtos de PCR foi realizada com 5 U da enzima *Bst* EII (cerca de 500 ng de PCR) e tampão de clivagem 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; $MgCl_2$ 10 mM e NaCl 100 mM) a 60 °C por 1 h. A reação foi parada a 70 ^{o}C por 5 min. Em seguida foram adicionados 50 mM de cloreto de sódio e 5U da enzima *Bam*HI. A reação foi incubada a 37 °C por 1 h em seguida, parada a 70 °C por 5 min e analisada em gel de agarose 0,8%. O fragmento clivado foi purificado do gel e utilizado para a clonagem no vetor pCAMBIA 1304 contendo o fragmento do promotor clonado denominado clone VP (vetor pCAMBIA 1304 + β-conglic).

2.2.4 Clonagem em vetor pCAMBIA 1304 (VP)

Células de *E. coli* contendo o clone VP foram inoculadas em meio LB contendo canamicina 50 μg/mL e incubadas por cerca de 12 h a 37 ºC e 180 rpm em agitador orbital. A extração de DNA plasmidial foi feita utilizando o kit Wizard®*Plus* SV Minipreps (PROMEGA).

Primeiramente o DNA plasmidial foi clivado com 5 U da enzima *Bst* EII a 60 °C por 1 h. Em seguida, a reação foi parada a 70 °C por 5 min. Foram adicionados 50 mM de cloreto de sódio e 5 U da enzima *Bam* HI e a reação foi incubada a 37 °C por 1 h e em seguida, parada a 70 °C por 5 min. Após a confirmação da clivagem em gel de agarose 0,8%, o DNA plasmidial foi submetido aos passos de desproteinização e desfosforilação, conforme descrito para a clonagem da região promotora. 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).

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

A transformação de células de *E. coli* foi realizada como descrito anteriormente e a análise dos transformantes também foi realizada 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 LPCAT e também em reações de restrição enzimática. Após a confirmação de clones positivos, as

bactérias foram aliquotadas em glicerol 40%, armazenadas a -80 ºC e as amostras de DNA plasmidial foram seqüenciadas conforme descrito anteriormente.

O seqüenciamento dos produtos de PCR do DNA plasmidial foi realizando usando os *primers* “Liso1 F”, “Liso1 R”, “Beta-conglic F” e “Beta-conglic R”. As seqüências obtidas para o fragmento da LPCAT foram comparadas com seqüências disponíveis no *GenBank* (análise *blast*) e posteriormente alinhadas com o *contig* formado por seqüências de ESTs de soja, no programa *Clustal W*.

2.2.6 Transformação de células de *A. tumefaciens* por eletroporação

Células de *A. tumefaciens* LB 4404 (GIBCO) foram crescidas em meio Rhizo 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 h a 28 ºC. Colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio Rhizo líquido contendo estreptomicina 100 mg/L e mantidas sob agitação por cerca de 12 h a 28 ºC e 220 rpm. Quando as células atingiram uma OD de 0,5 a 1, foram centrifugadas a 3.000 g por 10 min a 4 ºC. O precipitado formado foi lavado quatro vezes com volume igual de água deionizada autoclavada e gelada. Após esse tratamento, as células foram ressuspendidas em 2 mL de meio GYT (glicerol 10%, extrato de levedura 0,125% e triptona 0,25%) e aliquotadas em volume de 40 μL e armazenadas a -80 ºC.

Para eletroporação foram utilizadas cubetas de 0,2 cm de espessura contendo 40 μL de células descongeladas e 1 μL de DNA plasmidial. 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 Rhizo às células e estas ficaram sob agitação a 150 rpm por 2 h a 28 ºC. As células foram concentradas por centrifugação a 9.000 g por 30 s e ressuspendidas em 100 μL de meio Rhizo. Foram plaqueados 10 μL de células em meio Rhizo contendo estreptomicina 100 mg/L e canamicina 50 mg/L. As placas foram incubadas por três dias a 28 ºC. 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 Rhizo líquido seletivo e incubadas a 28 ºC por 12 a 16 h a 150 rpm. As células foram centrifugadas a 9.000 g por 2 min. O precipitado foi ressuspendido em 100 μL de solução I (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, glicose 50 mM, EDTA 10 mM e lisozima 50 mg/mL) e as amostras foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Foram adicionados 200 μL da solução II (SDS 10% e NaOH 0,2 M) e os tubos foram invertidos gentilmente e incubados 5 min no gelo. Em seguida, foram adicionados 150 μL da solução III (acetato de sódio 5 M pH 5,5) e os tubos foram incubados por mais 5 min no gelo. As amostras foram centrifugadas a 9.000 g por 5 min. Aproximadamente 400 μL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, adicionados 400 μL de fenol:clorofórmio (1:1), agitados em vórtex por 2 min e submetidos a uma nova centrifugação a 9.000 g por 5 min. 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 h a -20 ºC. Após este período, foi realizada uma centrifugação a 9.000 g por 10 min. 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 ºC por 30 min. Os ensaios para confirmação da clonagem (PCR e restrição enzimática) seguiram os procedimentos já descritos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento e clonagem da região promotora do gene que codifica a subunidade α da β-conglicinina

A amplificação do DNA genômico da variedade de soja CAC-1 com *primers* específicos para um segmento da região promotora do gene que codifica a subunidade α da β-conglicinina gerou o fragmento de tamanho esperado com 443 pb (Figura 1). Esse fragmento foi clonado no vetor pCAMBIA 1304 (Figura 2A), em substituição ao promotor 35S, produzindo o vetor denominado VP com tamanho de 12.804 pb (Figura 2B). Após a transformação com o clone VP, dez colônias de *Escherichia coli* DH5α foram analisadas por PCR, com o par de *primers* específicos, para a região promotora da subunidade α da β-conglicinina. Todas as colônias apresentaram a seqüência clonada (Figura 3A). Este resultado foi confirmado por restrição enzimática com as enzimas *Eco* RI e *Bam* HI (Figura 3B) e seqüenciamento do DNA plasmidial amplificado na canaleta 4.

A seqüência de 443 pb foi alinhada com outras seqüências genômicas depositadas no *GenBank*, com o auxílio do BLAST, confirmando a sua homologia com o gene que codifica a subunidade α da β-conglicinina (Figura 4).

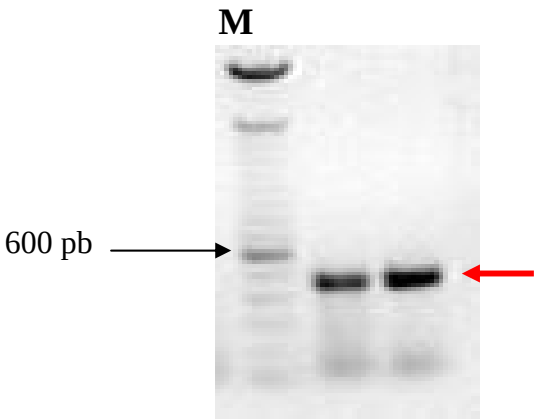
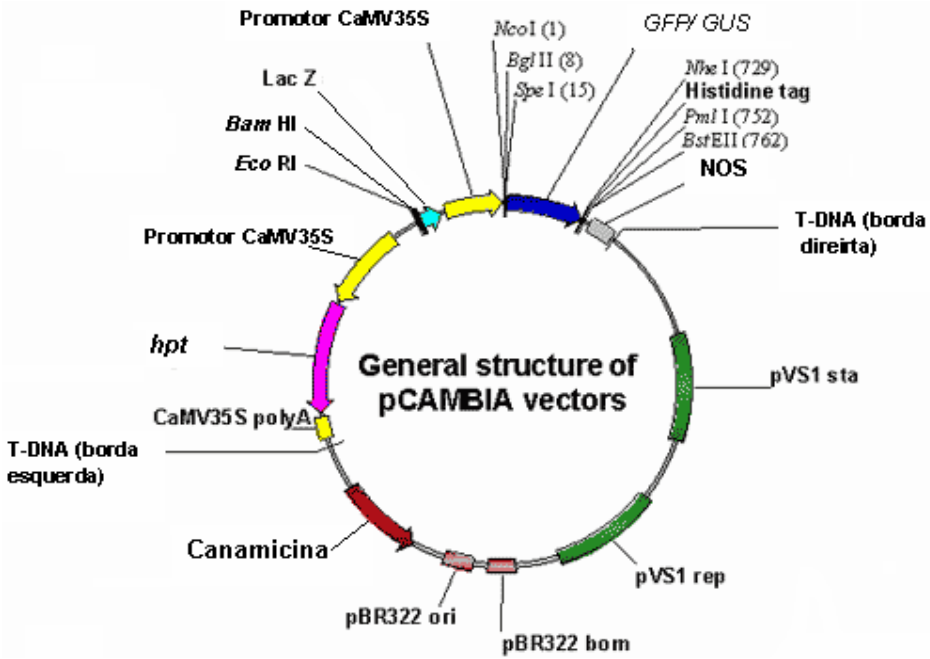


Figura 1 – Produto de amplificação do DNA genômico da variedade de soja CAC-1 com *primers* específicos para isolar um fragmento da região promotora do gene que codifica a subunidade α da β-conglicinina. A seta vermelha indica o tamanho do fragmento amplificado (443 pb). (M) refere-se M refere-se ao marcador de tamanho de 100 pb (INVITROGEN).

A



B

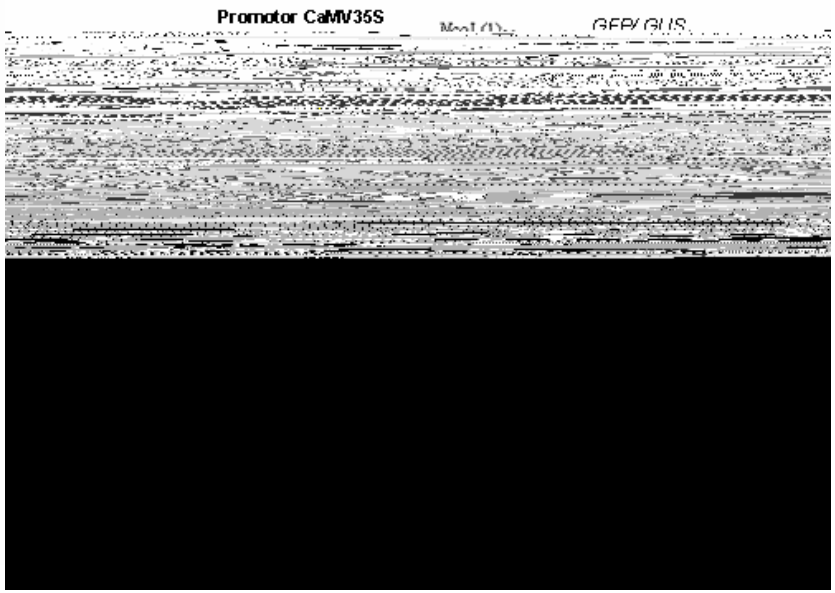


Figura 2 – Estrutura do vetor pCAMBIA 1

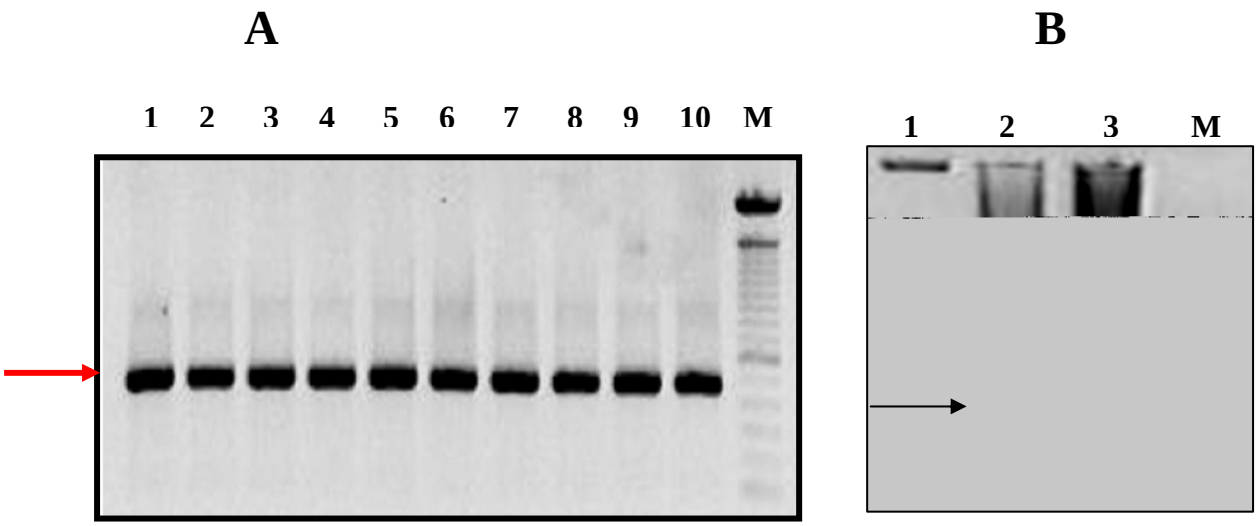


Figura 3 – Análise de transformantes para confirmação da clonagem da região promotora do gene que codifica a subunidade α da β-conglicinina de soja. (A) representa a amplificação obtida a partir das 10 colônias transformantes selecionadas, representadas pelos números de 1 a 10. A seta indica a banda de 445 pb presente em todas as colônias analisadas. Os números 1, 2 e 3 em B representam, respectivamente, o clone VP não clivado e duas amostras clivadas com *Eco* RI e *Bam* HI. A seta em B representa o fragmento excisado de aproximadamente 445 pb. M refere-se ao marcador de tamanho de 100 pb (INVITROGEN).

De acordo com o alinhamento dos genes codificantes das subunidades da β-conglicinina e o gene que codifica a β-faseolina em feijão (YOSHINO *et al*., 2001), a região amplificada e clonada em VP inclui o ponto +1 da transcrição. Estes mesmos autores identificaram, nesta região, uma seqüência muito similar ao *vicilin box* (Box I da figura 5), descrito por outros autores em outros genes relacionados a membros da família das globulinas 7S (BROWN *et al.,* 1988; HIGGINS *et al*., 1988; NEWBIGIN *et al*., 1990). Esta seqüência está relacionada com a expressão semente específica destas proteínas.

Homologia com: Gene da subunidade α da β-Conglicinina de soja

Probabilidade P: $4.8e^{-205}$

Registro de Acesso: AB237643.1

Identidades = 445/445 (100%), *Gaps* = 0/445 (0%)

```
BETA        AGCAACCATATCAGCATATCACACTATCTAGTCTCTTGGATCATGCATGCGCAACCAAA
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AB237643.1  AGCAACCATATCAGCATATCACACTATCTAGTCTCTTGGATCATGCATGCGCAACCAAA

BETA        AGACAACACATAAAGTATCCTTTCGAAAGCAATGTCCAAGTCCATCAAATAAAATTGAGA
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AB237643.1  AGACAACACATAAAGTATCCTTTCGAAAGCAATGTCCAAGTCCATCAAATAAAATTGAGA

BETA        CAAAATGCAACCTCACCCCACTTCACTATCCATGGCTGATCAAGATCGCCGCGTCCATGT
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AB237643.1  CAAAATGCAACCTCACCCCACTTCACTATCCATGGCTGATCAAGATCGCCGCGTCCATGT

BETA        AGGTCTAAATGCCATGCACATCAACACGTACTCAACATGCAGCCCAAATTGCTCACCATC
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AB237643.1  AGGTCTAAATGCCATGCACATCAACACGTACTCAACATGCAGCCCAAATTGCTCACCATC

BETA        GCTCAACACATTTCTTGTTAATTTCTAAGTACACTGCCTATGCGACTCTAACTCGATCAC
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AB237643.1  GCTCAACACATTTCTTGTTAATTTCTAAGTACACTGCCTATGCGACTCTAACTCGATCAC

BETA        AACCATCTTCCGTCACATCAATTTTGTTCAATTCAACACCCGTCAAACTTGCATGCCACC
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AB237643.1  AACCATCTTCCGTCACATCAATTTTGTTCAATTCAACACCCGTCAAACTTGCATGCCACC

BETA        CCATGCATGCAAGTTAACAAGAGCTATATCTCTTCTATGACTATAAATACCCGCAATCTC
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AB237643.1  CCATGCATGCAAGTTAACAAGAGCTATATCTCTTCTATGACTATAAATACCCGCAATCTC

BETA        GGTCCAGGTTTTCATCATCGAGAAC
            |||||||||||||||||||||||||
AB237643.1  GGTCCAGGTTTTCATCATCGAGAAC
```

Figura 4 - Resultado do alinhamento da seqüência isolada da região promotora da subunidade α da β-conglicinina, com a seqüência genômica depositada no *GenBank*.

Foram realizadas buscas por outros *cis*-elementos com o auxílio do programa PLACE (www.dna.affrc.go.jp/place/) e essa análise identificou os potenciais elementos: TATA *box*, CAAT *box*, três motivos CATGCAC (*RY LEG box*) e dois CATGCATG (*RY FLEB box*). Os elementos CAAT estão envolvidos na expressão semente-específica de genes que codificam leguminas. Já os elementos RY LEG *box* e RY FLEB *box* estão relacionadados, respectivamente, com expressão específica (FUJIWARA e BEACHY, 1994) e quantitativa (BAUMLEIN *et al.,* 1992) em sementes (Figura 5).

```
AAGCAACCATATCAGCATATCACACTATCTAGTCTCTTGGATCATGCATGCGCAACCAAAAGACAACACATAAAGTATC
                                           RYLEGBOX RYFLEB4
CTTTCGAAAGCAATGTCCAAGTCCATCAAATAAAATTGAGACAAAATGCAACCTCACCCCACTTCACTATCCATGGCTG

ATCAAGATCGCCGCGTCCATGTAGGTCTAAATGCCATGCACATCAACACGTACTCAACATGCAGCCCAAATTGCTCACC
                                  RYLEGBOX
ATCGCTCAACACATTTCTTGTTAATTTCTAAGTACACTGCCTATGCGACTCTAACTCGATCACAACCATCTTCCGTCAC

ATCAATTTTGTTCAATTCAACACCCGTCAAACTTGCATGCCACCCCATGCATGCAAGTTAACAAGAGCTATATCTCTTC
                 Box I                     RYLEGBOX RYFLEB4
TATGACTATAAATACCCGCAATCTCGGTCCAGGTTTTCATCATCGAGAAC
      TATABOX1                          +1 da transcrição
      TATABOX2
```

Figura 5 – Caracterização da região promotora da subunidade α da β-conglicinina clonada no vetor pCAMBIA 1304, identificando e posicionando os *cis*-elementos.

A presença de todos os *cis*-elementos identificados indica, com certa segurança, a funcionalidade desta região para controle da transcrição de transgenes em sementes. Experimentos realizados por CHEN *et al*. (1986) com o gene que codifica a subunidade α' da β-conglicinina, demonstraram que a região compreendida entre os pontos +14 a -257 em relação ao ponto mais +1 da transcrição é suficiente para garantir um alto nível de expressão semente específica. A adição de 8 kb a essa região não aumentou significativamente a síntese de proteínas repórteres na semente. KINNEY et al. (2001) produziram linhagens de soja com baixo conteúdo de β-conglicinina pela co-supressão do gene que codifica a região promotora tanto da subunidade α quanto da α'.

YOSHINO *et al.* (2006) descreveram possíveis elementos regulatórios para transcrição de genes da subunidade α da β-conglicinina, baseados em resultados de ensaios de expressão transiente com o gene *GUS* em *Arabidopsis thaliana*. Esses autores encontraram clara associação na diminuição da atividade de *GUS* em materiais transformados com a construção que continha uma deleção na região que

continha uma seqüência RY da construção original. Esses resultados coincidem com aqueles que descrevem que os elementos regulatórios, como as seqüências RY, estão envolvidas na ativação semente-específica da transcrição da subunidade α da β-conglicinina.

Outro ponto a ser testado seria a atividade deste promotor durante o desenvolvimento da semente. De acordo com HARADA *et al*. (1989), a quantidade de mRNA referente aos genes que codificam a β-conglicinina oscila durante o desenvolvimento do embrião, atingindo o máximo por volta de 80 dias após o florescimento. Apesar dessa oscilação, a utilização deste promotor em cassetes de expressão para silenciamento não se torna inviável porque mesmo um baixo nível de expressão poderia ser suficiente para direcionar a clivagem de mRNAs que não se acumulam em níveis tão altos quanto àqueles relacionados a proteínas de reserva.

Após estas análises, o DNA plasmidial de clones positivos contendo a construção ou vetor VP foram linearizados e utilizados para inserção “in frame” do fragmento de 358 pb da região codificadora do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT).

3.2 Isolamento e clonagem de um fragmento do gene que codifica a enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT)

Para o isolamento do fragmento de LPCAT o cDNA foi sintetizado a partir de RNA total de sementes de soja e os fragmentos obtidos por PCR. O tamanho dos fragmentos visualizados correspondeu ao tamanho esperado, 358 pb, para o produto amplificado a partir dos *primers* específicos para a LPCAT. O emprego de seqüências relativamente pequenas para silenciamento tem sido descrito na literatura (OGITA *et al.*, 2004; GILISSEN *et al*., 2005; MILES *et al*., 2005). Além de serem suficientes para garantir um silenciamento eficaz, pequenos fragmentos são de fácil manipulação e favorecem a eficiência de clonagem e transformação já que a construção de cassetes de expressão geralmente envolve vetores de alto peso molecular.

Antes do isolamento do fragmento do gene *LPCAT* para a construção dos cassetes de expressão, foram realizados ensaios de RT-PCR para quantificação dos

níveis de mRNA de *LPCAT* em sementes de soja nos diferentes estádios compreendendo o período de enchimento do grão (Figura 6). 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.

A análise por RT-PCR mostrou que o gene *LPCAT* é expresso em todos os estádios de desenvolvimento da semente, com um padrão de expressão levemente crescente nos dois estádios iniciais de desenvolvimento, mantendo-se constante até os últimos estádios. Nos estádios iniciais o acúmulo de produtos de reserva sintetizados durante o desenvolvimento do grão é grande.

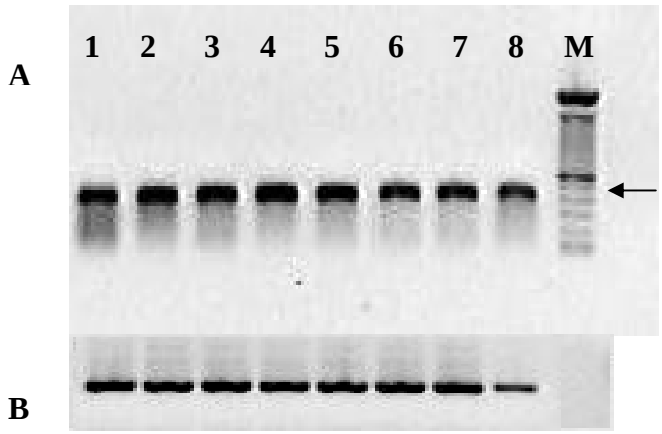


Figura 6 – Ensaio de RT-PCR para o gene da enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase durante o desenvolvimento de sementes de soja. (A) representa as amostras de cDNA amplificadas para o gene *LPCAT* e (B), o controle interno com actina. Os números de 1 a 8 correspondem aos oito estádios de desenvolvimento da semente. A seta indica o tamanho do fragmento amplificado (358 pb). (M) refere-se ao marcador de tamanho (100 pb).

Não foi encontrada na literatura, nenhuma referência que pudesse comprovar esses resultados sobre o padrão de expressão do gene da LPCAT nos estádios de desenvolvimento da semente. HEPPARD *et al*. (1996), verificaram que a expressão do gene *Fad2-1* (ω-6 dessaturase) em soja aumenta durante o desenvolvimento da semente, período que corresponde com a biossíntese de lipídios de reserva. Os resultados mostraram que os dois genes (*Fad2-1* e *Fad2-2*) são expressos durante o desenvolvimento da semente. No entanto, o nível de expressão de *Fad2-2* foi maior que o de *Fad2-1* nos estádios 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 diminui 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.

LANNA (2002) determinou a atividade da enzima LPCAT sob diferentes temperaturas de dois genótipos de soja, CAC-1 (com teor normal de ácido linolênico) e CC4 (com baixo teor de ácido linolênico), nos diferentes estádios de enchimento do grão, também utilizados no presente trabalho. Os resultados obtidos por LANNA (2002) mostraram que a atividade da LPCAT foi maior nas sementes produzidas em temperaturas variando de 13 – 22 °C do que em temperaturas variando de 28 – 34 °C. Em alta temperatura, a atividade foi superior somente nos dois primeiros estádios de desenvolvimento; nos últimos, a atividade tendeu a ser semelhante.

No presente trabalho, as sementes utilizadas nos ensaios de RT-PCR foram obtidas da variedade CAC-1, cultivada em casa de vegetação, com temperatura variando de 20 – 28 °C. O padrão de expressão observado foi semelhante ao obtido por LANNA (2002) em condições de alta temperatura correspondendo ao período de biossíntese de lipídio de reserva como o da ω-6 dessaturase.

A clonagem do fragmento correspondente ao cDNA do gene de interesse foi feita a partir de cDNA de sementes do segundo estádio de desenvolvimento. As amostras de cDNA sintetizadas por PCR com o par de *primers* específicos para o fragmento da LPCAT foram purificadas e submetidas à reação de restrição enzimática *Bam* HI e *Bst* EII, para posterior clonagem no vetor pCAMBIA 1304 contendo a região promotora clonada (VP).

Primeiramente, o clone VP foi submetido a reações de restrição enzimática com as enzimas *Bam* HI e *Bst* EII para a clonagem do fragmento LPCAT (Figura 7), em substituição aos genes repórteres presentes na estrutura original do pCAMBIA 1304. Este clone passou a ser chamado de VPL (vetor pCAMBIA 1304 + β-conglic + LPCAT).

Após a transformação de células competentes de *E. coli* com o clone VPL, 10 colônias recombinantes apresentando a seqüência clonada (Figura 8A) foram detectadas, por PCR com o par de *primers* para a LPCAT. Este resultado foi

confirmado por restrição enzimática com as enzimas *Bam* HI e *Bst* EII (Figura 8B). De acordo com este resultado, foi clonado um fragmento de 358 pb, indicando ser um fragmento do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase. Esse resultado foi confirmado por seqüenciamento.

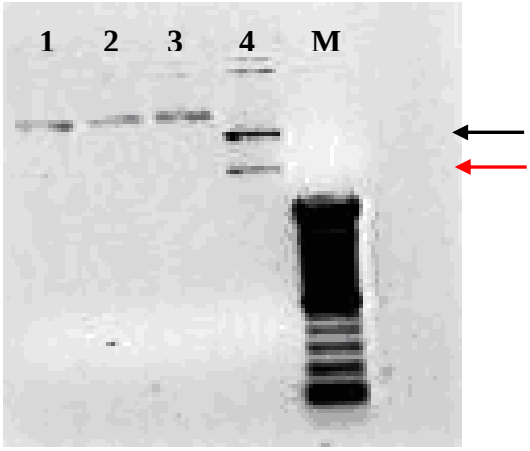


Figura 7 – Restrição enzimática do clone VP com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Bst* EII. Os números 1, 2, 3 e 4 representam, respectivamente, o vetor pCAMBIA 1304 fechado (12.361 pb); duas repetições do DNA plasmidial do clone VP não clivado (~12.804 pb) e o clivado. A seta de cor preta indica a banda correspondente ao vetor linearizado (aproximadamente 9.787 pb) usado na ligação com o fragmento de LPCAT e a seta vermelha ao fragmento de aproximadamente 2.574 pb correspondente à fusão dos genes repórteres (*GUS* e *GFP*) liberado. (M) refere-se ao marcador de tamanho (100 pb).

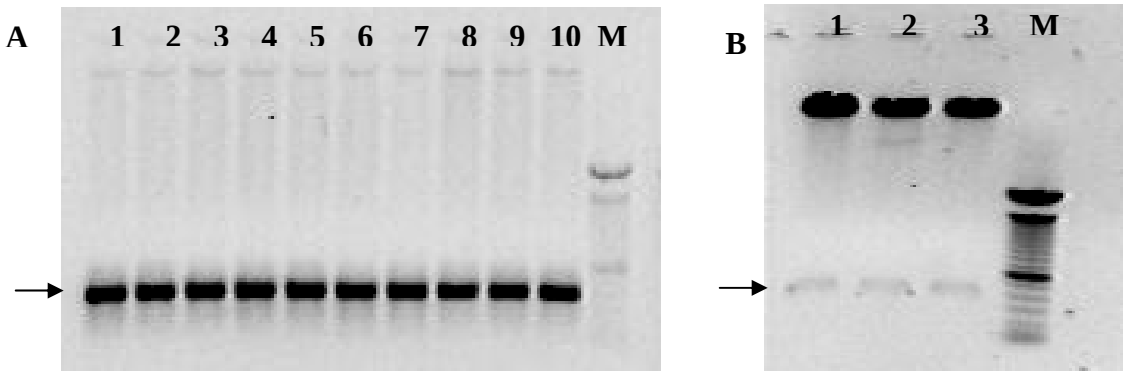


Figura 8 – Análise de transformantes para confirmação da clonagem do fragmento do gene da LPCAT. (A) representa a amplificação obtida a partir das 10 colônias transformantes selecionadas, representadas pelos números de 1 a 10. A seta indica a banda de 358 pb esperada presente em todas as colônias analisadas. Os números 1, 2 e 3 em B representam o clone VPL clivado com *Bam* HI e *Bst* EII de três colônias positivas. A seta em B representa o fragmento clivado de aproximadamente 358 pb. M refere-se ao marcador de tamanho de 100 pb (INVITROGEN).

A Figura 9 mostra a representação esquemática do cassete de expressão clonado no vetor pCAMBIA 1304.

T-DNA pCAMBIA 1304

Figura 9 – Representação esquemática da construção gênica com o fragmento do gene *LPCAT* no vetor pCAMBIA 1304. É mostrado apenas a região do T-DNA. BE - borda esquerda; BD - borda direita; pβ-conglic – região promotora da subunidade α da β-conglicinina; p35S - promotor 35S; T35S – terminador poli A de 35S; TNOS – terminador do gene da nopalina sintase; *hpt* – higromicina-fosfotransferase. A seta indica a orientação da clonagem.

A Figura 10 mostra o ensaio de restrição enzimática realizado com todas as enzimas de restrição utilizadas para construção do cassete de expressão (*Eco* RI, *Bam* HI e *Bst* EII) para confirmar clonagem da região promotora e do fragmento da LPCAT no mesmo clone (VPL). Na clivagem do VPL com o par de enzimas *Eco* RI e *Bam* HI, foi liberado um fragmento de 443 pb correspondente ao tamanho esperado para o fragmento da região promotora. A clivagem com as enzimas *Eco* RI e *Bst* EII mostrou uma banda com tamanho esperado de aproximadamente 801 pb para o fragmento correspondente à região promotora e de LPCAT. Na reação de clivagem com as enzimas *Bam* HI e *Bst* EII foi liberado um fragmento com tamanho de 358 pb correspondente ao fragmento isolado da LPCAT. Essas análises confirmam a clonagem dos fragmentos no vetor pCAMBIA 1304.

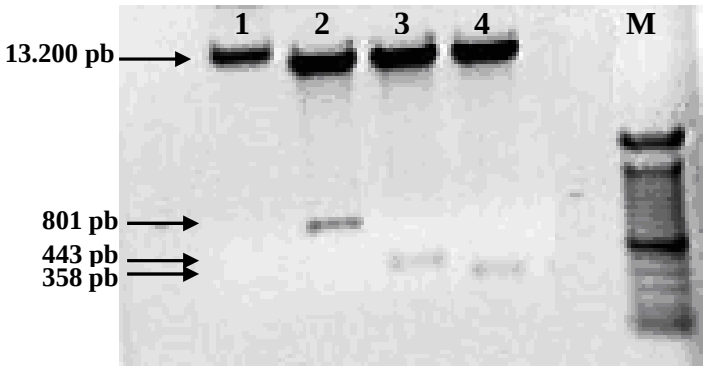


Figura 10 – Ensaios de restrição enzimática com o DNA plasmidial do clone VPL. Os números 1, 2, 3, 4 representam, respectivamente, VPL fechado (aproximadamente 13.200 pb); VPL clivado com as enzimas *Eco* RI e *Bs t*EII liberando promotor e LPCAT; VPL clivado com as enzimas *Eco* RI e *Bam* HI liberando o fragmento do promotor e VPL clivado com *Bam* HI e *Bst* EII liberando o fragmento da LPCAT. As setas indicam o tamanho do fragmento liberado e M refere-se ao marcador de tamanho de 100 pb (INVITROGEN).

O clone VPL foi submetido a reações de seqüenciamento para confirmar se a seqüência clonada se referia a um fragmento do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase microssomal de soja e determinar, com maior segurança, o tamanho do fragmento clonado.

A seqüência obtida foi analisada no programa *Seqman* (DNASTAR Inc.) e comparada com as seqüências depositadas no *GenBank*. Nas buscas pela seqüência do cDNA da LPCAT, não foi possível encontrar uma seqüência completa em soja. Nos bancos de dados foram encontrados ESTs de LPCAT de soja, os quais foram usados neste trabalho na montagem de um *contig* para o desenho dos *primers* específicos para o gene de interesse. Assim, a seqüência do fragmento clonada no vetor pCAMBIA 1304 foi alinhada com a seqüência do *contig* (Figura 11), confirmando que o fragmento clonado era o esperado. Na busca de homologia entre o fragmento de LPCAT clonado e o gene *LPCAT* de soja, foi possível encontrar similaridade nas análises em bancos de ESTs de soja depositados no *GenBank*. Essa análise mostrou identidade de 98% com acil-CoA:1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase (Figura 12). Esses resultados podem inferir que a seqüência clonada no vetor pCAMBIA 1304 é homóloga a seqüências de um fragmento expresso do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase de *Glycine max.*

```
Seq.1   ------------------------------------------------------------------
Seq.2   ATTGGTGGCAAGTGGCAACCGGAAAGCCAGAGTGTGTGGTTCCGTTTGCTGACCTGACCTCGGAAATC

Seq.1   ------------------------------------------------------------------
Seq.2   CAAAGAGGGAAACTCACGGTGTTTCGTTAGAGAATAGAGAATTCGACATAACGATAGCTCAGCATCAG

Seq.1   ------------------------------------------------------------------
Seq.2   CATTCAGCAACATCAATATGCGATCGACAAGGCAGACAACAATTTCGGGAATCCGCATGGCTATTGCA

Seq.1   ------------------------------------------------------------------
Seq.2   CATGCAGTTGTGGTCGTCCCATTGGGCCTTCTCTTCTTCGCTTCCGGCCTCATCGTTAACCTCATTCA

Seq.1   GGCCAAATA-TGCACTGGTGTGCGGC-GGTGTCAAGAA------TTGTACCGGCGGATGAACAGG-TG
Seq.2   GGCAATATGCTACGTGGTTGTGCGGCCGGTGTCAAAGAAGAAGTTTGTACCGGCGGATGAACAGGGTG
        *** * **  * *   * ******** ********  *      ******************** **

Seq.1   GTGGCTGAACTGCT-GTGGCTGGAGCTCGTTTGGATTATTGATTGGTGGGCTGGTGTTAAGGTCCAAG
Seq.2   GTGGCGGAGCTGCTCGTGGCTGGAGCTCGTGTGGATTATTGATTGGTGGGCCGGTGTTAAGGTCCAAG
        ***** ** ***** *************** ******************** ****************

Seq.1   TATTCACAGATCCTGAAACCTTTCATTCAATGGGTAAAGAGCATGCTCTTGTCATATCCAATCACAGA
Seq.2   TATTCACAGATCCTGAAACCTTTCGTTCAATGGGTAAAGAGCATGCTCTTGTTATATCCAATCACAGA
        ************************ *************************** ***************

Seq.1   AGTGACATTGATTGGCTTGCTGGATGGGTTTTAGCTCAGCGTTCAGGTTGCCTTGGCAGCACACTTGC
Seq.2   AGTGACATTGATTGGCTTGTTGGATGGGTTTTAGCTCAGCGTTCAGGTTGCCTTGGCAGCACTCTTGC
        ****************** ****************************************** *****

Seq.1   TGTGATGAAGAAATCTTCAAAGTTTCTACCGGTCATTGGTTGGTCAATGTGGTTTTCTGAATA-----
Seq.2   TGTGATGAAGAAATCTTCAAAGTTTCTACCGGTCATTGGTTGGTCAATGTGGTTTTCTGAATATCTTT
        ****************************************************************

Seq.1   ------------------------------------------------------------------
Seq.2   TCCTGGAGAGAAGTTGGGCCAAGGATGAACGCACATTAAAGTCAGGCCTACAGCAACTGAGGGATTTC

Seq.1   ------------------------------------------------------------------
Seq.2   CCTCTTCCCTTTTGGTTGGCTCTCTTTGTAGAAGGAACTCGCTTTACACAGGGCCAAACTATTAGCTG

Seq.1   ------------------------------------------------------------------
Seq.2   CTCAGGAGTATGCAGCCTCAGCTAGATTGCCTGTTCCAAGAAATGTCGATTGCATTCGAGGCAAGAAC

Seq.1   ------------------------------------------------------------------
Seq.2   TAAGGGTTTTGTTTCAGCAGTAAACCATATGCGCTCGTTTGTTCCTGCCATTTATGATGTAACTGTGG

Seq.1   ------------------------------------------------------------------
Seq.2   CCAATTCCCTAAGAGTTCACCTGCTCCTACAATGCTAAGACTCTTCAGAGGGACAATCTTCATTGGTG

Seq.1   ------------------------------------------------------------------
Seq.2   CATGTGCATATCAAGCGGCATGCGATGAAGGATTTGCCAGATACAAGATGAAGCTCGCTGCCCAATGG

Seq.1   ------------------------------------------------------------------
Seq.2   TGTCGAGATATATTTGTGGCCAAGGATGCTTTGCTAGACAAACATATAGCTGAGGACACATTTAGTGA

Seq.1   ------------------------------------------------------------------
Seq.2   TCAAGAGCTGCAGGATACTGGTCGACCAATAAAGTCTCTTCTGGTAGCCATATCTGTGGGCTTGTGTC

Seq.1   ------------------------------------------------------------------
Seq.2   TGGTTGTTACGGGGGTCTGAAAAGTTCCTCCAATGGTCTTCACTACTATCCTCCTGGAAGGGCGGCGC

Seq.1   ------------------------------------------------------------------
Seq.2   ATCTTCAGCATTTGGTTTGGCAGTTGTCACTGCTACTCATGCAAATTCTTGATTCAATGGTCTCACCA

Seq.1...------------------------------------------------------------------
Seq.2   GTCAGAGCGCGCAAACCCGGCTTCAAGATCGTGCCCTGACCAAAAAGTCCAATAAAAGCGAAGGGGTC

Seq.1   ------------------------------------------------------------------
Seq.2   TTGATTTATTTGGCGAACTTAAAGTTGCATTTATGTGTGATGAGTGACTCATGTAATACTCATTATT
```

Figura 11 - Alinhamento entre a seqüência clonada de LPCAT e o *contig* formado por seqüências de ESTs de soja. As setas em azul indicam as seqüências dos *primers* utilizados para a amplificação do cDNA de sementes de soja.

Homologia com: Acil-CoA: 1-acilglicerol-3-fosfatase aciltransferase

Probabilidade P: $9e^{-167}$

Registro de Acesso: CA785831.1

Identidades = 348/355 (98%)

```
LPCAT     2   CCTCATCGTTAACCTCATTCAGGCAATATGCTACGTGGTTGTGCGGCCGGTGTCAAAGAA  61
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CA785831.1 98 CCTCATCGTTAACCTCATTCAGGCAATATGCTACGTGGTTGTGCGGCCGGTGTCAAAGAA  157

LPCAT   62     TTTGTACCGGCGGATGAACAGGGTGGTGGCTGAACTGCTGTGGCTGGAGACTCGTTTGGA  121
               |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||
CA785831.1 158 TTTGTACCGGCGGATGAACAGGGTGGTGGCTGAACTGCTGTGGCTGGAG-CTCGTTTGGA  216

LPCAT   122    TTATTGATTGGTGGGCTGGTGTTAAGGTCCAAGTATTCACAGATCCTGAAACCTTTCATT  181
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CA785831.1 217 TTATTGATTGGTGGGCTGGTGTTAAGGTCCAAGTATTCACAGATCCTGAAACCTTTCATT  276

LPCAT    182   CAATGGGTAAAGAGCATGCTCTTGTCATATCCAATCACAGAAGTGACATTGATTGGCTTG  241
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CA785831.1 277 CAATGGGTAAAGAGCATGCTCTTGTCATATCCAATCACAGAAGTGACATTGATTGGCTTG  336

LPCAT    242    CTGGATGGGTTTAAGCTCAGCGTTCAGGTTGCCTTGGCAG-ACACTTGCTGTGATGAAGA  300
                ||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||
CA785831.1 337  TTGGATGGGTTTTAGCTCAGCGTTCAGGTTGCCTTGGCAGCACACTTGCTGTGATGAAGA  396

LPCAT   301     AATCTTCAAAGTTTCCTACCGGTCATTGGTTAGGTCAATGTGGTTTACTGAATAT  355
                |||||||||||||| ||||||||||||||||| |||||||||||||| ||||||||
CA785831.1  397 AATCTTCAAAGTTT-CTACCGGTCATTGGTT-GGTCAATGTGGTTTTCTGAATAT  449
```

Figura 12 – Resultado obtido junto ao programa *BLASTn* na busca de homologia entre a seqüência gerada a partir do clone **VPL** e seqüências nucleotídicas de ESTs de soja depositadas no *GenBank*.

As análises por PCR, restrição enzimática e seqüenciamento do clone VPL mostraram que os fragmentos tanto da região promotora da subunidade α da β-conglicinina (443 pb) quanto o fragmento da LPCAT (358 pb) estão clonados no vetor pCAMBIA 1304.

LIMA (2005), usando o mesmo vetor pCAMBIA 1304 para a construção de cassete de expressão para co-supressão do gene da oleoil dessaturase, sugere a utilização de fragmentos menores de cDNA, como o utilizado neste trabalho. Na literatura há relatos mostrando 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). A construção gênica foi clonada em vetor binário que apresenta o gene seletivo *hpt* em seu T-DNA, permitindo avaliar a seleção *in vitro*

dos explantes transformados. Essas construções, inicialmente clonadas em *E. coli*, foram transferidas para *A. tumefaciens* para serem utilizadas em ensaios de transformação genética de nós cotiledonares de soja.

Após a eletroporação de células de *Agrobacterium* com o **VPL**, dez colônias foram analisadas por PCR com os *primers* "Beta-conglic F" e "Liso1 R" e oito continham a construção clonada (Figura 13A). Após as reações de restrição com os conjuntos de enzimas *Eco* RI / *Bam* HI e *Bam* HI / *Bst* EII, os fragmentos liberados foram os mesmos dos ensaios iniciais em *E. coli* (Figura 13B).

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 freqüência 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).

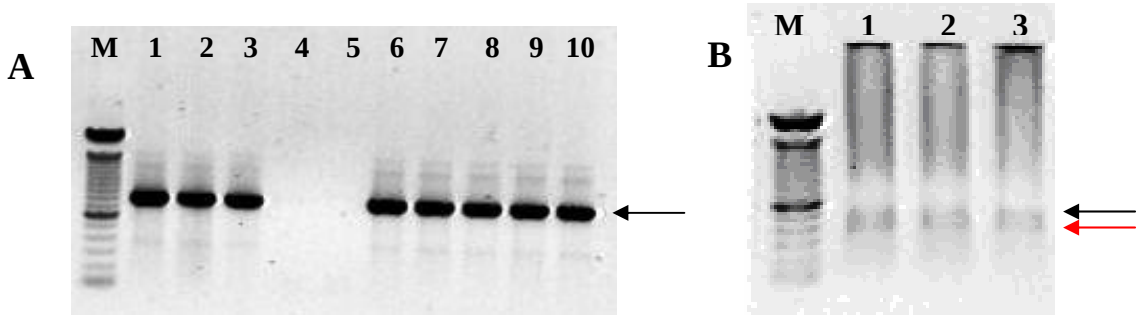


Figura 13 – Ensaios para confirmação da presença do clone VPL em *A. tumefaciens*. (A) e (B) representam, respectivamente, reações de PCR com DNA plasmidial de colônias transformadas com o clone VPL e ensaios de restrição enzimática. Os números de 1 a 10 em A correspondem aos DNAs amplificados com o par de *primers* "Beta-conglic F" e "Liso1 R", que flanqueiam a seqüência do promotor e da LPCAT. Os números 1, 2 e 3 em (B) representam a restrição enzimática com os conjuntos de enzimas: *Eco* RI / *Bam* HI e *Bam* HI / *Bst* EII para os clones amplificados nas canaletas 7, 8, 9 da figura A, respectivamente. A seta em A corresponde ao produto de amplificação (~800 pb) e as setas em (B), aos fragmentos liberados dos clones **VPL**; seta preta – fragmento do promotor com 443 pb; seta vermelha – fragmento de 358 pb de LPCAT. (M) refere-se ao marcador de tamanho de 100 pb (INVITROGEN).

A escolha do promotor e o tipo de construção gênica utilizada são dois pontos importantes a serem analisados com o objetivo de aumentar a eficiência do PTGS. 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). A expressão semente-específica de transgenes é requerida para várias aplicações que utilizam a engenharia genética, entre elas a melhoria da qualidade nutricional e funcional de grãos (KEELER *et al.,* 1997; SHINTANI e DELLAPENNA, 1998; GOTO *et al.,* 1999; YE *et al.,* 2000; BARRO *et al*; 1997). Proteínas de reserva estão presentes em altos níveis durante o desenvolvimento da semente e sua expressão é fortemente controlada espacial e temporalmente. Portanto, seqüências regulatórias presentes nos genes que codificam estas proteínas representam poderosa ferramenta usada para dirigir a expressão de transgenes de uma maneira semente-específica. Em soja, por exemplo, os promotores das subunidades α ou α' da proteína de reserva β-conglicinina têm sido muito utilizados para silenciamento semente-específico (KINNEY, 1996; CAHOON *et al*., 1999; CAHOON *et al*., 2000; BUHR *et al*., 2002).

Alguns trabalhos da literatura também relatam o efeito de diferentes tipos de construções gênicas para alterar a composição de lipídios em espécies vegetais oleaginosas. KINNEY (1996), um dos primeiros trabalhos descritos, obteve plantas de soja cujo óleo apresentava mais de 88% de conteúdo de ácido oléico pela introdução de uma cópia *sense* (co-supressão) do gene *Fad2-1* suprimindo a atividade da enzima ω-6 dessaturase microssomal. Variedades de canola com alto conteúdo de ácido oléico também foram produzidas por silenciamento gênico (STOUTJESDIJK *et al*., 2002).

O efeito do silenciamento deste mesmo gene (*Fad2-1*) em *Arabidopsis*, usando construções a*ntisense* e para a co-supressão foi mostrado por CARTEA *et al*. (1998). A construção *sense* promoveu uma freqüência 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 íntron, 100% dos regenerantes mostraram silenciamento do gene da ω6-dessaturase. HELLIWELL e WATERHOUSE (2003), desenvolveram vetores com um íntron como espaçador para simplificar o uso do silenicamento via hpRNA, e também verificaram que a utilização desse íntron entre as seqüências repetidas e invertidas aumentava significativamente o silenciamento de genes.

LIU *et al*. (2002a) também mostraram que construções tipo hpRNA são superiores na indução de silenciamento em relação a supressão *antisense* convencional. Como resultado da utilização dessa técnica, esses pesquisadores obtiveram um óleo de algodão com alto conteúdo de ácido oléico (cerca de 80%) e esteárico (cerca de 40%), silenciando os genes das enzimas oleoil dessaturase (ω6-dessaturase) e estearoil dessaturase (Δ9-dessaturase), respectivamente. Esse trabalho representa a primeira aplicação deste tipo de silenciamento para o desenvolvimento de óleos modificados.

KINNEY *et al*. (2001) com o objetivo de co-suprimir o gene da ω6-dessaturase, utilizaram na construção gênica o promotor da subunidade α da β-conglicinina. Esses autores, além de descreverem um aumento no conteúdo de ácido oléico pelo silenciamento da ω6-dessaturase, também obtiveram a co-supressão da região promotora das subunidades α e α' da β-conglicinina, diminuindo o conteúdo dessa proteína nas linhagens de soja transformadas.

Como na literatura ainda não são encontrados trabalhos de silenciamento gênico para a enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase a construção descrita neste trabalho seria boa ferramenta com o objetivo de diminuir o conteúdo de ácidos graxos polinsaturados em soja.

Como descrito anteriomente, embora o silenciamento mediado por co-supressão envolvendo genes da biossíntese de ácidos graxos tenha mostrado freqüência relativamente baixa, 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.

BARRO, F.; ROOKE, L.; BEKES, F.; GRAS, P.; TATHAM, A. S.; FIDO, R.; LASSERI, P.; SHEWRY, P. R.; BARCELO, P. 1997. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. **Nature Biotechnology**, v.15, p. 1295-1299.

BAULCOMBE, D. 2004. RNA silencing in plants. **Nature**, v.431, p. 356-363.

BAUMLEIN, H.; NAGY, I.; VILLARROEL, R.; INZE, D.; WOBUS, U. 1992. *Cis*-analysis of a seed protein gene promoter: the conservative RY repeat CATGCATG within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene. **Plant Journal,** v. 2, p. 233-239.

BAYLIN, A.; KABAGAMBE, E. K.; ASCHERIO, A.; SPIEGELMAN, D.; CAMPOS, H. 2003. Higher *18:2 trans*-fatty acids in adipose tissue are associated with increased risk of nonfatal acute myocardial infarction in Costa Rican adults. **Journal of Nutrition.**, v. 133, p. 1186-1191.

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.

BROWN, D.; ELLIS, T. H.; GATEHOUSE, J. A. 1988. The sequence of a gene encoding convicilin from pea (*Pisum sativum* L.) shows that convicilin differs form vicilin by an insertion near the N-terminus. **Biochemical Journal**, v. 251, p. 717-726.

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 Molecular of Endocrinology**, v. 25, p. 169-193.

BUSTOS, M. M.; GUILTINAN, M. J.; JORDANO, J.; BEGUM, D.; KALKAN, F. A.; HALL, T. C. 1989. Regulation of beta-glucuronidase expression in transgenic tobacco plants by an A/T-rich, *cis*-acting sequence found upstream of a French bean beta-phaseolin gene. **Plant Cell**, v.1, p. 839-853.

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.

CAHOON, E. B.; SHANKLIN, J. 2000. Substrate-dependent mutant complementation to select fatty acid desaturase variants for metabolic engineering of plant seed oils. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, p. 12350-12355.

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.

GENNITY, J. M.; STUMPF, P.K. 1985. Studies of the ^{12}desaturase of *Carthamus tinctorius* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 239, p. 444-454.

CHEN, Z. L.; NAITO, S.; NAKAMURA, I.; BEACHY, R. N. 1989. Regulated expression of genes encoding soybean beta-conglycinin in transgenic plants. **Development Genetic**, v. 10, p. 112-122.

CHEN, Z. L.; SCHULER, M. A.; BEACHY, R. N. 1986. Functional analysis of regulatory elements in a plant embryo-specific gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 83, p. 8560-8564.

FUJIWARA, T.; BEACHY, R. N. 1994. Tissue-specific and temporal regulation of a beta-conglycinin gene: roles of the RY repeat and other *cis*-acting elements. **Plant Molecular Biology**, v. 24, p. 261-272.

GILISSEN, L. W. J.; BOLHAAR, S. T. H. P; MATOS, C. I.; ROUWENDAL, G. J. A.; BOONE, M. J.; KRENS, F. A.; ZUIDMEER, L.; LEEUWEN, A.; AKKERDAAS, J.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; KNULST, A.; BOSCH, D.; WEG, E.; REE, R. 2005. Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. **Journal Allergy Clinical Imunnology**, v. 115, p. 364-36.

GOTO, F.; YOSHIHARA, T.; SHIGEMOTO, N.; TOKI, S.; TAKAIWA, F. 1999. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 282-286.

HARADA, J. J.; BAKER, S. J.; GOLDBERG, R. B. 1989. Soybean β-conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and posttranscriptional processes. **The Plant Cell**, v. 1, p. 415-425.

HELLIWELL. C.; WATERHOUSE, P. 2003. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. **Methods**, v. 30, p. 289-295.

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.

HIGGINS, T. J. V.; NEWBIGIN, E. J.; SPENCER, D., LLEWLLYN, D. J.; CRAIG, S. 1988. The sequence of a pea vicilin gene and its expression in transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, v. 11, p. 683-695.

JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P.; BARTEL, B. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. **Annual Review Plant Biology**, v. 57, p. 19-53.

KELLER, B.; BAUMGARTNER, C. 1991. Vascular-specific expression of the bean Grp-1.8 gene is negatively regulated. **The Plant Cell**, v. 3, p. 1639-1646.

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.

KINNEY, A.L.; JUNG, R; HERMAN, E.M. 2001. Cosuppression of the subunits α of β-Conglycinin in transgenic soybean seeds induces the formation of endoplasmic reticulum–derived protein bodies. **The Plant Cell**, v. 13, p. 1165-1178.

KINNEY, y4qd5 -1.72/tr1(, v. 30, p. 109)Tj-21.625 -1.725 TD0 Tc0 TY-fe subunits

LIMA, A. B. 2005. **Construção de cassete para a co-supressão do gene da oleoil dessaturase e transformação genética de embriões somáticos de soja**. Tese (Doutorado Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, MG, 117p.

LIPPMAN, Z.; MARTIENSSEN, R. 2004. The role fo RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, V. 431, p. 364-370.

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.

MEINS, F.; SI-AMMOUR, A.; BLEVINS, T. 2005. RNA silencing systems and their relevance to plant development. **Annual Review of Cell and Development Biology**, v. 21, p. 297-318.

MILES, G. P.; SAMUEL, M. A.; ZHANG, Y.; ELLIS, B. E. 2005. RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3. **Environmental Pollution**, v. 138, p. 230-237.

MOREAU, R. A; STUMPF, P. K. 1982. Solubilization and characterization of an acyl-coenzyme A. **Plant Physiology**, v. 69, p. 1293-1297.

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

ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N. N. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, v. 313, p. 810-812.

OGITA, S.; UEFUJI, H.; MORIMOTO, M.; SANO, H. 2004. Application of RNAi to confirms theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. **Plant Molecular Biology**, v. 54, p 931-941.

POTENZA, C.; ALEMAN, L.; SENGUPTA-COPALAN, C. 2004. Targeting transgene expression in research, agricultural and environmental applications: promoters used in plant transformation. **In Vitro Cellular Developmental and Biology Plant**, v. 40, p. 1-22.

QI, Y.; HANNON, G. J. 2005. Uncovering RNAi mechanisms in plants: Biochemistry enters the foray. **FEBS letters**, v. 579, p. 5899-5903.

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

SHINTANI, D.; DELLAPENNA, D. 1998. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. **Science**, 282, p. 2098-2100.

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.

SOURET, F. F.; KASTENMAYER, J. P.; GREEN, P. J. 2004. AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. **Molecular Cell**, v. 15, p. 173–83.

STOBART, A.; STYMNE, S. 1985. The regulation of the fatty-acid composition of the triacylglycerols in microsomal preparations from avocado mesocarp and the developing cotyledons of safflower. **Planta**, v. 163, p. 119-125.

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.

STYMNE, S.; STOBART, A.K. 1984. Evidence for the reversibility of the acyl-CoA: lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons and rat liver. **Biochemistry Journal**, v. 223, p. 305-314.

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

VOGEL, G.; BROWSE, J. 1996. Cholinephosphotransferase and diacylglycerol acyltransferase. **Plant Physiology**, v. 110, p. 23-93.

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

WATERHOUSE, P.M.; WANG, M.B.; LOUGH, T. 2001. Gene silencing as an adaptative defense against viruses. **Nature**, v. 411, p. 834-842.

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.

YE, X.; AL-BABILI, S.; KLOTI, A.; ZHANG, J.; LUCCA, P.; BEYER, P.; POTRYKUS, I. 2000. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. **Science**, v. 287, p. 303-305.

YOSHINO, M.; KANAZAWA, A.; TSUTSUMI, K.; NAKAMURA, I.; SHIMAMOTO, Y. 2001. Structure and characterization of the gene encoding α subunit of soybean β-conglycinin. **Genes Genetic Systems.**, v. 76, p. 99-105.

YOSHINO, M.; KANAZAWA, A.; TSUTSUMI, K.; NAKAMURA, I.; TAKAHASHI, K.; SHIMAMOTO, Y. 2002. Structural variation around the gene encoding the α subunit of soybean β-conglycinin and correlation with the expression of the α subunit. **Breeding Science**, v. 52, p. 285-292.

YOSHINO, M.; NAGAMURA, A.; TSUTSUMI, K.; KANAZAWA, A. 2006. The regulatory function of the upstream sequence of the β-conglycinin α subunit gene in seed-specific transcription is associated with the presence of the RY sequence. **Genes Genetic Systems.**, v. 81, p. 135-141.

CAPÍTULO 2

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM NÓS COTILEDONARES DE SOJA VIA *Agrobacterium* MEDIADA POR SONICAÇÃO (SAAT) E ANÁLISE MOLECULAR DOS TRANSFORMANTES

RESUMO

Este capítulo teve como objetivos realizar ensaios de transformação genética via *Agrobacterium* mediada por sonicação e análises moleculares para a detecção e confirmação de transformantes. Sementes maduras de soja CAC-1 foram desinfestadas e germinadas *in vitro* em meio B5. Após 5 dias, foram isolados os nós cotiledonares, os quais foram expostos à suspensão bacteriana contendo o vetor pCAMBIA 1304 contendo a construção gênica compreendida pela região promotora e um fragmento da LPCAT (**VPL**), mediante sonicação (SAAT) e adição de acetoseringona 100 μM. Após 3 dias de co-cultivo, os nós cotiledonares foram transferidos para meio de indução (SIM) sem agente seletivo, durante 14 dias. Após esse período, foram adicionados 5mg/L de Higromicina B ao meio SIM, para seleção dos transformantes. Os explantes que sobreviveram a essa seleção foram transferidos para o meio de alongamento (SEM), ainda com Higromicina, e depois para o meio de enraizamento (RM) sem o agente seletivo. Aproximadamente três meses após inoculação com *A. tumefaciens*, múltiplos brotos foram produzidos nas regiões nodais resistentes a Higromicina B que estavam em contato direto com o meio. Análises a partir do DNA de folhas de plantas em fase de aclimatização permitiram a detecção de vários eventos de transformação. Num total de 700 explantes inoculados com *Agrobacterium* e sonicados, 17 das 23 plantas em fase de aclimatização em laboratório foram confirmadas por reações de PCR, com *primers* específicos para seqüências presentes apenas em plantas transformadas. A utilização de L-cisteína no meio de co-cultivo, transformação via *Agrobacterium* mediada por sonicação e seleção com Higromicina B demonstraram ser uma boa estratégia para aumentar a eficiência de transformação de nós cotiledonares de soja.

1. INTRODUÇÃO

Diferentes técnicas de transformação genética de plantas foram estabelecidas com o desenvolvimento da cultura de tecidos e da engenharia genética (BRASILEIRO *et al*., 1999). A introdução de características agronomicamente importantes em soja pode ser realizada via transformação de plantas como método alternativo ao melhoramento convencional (LIMA, 2005).

A transformação genética de soja tem sido um grande desafio, devido à variabilidade genética de cultivares e as diferenças nas respostas à cultura *in vitro* e procedimentos de transformação (DROSTE *et al*., 2002; MEURER *et al*., 1998). As eficiências de transformação que são relatadas são geralmente baixas e, como em outras culturas de interesse, os protocolos estabelecidos são normalmente genótipo-específicos (SOMERS, 2003).

Existem dois métodos que têm sido bem sucedidos em transformação de soja: o primeiro é o método de biobalística em tecidos embriogênicos (DROSTE *et al.,* 2002) e o segundo é a transformação de tecidos cotiledonares por meio da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (OLHOFT e SOMERS, 2001). Apesar de os dois métodos serem viáveis, os mesmos possuem algumas limitações.

Plantas transgênicas derivadas do bombardeamento de micropartículas tendem a possuir integração de múltiplas cópias do transgene em seu genoma ou a fragmentação do DNA exógeno antes que isso aconteça. Existem relatos em soja de eventos de inserção de até 100 cópias de um transgene (REDDY *et al*., 2003). A interação entre múltiplas cópias pode causar silenciamento gênico e dificultar o desenvolvimento de variedades comerciais geneticamente estáveis. Como vantagem, pode-se citar seu procedimento rápido e simples além da facilitação da transformação de tecidos totipotentes como pólen, embriões, meristemas e culturas de células além de ser um método viável para a transformação de organelas (SANFORD, 1990).

No caso de transformação por *Agrobacterium*, a infecção e regeneração dos tecidos são dependentes da cultivar utilizada. Além disso, essa técnica tem a vantagem de inserir um número de cópias menor que os métodos diretos de transformação (PAZ *et al*., 2004). A maior limitação na produção de soja geneticamente modificada utilizando transformação por *Agrobacterium* é a baixa

freqüência de transferência do T-DNA da bactéria para tecidos de soja, mas vários laboratórios sugerem que linhagens desta bactéria que são menos eficientes em transferir o T-DNA podem ser mais eficientes em introduzir inserções de cópias únicas no genoma (GELVIN, 2003). Entretanto, mesmo que normalmente a

tem sido adotada rotineiramente em vários laboratórios (OLHOFT *et al*., 2003; PAZ *et al.,* 2004; SHAN *et al*., 2005; OPABODE, 2006). A regeneração organogênica é baseada na proliferação de meristemas nos nós cotiledonares, entretanto, a recuperação de plantas transgênicas capazes de transmitir o(s) gene(s) alvo(s) para gerações F1 é baixa (CHRISTOU *et al*., 1990). A eficiência da organogênese para modificação genética pode ser melhorada aumentando-se o número de brotos por explante ou o número de células meristemáticas no explante (SHAN *et al.,* 2005).

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). O uso de técnicas que causam maiores ferimentos no tecido alvo tem se mostrado eficiente na transformação estável de soja por *Agrobacterium*.

Assim, a técnica de SAAT foi concebida na tentativa de maximizar a eficiência de transformação mediada por *Agrobacterium* em espécies vegetais de baixa susceptibilidade a infecção (TRICK e FINER, 1997). A técnica consiste em expor os explantes a ondas de ultrasom por breve período de tempo, o que leva a formação de microferimentos na superfície dos tecidos, facilitando o contato das células de *Agrobacterium* com camadas celulares potencialmente regenerativas mais internas dos tecidos, ocasionando aumento na probabilidade de infecção de células competentes dos explantes. O sistema SAAT foi aplicado na transformação de cotilédones imaturos de soja (SANTARÉM *et al*., 1998) e em suspensões embriogênicas cultivadas *in vitro* (TRICK e FINER, 1998), resultando no aumento de

Os genes utilizados como marcadores de seleção podem ser divididos em três categorias de acordo com o modo de ação: genes que conferem resistência a antibióticos, a herbicidas e genes marcadores para seleção positiva. Dentre os genes que conferem resistência a antibióticos estão o *npt* II (ou neo) e o *hpt* (ou *aph* IV).

O gene *hpt* codifica para a enzima higromicina fosfotransferase (Pat:2.7.1.119), também conhecida como aminoglicosídeo 4 -fosfotransferase. Este gene foi isolado de *Escherichia coli* e tem sua ação conferindo resistência ao antibiótico Higromicina B (GUIMARÃES e SANTANA, 2003). O antibiótico Higromicina, quando ativo, ocupa o sítio de ligação ribossomal do fator de alongamento 2 (EF-2) em células procarióticas. Como conseqüência, o alongamento da cadeia polipeptídica é inibida e a síntese de proteína interrompida causando os mesmos sintomas que os descritos para antibióticos aminoglicosídeos. A enzima codificada pelo gene *hpt* catalisa a fosforilação do grupo hidroxil no antibiótico Higromicina B, inativando-o (BRASILEIRO e ARAGÃO, 2001).

O gene *bar*, utilizado na manipulação de resistência a herbicida em plantas transgênicas, foi isolado de *Streptomyces higroscopicus* e codifica a enzima PAT (fosfinotricina N-acetiltransferase). 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 à enzima glutamina sintase (GS).

Os marcadores de seleção positiva agem de forma diferente, dando vantagens seletivas às células transformadas, não matando as células não transformadas. Neste caso, o gene marcador confere às células transformadas a capacidade de metabolizar alguns compostos que não são normalmente metabolizados pela planta. A adição de um novo composto ao meio de cultura, como única fonte de nutriente durante o processo de regeneração, permite o crescimento e diferenciação normal das células transformadas, enquanto as não transformadas não serão capazes de crescer e regenerar novas plantas (BRASILEIRO e ARAGÃO, 2001). Dentre os genes de seleção que fazem parte desse tipo de seleção está o gene *man*A. O gene *man* codifica para uma enzima chamada fosfomanose isomerase (Patente: EC5. 3.1.8.) isolado de *Escherichia coli*. Na presença do substrato manose em células transformadas, essa enzima converte manose-6-

fosfato em frutose-6-fosfato que pode ser imediatamente incorporado à via metabólica da planta. Desta forma, a manose pode ser usada como uma fonte de carboidrato para as células transformadas o que normalmente não ocorre em plantas (JOERSBO *et al*., 1998).

O uso de um bom marcador de seleção é fundamental para uma eficiente recuperação *in vitro* de plantas transgênicas. O sucesso de um determinado marcador de seleção depende das características do agente de seleção, do gene marcador de seleção (gene de resistência) e do material vegetal utilizado (BRASILEIRO,1998).

Os objetivos deste capítulo foram realizar ensaios de transformação genética de nós cotiledonares de soja via *Agrobacterium* mediada por sonicação e ensaios moleculares para a detecção e confirmação de transformantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições para germinação

Foram utilizadas sementes maduras de soja da variedade CAC-1 cultivada em casa de vegetação com fotoperíodo de 14 horas de luz e temperatura média de 27 °C.

A desinfestação das sementes ocorreu mediante sua imersão em etanol 70%, por 2 min, seguida de imersão em hipoclorito de sódio comercial (Super Globo) a 2,5% (v/v), acrescido de Tween 20 0,01%, por 30 min. Após esse período, as sementes passaram por quatro lavagens sucessivas em água ultrapura autoclavada e, em seguida, foram secas em papel de filtro estéril e transferidas para meio de germinação (GM; Tabela 1). As sementes foram incubadas em placas de Petri (90 mm) à temperatura de 27 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 16 h de luz e irradiância de 24-36 µmol m^{-2} s^{-1}, permanecendo nessas condições de 4 a 6 dias ou até que os cotilédones apresentassem coloração verde, mas antes da expansão das primeiras folhas verdadeiras.

2.2 Condições de cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

A cepa LB4404 de *A. tumefaciens*, contendo o vetor binário pCAMBIA 1304 onde clonou-se a construção gênica para co-supressão do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase (clone **VPL**), foi utilizada nos ensaios de transformação genética.

As células de *A. tumefaciens* foram crescidas em 50 mL de meio Rhizo contendo estreptomicina (100 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL), por 14-16 h a 28 °C e 180 rpm. As bactérias foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspendido em meio líquido de co-cultivo (CCM; Tabela 1) com densidade óptica (OD_{600nm}) ajustada para 0,6. Antes da inoculação, foi acrescentado acetoseringona (Sigma Aldrich, USA) 100 µM à suspensão bacteriana.

Tabela 1 – Componentes dos meios de cultura utilizados no processo de transformação e regeneração de plantas via nós cotiledonares de soja (Adaptado de OLHOFT e FLAGEL, 2003).

	GM	*CCM*	*SIM*	*SEM*	**RM**
Sais MS[a]	–	–	–	1X	–
Sais B5[b]	1X	1/10X	1X	–	1/2X
FeEDTA	1X	1/10X	1X	1X	1X
Vitaminas B5	1X	1X	1X	1X	–
MES (mM)	3	20	3	3	3
Sacarose (%; p/v)	3	3	3	3	3
Gelrite (%; p/v)	0,8	0,5	0,8	0,8	0,8
pH	5,8	5,4	5,6	5,6	5,6
BAP (mg/L)	–	1,67	1,67	–	–
GA_3 (mg/L)	–	0,25	–	0,5	–
Acetoseringona (mM)	–	0,2	–	–	–
L-Cisteína (mM)	–	3,3	–	–	–
Higromicina B (mg/L)	–	–	5	10	–
Meropenen (mg/L)	–	–	6,25	6,25	–
Asparagina (mg/L)	–	–	–	50	–
AIA (mg/L)	–	–	–	0,1	–
Zeatina (mg/L)	–	–	–	1	–
AIB (mg/L)	–	–	–	–	1

Macro e Micronutrientes para o [a]meio MS (Murashige e Skoog, 1962) e [b]meio B5 (Gamborg *et al*., 1968); AIA: Ácido indolil-acético; BAP: 6-benzilaminopurina; CCM: meio de co-cultivo; GA_3: Ácido giberélico; GM: meio de germinação; MES: ácido 2-N-morfolinoetanosulfônico); SIM: meio de indução de brotos, SEM: meio de alongamento de brotos; RM: meio de enraizamento.

2.3 Preparo dos explantes e transformação genética

O método descrito neste trabalho foi modificado de OLHOFT e FLAGEL (2003) (Tabela 1). Para cada semente germinada, a raíz e a maior parte do hipocótilo foram removidos pelo corte, com auxílio de pinças e bisturi, abaixo do nó cotiledonar (~3-5 mm). Finalmente, dois explantes (NC) eram obtidos pela sepação dos cotilédones cortados verticalmente ao longo do hipocótilo restante. Esses mesmos explantes foram utilizados para determinar a concentração adequada do antibiótico Higromicina B, para a seleção dos transformantes em um ensaio de curva

de sobrevivência com diferentes concentrações do antibiótico. Foram utilizadas as concentrações de 0, 3, 5, 7, 10 e 13 mg/L em meio (SIM). Cada tratamento continha 3 repetições, cada uma constituída por 10 explantes.

Nos ensaios de transformação genética foram utilizados aproximadamente 100 explantes divididos em tubos Falcon (50 mL) estéreis (em média 16 explantes por tubo) juntamente com 6 mL de suspensão bacteriana. Os tubos foram, um a um, submetidos a 6 s de sonicação (*Bransonic Ultrasonic Cleaner*, modelo B1210E-Mt, potência de 80W). Após esse período, permaneceram em repouso na suspensão bacteriana por 5 min e, em seguida, foram transferidos para papel de filtro estéril para retirada do excesso de bactérias. Cerca de nove explantes foram aleatoriamente colocados em placas de Petri estéreis de poliestireno de 90 X 15mm (J. Prolab) contendo meio CCM semisólido acrescido de acetoseringona 100 μM e L-cisteína (Sigma) 3,3 mM. Os explantes foram dispostos nas placas de forma que a face abaxial ficasse em contato direto com o meio e incubados a 27 ± 1 °C por 4 dias, no escuro.

2.4 Seleção e regeneração de plantas

Para remover o excesso de *Agrobacterium*, após o período de co-cultivo, os explantes foram lavados em solução líquida do meio de indução de brotos (SIM; Tabela 1) contendo 6,25 mg/L do antibiótico Meropenen (ABL, Brasil). Os explantes foram transferidos para o meio SIM semisólido sem o agente seletivo, por 14 dias à temperatura de 27 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 16 h de luz e irradiância de 24-36 μmol m^{-2} s^{-1}, estimulando a indução dos brotos. Após esse período, o tecido restante do hipocótilo foi retirado e o explante contendo os novos brotos desenvolvidos foram sub-cultivados em meio SIM novo contendo 5 mg/L de Higromicina B (Sigma), para início da seleção dos transformantes.

Num total de 28 dias em meio SIM, os cotilédones foram excisados e os brotos transferidos para o meio de alongamento (SEM; Tabela 1) contendo 10 mg/L de Higromicina B para seleção. Nestas condições os brotos permaneceram durante 28 dias, sendo realizados dois recultivos neste período (14 em 14 dias). Quando os brotos atingiram aproximadamente 3 cm, foram individualizados e transferidos para tubos de ensaio contendo meio para enraizamento (RM; Tabela 1) na presença de 1 mg/L de ácido indol-3-butírico (AIB; Sigma).

Quando as plântulas apresentavam sistema radicular bem desenvolvido, foram retiradas do meio de cultura e mantidas em água por 2 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.

Os controles da transformação foram constituídos por: 1 – Nós cotildonares (CNs) que sofreram o processo de sonicação e não receberam suspensão bacteriana, mas passaram por todas as etapas pós-transformação; 2- CNs que não passaram pela sonicação nem entraram em contato com *Agrobacterium*; 3- CNs que foram inoculados com a suspensão bacteriana, mas não foram sonicados.

2.5 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 plântuas regeneradas em fase de aclimatização ou de plântulas em fase de enraizamento em tubo de ensaio. 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 65 °C e β-mercaptoetanol 0,2%. As amostras foram então incubadas a 65 °C por 5 min. A seguir, foram adicionados 700 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), os tubos foram agitados por 1 min no vórtex e centrifugados a 13.000 g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e precipitado com o mesmo volume de isopropanol gelado a – 20 ºC por cerca de 12 h. Após centrifugação a 13.000 g por 10 min, o precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 200 μL de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0) acrescido de RNAse na concentração final de 40 μg/mL. As amostras foram incubadas a 37 ºC por 30 min, sendo posteriormente precipitadas com acetato de amônio 7,5 M na proporção 1:10 (acetato:DNA ressuspendido) e 2/3 do volume de isopropanol gelado a -20 ºC por 3 h. Após centrifugação a 13.000 *g* por 10 min, o precipitado foi lavado uma vez com etanol 70% e uma vez com etanol 95% e ressuspendido em 50-60 μL de TE.

As extrações de DNA das plântulas que ainda estavam em meio RM, foram realizadas com este mesmo protocolo, porém, foram maceradas plântulas inteiras.

Todas as amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8% para verificação da qualidade do DNA e fotodocumentadas. Nas reações de PCR, foram utilizados os *primers* para Higromicina B (Hygro) e para o terminador da nopalina sintase (Nos). As seqüências dos *primers* estão listadas a seguir:

Hygro: 5' – GGC ATT TGT GTA CGC CCG ACA GT – 3'
Hygro: 5' – GGC GAT GTA GGA GGG CGT GGA TA – 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 50 ng de DNA, Tris-HCl 10 mM 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 min, 35 ciclos de 95 ºC por 30 s, 60 ºC por 30 s e 72 ºC por 40 s e 1 ciclo de extensão final de 72 °C por 7 min.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% 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

Em média, 100 sementes da cultivar CAC-1 cultivadas em casa de vegetação foram primeiramente desinfestadas em solução de hipoclorito 2,5% comercial e transferidas para o meio de germinação (GM). Com um período de 20 min em hipoclorito, verificou-se contaminação com fungos em aproximadamente 40% das sementes. Aumentando esse tempo para 40 min, houve redução significativa na contaminação chegando a 100% de sementes sobreviventes (Figura 1A).

Para desinfestação da superfície de sementes maduras de soja dois métodos têm sido bastante utilizados: o denominado desinfestação a seco ou *dry* (dessecador com gás clorídrico) e o método úmido ou *wet* (etanol 70% e hipoclorito 2,5% comercial). Embora o método seco de desinfestação seja eficiente para a maioria das sementes maduras produzidas em casa de vegetação, é necessário um tempo maior de descontaminação. Prolongados períodos de exposição das sementes de soja ao gás clorídrico pode causar efeitos adversos na qualidade da semente comprometendo a germinação e regeneração (PAZ et al., 2004).

Esses mesmos autores conduzindo experimentos para medir os efeitos do tempo de duração da desinfestação em sementes de soja, demonstraram que a utilização de gás clorídrico reduz significativamente o vigor das sementes chegando a menos de 35% após 48 horas de tratamento.

Após a desinfestação de sementes da cultivar CAC-1, os explantes constituídos de nós cotiledonares (NC) (Figura 1B), obtidos a partir da germinação dessas sementes, foram transformados utilizando a técnica de SAAT (transformação genética via *Agrobacterium* mediada por sonicação), como forma de aumentar a eficiência de transformação.

Para a transformação desses NCs foi adotada a densidade ótica (OD_{600}) de 0,6 e o tempo de sonicação de 6 s. 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).

MEURER *et al*. (1998) demonstraram que poucos explantes (NC) sobreviviam por, no máximo, 10 dias com o aumento do tempo de sonicação para 600 s e padronizaram o tempo de sonicação de NC para 6 s baseados na

otimização da expressão transiente de *GUS* e na proliferação tecidual, ou seja, esse tempo foi determinado como sendo o nível que leva a percepção de um aumento dos loci de *GUS* sem a diminuição da viabilidade do explante.

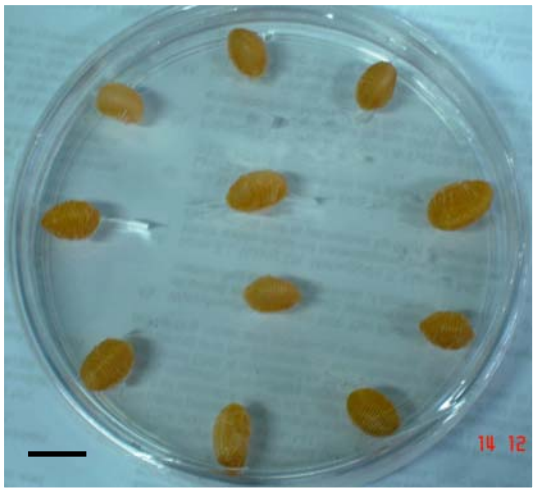
Muitos trabalhos têm utilizado OD_{600} variando de 0,8–1,0 para nós cotiledonares de soja transformados sem sonicação (OLHOFT *et al*., 2003; PAZ *et al*., 2006; PAZ *et al*., 2004). Já em nós cotiledonares que sofreram sonicação, a OD_{600} pode variar de 0,5 – 0,6, pois uma concentração maior de bactérias em contato com o explante sonicado aumentaria a possibilidade de ocorrer uma superinfecção pela *Agrobacterium*.

Depois da transformação via SAAT, os nós cotiledonares foram transferidos para o meio de co-cultivo (CCM) acrescido de L-Cisteína 3,3mM, onde permaneceram por 4 dias protegidos da luz. A incubação dos explantes à luz pode resultar em severa alteração na cor do explante, estes ficam mais marrons do que os tecidos co-cultivados em meio sem L-Cisteína (OLHOFT *et al*., 2001). Este aminoácido é inibidor (propriedades antioxidantes) do escurecimento dos tecidos, assim, quando o explante é exposto a luz em meio com L-Cisteína, seu efeito como inibidor diminui levando ao aparecimento de regiões marrons no explante (PAZ et al., 2004).

OLHOFT e SOMERS (2001) mostraram que a adição de 3,3 a 8,3 mM de L-Cisteína ou DTT (ditiotreitol) no meio semisólido de co-cultivo aumentou a eficiência de transformação (0,9% sem L-Cisteína para 2,1% com L-Cisteína) em nós-cotiledonares de soja (cultivar Bert) baseados na expressão transiente do gene *GUS*.

PAZ *et al.* (2004) confirmaram esses resultados obtendo uma variação de 0,6 a 2,9% na eficiência de transformação de eventos resistentes à seleção com glufosinato, quando adicionado L-Cisteína ao meio de co-cultivo comparado com 0,2 a 0,9% em meio CCM sem L-Cisteína. Neste mesmo trabalho, a adição de DTT e L-Cisteína no meio de co-cultivo aumentou drasticamente a atividade transiente de *GUS* em todas as cultivares testadas. Cerca de 95% de atividade foi obtida quando L-Cisteína foi adicionada ao meio, contrastando com 10% de atividade de *GUS* em meio sem L-Cisteína.

Outros trabalhos têm demonstrado que a combinação de componentes tiol como a L-Cisteína, o DTT ou tiosulfato de sódio no meio de co-cultivo,



D

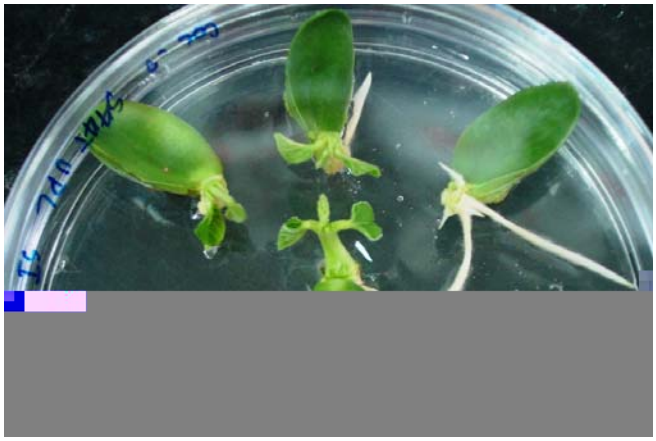


Figura 1 – Metodologia utilizada na transformação de nós cotiledonares de soja. Germinação de sementes maduras de soja variedade CAC-1 em meio GM (**A**); Isolamento do explante para transformação (**B**); Explantes transferidos para o meio SIM sem Higromicina B para indução da formação de brotos na região do nó cotiledonar (**C**); Explantes na presença de 5 mg/L de Higromicina B (**D**); No detalhe dois explantes um na ausência e outro na presença de Higromicina B, respectivamente, (**E**) e (**F**). *Barra = 1 cm*.

aumenta significativamente a eficiência de transformação em nós cotiledonares de soja. OLHOFT *et al*. (2003) verificaram que no meio CCM acrescido de 3,3 mM de L-Cisteína e 1 mM de DTT a eficiência de transformação chegou a 12,7%. Em outro tratamento de co-cultivo (1 mM de tiosulfato de sódio + 1 mM de DTT + 8,8 mM de L-Cisteína) demonstraram que 16,4% (9,4 – 26,2%) dos explantes inoculados produziram plantas *GUS* $^{+}$ em comparação a 0,8% dos explantes sem o tratamento com os agentes redutores.

Após o período de co-cultivo e lavagem dos explantes para retirar o excesso de *Agrobacterium,* estes foram submetidos a indução de brotos, primeiramente, sem Higromicina B. Depois dos primeiros 7 dias em meio SIM não seletivo, os explantes formaram calos e brotos na região do nó cotiledonar (Figura 1C). Experimentos relatam que ao passar os explantes para meio SIM contendo o agente seletivo, logo após o co-cultivo, estes exibem severa necrose tecidual e a não formação dos brotos (OLHOFT *et al*., 2003). Assim, sugerem que primeiramente deve-se induzir o desenvolvimento dos brotos em meio SIM por 14 dias para depois transferí-los para meio com Higromicina B. A Figura 1D mostra a regeneração de brotos transformantes com aproximadamente 14 dias em meio SIM com o agente seletivo.

Dos explantes que apresentaram resposta morfogênica em meio SIM com 5 mg/L Higromicina B, retirou-se a região do cotilédone restante, transferindo-se somente os brotos para o meio de alongamento (SEM) suplementado com 10 mg/L Higromicina B (Figura 2A). Após 8 dias em meio SEM com agente seletivo, significantes porções de tecidos não transformados sensíveis a Higromicina B foram completamente necrosados (Figura 2B), resultados também observados para a curva de sobrevivência.

A concentração de Higromicina B no meio SEM foi adequada para rápida morte celular sem afetar os tecidos transformados. Os primeiros brotos resistentes a Higromicina B alongaram aproximadamente 8 semanas após o co-cultivo (Figura 2C) e culturas com múltiplos brotos foram obtidas dentro de 12 a 16 semanas depois da inoculação com *Agrobacterium* (Figura 2D).

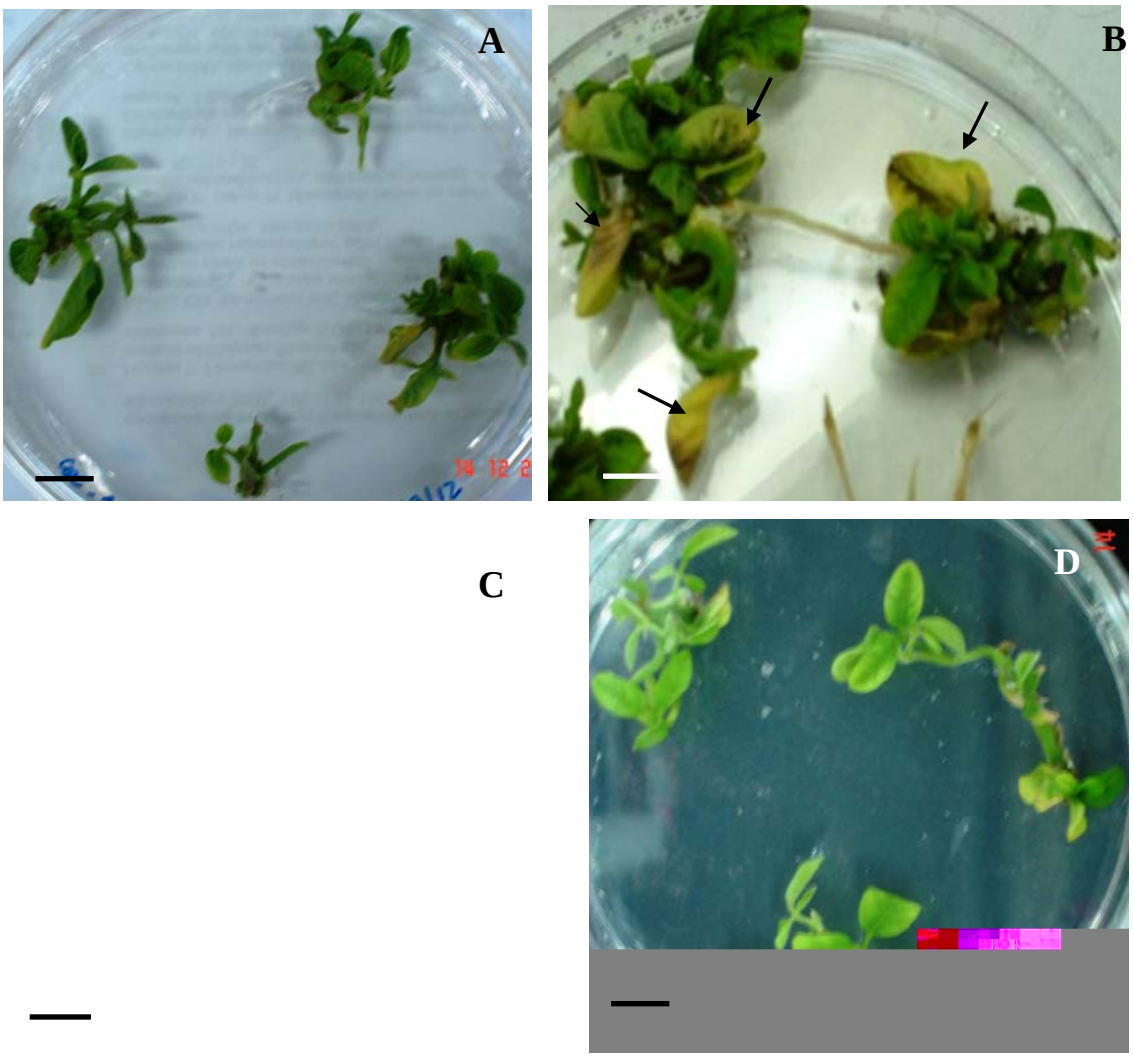


Figura 2 – Regeneração de plantas transformadas a partir de nós cotiledonares de soja. Retirada dos cotilédones e transferência dos brotos para meio de alongamento (SEM) contendo 10 mg/L Higromicina B (**A**); Porções do tecido, não transformado (setas), demonstrando sensibilidade à concentração de Higromicina B (**B**); Brotos com aproximadamente 2-3 semanas em meio SEM contendo agente seletivo (**C**); Brotos alongados resistentes à seleção com 10 mg/L de Higromicina B, com 12-16 semanas após inoculação e sonicação com *Agrobacterium tumefaciens* (**D**). *Barra = 1 cm*.

OLHOFT e SOMERS (2001) obtiveram eficiência de transformação de 2,1% para explantes (NC) tratados com L-Cisteína usando PPT como agente seletivo. OLHOFT *et al.* (2003) usando o mesmo tratamento com L-Cisteína, porém usando a Higromicina B como agente seletivo, relataram aumento na produção de plantas transgênicas de 2,1 para 7,7%. Esses mesmos autores demonstraram que o co-cultivo desses explantes na presença de uma mistura dos agentes redutores (L-

cisteína, DTT e tiosulfato de sódio) combinados com seleção por Higromicina B, resultou num aumento da eficiência de transformação para 16,4%, em média.

PAZ *et al.* (2004), utilizando glufosinato 6 mg/L para seleção de nós cótiledonares transformantes durante os estádios de indução e alongação dos brotos, observaram uma eficiência final de transformação em torno de 2,0 a 6,3%, menor do que os trabalhos com Higromicina B.

A seleção com Higromicina B (HPT) tem sido descrita para seleção de soja transgênica regenerada a partir de culturas embriogênicas em suspensão e cotilédones imaturos bombardeados por microprojéteis (FINER e MCMULLEN, 1991; TRICK e FINER, 1998). Porém, o primeiro trabalho reportando o uso de seleção com Higromicina B para soja transgênica obtida a partir de nós cotiledonares transformados via *Agrobacterium* foi o de OLHOFT *et al*. (2003).

Diferenças no modo de ação e nas atividades de detoxificação dos agentes seletivos Higromicina B e PPT (fosfinotricina acetiltransferase, codificada pelo gene *bar*) contribui muito para uma melhor eficiência na seleção usando Higromicina B, principalmente quando se considera o tamanho da área formada pelos novos brotos/calos na região do nó cotiledonar (OLHOFT *et al*., 2003). Como a Higromicina B é um potente antibiótico que inibe a síntese protéica (GONZALEA *et al*., 1978), não é provável que células transformadas contaminem outras células não transformadas com metabólitos que anulam

20%, o número de plantas transgênicas relatadas, para o número de embriões bombardeados) comparado com o protocolo padrão de transformação de soja.

Resultados prévios baseados na seleção com PPT mostraram morte lenta de brotos e calos (obtidos a partir de nós cotiledonares de soja) sensíveis ao PPT, uma frequência alta de escapes, um crescimento lento ou clorose dos brotos. Em adição, o alongamento da maioria dos brotos transformados tipicamente ocorre entre 6 a 12 meses depois do co-cultivo sob seleção com PPT, enquanto que na seleção com Higromicina B, foram necessários somente de 2 a 6 meses para elongação dos brotos. Acredita-se que a rápida morte de células sensíveis a Higromicina B aumenta o crescimento e desenvolvimento dos brotos sobreviventes resistentes a Higromicina B (OLHOFT *et al*., 2003).

A rápida produção de múltiplos brotos transgênicos na presença de Higromicina B não somente aumenta a probabilidade de produzir plantas férteis a partir de um único evento de transformação, como também reduz a probabilidade de indução de variação somaclonal (OLHOFT e PHILLIPS, 1999).

No presente trabalho a utilização de Higromicina B como sistema de seleção foi fator decisivo, pois a construção gênica para co-supressão da LPCAT está clonada no vetor binário pCAMBIA 1304, que possui o gene *hpt* para a seleção em plantas.

No entanto, para qualquer tipo de ensaio de transformação é fundamental a existência de um sistema adaptado e bastante eficiente de regeneração e aclimatização de plantas transformadas.

Aproximadamente 2-3 meses após o co-cultivo, os brotos alongados com cerca de 3-4 cm de comprimento (Figura 3A), foram isolados e transferidos individualmente para tubos com meio de enraizamento (RM), sem agente seletivo, acrescido de 1 mg/L de AIB, para indução de raizes.

Considerando-se o número de explantes inoculados com *Agrobacterium*, para este trabalho, poucos brotos individualizados responderam positivamente à indução de raízes e somente os brotos com raízes bem desenvolvidas foram levados para a etapa de aclimatização (Figura 3B).

A aclimatização de plantas regeneradas é considerada uma fase crítica em qualquer processo de obtenção de plantas transgênicas. Alguns problemas ocorreram nesta etapa levando a grandes perdas de eventos transformados. Lima (2005) realizou vários testes quanto ao tipo de substrato mais adequado e condições

de aclimatização, em laboratório e casa de vegetação, para plantas regeneradas a partir de embriões somáticos de soja. Seus resultados mostraram que após a retirada das plântulas dos tudos de ensaio, é necessário que suas raizes permaneceam por 3 dias em recipiente com água potável coberto com saco plástico, antes de serem transferidas para copos com substrato agrícola.

Os mesmos procedimentos foram adotados neste trabalho para aclimatização de plantas regeneradas a partir de nós cotiledonares. Porém, depois de uma semana em copos de plástico de 100 mL com substrato agrícola autoclavado (Figura 3C), cobertos com plástico e sob condições de sala de cultivo (temperatura de 27 ± 1 ºC, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 24-36 µmol m^{-2} s^{-1}), algumas plantas foram contaminadas com fungos e descartadas. As restantes foram transferidas para condições de laboratório, em um sistema de prateleiras sob iluminação e com fotoperíodo de 12 horas de luz, inicialmente com irradiância de 32-46 µmol m^{-2} s^{-1} e posteriormente, mantidas em irradiância de 54-86 µmol m^{-2} s^{-}1.

Nesta etapa, foram retiradas folhas dessas plantas para detecção por PCR de possíveis eventos transformantes. Apesar de todos os cuidados e esforços para que essas plantas chegassem à casa de vegetação, isso não foi possível. As plantas não sobreviveram mais que três dias em condições de laboratório sendo observada uma severa clorose nas folhas das plantas transferidas para os copos (Figura 3D). A forma de obtenção dessas plantas, por meio da regeneração *in vitro*, as torna mais frágeis e sensíveis a qualquer alteração ambiental, por isso há a necessidade de se otimizar a aclimatização de plantas regeneradas a partir de nós cotiledonares de soja.

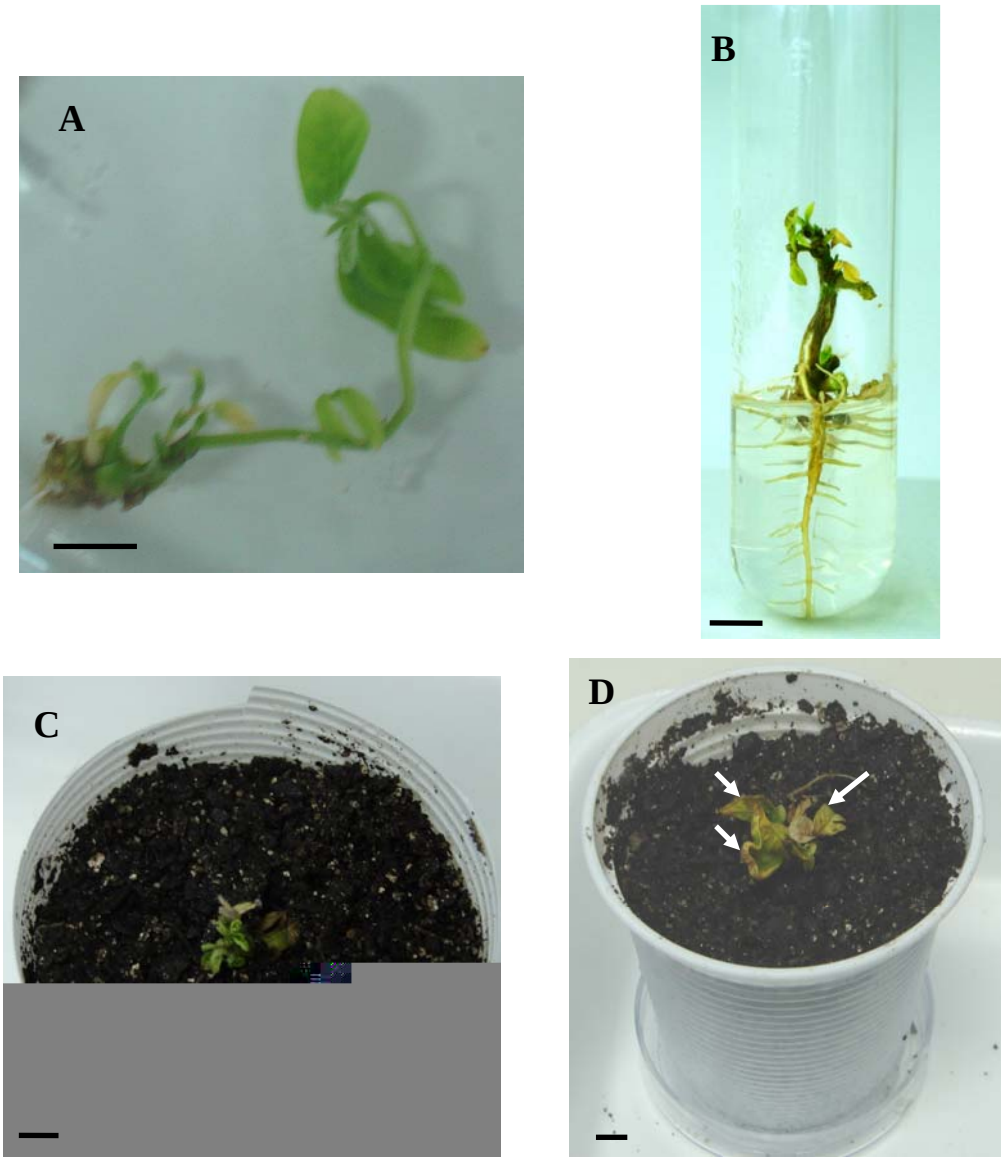


Figura 3 – Etapas de regeneração e aclimatização de plantas a partir de nós cotiledonares transformados de soja. Brotos com 3-4 cm de comprimento isolados para transferência para meio de enraizamento (RM), sem agente seletivo (**A**); Brotos em meio RM, com raíz bem desenvolvida (**B)**; Fase de aclimatização das plântulas em condições de sala de cultivo (**C**); Morte do explante após aproximadamente 4 dias em condições de laboratório, as setas mostram uma severa clorose em todo o broto (**D**). *Barra = 1 cm*

De aproximadamente 700 explantes inoculados com *Agrobacterium* e sonicados, somente 23 plantas (~3,0%) chegaram à fase de aclimatização. Dos tratamentos controle apenas 6 plantas do controle sem sonicação e sem inoculação com *Agrobacterium* atingiram a mesma fase. Já os outros controles (sem sonicação + *Agrobacterium* e com sonicação sem a suspensão bacteriana) demonstraram

maior sensibilidade à contaminação com fungos e outras bactérias ou até mesmo contaminação generalizada pela própria inoculação com *Agrobacterium* foi observada.

Apesar das plantas não terem chegado à casa de vegetação, folhas das 29 plantas (23 trasnformadas e 6 controles) que chegaram a etapa de aclimatização (em sala de cultivo) foram retiradas e seu DNA extraído. A análise molecular por PCR comprovou que das 23 plantas regeneradas dos ensaios de transformação via SAAT, 17 eram transgênicas (Figura 4).

Organismos geneticamente modificados (OGMs) podem ser identificados por detecção do material genético inserido em nível de DNA, RNAm, proteína, metabólito ou o respectivo fenótipo (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998; LUBECK, 2002), através de várias técnicas como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), ensaio imunológico ou bioensaio com herbicidas (LUBECK, 2002).

A técnica de PCR, no entanto, oferece uma análise mais precisa em estudos envolvendo OGMs. Ensaios baseados em PCR requerem etapas que influenciam a confiabilidade e a sensibilidade do método, como o tipo de amostra e a preparação da mesma (BROWN *et al*., 1993). Cada etapa do PCR deve ser otimizada a fim de garantir ao método a alta precisão que possui. A extração de DNA da amostra deve possuir um rendimento máximo (~100%), evitando a degradação do DNA e com a remoção dos contaminantes químicos que possam inibir a amplificação por PCR. Além disso, métodos de análise baseados em PCR devem incluir controles e padrões apropriados que facilitam a verificação de cada análise e asseguram que o método está otimizado, promovendo desse modo confiabilidade dos resultados obtidos (GAMA, 1998; LUBECK e HOORFAR, 2002).

Durante a fase de enraízamento dos brotos (meio RM), também foram coletadas amostras para uma análise antecipada quanto a transgenia destes, já que muitos não enraízaram (Figura 3) ou tiveram contaminação com fungo e não seriam conduzidos até as etapas de aclimatização. Esses resultados foram utilizados como forma de verificar se a transformação via SAAT foi eficiente para este trabalho. Foram realizadas extrações de DNA de 76 brotos, entretanto, algumas amostras foram descartadas devido à qualidade do DNA.

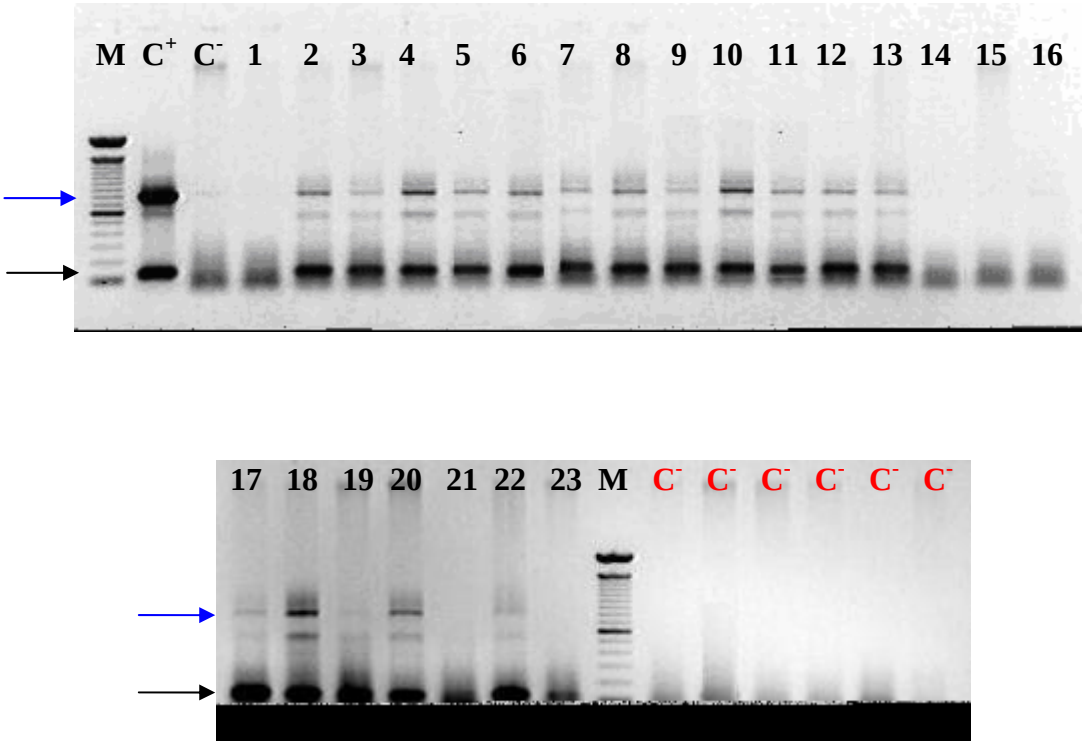


Figura 4 – Análise eletroforética de produtos de amplificação para detecção de transgênicos. Em uma mesma reação de PCR foram utilizados o *primer HPT* e o *primer* NOS. Como controle positivo (C^+) foi utilizado o DNA plasmidial do vetor 1304 e como controles negativos (**C^-**) e (**C^-**) foram utilizados, respectivamente, DNAs de soja (variedade CAC-1) não transformada e DNA de plantas, obtidas por regeneração, também não transformadas. As canaletas indicadas pelos números de 1 a 23, correspondem às plantas transformadas e regeneradas até a fase de aclimatização em laboratório. As setas azul e preta correspondem aos fragmentos amplificados de 800 pb (HPT) e 180 pb (NOS), respectivamente.

Foram realizadas reações de PCR com 63 amostras e dessas, 37 apresentaram resultado positivo (Figura 5). No entanto, essas amostras analisadas representam apenas uma pequena parcela de toda a população dos possíveis eventos transgênicos ocorridos, já que houve grande perda de explantes que resistiram a seleção, mas não atingiram a fase de aclimatização.

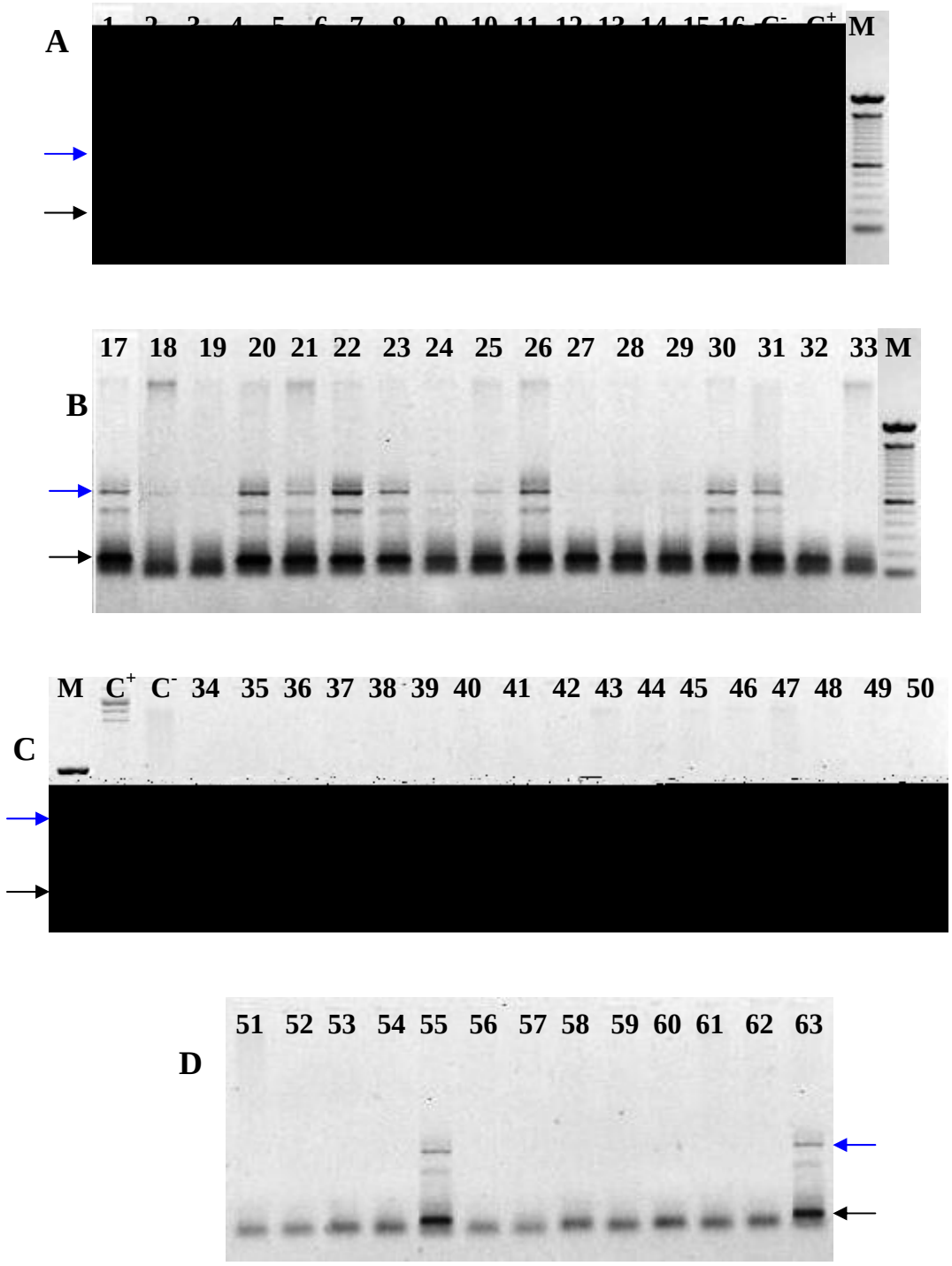


Figura 5 – Análise eletroforética de produtos de amplificação para detecção de transgênicos. Em uma mesma reação de PCR foram utilizados o *primer HPT* e o *primer* NOS. Como controle positivo (C^+) foi utilizado o DNA plasmidial do vetor 1304 e como controle negativo (**C^-**) DNAs de soja normal. As canaletas indicadas pelos números de 1 a 63 em A, B, C e D correspondem aos brotos transformados e regenerados até a fase de enraizamento. As setas azul e preta correspondem aos fragmentos amplificados de 800 pb (HPT) e 180 pb (NOS), respectivamente.

Assim, se considerarmos a razão entre o número total de eventos transgênicos positivos, obtidos a partir dos resultados moleculares, e o total de explantes inoculados com *Agrobacterium* e sonicados, a eficiência de transformação será de 8,5%. Mas se calcularmos a eficiência de transformação com base nas plantas regeneradas até a fase de aclimatização, esta cai para 3,2%.

Apesar do baixo número de explantes utilizado neste trabalho, dos problemas com contaminações ocorridos durante o período pós-transformação e com a aclimatização das plantas regeneradas, os valores obtidos para eficiência de transformação mostraram-se significativos, utilizando formas alternativas (como o uso de agentes redutores no meio de co-cultivo, a o uso da técnica SAAT para transformação e a seleção com antibiótico) a fim de minimizar o aparecimento de quimeras e aumentar a eficiência de transformação e regeneração de plantas a partir de nós cotiledonares de soja.

4. CONCLUSÕES GERAIS

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

- A análise por RT-PCR para o gene *LPCAT* que codifica a enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase 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 permanecendo constante o nível de transcritos em sementes maduras;

- Foi obtida uma construção gênica clonada no vetor binário pCAMBIA 1304, contendo um fragmento de cerca de 800 kb que compreende: a região promotora da subunidade α da β-Conglicinina (promotor semente-específico), com 445 pb, dirigindo a expressão de um fragmento de 358 pb do gene da LPCAT alvo para co-supressão;

- Adaptação da metodologia para transformação e regeneração de plantas a partir de nós cotiledonares de soja;

- Após a obtenção dos nós cotiledonares de sementes maduras de soja, germinadas *in vitro*, e transformação genética dos mesmos, via SAAT, foi possível chegar até a fase de aclimatação em laboratório com 23 plantas, sendo 17 transgênicas;

- Ensaios moleculares, tanto para seleção de eventos transgênicos a partir de folhas de plantas em fase de aclimatação, quanto para brotos em fase de enraizamento, mostraram que a eficiência de transformação foi alta utilizando o sistema seletivo com o antibiótico higromicina B confirmando dados da literatura;

- Como o método de aclimatação das plantas regeneradas a partir de nós-cotiledonares de soja adotada neste trabalho não foi eficaz, não foi possível

determinar o efeito (fenótipo) do silenciamento da enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase na fração óleo da semente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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.

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

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

BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Eds.), 1998. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-Cenargen, p.143-154. Brasília, DF.

BROWN, P. T. H; LANGE, F. D.; KRANZ; E.; LORZ, H. 1993. Analysis of single protoplasts and regenerated plantas by PCR and RAPD technology. **Molecular and General Genetics**, v.237, p.311-317.

CHRISTOU, P.; MCCABE, D.E.; MATINE, B. J., SWAIN, W. F. 1990. Soybean genetic transformation-commercial production of transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, v. 8, p. 145–151.

D'HALLUIN, K.; DE BLOCK, M.; DENECKE, J.; JANSSENS, J.; LEEMANS, J.; REYNAERTS, A.; BOTTERMAN, J. 1992. The *bar* gene selectable and screenable marker in plant engineering. **Methods in Enzymology**, v. 216, p. 415-426.

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

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

DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-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. 1994. Plant regeneration via embryogenic suspension culture. In: Dixion, R.A. and Gonzales, R.A. (eds.). **Plant Cell Culture: a practical approach**. Oxford University Press, Oxford, p. 67-102.

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.

GAMA, M. I. C. S. 1998. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C., (Eds.) **Manual de Transformação Genética de Plantas,** Brasília, Embrapa SPI/Embrapa-Cenargem, p.180-189.

GELVIN, S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67 p. 16-37.

GONZALEZ, A.; JIMENEZ, A.; VAZQUEZ, D.; DAVIES, J. E.; SCHINDLER, D. 1978. Studies on the mode of action of hygromicin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. **Biochimmica and Biophysica Acta**, v. 521, p. 459-469.

GUIMARÃES, P. M.; SANTANA, E. F. 2003. **Relatório Anual De Biossegurança Da Embrapa Recursos Genéticos E Biotecnologia.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, doc.92, Brasília.

JOERSBO, M.; DONALDSON, I.; KREIBERG,J.; PETERSEN, S. G.; BRUNSTEDT, J.; OKKELS, F. T. 1998. Analysis of mannose selection used to transformation of sugar beet. **Molecular Breeding**, 4:111-117.

LIMA, A. B. 2005. **Construção de cassete para a co-supressão do gene da oleoil dessaturase e transformação genética de embriões somáticos de soja**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, MG, 117p.

LUBECK, P. S. e HOORFAR, J. 2002. PCR technology and applications to zoonotic food-borne bacterial pathogens. **Methods in Molecular Biology**, v. 216, p. 65–83.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497.

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

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

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

OLHOFT, P. M; PHILLIPS, R. L. 1999. Genetic and epigenetic instability in tissue culture and regenerated progenies. In: LERNER, H. R. (ed.). **Plant responses to environmental stresses: from phytohormones to genome reorganization**, Dekker, New York, p. 111-148.

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

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

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

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

SANFORD, J. C. 1990. Biolistic plant transformation. **Physiologia Plantarum**, v.79, p.206-209.

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

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.

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

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

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.

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.

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.

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.

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.

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

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 and Organ Culture**, v. 56, p. 37-46.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo