

BEATRIZ DE ALMEIDA BARROS

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM OS  
INIBIDORES DE PROTEASE BOWMAN-BIRK (BBI) E  
TRANSFORMAÇÃO DE NÓS COTILEDONARES PARA O  
SILENCIAMENTO GÊNICO DE BBI EM SEMENTES DE SOJA**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010**

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

T

B277c  
2010

Barros, Beatriz de Almeida, 1981-

Caracterização dos genes que codificam os inibidores de protease Bowman-Birk (BBI) e transformação de nós cotiledonares para o silenciamento gênico de BBI em sementes de soja / Beatriz de Almeida Barros. – Viçosa, MG, 2010.

xi, 73f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Soja - Genética. 2. Genética molecular. 3. Genes.  
4. Regulação de expressão gênica. 5. Serina proteinases -  
Inibidores. 6. Reação em cadeia de polimerase. 7. Células -  
Transformação. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

CDD 22. ed. 633.3423

BEATRIZ DE ALMEIDA BARROS

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM OS  
INIBIDORES DE PROTEASE BOWMAN-BIRK (BBI) E  
TRANSFORMAÇÃO DE NÓS COTILEDONARES PARA O  
SILENCIAMENTO GÊNICO DE BBI EM SEMENTES DE SOJA**

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

APROVADA: 09 de setembro de 2010.

---

Prof. Luciano Gomes Fietto

---

Prof. Maurilio Alves Moreira  
(Co-Orientador)

---

Prof. Marcelo de Oliveira Santos

---

Prof<sup>a</sup>. Valéria Monteze Guimarães

---

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Orientador)

**Aos meus pais, Tadeu e Maria Amélia.**

**A minha irmã, Vanessa.**

**Ao meu avô, Irineu.**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela orientação, pela confiança e pelo exemplo de profissionalismo. À você professor, minha amizade, meu respeito e eterna gratidão.

Aos meus co-orientadores, Professores Wagner Campos Otoni e Maurilio Alves Moreira, pela amizade e pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Marcelo de Oliveira Santos, Valéria Monteze Guimarães e Luciano Gomes Fietto, por terem aceitado participar da banca examinadora.

A todos os meus professores, pela contribuição ao meu crescimento profissional.

Aos funcionários da cozinha, do almoxarifado e da casa de apoio, pelo auxílio profissional, pela atenção e pela amizade. Um agradecimento especial ao Newton e ao José Carlos pela grande apoio nos trabalhos na casa de vegetação.

Aos meus amigos do SEQDNA, do BIOMOL e da PROTEÍNA, pelo auxílio técnico, pela amizade e pelo agradável convívio no ambiente de trabalho. Um agradecimento especial às companheiras de projeto, Cassiana e Maria Andréia,

Às companheiras de república, Maria Andréia, Roberta e Vanessa pela amizade, pelo carinho pelo companheirismo, pelo alegre convívio e pela companhia durante as madrugadas durante a escritura da tese.

Ao Leandro, pelo amor, cuidado, apoio e compreensão.

À família da minha querida “Tia-Avó” Vera, por todo carinho, amor e acolhimento durante o início dos meus estudos. Sem a generosidade de vocês esta conquista não teria sido possível.

À querida Tia Ceci, por todo apoio e incentivo.

Aos meus amados pais: Tadeu e Maria Amélia, pelo amor imensurável, apoio constante e compreensão durante a minha ausência. E, acima de tudo, esta conquista é para vocês.

Ao meu querido “Vô Irineu”, pelo exemplo de vida.

A Deus, pelo dom e pela alegria de viver para alcançar mais este objetivo.

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

## **BIOGRAFIA**

BEATRIZ DE ALMEIDA BARROS, filha de Tadeu Quirino de Almeida e Maria Amélia Barros, nasceu no dia 23 de outubro de 1981, em Aiuruoca, Minas Gerais.

Em 2001 iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa, bacharelando-se em 28 de janeiro de 2005. Durante a graduação desenvolveu atividades de Iniciação Científica na área de Genética e Biologia Molecular de Plantas (2002/2004).

Em março de 2005, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Genética e Melhoramento da UFV, defendendo tese em 29 de setembro de 2006.

Ingressou, em outubro de 2006, no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Genética e Melhoramento da UFV, submetendo-se à defesa de tese em 09 de setembro de 2010.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	3
3. OBJETIVOS .....	4
3.1. Objetivo Geral .....	4
3.2. Objetivos Específicos .....	4
CAPÍTULO 1 .....	5
CARACTERIZAÇÃO <i>IN SILICO</i> E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DA FAMÍLIA MULTIGÊNICA QUE CODIFICA INIBIDORES DE PROTEASE DO TIPO BOWMAN-BIRK EM SOJA .....	5
RESUMO .....	5
1. INTRODUÇÃO .....	6
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	8
2.1. Identificação e Caracterização <i>in silico</i> .....	8
2.2. Isolamento dos genes que codificam BBI em soja .....	9
2.3. Material Vegetal e RT-PCR .....	9
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	11
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	22
CAPÍTULO 2 .....	27
THE PROMOTER OF THE BOWMAN-BIRK D SOYBEAN PROTEASE INHIBITOR GENE IS A POTENTIAL CANDIDATE FOR SEED-SPECIFIC TRANSGENE EXPRESSION IN DICOTS .....	27
ABSTRACT .....	27
1. INTRODUCTION .....	28
2. MATERIALS AND METHODS .....	29
3. RESULTS AND DISCUSSION .....	31
4. REFERENCES .....	34

CAPÍTULO 3 .....	38
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE NÓS COTILEDONARES DE SOJA PARA O SILENCIAMENTO GÊNICO, VIA INTERFERÊNCIA POR RNA, DO INIBIDOR DE PROTEASE DO TIPO BOWMAN-BIRK A .....	38
RESUMO .....	38
1. INTRODUÇÃO .....	39
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	40
2.1. Silenciamento gênico mediado por RNA e sua aplicação no melhoramento de culturas agronomicamente importantes .....	40
2.2. Transformação de Soja .....	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	50
3.1. Material vegetal .....	50
3.2. Plantio, coleta e desinfestação .....	50
3.3. Esterilização e germinação das sementes .....	50
3.4. Vetores de transformação e linhagem de <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> .....	52
3.5. Preparo do explante e infecção .....	52
3.6. Seleção e regeneração de plantas .....	53
3.7. Aclimação das plantas transformadas .....	53
3.8. Análise molecular dos transformantes .....	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
5. CONCLUSÕES .....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62

## RESUMO

BARROS, Beatriz de Almeida, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2010. **Caracterização dos genes que codificam os inibidores de protease Bowman-Birk (BBI) e transformação de nós cotiledonares para o silenciamento gênico de BBI em sementes de soja.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-Orientadores: Maurilio Alves Moreira e Wagner Campos Otoni.

Além de proteínas de reserva, as sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill) acumulam inibidores de proteases, como os inibidores do tipo Bowman-Birk (BBI), que são considerados antinutricionais. A redução desses inibidores em sementes de soja poderia levar ao aumento da biodisponibilidade dos aminoácidos obtidos a partir de alimentos derivados da soja. Os genes que codificam BBI em soja formam uma família multigênica com, no mínimo, cinco membros: BBI-A, BBI-B, BBI-CII, BBI-DII e BBI-EI. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os genes que codificam os inibidores de protease Bowman-Birk (BBI) e transformar nós cotiledonares para o silenciamento gênico de BBI em sementes de soja. Análises computacionais mostraram que o genoma da soja apresenta 11 locos que potencialmente codificam BBI. Destes, seis codificam os inibidores do tipo A, C-II e D-II que são expressos somente em sementes. Os perfis de expressão destes membros durante o desenvolvimento da semente são semelhantes. Transcritos para BBI-DII são os mais abundantes, seguidos por BBI-A e BBI-CII. A expressão do gene *BBI-D* foi comparada, por meio de RT-PCR quantitativo, com a do gene que codifica a subunidade  $\alpha$  da proteína de reserva  $\beta$ -conglícinina ( $\alpha$ - $\beta$ C) durante o desenvolvimento da semente. A expressão de *BBI-D* foi significativamente maior que a expressão de  $\alpha$ - $\beta$ C, indicando que o promotor de *BBI-D* é um excelente candidato para dirigir a expressão de transgenes em sementes de soja. Para a redução dos teores de BBI em sementes de soja, nós cotiledonares foram transformados via *Agrobacterium tumefaciens* (linhagem KYRT1) carregando o vetor pBBIAi. No total, 1800 explantes foram transformados, 16 brotos alongaram e destes, 11 desenvolveram raízes. Sete plântulas foram estabelecidas em casa de vegetação. Pequenas amostras de folhas foram coletadas para a extração de DNA e três das amostras apresentaram resultado positivo para a reação de PCR. A baixa eficiência de transformação (0,16%) e alta frequência de escapes estão de acordo com relatos da literatura. Pode-se concluir

que o sistema adotado é adequado mas, em trabalhos futuros, modificações relacionadas principalmente ao sistema de seleção e à regeneração dos brotos transformados devem ser consideradas.

## ABSTRACT

BARROS, Beatriz de Almeida, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2010. **Characterization of the genes encoding Bowman-Birk inhibitors (BBI) and transformation of cotyledonary nodes for BBI gene silencing in soybean seeds.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-Advisers: Maurílio Alves Moreira and Wagner Campos Otoni.

In addition to storage proteins the seeds of soybean (*Glycine max* L. Merrill) accumulate protease inhibitors such as Bowman-Birk inhibitors (BBI), which are regarded as antinutritional factors. The reduction of these inhibitors in soybean seeds could lead to increased bioavailability of amino acids obtained from soy foods. The genes encoding BBI in soybean constitute a multigene family with at least five members: BBI-A, B, BBI, BBI-CII, DII-BBI and BBI-EI. The aim of this study was to characterize the genes encoding Bowman-Birk (BBI) protease inhibitors and to transform cotyledonary nodes to silence the BBI gene in soybean seeds. Computer analysis showed that the soybean genome has 11 *loci* which potentially encode BBI proteins. Of these, six encode type A, CII and DII inhibitors which are only expressed in seeds. The expression profiles of these genes during seed development are similar. Transcripts of BBI-DII are the most abundant, followed by BBI-A and BBI-CII. The expression of the *BBI-D* gene was compared with that encoding subunit  $\alpha$  of the storage protein  $\beta$ -conglycinin ( $\alpha$ - $\beta$ C) during seed development using quantitative RT-PCR. Expression of *BBI-D* was significantly higher than that of  $\alpha$ - $\beta$ C, indicating that the promoter of *BBI-D* might be an excellent candidate for direct expression of transgenes in soybean seeds. To reduce the levels of BBI in soybean seeds, cotyledonary nodes were transformed using *Agrobacterium tumefaciens* (KYRT1 strain) carrying the vector pBBIAi. In total 1800 explants were transformed, 16 shoots elongated, and of these 11 developed roots. Seven seedlings were established in the greenhouse. Small samples of leaf from these seedlings were collected for DNA extraction and three seedlings were shown to be transformed using PCR. The low transformation efficiency and high frequency of false positive plants are in agreement with information from the literature. It can be concluded that the system adopted for transformation is adequate, but in future works modifications

related mainly with the system used for selection and shoot regeneration should be considered.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja é a cultura agrícola mais importante do Brasil. A safra 2009/2010, até agosto de 2010, ocupou uma área de 23,46 milhões de hectares, o que significou um aumento de 7,9% em relação à 2008/2009. A produção nacional foi, nesse período, de 68,4 milhões de toneladas, superior à safra anterior em 19,8% (CONAB, 2010). Além disso, ela sustenta o agronegócio brasileiro, sendo o maior produto nacional de exportação gerando ao país, nesse período, US\$ 11,7 bilhões, o que representou 11% do total nacional de exportações (CONAB, 2010).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, atrás somente dos Estados Unidos, e ainda apresenta potencial de aumento de produção devido a existência de crescente demanda mundial por produtos a base de soja. Devida à excelente combinação entre produtividade e características de interesse para a indústria de alimentos. A excelente combinação entre produtividade e características de interesse para a indústria de alimentos contribuiu para a formação de um vasto complexo agroindustrial destinado ao processamento dos produtos derivados da soja. Esses produtos são utilizados na constituição de ração animal e na alimentação humana por ser uma fonte protéica de boa qualidade. Apesar disso, a fração protéica encontrada na semente desta leguminosa não é considerada ideal por apresentar baixo teor de metionina, além da presença de fatores alergênicos e de inibidores de proteases. Dentre os fatores anti-nutricionais estão os inibidores de protease do tipo Bowman-Birk (BBI).

Apesar de ser um peptídeo associado à prevenção de alguns tipos de câncer (Friedman e Brandon 2001), a alta concentração de BBI nas sementes pode limitar a biodisponibilização de aminoácidos durante a digestão, comprometendo a utilização da soja como fonte protéica na alimentação humana e animal. Por isso, a redução dos teores de inibidores de proteases nas sementes de soja tem sido uma meta em programas de melhoramento voltados à alimentação humana e animal.

Considerando que os inibidores BBI são codificados por uma família multigênica, sua redução em sementes se torna extremamente difícil e demorada por metodologias tradicionais. Tecnologias de silenciamento e de transformação genética podem ser conjugadas e aplicadas, mas devem ser aprimoradas para que se obtenha um silenciamento eficaz e estável de alguns membros da família. Para a escolha dos genes a serem silenciados, os constituintes e o padrão de expressão de

toda a família devem ser conhecidos. Com o seqüenciamento do genoma da soja (<http://www.phytozome.net/soybean>), e sua recente publicação (Schmutz et al. 2010), os processos de anotação, clonagem e análise da expressão dos genes constituintes de famílias multigênicas podem ser rapidamente conduzidos. Todas essas informações podem ser inter-relacionadas e utilizadas para o desenvolvimento de variedades de soja apresentando baixos teores de BBI.

Este trabalho está organizado em três capítulos. Os dois primeiros estão em formato de artigo e serão submetidos às revistas DNA Research e Plant Cell Reports, respectivamente. O primeiro capítulo descreve a caracterização *in silico* e a análise de expressão da família multigênica que codifica BBI em soja. O segundo trata da análise do potencial do promotor do gene que codifica BBI-D para expressão de transgenes em dicotiledôneas. O terceiro capítulo, escrito no formato livre, descreve experimentos de transformação buscando a redução de teores de BBI em sementes de soja.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Friedman M, Brandon DL (2001) Nutritional and health benefits of soy proteins. *J Agric Food Chem* 49: 1069-1086.

Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, Xu D, Hellsten U, May GD, Yu Y, Sakurai T, Umezawa T, Bhattacharyya MK, Sandhu D, Valliyodan B, Lindquist E, Peto M, Grant D, Shu S, Goodstein D, Barry K, Futrell-Griggs M, Abernathy B, Du J, Tian Z, Zhu L, Gill N, Joshi T, Libault M, Sethuraman A, Zhang X, Shinozaki K, Nguyen HT, Wing RA, Cregan P, Specht J, Grimwood J, Rokhsar D, Stacey G, Shoemaker RC, Jackson SA (2010) Genome sequence of the paleopolyploid soybean. *Nature*, 463:178-183.

<http://www.conab.gov.br> (Boletim Indicadores da Agropecuária- Nº 8, 2010).

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os genes que codificam os inibidores de protease Bowman-Birk (BBI) e transformar nós cotiledonares para o silenciamento gênico de BBI em sementes de soja.

### 3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar *in silico*, isolar e analisar a expressão dos genes que constituem a família multigênica que codifica os inibidores BBI em soja;
- Avaliar o potencial do promotor do gene *BBI-DII* para a regulação semente-específica em dicotiledôneas e comparar sua expressão com a expressão do promotor da subunidade  $\alpha$  da  $\beta$ -conglucininina;
- Transformar nós cotiledonares para a redução, via interferência por RNA, dos teores de BBI em sementes de soja.

## CAPÍTULO 1

### CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DA FAMÍLIA MULTIGÊNICA QUE CODIFICA INIBIDORES DE PROTEASE DO TIPO BOWMAN-BIRK EM SOJA

#### RESUMO

Inibidores de protease do tipo Bowman-Birk (BBI), proteínas ricas em aminoácidos sulfurados, atuam na regulação de proteases endógenas durante a germinação e na resposta de defesa em plantas. Em soja, a família multigênica que codifica BBI ainda não foi completamente descrita. O objetivo deste trabalho foi caracterizar *in silico* e analisar a expressão dos membros da família BBI em soja. Foram detectados 11 potenciais genes que codificam BBI no genoma anotado da soja. Em cada um deles foi detectado pelo menos um domínio conservado que caracteriza essa família e um potencial peptídeo sinal. As sequências foram posicionadas no mapa físico da soja e suas regiões promotoras foram analisadas em busca de *cis*-elementos regulatórios. Foram identificados elementos responsáveis por expressão semente-específica e também de resposta a estresses biótico e abiótico. Com base na análise *in silico* e RT-PCR concluiu-se que os tipos BBI-A, CII e DII são expressos especificamente em sementes. Os perfis de expressão destes genes são semelhantes durante o desenvolvimento da semente, atingindo um máximo nos estágios intermediários e decrescendo com o amadurecimento da semente. Os transcritos para o tipo BBI-DII foram os mais abundantes, seguidos por BBI-A e BBI-CII.

**Palavras-chave:** Bowman-Birk, família multigênica, caracterização *in silico*, qRT-PCR.

## 1. INTRODUÇÃO

Inibidores de proteases, proteínas ricas em aminoácidos sulfurados, são encontrados em várias espécies vegetais e possuem um papel essencial na regulação da atividade proteolítica de enzimas alvo durante a germinação e protegem a planta contra herbivoria (Mayer et al. 1974; Ryan 1990). Os inibidores de protease de soja são classificados em duas famílias: os inibidores Kunitz (KTI) e os inibidores Bowman-Birk (BBI).

Os inibidores BBI, descritos em soja por Bowman (1946) e Birk (1967), consistem de uma cadeia de 71 aminoácidos ligada por sete pontes dissulfeto com uma tendência a auto-associação (Chen et al. 2006). São pequenas proteínas, ricas em resíduos de cisteína, que funcionam como pseudosubstratos específicos para enzimas digestivas. Sua estrutura, tipicamente, apresenta dois sítios independentes de ligação a proteases, sendo capazes de inibir tripsina, quimiotripsina e elastase (Fernandez et al. 2007). A ligação destes inibidores às suas enzimas alvo promove a formação de um complexo no qual a proteólise se torna limitada e extremamente lenta (Tiffin e Gaut, 2001). Como consequência, ocorre uma deficiência na biodisponibilidade de aminoácidos quando soja *in natura* é utilizada na alimentação.

Os genes que codificam BBI em *Glycine max* e *Glycine soja* constituem uma família multigênica que codifica, no mínimo, cinco membros: BBI-A, BBI-B, BBI-CII, BBI-DII e BBI-EI. BBI-B é muito similar a BBI-A em sua especificidade inibitória e na sua seqüência aminoacídica e, provavelmente, é codificado por um segundo gene BBI-A2. BBI-EI é originado por meio de uma proteólise de DII. Desta forma os inibidores BBI foram agrupados em três classes – A, C e D – com distintas especificidades; BBI-A, -C e -D inibem tripsina/quimiotripsina, elastase/tripsina, e tripsina/tripsina, respectivamente, em seus sítios ativos duplos (revisado em Deshimaru et al. 2004).

Com a recente finalização e liberação do genoma da soja (Schmutz et al. 2010) (<http://www.phytozome.net/soybean>) os processos de identificação, isolamento e análise funcional de genes serão acelerados. Dentro do modelo genômico da soja (*Glyma1*), aproximadamente 975 Mb foram organizados em 20 cromossomos e 66153 locos que potencialmente codificam proteínas foram preditos. Em uma perspectiva biotecnológica, essas informações serão importantes para

estudar a organização e regulação de genes envolvidos em produtividade, qualidade de semente, fixação de nitrogênio e resposta a alterações ambientais (Mochida et al. 2009).

O objetivo deste trabalho foi identificar, caracterizar *in silico* e analisar a expressão dos genes que constituem a família multigênica que codifica os inibidores de protease do tipo Bowman-Birk em soja.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Identificação e Caracterização *in silico*

A identificação dos genes que codificam BBI foi feita utilizando o algoritmo *blastp* (Altschul et al. 1997), sob um ponto de corte de E-value =  $1e^{-5}$ , contra o proteoma predito a partir da anotação do genoma da soja (*Glyma1*). Foram utilizadas 14 sequências de proteínas (*queries*) pertencentes a nove espécies (*Glycine max*, *Glycine microphylla*, *Glycine soja*, *Oriza sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Triticum aestivum*, *Vigna Unguiculata*, *Zea mays*). As sequências dos genes identificados foram obtidas utilizando Phytozome GBrowser.

A busca por peptídeo sinal foi feita utilizando o software SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e a provável localização subcelular foi determinada por meio dos softwares de predição PREDOTAR (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>) e TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Os domínios conservados nas sequências protéicas correspondentes aos genes de interesse foram identificados com InterProScan e InterPro DB ([www.ebi.ac.uk/interpro](http://www.ebi.ac.uk/interpro)). Para avaliar a conservação dos resíduos de cisteína (importantes para a manutenção da estrutura do inibidor) e dos domínios de Bowman-Birk, as sequências peptídicas (sem os possíveis peptídeos sinais) foram alinhadas utilizando o software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>).

Todos os genes identificados foram posicionados e ancorados no mapa físico baseado na sequência consenso do genoma da soja disponível no banco de dados SoyBase (<http://soybeanphysicalmap.org/index.php>) (Grant et al. 2010).

O software SignalScan (Pestridge 1991) e o banco de dados PLACE (Higo et al. 1997) (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>) foram utilizados para identificar *cis*-elementos regulatórios nas regiões promotoras (uma região de 1500 pb *upstream* do provável ponto +1 da tradução) dos genes que codificam BBI.

Para uma avaliação inicial sobre a expressão dos genes que codificam BBI, a sequência predita do transcrito de cada um deles foi utilizada para a busca, por meio de *blastn*, no banco de ESTs de soja do NCBI por meio do SoyBase (<http://soybase.org/GlycineBlastPages/>), constituído de 394.070 sequências. O ponto de corte utilizado foi um E-value =  $1e^{-100}$ .

## 2.2. Isolamento dos genes que codificam BBI em soja

DNA genômico de sementes de soja, variedade CAC-1, foi extraído com base no protocolo de McDonald et al. (1994). *Primers* específicos para a amplificação da provável ORF de cada gene identificado foram desenhados. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador MasterCycle Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) com período inicial de desnaturação de 94 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s/55 °C por 30 s/72 °C por 30s e um período adicional de extensão de 72 °C por 4 min. Uma alíquota da reação (10 µL) foi purificada utilizando ExoSAP-IT® (USB, Cleveland, OH, EUA), de acordo com as indicações do fabricante e submetidas à reação de sequenciamento pela empresa MacroGen (Seoul, Coréia do Sul).

## 2.3. Material Vegetal e RT-PCR

Para as análises de expressão dos genes que codificam BBI também foi utilizada a variedade de soja CAC-1. Foram coletadas amostras de raiz, caule, folhas e semente. No caso de sementes, a coleta foi separada em oito estágios de desenvolvimento, que compreenderam o período de enchimento do grão. Os estágios foram determinados de acordo com o peso de matéria fresca da semente: 1<sup>o</sup> – 0 a 75 mg; 2<sup>o</sup> – 76 a 150 mg; 3<sup>o</sup> – 151 a 225 mg; 4<sup>o</sup> – 226 a 300 mg; 5<sup>o</sup> – 301 a 375 mg; 6<sup>o</sup> – 376 a 450 mg; 7<sup>o</sup> – 451 a 525 mg e 8<sup>o</sup> – representado por sementes maduras.

RNA total foi extraído com fenol:clorofórmio (Sambrook et al. 1989), e tratado com RQ1 RNase-Free DNase (PROMEGA, Madison, WI, EUA) para remover o DNA genômico. A síntese de cDNA foi feita utilizando *primer* oligo d(T) e o kit *SuperScript First Strand-Synthesis System* (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Para as reações de RT-PCR qualitativo foram utilizados os mesmos *primers* desenhados para a clonagem dos genes de interesse. As condições das reações de PCR foram as mesmas, apenas substituindo-se o molde de DNA genômico por

cDNA de raiz, caule, folha e semente. O gene que codifica actina em soja foi utilizado como controle interno.

A expressão quantitativa dos genes identificados foi analisada ao longo do período de enchimento da semente de soja. Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações foram conduzidas em termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Um controle negativo, sem cDNA, foi incluído para cada conjunto de *primers*. O gene *GAPDH* foi utilizado como referência endógena para a normalização dos dados e para o cálculo da abundância relativa dos transcritos por meio do método  $2^{-\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001). A especificidade e a eficiência da reação para cada conjunto de *primers* foram avaliadas por meio de uma curva de dissociação e uma curva padrão, respectivamente. As amostras foram analisadas em três repetições biológicas e três réplicas técnicas por amostra.

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para identificar genes que codificam BBI, 14 sequências protéicas de BBI de diferentes espécies de plantas foram analisadas por meio de *blastp* contra o proteoma predito da anotação genoma da soja (*Glyma1*). Essa análise revelou a existência de 11 genes, com ausência de íntrons, que potencialmente codificam BBI: Glyma09g28700, Glyma09g28720, Glyma09g28730, Glyma09g39630, Glyma09g39640, Glyma14g26400, Glyma14g26410, Glyma16g33400, Glyma18g46550, Glyma18g46560 e Glyma18g46580.

Seis desses genes codificam os inibidores do tipo A (Glyma09g28700, Glyma09g28730, Glyma14g26410), C-II (Glyma09g28720, Glyma14g26400) e D-II (Glyma16g33400), já descritos na literatura (Baek et al. 1994; Deshimaru et al. 2004).

Os inibidores do tipo A foram divididos por Deshimaru et al. (2004) em dois grupos, A1 e A2. A diferença entre seus transcritos são 11 substituições de base que resultam na modificação de 2 resíduos de aminoácidos. Além disso, somente a sequência que codifica BBI-A1 possui um sítio de clivagem para a enzima de restrição *Hind* III. Utilizando essas diferenças, verificamos que Glyma09g28700 e Glyma09g28730 codificam BBI-A1 e Glyma14g26410 codifica BBI-A2. Esses mesmos autores, por meio de *Southern blotting*, identificaram três genes que codificam BBI-A. No entanto, como só haviam isolado dois tipos de cDNA, sugeriram que o terceiro gene não seria transcrito ou poderia ser uma cópia idêntica dos anteriores. Nosso trabalho permitiu a inferência de que o terceiro gene é uma segunda cópia que codifica um BBI-A1.

Nós também identificamos dois genes que codificam BBI-CII e um que codifica BBI-DII, corroborando com a descrição de Deshimaru et al. (2004). Segundo esses mesmos autores, a diferença entre os transcritos dos dois genes que codificam BBI-CII são 3 substituições de base e que levam a substituição de uma arginina por um histidina. Por alinhamento (100% de identidade), verifica-se que o transcrito codificado por Glyma09g28720 é idêntico à sequência clonada por Baek et al. (1994). Não foram encontrados relatos do segundo transcrito na literatura.

Rashed et al. (2008) clonaram dois transcritos (*GmBBI1* e *GmBBI2*) que codificam BBI em raízes de soja, durante a interação com nematóide do cisto. Esses

cDNAs, quando alinhados aos transcritos anotados no genoma da soja, se mostraram idênticos aos transcritos dos genes Glyma18g46560 e Glyma18g46550. As demais sequências (Glyma18g465820, Glyma09g39630 e Glyma09g39640) ainda não haviam sido descritas na literatura.

Caracteristicamente, os inibidores de protease de soja do tipo Bowman-Birk possuem dois sítios que inibem simultaneamente tripsina/quimiotripsina (tipo A), elastase/tripsina (tipo C-II) e tripsina/tripsina (tipo D-II) (Deshimaru et al. 2004). Além disso, a estrutura desses inibidores é mantida por sete pontes dissulfeto, formadas entre resíduos de cisteínas conservadamente posicionados (Odani e Ikenaka, 1977). As sequências que codificam BBI-A, CII e DII apresentaram os resíduos de cisteína em suas posições conservadas e os dois domínios característicos de BBI em soja (Figura 1). No entanto, as novas sequências apresentaram uma maior variação tanto com relação à composição aminoacídica. Como as proteínas codificadas por essas sequências não foram isoladas, não se pode inferir se essas variações implicam em alteração de estrutura e funcionalidade. Com relação aos domínios de Bowman-Birk, as sequências (Glyma09g39640, Glyma18g46550 e Glyma18g46580) apresentaram somente um domínio ativo. Nessas sequências, o segundo domínio apresenta variação no sítio de inibição (Figura 1).

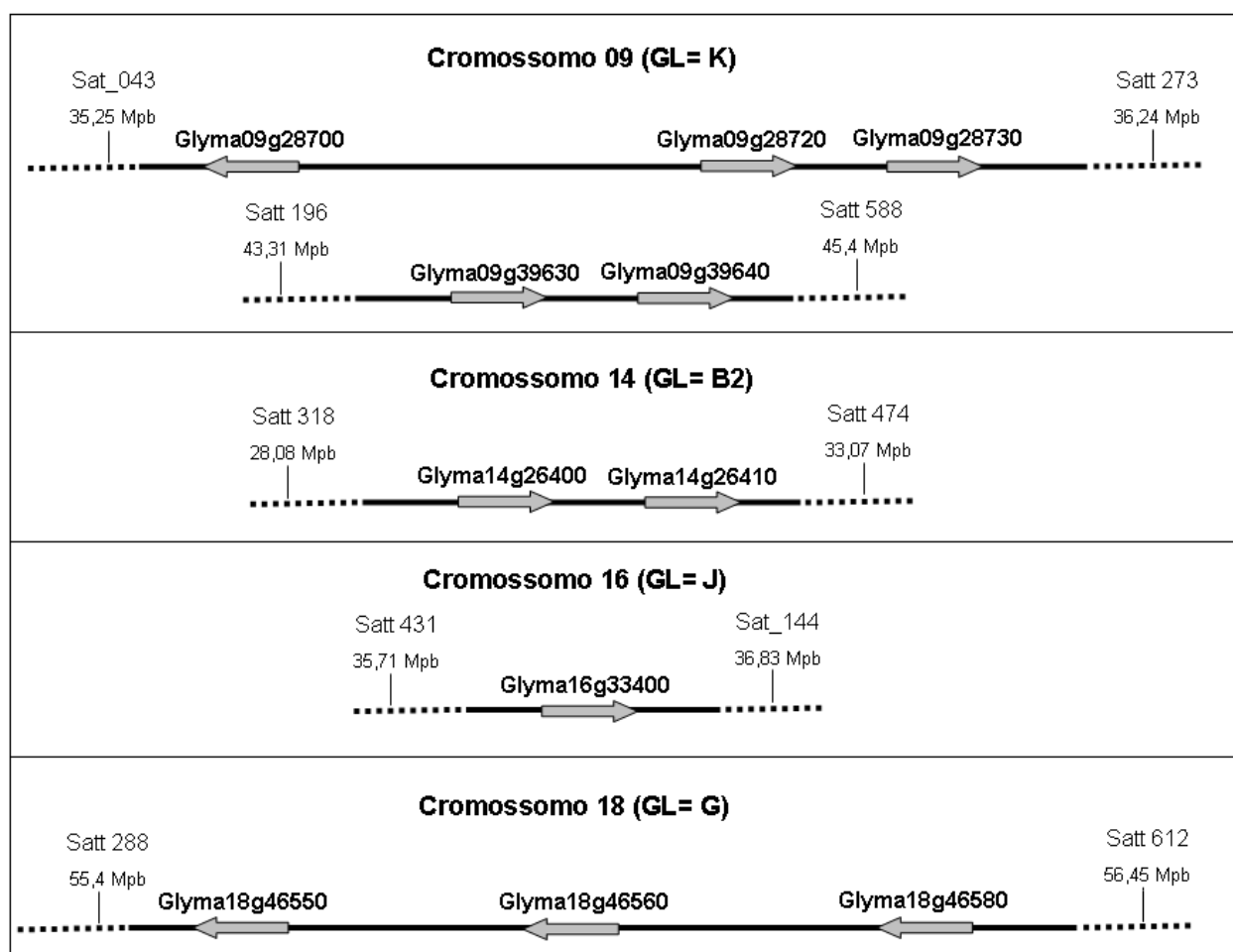
	10	20	30	40	50	60
09g28700	.....dESSKPCCDQCACTKSNPPQCRCSDMrLNSCHSACKSCICA.	<b>LSY</b> PAQCF	CVDITDF	CYEPCKP	sedd.	
09g28720	.....dESSKPCCDQCACTKSNPPQCRCSDMrLNSCHSACKSCICA.	<b>LSY</b> PAQCF	CVDITDF	CYEPCKP	sedd.	
16g26410	.....dSSKPCCDQCACTKSNPPQCRCSDMrLNSCHSACKSCICA.	<b>LSY</b> PAQCF	CVDITDF	CYEPCKP	sedd.	
14g33400	.....dEYSKPCCDLCMCTRSMPQCSCEDIrLNSCHSDCKSCMCT.	<b>RSQ</b> PGQCRCLD	TNDFCYK	PCKS	.....	
09g28720	.....dESSKPCCDLCMCTASMPQCCHCADIrLNSCHSACDRCACT.	<b>RSMP</b> GQCRCLD	TTDFCYK	PCKS	sedd	
16g26400	.....dESSKPCCDLCMCTASMPQCCHCADIrLNSCHSACDRCACT.	<b>RSMP</b> GQCRCLD	TTDFCYK	PCKS	sedd	
18g46560	nnyyvkSTTKACCNSCPCKSI PPQCRCSDI .GETCHSACKTCICT.	<b>RSI</b> PPQCHCSDI	TNFCYEP	PCNS	sete.	
18g46580	.vkikSTATACCDLCLCTKSYPPQCNVDEsETGCHSCKNCICN.	<b>KKF</b> PRTCYCSDI	TNFCYD	KCN	stean.	
09g39630	dnynlkSTTSACCDACACTKSI PPICHCHDF .GETCHSACNLCICT.	<b>ASY</b> PPQCRCLD	QTTF	CYDK	CDssek.	
18g46550	nnyyvkSTTNGCCDNCRCCTISI SEMCKCADI .GETCHPSCKSCFCDiPTFPGLQCIDVTNFCYELCN	<b>S</b> setk.				
09g39640	nnyyikSTTKACCDKCYCSKSI PPKCYADV .GITCHSACKVCLCI .	<b>---</b> HPQCR	CVDITDF	CYEP	CNH.....	

**Figura 1:** Alinhamento da sequências preditas de BBI codificados no genoma da soja. Os resíduos de cisteína conservados estão destacados em cinza claro e os sítios ativos estão em negro e destacados em cinza escuro.

Um potencial peptídeo sinal está presente no N-terminal das 11 sequências de BBI descritas, indicando que as proteínas eventualmente sintetizadas são armazenadas em vacúolos especializados (PSV – *protein storage vacuoles*), como descrito para as proteínas 11S e 7S de soja (revisado em Herman e Larkins, 1999), ou exportadas para o espaço intercelular. A entrada das proteínas de reserva no retículo endoplasmático rugoso (RER) ocorre co-traducionalmente especificada pelo peptídeo sinal presente no seu N-terminal que é clivado assim que as proteínas de reserva entram no espaço luminal (Von Heijin, 1984). Elas permanecem no RER por poucas horas para dobramento e oligomerização, que são facilitados por enzimas e chaperonas luminares (Vitale e Denecke 1999). Depois desse tempo, elas são direcionadas ao Complexo de Golgi onde são empacotadas em vesículas de secreção e direcionadas ao vacúolo. Horisberger e Tacchini-Vonlathen (1983), analisando eixo-embrionário e cotilédones de soja, demonstraram que BBI podem ser encontrados em PSV, no núcleo e, em menor extensão, no citoplasma. Ao contrário do inibidor de tripsina de Kunitz, eles não estão presentes na parede celular, mas foram encontrados no espaço intercelular (Horisberger e Tacchini-Vonlathen 1983).

Para o mapeamento dos genes identificados, foi utilizado o mapa baseado na sequência consenso do genoma da soja, disponibilizado pelo USDA no banco de dados SoyBase. Cinco genes foram mapeados no cromossomo 09 (Grupo de Ligação (GL) K): Glyma09g28700, Glyma09g28720 e Glyma09g28730 – posicionados entre os marcadores microssatélites Sat\_043 e Satt 273; e Glyma09g39630 e Glyma09g39640 entre Satt 196 e Satt 588. Glyma16g33400 foi mapeado no cromossomo 16 (GL J) entre as marcas Satt 441 e Sat\_144, enquanto que Glyma14g26400 e Glyma14g26410 são flanqueadas pelos marcadores Satt 318 e Satt474 no cromossomo 14 (GL B2). Entre Satt 288 e Satt612, no cromossomo 18 (GL G), estão os genes Glyma18g46550, Glyma18g46560 e Glyma18g46580. Embora ainda seja necessária comprovação molecular, esta é a primeira vez que os genes BBI são posicionados no mapa físico da soja (Figura 2). Esse mapeamento *in silico* demonstra a importância da utilização deste tipo de ferramenta em estudos genômicos, uma vez que a não existência de genitores naturais contrastantes com relação a teores de BBI compromete a obtenção de populações adequadas para o mapeamento molecular.

Ao longo dos anos, refinadas análises de promotores têm identificado um grande número de *cis*-elementos envolvidos na regulação transcricional de uma rede dinâmica de atividades gênicas controlando vários processos biológicos como respostas a estresse (biótico e abiótico) e processos durante o desenvolvimento (Vandepoele et al. 2009). Para caracterizar a região promotora dos genes identificados, 1500 pb *upstream* do ponto +1 da tradução foram obtidos do genoma da soja e submetidos a uma extensiva análise *in silico* para avaliar a presença de *motifs* regulatórios conhecidos.



**Figura 2:** Posicionamento dos genes que codificam BBI no mapa físico da soja.

De uma forma geral, a região promotora de todos os genes apresentou elementos responsáveis por expressão semente-específica e de resposta a estresse biótico e abiótico (Tabela 1).

**Tabela 1:** Cis elementos comuns encontrados nas regiões promotoras dos 11 genes que codificam BBI em soja.

PLACE ID	Motif	Função
ARR1AT	NGATT	Sítio de ligação dos ativadores transcricionais ARR1 e ARR2.
CAAT BOX	CAAT	Atividade semente específica.
DOFCOREZM	AAAG	Sítio de ligação de fatores de transcrição DOF induzidos por ácido salicílico.
DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	Elementos de ligação dos fatores de transcrição DPBF ( <i>Dc3 promoter-binding factor</i> ) 1 e 2, envolvidos na transcrição embrião-específica.
EBOXBNNAPA	CANNTG	Elemento essencial para a expressão de proteínas de reserva.
GT1GMSCAM4	GAAAAA	Envolvidos com expressão gênica induzida por sal ou patógeno.
MART BOX	TTWTWTTWTT	Podem também estabilizar o complexo de iniciação da transcrição: DNA-TBP-TFIIA.
MYB1A	WAACCA	<i>Matrix attachment region</i> – atua como <i>enhancer</i> em construções para expressão de transgenes.
MYCATERD1	CATGTG	Sítio de reconhecimento dos fatores MYB em genes responsivos a desidratação.
MYCCONSUSAT	CANNTG	Sítio de reconhecimento dos fatores MYC e da proteína NAC em genes responsivos a desidratação.
RYPEATBNNAPA	CATGCA	Sítio de reconhecimento dos fatores de transcrição MYC em genes responsivos a desidratação.
SEF3MOTIFGM	AACCCA	Importante para expressão semente específica.
SEF4MOTIFGM7S	RTTTTTR	<i>Enhancer</i> presente nos promotores nos genes da $\beta$ -conglucina em soja.
T/GBOXATPIN2	AACGTG	<i>Enhancer</i> presente nos promotores nos genes da $\beta$ -conglucina em soja.
TATA BOX	TATAAAT	Responsável pela ativação da expressão gênica em resposta a jasmonato induzida por ferimento.
WBOXARNPR1	TTGAC	Elemento posicionalmente importante para a acurácia do início da transcrição.
WBOXNTERF3	TGACY	W-Box reconhecido por fatores de transcrição induzidos por ácido salicílico.
		W-Box envolvido na ativação gênica em resposta a ferimento.

Yoshino et al. (2006), analisando o promotor do gene da subunidade  $\alpha$  da  $\beta$ -conglucina, verificaram a presença de alguns elementos importantes para a expressão semente-específica: SEF (*Soybean Embryonary Factors*) 1,3 e 4; E-Box (Kawagoe and Murai 1992), RY *motifs* (Dickinson et al. 1988), e um sítio de ligação para fatores de transcrição DPBF (*DC3 Protein-Binding Factor*) (Kim et al. 1997).

Enquanto as sequências RY são importantes para a expressão semente-específica, as outras sequências têm papéis na sua regulação (Fujiwara and Beachy 1994; Sakata et al. 1997). Dentre os elementos de resposta a estresse estão os sítios de ligação de fatores de transcrição WRKY, MYB e DOF. Proteínas WRKY constituem uma família de fatores de transcrição que são únicas em plantas. Membros dessa família têm sua atividade de ligação ao DNA induzida após ataque por patógenos, sinalização de defesa e ferimentos (revisado por Eulgem et al. 2000). Membros de outra família de fatores de transcrição, os fatores MYB têm sido associados com resposta a estresse, como luz UV, ferimento, estresse anaeróbico e patógenos (Jin e Martin 1999; Stracke et al. 2001). As proteínas DOF (*DNA binding with one finger*), induzíveis por ácido salicílico, interagem e estimulam a atividade de ligação ao DNA de proteínas bZIP, também responsivas a estresse (Kang e Singh 2000). Além disso, em arroz, a expressão de um gene que codifica um tipo de BBI é induzida por ferimento, ácido jasmônico e etileno (Rakwal et al. 2001), sinais considerados indutores em resposta de defesa em plantas assim como ácido salicílico.

Outros elementos importantes, como CANBNNAPA (CNAACAC – envolvido na transcrição semente específica) estão presentes apenas nos genes que codificam BBI-A (Glyma09g28700, Glyma28730, Glyma14g26410) e BBI-D (Glyma16g33400) e no gene Glyma18g46580. Além disso, o gene Glyma18g46580 e um dos genes que codifica BBI-C (Glyma14g26400) não apresentaram predição de TATA box e o último também não apresenta o elemento RY que é importante para a expressão semente-específica. Mas somente essas informações não nos permitem inferir a respeito da funcionalidade desses genes.

Para completar as análises feitas *in silico*, o perfil de expressão virtual, semelhante a um *virtual northern blotting* (VNB), de cada gene identificado foi determinado. A representatividade no banco de dados e a expressão tecido-específica de cada transcrito foram avaliadas e estão representadas na Tabela 2.

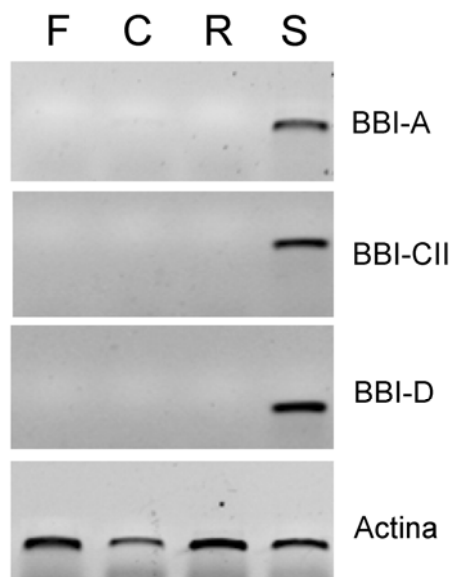
**Tabela 2:** Avaliação da representatividade e expressão tecido-específica dos genes identificados em um banco composto de 394.070 ESTs.

Gene	Tecido de origem da biblioteca	Nº de Hits
Glyma09g28700/28730/14g26410 (BBI-A)	Sementes imaturas (100-300 mg)	55
Glyma09g28720/14g26400 (BBI-CII)	Sementes imaturas (100-300 mg)	20
	Embriões somáticos	1
Glyma16g33400 (BBI-DII)	Sementes imaturas (100-300 mg)	104
Glyma18g46550	Raízes sob estresse (nodulação, patógenos e seca)	24
Glyma18g46560	Raízes sob estresse (nodulação, patógenos e seca)	27
Glyma18g46580	plântulas com Síndrome da Morte Súbita ( <i>Sudden Death Syndrome Disease</i> )	1
Glyma09g39630	Embriões somáticos	1
Glyma09g39640	Raízes sob estresse (nodulação, patógenos e seca)	1

Quando analisados em conjunto, os resultados obtidos das análises das regiões promotoras de genes que codificam BBI e dos tecidos em que eles são expressos corroboram com a função de proteção contra herbivoria e demonstram uma regulação semelhante àquela das proteínas de reserva.

Depois da caracterização *in silico*, passamos ao isolamento e análise da expressão dos genes identificados. Como não houve predição de íntrons, nós utilizamos DNA genômico como molde na reação de PCR para o isolamento da provável ORF que cada um deles codifica. Todos os amplicons apresentaram o tamanho esperado e foram sequenciados. As sequências obtidas foram bastante similares às sequências disponíveis no genoma da soja.

A expressão tecido-específica de cada gene foi avaliada por meio de RT-PCR qualitativo utilizando cDNA de folha, caule, raiz e sementes de soja. Os genes que codificam BBI A, CII e DII apresentaram expressão somente em sementes (Figura 3), enquanto que a expressão dos outros genes não foi detectada em nenhum órgão.



**Figura 3:** Análise da expressão dos genes que codificam os BBI-A, CII e DII em diferentes tecidos da soja (F = folha, C = caule, R = raiz, S = semente).

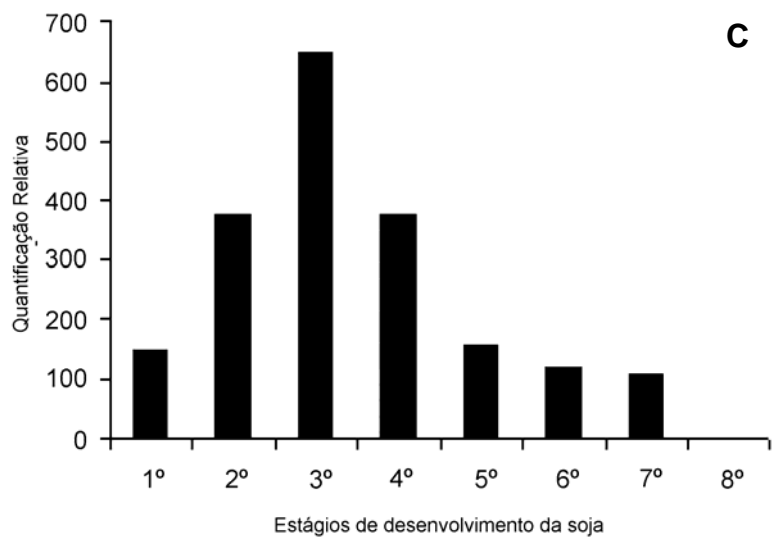
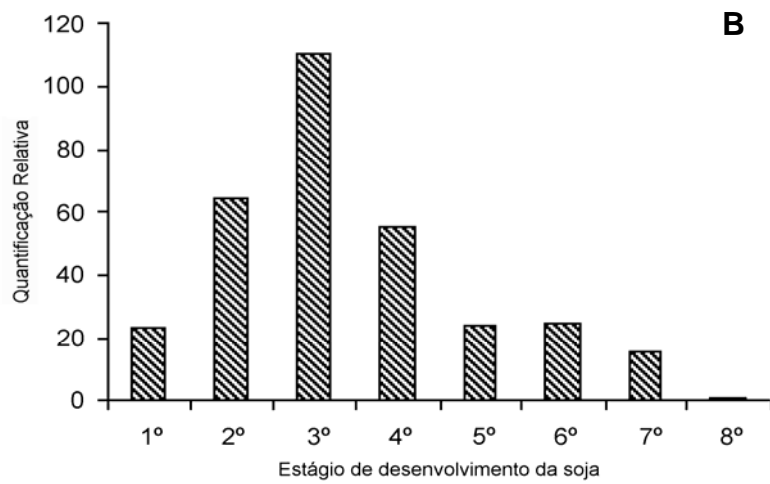
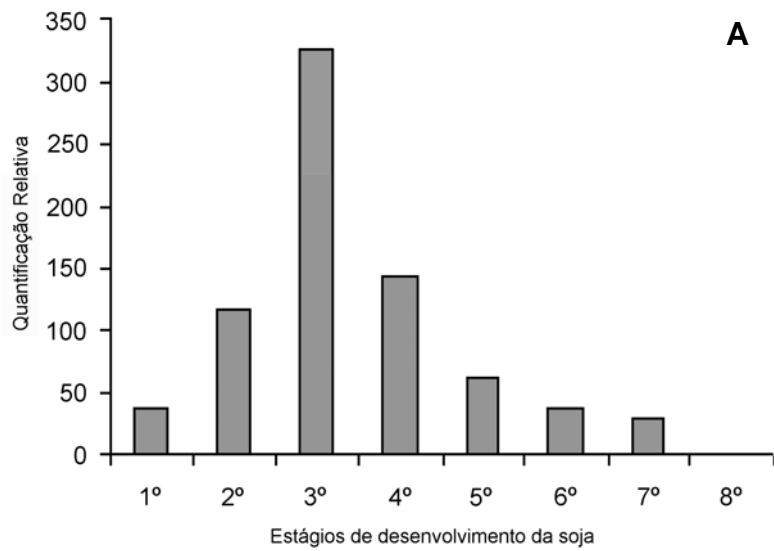
Como o material vegetal utilizado foi coletado sob condições normais de cultivo (ausência de estresse), esse padrão de expressão era esperado e está de acordo com o observado na análise de expressão *in silico*. Em feijão comum, Galasso et al. (2009) analisaram a expressão, por meio de *northern blotting*, de dois genes que codificam BBI em vários órgãos dessa leguminosa. A expressão de ambos os genes foi predominante em cotilédones em desenvolvimento e ausente em folhas, tegumento e flores. Além disso, Birk (1967) relatou que plântulas de uma semana de idade apresentam todos os tipos de inibidores de protease em cotilédones e um pouco no hipocótilo. Hwang et al. (1978) encontraram BBI em cotilédones, epicótilos, hipocótilos e raízes em plântulas de 12 dias, mas concluíram que somente a quantidade encontrada em cotilédones foi significativa. Em plantas maduras, Goldberg (1983) reportou evidências de síntese de BBI somente nos cotilédones.

A expressão dos genes que codificam os principais tipos de BBI em sementes (BBI-A, CII e DII) foi avaliada por meio de RT-PCR quantitativo ao longo do desenvolvimento da semente. Para tanto, foi utilizado um par de *primers* para a amplificação de BBI A1 e A2, e um par de *primers* para a amplificação dos dois

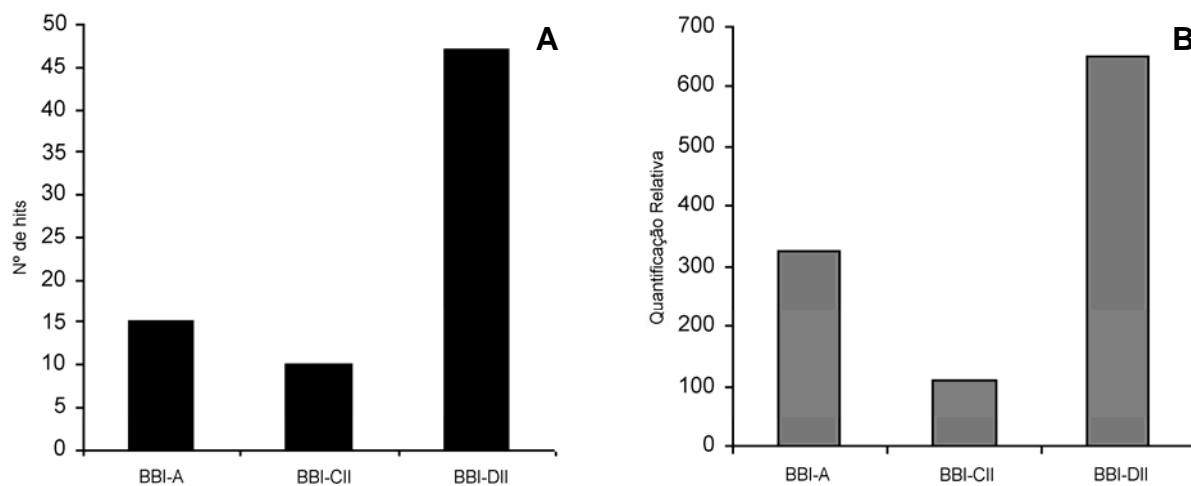
genes que codificam BBI-CII. Os conjuntos de *primers* apresentaram eficiência de reação acima de 90% e amplificaram um único tipo de transcrito cada. Todos os genes mostraram expressão extremamente alta ao longo de todo o desenvolvimento da semente, com exceção da semente madura. O nível de transcritos aumenta nos estágios iniciais, atinge expressão máxima no 3º estágio e reduz gradativamente até chegar próximo a zero na semente madura (Figura 4).

Durante todo o desenvolvimento da semente, quando comparados entre si, os transcritos para BBI-DII são os mais abundantes, seguidos pelos que codificam BBI-A e, por último, BBI-CII. Esses resultados são semelhantes aos obtidos na análise de expressão *in silico*. Os transcritos que codificam BBI-A, CII e DII são encontrados em bibliotecas de sementes, principalmente de cotilédones imaturos de 100-300mg. Essa faixa de peso fresco se sobrepõem à faixa utilizada para delimitar o 3º estágio de desenvolvimento (151-225mg) da semente da soja. Neste estágio, *in vivo*, observamos o maior acúmulo de transcritos que codificam BBI, sendo que o que codifica BBI-DII é o mais abundante (Figura 5).

Além disso, como já foi mencionado, o *cis*-elemento RY é muito importante para a expressão semente específica. A região promotora do gene Glyma16g33400 (BBI-DII) possui três desses elementos, sendo que dois estão próximos ao TATA box. Os genes que codificam BBI-A apresentam apenas um elemento RY e os que codificam BBI-CII apresentam dois, situados a cerca de 1200 pb do TATA box. É possível que a quantidade e a posição desses elementos contribuam diretamente para as diferenças nos perfis de expressão observados. Recentemente, uma análise sistemática combinatorial *in silico* de *cis*-elementos com análises do padrão de expressão em *Arabidopsis* indicaram uma correlação positiva entre a resposta de genes a estímulos e densidade de *cis*-elementos em sua região promotora (Walther et al. 2007). Embora Odani e Ikenaka (1977) tenham considerado o tipo A o BBI mais abundante em soja, Tan-Wilson et al. (1982) reportaram que o BBI mais abundante em soja é o BBI-EI. Esse tipo de inibidor é obtido a partir de uma modificação pós-traducional de BBI-DII (revisado em Deshimaru et al. 2004). E, finalmente, BBI-CII parece ser o menos abundante (Baek et al. 1994).



**Figura 04:** Análise quantitativa da expressão dos genes que codificam BBI-A (A), CII (B) e DII (C) durante o desenvolvimento da semente de soja.



**Figura 5:** Comparação entre as análises de expressão *in silico* (A) e em tempo real (B) dos genes que codificam BBI durante o 3º estágio de desenvolvimento da semente de soja.

Conclui-se que o genoma da soja apresenta 11 *loci* que potencialmente codificam inibidores de protease do tipo Bowman-Birk. Desses, seis codificam os inibidores do tipo A, CII e DII que são expressos em sementes (Figura 3). As demais sequências aparecem em bibliotecas de tecidos submetidos a estresse e sua expressão não foi detectada em nenhum órgão da planta sob condições normais de cultivo (Tabela 2). O perfil de expressão dos genes que codificam BBI em sementes é semelhante durante o desenvolvimento da semente e transcritos que codificam BBI-DII são os mais abundantes, seguidos por BBI-A e, por último, BBI-CII.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acid Res* 25: 3389-3402
- Baek J-M, Song J-C, Choi YD, Kim SI (1994) Nucleotide sequence homology of cDNAs encoding soybean Bowman-Birk type proteinase inhibitor and its isoinhibitors. *Biosci Biotech Biochem* 58: 843-846
- Birk Y (1967) Chemistry and nutritional significance of proteinase inhibitors from plant sources. *Ann NY Acad Sci* 146: 388-399
- Birk Y, Gertler A, Khalef S (1963) A pure trypsin inhibitor from soya beans. *Biochem J* 87: 281-284
- Bowman DE (1946) Differentiation of soybean anti-tryptic factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 63: 547-550
- Chen J, Mao SJ, Xie, Y (2006) Expression and inhibitory activity analysis of a 25-kD Bowman-Birk protease inhibitor in rice. *Chin Sci Bull* 51: 54-62
- Deshimaru M, Yoshimi S, Shioi S, Terada S (2004) Multigene family for Bowman-Birk type proteinase inhibitors of wild soja and soybeans: the presence of two BBI-A genes and pseudogenes. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 1279-1286
- Dickinson CD, Evans RP, Nielsen NC (1988) *RY* repeats are conserved in the 5'-flanking regions of legume seed-protein genes. *Nucleic Acids Res* 16: 371
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000) The WRKY superfamily of plant transcription. *Trends Plant Sci* 5: 199-206
- Fernandez JH, Mello MO, Galgaro L, Tanaka, AS, Silva-Filho MC, Neshich G (2007) Proteinase inhibition using small Bowman-Birk-type structures. *Genet Mol Res* 6: 846-858

Fujiwara T, Beachy RN (1994) Tissue-specific and temporal regulation of a  $\beta$ -conglycinin gene: roles of the RY repeat and other *cis*-acting elements. *Plant Mol Biol* 24: 261-272

Galasso I, Piergiovanni AR, Lioi L, Campion B, Bollini R, Sparvoli F (2009) Genome organization of Bowman-Birk inhibitor in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Mol Breeding* 23: 617-624

Grant D, Nelson RT, Cannon SB, Shoemaker RC (2010) SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. *Nucleic Acids Res* 38: D843-D846

Goldberg RB, Crouch ML Walling L (1983) Regulation of soybean seed protein gene expression. In: Nagley P, Linnane AW, Peacock WJ, Pateman JA (eds) *Manipulation and expression of genes in eukaryotes*. Academic Press, New York, pp 193-201

Herman EM, Larkins BA (1999) Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell* 11: 601-613

Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nuclei Acids Res.* 27: 297-300

Horisberger M, Tacchini-Vonlanthen M (1983) Ultrastructural localization of Bowman-Birk inhibitor on thin sections of *Glycine max* (soybean) cv Maple Arrow by the gold method. *Histochem cell Biol* 3: 313-321

Hwang DL, Yang W-K, Foard DE (1978) Rapid release of protease inhibitors from soybeans. *Plant Physiol* 61:30-34

Jin H, Martin C (1999) Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol* 41:577-585

Kang HG, Singh K (2000) Characterization of salicylic acid responsive, *Arabidopsis* Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. *Plant J* 21:329-339

Kawagoe Y, Murai N (1992) Four distinct nuclear proteins recognize *in vitro* the proximal promoter of the bean seed storage protein  $\beta$ -phaseolin gene conferring spatial and temporal control. *Plant J* 2: 927-936

Kim SY, Chung H-J, Thomas TL (1997) Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the *Dc3* promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J* 11: 1237-1251

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods* 25: 402-408

MacDonald MB, Elliot IJ, Sweeney PM (1994) DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. *Seed Sci Technol* 22: 171-176

Mayer AM, Shain Y (1974) Control of seed germination. *Annu Rev Plant Physiol* 25: 167-193

Mochida K, Yoshida T, Sakurai T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-SP (2009) In silico analysis of transcription factor repertoire and prediction of stress responsive transcription factors in soybean. *DNA Res* 16: 353-369

Odani S, Ikenaka T (1977) Studies on soybean trypsin inhibitors. X. Isolation and partial characterization of four soybean double-headed proteinase inhibitors. *J. Biochem* 82: 1513-1522

Pestridge DS (1991) SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *Comput Appl Biosci* 7: 203-206

Rakwal R, Agrawal GK, Jwa N-S (2001) Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. *Gene* 263: 189-198

Rashed NA, MacDonald MH, Matthews BF (2008) Protease inhibitor expression in soybean roots exhibiting susceptible and resistant interactions with soybean cyst nematode. *J Nematol* 40: 138-146

Ryan CA (1990) Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 28: 425-429

Sakata Y, Chiba Y, Fukushima H, Matsubara N, Habu Y, Naito S, Ohno T (1997) The RY sequence is necessary but not sufficient for the transcription activation of a winged bean chymotrypsin inhibitor gene in developing seeds. *Plant Mol Biol* 34: 191-197

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, Xu D, Hellsten U, May GD, Yu Y, Sakurai T, Umezawa T, Bhattacharyya MK, Sandhu D, Valliyodan B, Lindquist E, Peto M, Grant D, Shu S, Goodstein D, Barry K, Futrell-Griggs M, Abernathy B, Du J, Tian Z, Zhu L, Gill N, Joshi T, Libault M, Sethuraman A, Zhang X, Shinozaki K, Nguyen HT, Wing RA, Cregan P, Specht J, Grimwood J, Rokhsar D, Stacey G, Shoemaker RC, Jackson SA (2010) Genome sequence of the paleopolyploid soybean. *Nature*, 463:178-183

Stracke R, Werber M, Weisshaar B (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* 4:447-456

Tan-Wilson AL, Rightmire BR, Wilson KA (1982) Different rates of metabolism of soybean proteinase inhibitors during germination. *Plant Physiol* 70: 493-497

Tan-Wilson AL, Cosgriff SE, Duggan MC, Obach RS, Wilson KA (1985) Bowman-Birk protease isoinhibitor complements of soybean strains. *J Agric Food Chem* 33: 389-393

Vandepoele K, Quimbaya M, Casneuf T, De Veylder L, Van de Peer Y (2009) Unraveling transcriptional control in *Arabidopsis* using *cis*-regulatory elements and coexpression networks. *Plant Physiol* 50: 535-546

Von Heijin, G (1984) How signal sequences maintain cleavage specificity. *J Mol Biol* 173: 243-251

Tiffin P, Gaut BS (2001) Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor wip1 in *Zea* and related genera. *Mol Biol Evol* 18: 2092-2101

Walther D, Brunnemann R, Selbig J (2007) The regulatory code for transcriptional response diversity and its relation to genome structural properties in *A. thaliana*. *PLoS Genet* 3: e11

Yoshino M, Nagamatsu A, Tsutsumi K, Kanazawa A (2006) The regulatory function of the upstream sequence of the  $\beta$ -conglycinin  $\alpha$ -subunit gene in seed-specific transcription is associated with the presence of the RY sequence. *Genes Genet Sys.* 81: 135-141

## CAPÍTULO 2

### THE PROMOTER OF THE BOWMAN-BIRK D SOYBEAN PROTEASE INHIBITOR GENE IS A POTENTIAL CANDIDATE FOR SEED-SPECIFIC TRANSGENE EXPRESSION IN DICOTS

#### ABSTRACT

Promoters are key elements for the development of genetically modified organisms. In plants, promoters of genes encoding for storage proteins are often used to direct the specific expression of genes in seeds. Promoters of genes encoding soybean  $\beta$ -conglycinin subunits have been successfully used for seed-specific expression in dicots. However, the development of new transgenic cultivars leads to an increasing search for new tissue-specific promoters. We have shown that the expression of the soybean gene encoding the Bowman-Birk D protease inhibitor (BBI-D) is seed specific. In addition we used quantitative RT-PCR and demonstrated that the relative expression of the gene encoding BBI-D was significantly higher than that of the gene encoding the  $\alpha$  subunit of the  $\beta$ -conglycinin ( $\alpha$ - $\beta$ C) along all stages of seed development. As in most cases the strength of the promoter is proportional to the expression level of the gene under its control, one can conclude that the BBI-D promoter is stronger than the  $\alpha$ - $\beta$ C promoter, and most probably an excellent alternative for seed expression of transgenes in soybean and in other dicot species.

**Key words:** promoter strength – genetically modified organisms – *Glycine max* – quantitative RT-PCR

## 1. INTRODUCTION

Genetic transformation of plants has allowed the development of cultivars with improved nutritional quality, with tolerance to herbicides and insects, and also capable to synthesize compounds for pharmaceutical and industrial purposes (Potenza et al. 2004). Originally the expression of transgenes in plants was governed by constitutive promoters such as the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter. Although this promoter is still being used, other types of promoters have been tested and there is a constant demand for promoters which can orient tissue-specific expression, limiting the expression of the transgene to the target tissue (Gudynaite-Savitch et al. 2009).

In legumes, storage proteins are expressed at high levels during seed filling and thus promoters governing the expression of their genes are currently used for genetic engineering purposes. Among the seed storage protein promoters being used for seed-specific expression in dicots are the ones governing the expression of the soybean  $\beta$ -conglycinin subunits (Chen et al. 1989). These promoters have been characterized functionally (Awazuhara et al. 2002; Caiyin et al. 2007; Naito et al. 2004; Yoshino et al. 2006) and used for development of plants expressing high phytase levels (Chiera et al. 2004; Li et al. 1997) and high arachidonic acid content (Chen et al. 2006). Others have used these promoters to reorient the metabolic flow in soybeans leading to the accumulation of high levels of oleic acid (Kinney, 1996) and to silence the gene encoding the allergenic protein Gly mBd 30 K (Herman et al. 2003).

As new transgenic cultivars are constantly being released, there is a growing interest for the characterization of new specific promoters (Chiera et al. 2007). For dicots, especially for legume species, the promoters governing the expression of Bowman-Birk protease inhibitors (BBI) might be an interesting alternative. These proteins accumulate at high levels in soybean seeds (Birk et al. 1963, Bowman, 1946) and together with the Kunitz trypsin inhibitors (KTI) they represent approximately 6% of the total protein present in the seed (Baek et al. 1994). However, the use of these promoters for genetic engineering purposes has not been evaluated so far.

As the expression level of a gene reflects the activity of its promoter, the main goal of the present work was to compare the expression levels of the gene encoding BBI-D with that of the gene encoding the  $\beta$ -conglycinin  $\alpha$  subunit and infer on the potential use of the BBI-D promoter to orient seed-specific expression in soybean and possibly in other dicot species.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Developing soybean seeds of the commercial cultivar 'CAC-1' were harvested in the greenhouse along eight developmental stages according to their fresh weight: 1<sup>st</sup> - 0 to 75 mg; 2<sup>nd</sup> - 76 to 150 mg; 3<sup>rd</sup> - 151 to 225 mg; 4<sup>th</sup> - 226 to 300 mg; 5<sup>th</sup> - 301 to 375 mg; 6<sup>th</sup> - 376 to 450 mg; 7<sup>th</sup> - 451 to 525 mg and 8<sup>th</sup> - mature seeds. Root, stem and leaf samples were also collected.

*BBI-D* seed specific expression was determined by conventional RT-PCR in roots, stem, leaves and seeds. *BBI-D* expression along seed development was determined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR).

Total RNA was extracted with a phenol:chloroform procedure (Sambrook et al. 1989) and treated with DNase I to remove genomic DNA. Synthesis of the first cDNA strand primed by oligo d(T) was performed with the SuperScript First Strand-Synthesis System kit (Invitrogen, Grand Island, NY) according to the manufacturer's instructions. For the PCR reactions specific primers were used (Table 1).

Conventional RT-PCR was conducted in an MasterCycle Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) according to the following conditions: one initial step at 94 °C for 4 min followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s; the last cycle was followed by an extension step at 72 °C for 4 min. The soybean actin gene was used as internal control.

The qRT-PCR was conducted in a 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) using a SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. A negative control (no cDNA) was included for each set of primers. The *GAPDH* gene was used as endogenous reference to normalize the data and to determine the relative abundance of the transcripts by the  $2^{-\Delta Ct}$  method (Livak and Schmittgen, 2001). PCR

efficiency for each primer set was determined by standard curve analysis. Three biological samples and three technical replicates for each biological sample were used.

**Table 1:** Forward (F) and reverse (R) primers used for RT-PCR.

Gene (AN)	Primers	Amplicon Size
<i>BBI-D</i> <sup>a</sup> (X68706)	(F) 5' ATGAGTTTGAAGAACAACAT 3' (R) 5' CTAGTCATCTCTGGACTTGC 3'	327 bp
<i>BBI-D</i> <sup>b</sup> (X68706)	(F) 5' TTGACACCAACGACTTCTGC 3' (R) 5' GGCTTCGTCCATTTGAGAGA 3'	83 bp
$\alpha\beta$ - <i>C</i> <sup>b</sup> (AB197785)	(F) 5' GATGAGGAACAAGATGAACGTCAAT 3' (R) 5' CTTGCTTTGCTCTTTCCTTC 3'	70 bp
<i>GAPDH</i> <sup>b</sup> (DQ192668)	(F) 5' GGGTGGTGCAAAGAAGGTTATTA 3' (R) 5' TCGTTGACACCAACAACAACA 3'	72 bp
<i>Actin</i> <sup>a</sup> (U60496)	(F) 5' CCCCTCAACCCAAAGGTCAACAG 3' (R) 5' GGAATCTCTCTGCCCAATTGTG 3'	480 bp

AN – Accession Number (*GenBank*)

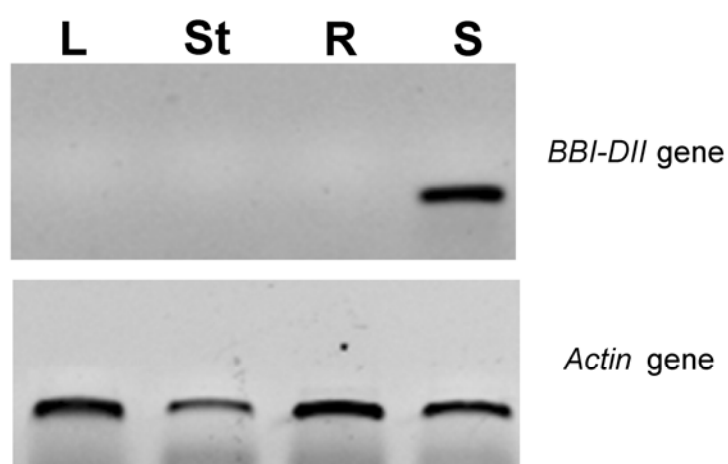
<sup>a</sup> – Primers used for conventional RT-PCR.

<sup>b</sup> – Primers used for qRT-PCR.

Regulatory DNA elements present in the 5' upstream sequence of the  $\alpha\beta$ C and *BBI-D* genes were identified using Plant Cis-Acting Regulatory DNA elements (PLACE) database (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) (Higo et al. 1999) and the Signal Scan software (Pestridge 1991). Upstream DNA sequences of both genes from position -1500 to the translation start codon (+1) were downloaded from Glyma 1 annotation (Glyma16g33400 and Glyma20g28650, respectively) (<http://www.phytozome.net>) and used for promoter analysis.

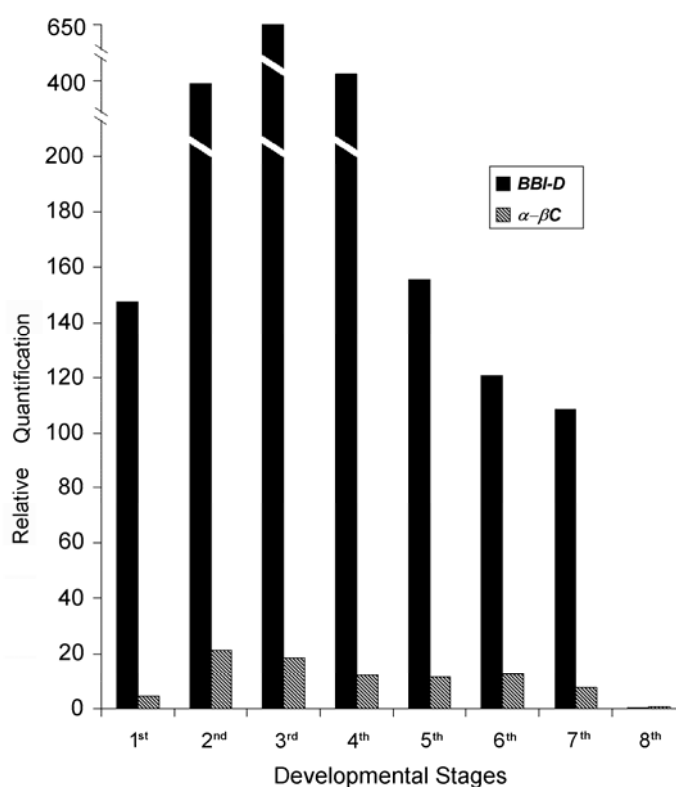
### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The experiments using conventional RT-PCR indicated that expression of the *BBI-D* gene is restricted to the seed. No transcripts were detected in root, stem or leaf (Figure 1).



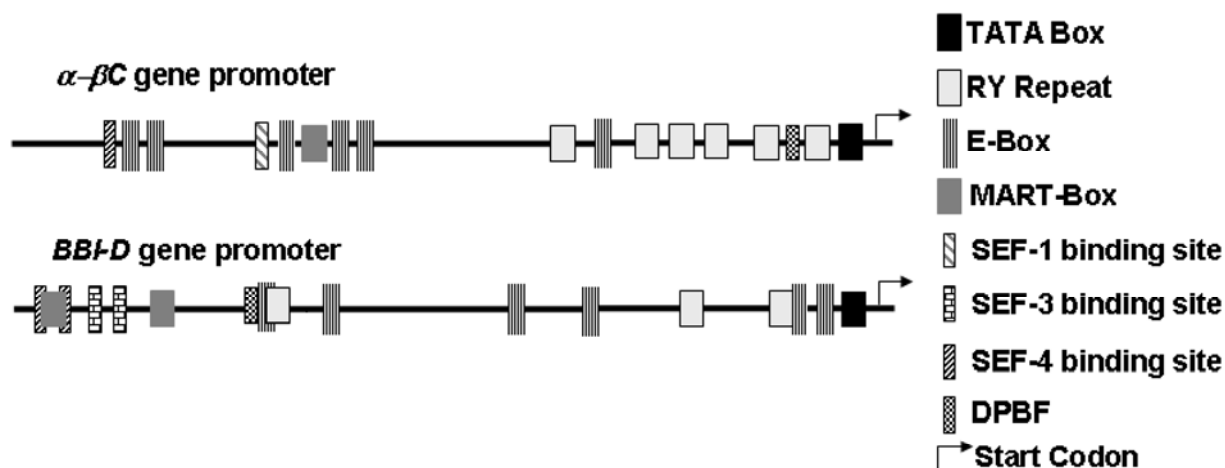
**Figure 1:** Analysis of the *BBI-D* gene expression in different soybean tissues by conventional RT-PCR (R = Root, St = Stem, L = Leaf, and S = Seed).

The expression levels of the *BBI-D* and  $\alpha$ - $\beta$ C genes were determined along the development of soybean seeds by qRT-PCR. The expression of genes encoding both proteins was detected in all development stages analyzed except for the 8th stage (mature seeds) where the expression levels of both genes were negligible. The expression of the *BBI-D* gene was higher than that of  $\alpha$ - $\beta$ C in all stages (Figure 2). Relative *BBI-D* mRNA levels were between 9.4 and 37.1 times higher than those of the  $\alpha$ - $\beta$ C gene along seed development. As the strength of the promoter is directly related with the expression level of the gene under its control, one can assume that the *BBI-D* promoter is extremely strong.



**Figure 2:** Quantitative RT-PCR analysis of Bowman-Birk D (*BBI-D*) and  $\beta$ -conglycinin  $\alpha$ -subunit ( *$\alpha$ - $\beta$ C*) genes expression during soybean seed development.

To get a better insight of the structure of the *BBI-D* promoter in relation to the  *$\alpha$ - $\beta$ C* promoter, we did an *in silico* analysis of a region corresponding to approximately 1,500 bp upstream the start codon of the genes (Figure 3). According to Yoshino et al. (2006) the soybean  *$\alpha$ - $\beta$ C* promoter region contains elements related with seed-specific expression – binding sites for embryony factors (SEF) 1, 3, and 4; E-Box (Kawagoe and Murai 1992), RY motifs (Dickinson et al. 1988), and one binding site for the DC3 factor (Kim et al. 1997). The RY motif are important for seed specific expression while the other elements are critical for gene regulation (Fujiwara and Beachy 1994; Sakata et al. 1997). Similar *cis*-elements were also found by Caiyin et al. (2007) in the  *$\alpha$ - $\beta$ C* promoter region. We detected the same *cis*-elements in our *in silico* analysis of the *BBI-D* promoter region demonstrating that this region contains elements necessary for seed specific expression of transgenes during seed development. In addition to the elements mentioned matrix attachment regions (MAR) were found flanking the  *$\alpha$ - $\beta$ C* and *BBI-D* genes which can act to enhance transcription when included in transgenic constructs (van der Geest and Hall 1997).



**Figure 3:** Comparison of putative regulatory *cis* elements of the promoter regions between *α-βC* and *BBI-D* genes.

Although transformation experiments using the *BBI-D* promoter to direct the expression of specific genes to dicot seeds are necessary, our data strongly indicate that this is a promising promoter that can be used for this purpose. It is a strong promoter which is active during soybean seed development and whose activity is specifically detected in the seed.

#### 4. REFERENCES

- Awazuhara M, Hoyeun K, Goto DB, Matsui A, Hayashi H, Chino M, Kim S, Naito S, Fujiwara T (2002) A 235-bp region from a nutritionally regulated soybean seed-specific gene promoter can confer its sulfur and nitrogen response to a constitutive promoter in aerial tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 163: 75-82. doi:10.1016/S0168-9452(02)00064-X
- Baek J-M, Song J-C, Choi YD, Kim SI (1994) Nucleotide sequence homology of cDNAs encoding soybean Bowman-Birk type proteinase inhibitor and its isoforms. *Biosci Biotech Biochem* 58: 843-846
- Birk Y, Gertler A, Khalef S (1963) A pure trypsin inhibitor from soya beans. *Biochem J* 87: 281-284
- Bowman DE (1946) Differentiation of soybean anti-tryptic factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 63: 547-550.
- Caiyin Q, Li M, Wei D, Cai Y, Xing L (2007) Isolation and sequencing analysis on the seed-specific promoter from soybean. *Front Agric China* 1: 17-23. doi:10.1007/s11703-007-0003-1
- Chen L, Naito S, Nakamura I, Beachy RN (1989) Regulated expression of genes encoding soybean beta-conglycinins in transgenic plants. *Dev Genet* 10: 112-122
- Chen R, Matsui K, Ogawa M, Oe M, Ochiai M, Kawaxhima H, Sakuradani E, Shimizu S, Ishimoto M, Hayashi M, Murooka Y, Tanaka Y (2006) Expression of  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$  desaturase and GLELO elongase genes from *Mortierella alpine* for production of arachidonic in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds. *Plant Sci* 170: 399-406. doi: [10.1016/j.plantsci.2005.09.006](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.09.006)
- Chiera JM, Finer JJ, Grabau EA (2004) Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability. *Plant Mol Biol* 56, 895-904. doi:10.1007/s11103-004-5293-6

Chiera JM, Bouchard RA, Dorsey SL, Park E, Buenrostro-Nava MT, Ling PP, Finer JJ (2007) Isolation of two highly active soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) promoters and their characterization using a new automated image collection and analysis system. *Plant Cell Rep* 26: 1501-1509. doi:10.1007/s00299-007-0359-y

Dickinson CD, Evans RP, Nielsen NC (1988) RY repeats are conserved in the 5'-flanking regions of legume seed-protein genes. *Nucleic Acids Res* 16: 371

Fujiwara T, Beachy RN (1994) Tissue-specific and temporal regulation of a  $\beta$ -conglycinin gene: roles of the RY repeat and other *cis*-acting elements. *Plant Mol Biol* 24: 261-272. doi: 10.1007/BF00020166

Gudynaite-Savitch L, Johnson DA, Miki BLA (2009) Strategies to mitigate transgene-promoter interactions. *Plant Biotechnol J* 7: 472-485. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00416.x

Hwang DL, Yang W-K, Foard DE (1978) Rapid release of protease inhibitors from soybeans. *Plant Physiol* 61:30-34

Herman EM, Helm RM, Jung R, Kinney AJ (2003) Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol* 132: 36-43

Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nuclei Acids Res.* 27: 297-300

Kawagoe Y, Murai N (1992) Four distinct nuclear proteins recognize *in vitro* the proximal promoter of the bean seed storage protein  $\beta$ -phaseolin gene conferring spatial and temporal control. *Plant J* 2: 927-936. doi: 10.1046/j.1365-313X.1992.t01-6-00999.x

Kim SY, Chung H-J, Thomas TL (1997) Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the *Dc3* promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J* 11: 1237-1251. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11061237.x

Kinney JA (1996) Development of genetically engineered soybean oils for food applications. *J Food Lipids* 3: 273-292. doi:10.1111/j.1745-4522.1996.tb00074.x

Li J, Hegeman CE, Hanlon RW, Lacy GH, Denbow DM, Grabau EA (1997) Secretion of active recombinant phytase from soybean cell-suspension cultures. *Plant Physiol* 114: 1103-1111

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods* 25: 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262

Naito S, Inaba-Higano K, Kumagai T, Kanno T, Nambara E, Fujiwara T, Chino M, Komeda Y, Fujiwara T, Chino M, Komeda Y (2004) Maternal effects of *mtol* mutation, that causes overaccumulation of soluble methionine, on the expression of a soybean  $\beta$ -conglycinin gene promoter-*GUS* fusion in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 35: 1057-1063

Pestridge DS (1991) SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *Comput Appl Biosci* 7: 203-206

Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan C (2004) Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40: 1-22. doi: 10.1079/IVP2003477

Sakata Y, Chiba Y, Fukushima H, Matsubara N, Habu Y, Naito S, Ohno T (1997) The RY sequence is necessary but not sufficient for the transcription activation of a winged bean chymotrypsin inhibitor gene in developing seeds. *Plant Mol Biol* 34: 191-197. doi: 10.1023/A:1005841125832

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

van der Geest AHM, Hall TC (1997) The  $\beta$ -phaseolin 5' matrix attachment region acts as an enhancer facilitator. *Plant Mol Biol* 33: 553-557. doi: 10.1023/A:1005765525436

Yoshino M, Nagamatsu A, Tsutsumi K, Kanazawa A (2006) The regulatory function of the upstream sequence of the  $\beta$ -conglycinin  $\alpha$ -subunit gene in seed-specific transcription is associated with the presence of the RY sequence. *Genes Genet Sys.* 81: 135-141

## CAPÍTULO 3

### TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE NÓS COTILEDONARES DE SOJA PARA O SILENCIAMENTO GÊNICO, VIA INTERFERÊNCIA POR RNA, DO INIBIDOR DE PROTEASE DO TIPO BOWMAN-BIRK A

#### RESUMO

A soja é uma das principais *commodities* agrícolas do mundo e, cada vez mais, tem sido utilizada na alimentação humana e animal, dentre outros motivos, por ser uma fonte protéica de boa qualidade. No entanto, adversidades nutricionais e outros efeitos que se seguem à ingestão de soja *in natura* são atribuídos à presença de inibidores endógenos de enzimas digestivas, como os inibidores do tipo Bowman-Birk. A redução desses inibidores em sementes de soja aumentaria a biodisponibilidade de aminoácidos obtidos a partir de alimentos derivados da soja. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi transformar nós cotiledonares de soja visando ao silenciamento gênico, via interferência por RNA, dos inibidores BBI-A em sementes de soja. Nos experimentos utilizando o clone pBBIAi 1800 nós cotiledonares foram transformados, 16 brotos alongaram e desses, 11 desenvolveram raízes. Sete plântulas foram estabelecidas em casa de vegetação e todas elas apresentaram desenvolvimento frágil, maturação fisiológica precoce e quase nenhuma produção. Pequenas amostras de folhas foram coletadas para a extração de DNA e análise molecular desses eventos. As análises moleculares foram realizadas por meio de PCR. Três amostras apresentaram resultado positivo. A baixa eficiência (0,16%) de transformação e alta frequência de escapes estão de acordo com relatos da literatura. Pode-se concluir que o sistema adotado é adequado mas, para trabalhos futuros, modificações relacionadas principalmente ao sistema de seleção e à regeneração dos brotos transformados devem ser consideradas.

Palavras-chave: Bowman-Birk A, transformação de soja, RNAi.

## 1. INTRODUÇÃO

Originária da China, a soja é uma das principais *commodities* agrícolas do mundo e, cada vez mais, tem sido utilizada na alimentação humana e animal. Embora seja considerada uma fonte protéica de boa qualidade, a soja possui fatores antinutricionais, como inibidores de protease, fitato, lectinas e fatores alergênicos, que limitam sua utilização como fonte de alimento. Adversidades nutricionais e outros efeitos que se seguem à ingestão de soja *in natura* são atribuídos à presença de inibidores endógenos de enzimas digestivas, como os inibidores do tipo Bowman-Birk (BBI) (Friedman e Brandon 2001). A redução desses inibidores em sementes de soja aumentaria a biodisponibilidade dos aminoácidos obtidos a partir de alimentos derivados da soja *in natura*.

Muitos esforços têm sido empregados para a utilização da engenharia de vias metabólicas para alterar a constituição nutricional das plantas. Para a redução dos níveis de produtos gênicos indesejáveis, dois métodos têm sido comumente utilizados: a interrupção (*knockout*) e o silenciamento de genes (Tang et al. 2007). Das metodologias de silenciamento gênico induzido por RNA dupla fita (dsRNA), a interferência por RNA (*RNA interference*), que utiliza estruturas em *hairpin* para ativar o silenciamento, é a mais eficiente (Smith 2000). Essa tecnologia é uma ferramenta molecular de alto poder para gerar variedades com características agroindustriais importantes, mas não disponíveis na natureza, como é o caso de soja com reduzidos teores de BBI. Por isso, o programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV, buscando melhorar seu germoplasma e atender as novas demandas do mercado, investe agora, por meio desta tecnologia, na produção de variedades transgênicas de interesse agroindustrial. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolo e transformar nós cotiledonares para redução, via silenciamento gênico, dos teores de BBI-A em sementes de soja.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Silenciamento gênico mediado por RNA e sua aplicação no melhoramento de culturas agronomicamente importantes

Pequenos RNAs (sRNAs) estão envolvidos em diversos fenômenos que são essenciais para a estabilidade do genoma, desenvolvimento e respostas adaptativas a estresses bióticos e abióticos. Seu modo de ação é também diverso. Eles guiam a eliminação de DNA durante a formação de macronúcleos em protistas e de heterocromatina em fungos e plantas. Em animais e plantas, eles são direcionados à clivagem de mRNAs endógenos e à inibição da transcrição; controlam o movimento de elementos transponíveis; e, ainda, protegem estes organismos contra infecções virais por meio de um “sistema imune” baseado em RNA (Vaucheret, 2006).

As características que definem os pequenos RNAs são o seu tamanho pequeno (20 a 30 nucleotídeos - nt) e sua associação com membros da família das proteínas Argonauta (AGO), as quais eles guiam para seus alvos regulatórios, o que tipicamente resulta na redução da expressão do gene alvo. Proteínas Argonauta são caracterizadas por dois domínios – MID/Piwi (o motivo MID se liga ao 5' do siRNA guia e o motivo Piwi tem atividade de ribonuclease) e PAZ (este domínio se liga ao terminal 3' do siRNA guia) (Guiladiyal e Zamore, 2009).

O processo de interferência por RNA estimulado por dsRNA exógenos foi descrito pela primeira vez em *Caenorhabditis elegans* (Fire et al. 1998). Nesse caso, os dsRNAs exógenos são clivados em siRNAs por uma Dicer – uma ribonuclease do tipo III específica para dsRNAs. Os siRNAs produzidos são dupla-fita, possuem ~21 nt e uma protuberância de 2 nts nos terminais 3' (ZAMORE et al. 2000). A fita que direciona o silenciamento é chamada de fita guia, enquanto a outra, que é destruída, é a fita passageira. A estabilidade termodinâmica dos terminais 5' das duas fitas no siRNA dupla-fita determina a identidade da fita guia e da fita passageira (Schwarz et al. 2003). A regulação mRNA alvo é mediada pelo complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) que é constituído por uma proteína Argonaute e pelo ssRNA guia (Hammond et al. 2000) além de proteínas auxiliares que estendem ou modificam sua função; por exemplo, proteínas que redirecionam o mRNA alvo ao sítio de degradação de mRNAs (Liu et al. 2005).

Plantas apresentam uma surpreendente diversidade de sRNAs e de proteínas envolvidas na sua biossíntese. Em *Arabidopsis* foram identificadas 4 proteínas Dicer-like (DCL) e 10 Argonautas, com funções únicas e/ou redundantes e o silenciamento de seqüências endógenas pode ser obtido em baixa freqüência utilizando transgenes *sense* ou *antisense* e, em alta freqüência, utilizando transgenes com seqüências invertidas (*hairpin*). A expressão desses transgenes produz dois tipos de siRNAs – de 21 e 24 nt (Tang et al. 2003). Os siRNAs de 21 nt são produzidos pela DCL4, mas na sua ausência, DCL2 pode substituí-la produzindo siRNAs de 22 nt (Gascioli et al. 2005). Todos os siRNAs são metilados pela proteína HEN 1 (HUA ENHANCER1) que catalisa a metilação de terminais hidroxila livres e protegem os siRNAs da oligo uridilação, uma modificação que promove a instabilidade dos sRNAs (Li et al. 2005). Os siRNAs produzidos pela DCL4, geralmente, se associam a AGO1 e guiam a clivagem do mRNA. Já os siRNAs de 24 nt podem se associar a AGO4 (rota principal) ou AGO6 (rota alternativa) e promover o silenciamento por meio de alterações na cromatina (Chan, 2008). Além disso, em plantas, RNA polimerases dependente de RNA (RdRPs) amplificam o sinal de silenciamento. Inicialmente, siRNAs primários (originados pela clivagem de dsRNAs exógenos pela Dicer) se ligam ao seu mRNA alvo e direcionam sua clivagem por meio das proteínas AGO (Sijen et al. 2001). A RdRP6 utiliza esses fragmentos de transcrito como molde para a síntese de dsRNAs que serão processados em siRNAs secundários. Os siRNAs secundários são formados pela DCL4 a partir de dsRNAs produzidos a partir dos terminais 5' e 3' do mRNA endógeno clivado, sugerindo que a clivagem do mRNA alvo pode ser o sinal para a amplificação dos siRNAs. A amplificação do sinal de silenciamento é especialmente importante na defesa das plantas contra infecções virais (Baulcombe 2004).

As primeiras culturas geneticamente modificadas já usaram a ação de sRNAs, mesmo com o seu mecanismo celular ainda não sendo completamente entendido à época. Por exemplo, o tomate “FlavrSavr”, aprovado em 1992 pela Calgene, apresenta amadurecimento mais lento por meio da supressão, via RNA antisense, da enzima poligalacturonase (Sheehy et al. 1988).

A utilização do silenciamento via RNA como ferramenta biotecnológica pode aumentar o valor nutritivo das culturas, eliminar compostos alergênicos, criar macho-

esterilidade para fins de melhoramento, diminuir compostos tóxicos e modificar várias outras características de interesse (Newell-Glounhlin, 2008).

Metodologias utilizando RNAi de forma semente específica foram utilizadas para gerar uma variedade de milho com alto conteúdo de resíduos de lisina por meio do silenciamento da expressão das proteínas de reserva 22kDa, um grupo de proteínas abundantes no milho, mas pobres em conteúdo de lisina. Um mutante natural rico em lisina já havia sido isolado, mas este apresentava efeitos adversos na qualidade e na produção das sementes. A regulação negativa do gene que codifica a proteína de 22 kDa, via RNAi, gera sementes normais e de boa qualidade com altos teores de proteínas ricas em lisina ou de lisina livre (Segal et al. 2003).

Outro exemplo é o algodão que é uma cultura utilizada, principalmente, para a produção de fibras. Mas, em países em desenvolvimento, os resíduos de sementes que sobram após a extração da fibra poderiam ser utilizadas como fonte de proteínas e calorias. Isso não tem ocorrido porque estas sementes contêm um terpenóide tóxico, o gossipol. Neste sentido, plantas transgênicas de algodão expressando uma construção para silenciamento do gene que codifica a  $\sigma$ -cadieno sintase fusionado a um promotor semente específico proporcionou a redução dos níveis de gossipol nesse órgão, enquanto que seu conteúdo nos outros tecidos foi comparável ao das plantas controle (Sunilkumar et al. 2006).

Uma significativa parte da dieta humana é composta de hortaliças. Entre estas, o tomate é relativamente rico em uma série de vitaminas, bem como outros metabólitos importantes para a saúde, como o licopeno, um carotenóide antioxidante forte. Carotenóides são sintetizados pela mesma via biossintética da clorofila, e tem sido mostrado que genes que controlam a regulação da fase da fotossíntese dependente de luz, também influenciam na qualidade do tomate por alterar os níveis de carotenóides e flavonóides (Adams-Phillips, 2004). A supressão, via RNAi, da expressão do gene *DE-ETHILATED1* (*DET1*), que reprime várias vias de sinalização dependente de luz, mostra um aumento nos níveis de flavonóides e carotenóides e efeitos mínimos no crescimento da planta e qualidade do fruto (Davuluri et al. 2005).

Outra grande aplicação da interferência por RNA tem sido a modificação genética do teor de ácidos graxos na fração óleo. Em algodão, por exemplo, a composição de ácidos graxos foi geneticamente modificada por meio do silenciamento de enzimas chave do metabolismo de ácidos graxos como a  $\omega$ 6-

dessaturase e a esteroil-acil  $\Delta 9$ -dessaturase (Liu et al. 2002). A baixa expressão dessas proteínas leva à produção de óleos com alto conteúdo de ácido oléico e ácido esteárico que são ácidos graxos essenciais e saudáveis ao coração humano.

Além de melhorar a qualidade das culturas, pesquisadores estão modificando geneticamente variedades que expressam pequenos RNAs para silenciar genes em insetos, nematóides e patógenos – uma metodologia conhecida como HD-RNAi (*host-delivered* RNAi) (Auer e Frederick, 2009).

RNAi é uma via natural poderosa de resistência a vírus em plantas (Kang et al. 2005; Soosaar et al. 2005). A resistência a vírus de RNA ocorre por meio da perpetuação (via RdRP viral) da degradação sequência-específica de um mRNA viral. Experimentos com tabaco mostraram que HD-RNAi pode ser obtido pela expressão de siRNAs ou dsRNAs complementares a mRNAs de proteínas do capsídeo viral (Lindbo e Dougherty, 2005) de vírus de interesse. HD-RNAi já foi utilizado para a obtenção de mamão (Fitch et al. 1992) e abóbora (Tricoll et al. 1995) resistentes a vírus.

Ao contrário das plantas, os insetos, moluscos e vertebrados parecem não apresentar RdRPs e isso parece ser um problema para o desenvolvimento de HD-RNAi para controlar o ataque de insetos (Price e Gatehouse, 2008). No entanto, trabalhos recentes têm demonstrado que HD-RNAi para resistência a insetos é possível, embora sua eficácia em condições de campo não tenha sido verificada. Baum et al. (2007) mostraram que o silenciamento do gene que codifica uma ATPase vacuolar (V-type ATPase A) de células do intestino de crisomelídeos (coleópteros que atacam o milho) causou uma diminuição da taxa de crescimento e aumentou a mortalidade larval. Plantas transgênicas de milho expressando dsRNAs para ATPase A do tipo V, ATPase E do tipo V e  $\beta$ -tubulina apresentaram significativa redução nos danos causados por crisomelídeos. Outro grupo de pesquisa usou RNAi para explorar metabólitos secundários vegetais e as vias que os insetos utilizam para desintoxicação. Mao et al. (2007) mostraram que HD-RNAi poderia tornar lagartas do algodão mais susceptíveis ao gossipol. Os pesquisadores identificaram uma citocromo P450 mono-oxigenase (CYP6AE14), expresso no intestino e importante para o crescimento larval, que apresenta relação com tolerância ao gossipol. Larvas que se alimentaram de plantas transgênicas de tabaco e *Arabidopsis* produzindo dsRNAs para CYP6AE14, apresentaram uma

redução do nível do mRNA de CYP6AE14, o que levou a uma diminuição na taxa de crescimento e maior sensibilidade ao gossipol. Mais pesquisas devem ser feitas para determinar se HD-RNAi pode ser otimizado para condições de campo como alternativa para a utilização de inseticidas químicos e da endotoxina Bt (Auer e Frederik, 2009).

Recentes estudos sugerem que HD-RNAi também poderia oferecer proteção contra nematóides parasitas de plantas (Fairbairn et al. 2007; Gheysen e Vanholme, 2007; Fuller et al. 2008). Yadav et al. (2006) mostraram que plantas de tabaco, expressando dsRNA que tinham como alvo dois genes do nematóide *Meloidogyne*, apresentaram resistência a *Meloidogyne incognita*. Huang et al. (2006) mostraram que *Arabidopsis* expressando dsRNA para um gene essencial na interação planta-parasita (*16D10*) resultou em resistência efetiva a quatro espécies, economicamente importantes, de *Meloidogyne*.

Pouco progresso tem sido obtido na utilização do RNAi para proteger culturas de bactérias e fungos. Vias metabólicas envolvendo pequenos RNAs são importantes na resposta basal de defesa de plantas contra patógenos. No entanto, alguns efetores bacterianos conseguem suprimir a ativação dessas vias durante o ataque do patógeno. Isso pode ser uma evidência de que, como os vírus, as bactérias têm evoluído para suprimir o silenciamento via RNA e conseguir infectar plantas (Navarro et al. 2008). Ainda assim, Escobar et al. (2001) mostraram que o silenciamento de dois genes bacterianos (*iaaM* e *ipt*) poderiam diminuir a formação de galhas da coroa – causadas por *Agrobacterium tumefaciens* – em *Arabidopsis*.

## **2.2. Transformação de Soja**

Trabalhos envolvendo transformação de soja surgiram nos anos 80, embora ainda fosse uma técnica limitada de melhoramento genético devido à dificuldade de regeneração de plantas férteis e à baixa infectividade dessa cultura por *Agrobacterium tumefaciens*. Os primeiros trabalhos de sucesso envolveram a utilização de *Agrobacterium* para obter plantas regeneradas a partir de nós cotiledonares (Hinchee et al. 1988) e o sistema de biobalística para transformação de meristemas apicais do eixo embrionário (McCabe et al. 1988). A revisão abaixo é baseada em Wildholm et al. (2010).

## 2.2.1. Principais Metodologias

### a) Sistemas de Transformação utilizando Organogênese

Nós cotiledonares: O primeiro registro de transformação e regeneração de soja utilizou o tratamento de nós cotiledonares em suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* (Hinchee et al. 1988). O sistema utilizando nós cotiledonares representa um dos dois principais métodos utilizados para a transformação de soja. Por esse método, sementes são germinadas em meio de cultura e os nós cotiledonares são preparados e feridos para permitir o acesso da *Agrobacterium tumefaciens* ao tecido, o qual então dá origem a múltiplos brotos (Wright et al. 1986). A produção de uma massa proliferativa de brotos formados *de novo* é desejável e as células iniciais que dão origem a esses brotos são o real alvo para transformação. Depois da inoculação com *A. tumefaciens*, os tecidos produzindo brotos são submetidos a uma moderada seleção, na qual os brotos transformados são selecionados. O subsequente alongamento e enraizamento dos brotos é a fase final da regeneração das plantas transgênicas (Widholm et al. 2010). Vários trabalhos utilizando esse sistema já foram relatados (Olhoft et al. 2003; Paz et al. 2004; Zeng et al. 2004; Olhoft et al. 2006; Paz et al. 2006; Xue et al. 2006; Yi et al. 2006).

Nós primários ou caulinares: Utilizando uma metodologia similar à que usa nós cotiledonares, Olhoft et al. (2007) desenvolveram um sistema utilizando nós axilares do caule como explantes para a transformação via *A. rhizogenes*. As etapas seguintes são conduzidas da mesma forma que no sistema que utiliza nós cotiledonares.

Bombardeamento de meristema apical ('shoot tip'): Esta metodologia, produziu o evento que originou a primeira geração da soja RR – Roundup Ready®. Meristema apical do eixo embrionário é minuciosamente preparado e vários deles são submetidos à transformação. Atualmente, esta tecnologia tem sido utilizada com bastante sucesso (Liu et al. 2004; Dang & Wei, 2007), destacando-se o protocolo desenvolvido pela EMBRAPA (Aragão et al. 2000; Nunes et al. 2006; Rech et al. 2008).

### b) Sistema de Transformação de Culturas Embrionárias

Culturas embriogênicas de soja são obtidas por meio de um cultivo preliminar de cotilédones de embriões zigóticos imaturos em meio de cultura contendo altos níveis de uma auxina sintética (2,4 – D). Altos níveis de auxina induzem a formação de embriões, mas inibem seu desenvolvimento. Quando a concentração de auxina é reduzida, os embriões retomam seu desenvolvimento se estiverem em condições adequadas de crescimento. Culturas embriogênicas em proliferação são ideais para a transformação porque os novos embriões são formados na superfície apical de embriões velhos (Finer, 1988) e são um alvo fácil para a introdução de DNA. A transformação de culturas embriogênicas é mais eficiente utilizando bombardeamento de moléculas de DNA (Finer & McMullen, 1991; Sato et al. 1993; Hadi et al. 1996; Stewart et al., 1996; Hazel et al. 1998; Ponappa et al. 1999; Herman et al. 2003; El-Shemy et al. 2004; Khalafalla et al. 2005; Kita et al. 2007).

### **c) VIGS (*Virus-induced gene silencing*)**

Embora seja uma técnica de expressão transiente, ela pode ser muito útil para a caracterização funcional de genes e promotores. Nagamatsu et al. (2007) utilizaram o vetor viral CMV (*Cucumber Mosaic Virus*) – de ampla faixa de hospedeiros – como carreador de uma sequência antisense para um mRNA da chalcona sintase. A infecção de plantas não provocou sintomas característicos da presença viral, mas as sementes, que eram marrons, ficaram amarelas indicando o silenciamento dos genes que codificam a chalcona sintase. Meyer et al. (2009) utilizaram VIGS para caracterizar funcionalmente uma sequência candidata ao gene *Rpp4* que confere resistência à ferrugem asiática da soja.

## **2.2.2. Eventos de Transformação de Soja de Importância Agronômica**

### **a) Resistência a herbicida**

Inquestionavelmente a característica econômica mais importante, que já foi introduzida na soja é a resistência ao herbicida glifosato. Uma sequência de *A. tumefaciens*, que codifica uma forma da enzima EPSPS (*5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase*) insensível ao glifosato, foi isolada e inserida em soja utilizando bombardeamento do meristema apical (McCabe et al. 1988) e a expressão do gene repórter *gusA* foi utilizado para a seleção visual da linhagem de soja resistente ao

herbicida (Padgett et al. 1995). A EMBRAPA e a BASF desenvolveram em conjunto uma variedade de soja resistente a imidazolinonas (Soja CV127), enquanto a BAYER desenvolveu duas variedades resistentes a glufosinato de amônio (Soja Liberty Link - LL eventos A5547 – 127 e A2704 – 12). Os pareceres técnicos de liberação para plantio dessas três variedades no Brasil estão disponíveis no site do CTNBio (<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12482.html>).

## **b) Resistência a insetos**

Stewart et al. (1996) relataram o primeiro evento de soja expressando um “gene inseticida”. Eles bombardearam culturas embriogênicas com uma construção contendo um gene sintético *cry1AC* sob regulação do promotor 35S. A eficiência da expressão da endotoxina Bt no controle de lagartas que atacam a soja tem sido avaliada (Walker et al. 2000; Macrae et al. 2005; Miklos et al. 2007). Uma resistência eficaz é alcançada, particularmente quando cruzamentos são utilizados para piramidar esses eventos com genes de resistência já encontrados em soja (Zhu et al. 2008).

## **c) Resistência a doenças**

O mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, é uma séria doença da soja. Ácido oxálico é secretado pelo fungo como um fator de patogenicidade que danifica o tecido vegetal. Então existe interesse na inserção de um gene que codifica a oxalato oxidase que degrada ácido oxálico a dióxido de carbono e peróxido de hidrogênio. Plantas transformadas carregando um gene de trigo que codifica uma oxalato oxidase, sob o controle do promotor 35S, mostraram um nível de resistência a *S. sclerotiorum* semelhante àquele apresentado por cultivares naturalmente resistentes (Donaldson et al. 2001; Cober et al. 2003). Com relação a doenças causadas por vírus, já foram obtidas variedades de soja resistentes a BPMV (*Bean Pod Mottle Virus*) (Di et al. 1996) e a SMV (*Soybean Mosaic Virus*) (Wang et al. 2001; Tougou et al. 2006).

## **d) Resistência a nematóides**

Ibrahim et al. (2010) utilizaram construções para HD-RNAi de dois genes de *M. incognita* – *tyrosine phosphatase* (TP) e *mitochondrial stress-70 protein precursor* (MSP) – para transformar raízes de soja, via *A. rhizogenes*. Os genes alvo apresentavam alta similaridade com genes do nematóide do cisto da soja (*Heterodera glycines*) e o seu silenciamento reduziu fortemente (92% e 94,7%) a formação de galhas durante a infecção por *M. incognita*. Essa metodologia representa uma solução promissora para o desenvolvimento de variedades de soja com ampla resistência a nematóides.

#### **e) Composição da semente**

Algumas das primeiras transformações da soja foram feitas buscando a alteração da fração óleo da semente utilizaram culturas embriogênicas de forma que as modificações podiam ser quantificadas em embriões maduros, antes da regeneração da planta. Essas transformações buscaram um aumento do acúmulo de ácido oléico nas sementes (Kinney, 1996; Buhr et al. 2002). O aumento do conteúdo de ácido oléico aumenta a estabilidade oxidativa do óleo, diminuindo a necessidade de hidrogenação química do óleo que leva à formação de ácidos graxos do tipo trans, cujo consumo está associado à ocorrência de doenças cardiovasculares (Wildholm et al. 2010).

Vários esforços têm sido feitos para se manipular o conteúdo de isoflavonas em sementes de soja. Yu et al. (2003) utilizaram uma construção com uma fusão dos genes que codificam os fatores de transcrição C1 e R de milho dirigida pelo promotor da  $\beta$ -faseolina que é semente-específico. Plantas expressando esses genes apresentaram um aumento de duas vezes no conteúdo total de isoflavonas.

Ácido fítico ou fitato é um composto de reserva de fósforo utilizado pelas plantas durante a germinação de sementes, quando o fósforo é disponibilizado ao embrião por meio da atividade de uma fitase endógena. Genes que codificam fitases de fungos (Denbow et al. 1998), bactéria (Bilyeu et al. 2008) e soja (Chiera et al. 2004) têm sido introduzidos em soja na tentativa de reduzir os níveis de ácido fítico. A molécula de ácido fítico apresenta carga líquida negativa e se liga fortemente a íons metálicos como Ca, Fe, K, Mg, Mn e Zn tornando-os insolúveis e indisponíveis como fatores nutricionais (Bohn et al. 2008). E, ainda, como a hidrólise do fitato libera fosfato, inositol e micronutrientes que suportam o desenvolvimento do

embrião, transgênicos expressando baixos níveis de fitato apresentam problemas durante a germinação.

Apesar de seu alto conteúdo protéico, a soja apresenta deficiência em metionina. A introdução em soja dos genes que codificam a zeína de 15kDa (Dinkins *et al.* 2001) e  $\gamma$ -zeína (Li *et al.* 2005) de milho resultou em ligeiros aumentos dos conteúdos de cisteína e metionina. Esse modesto aumento nos aminoácidos sulfurados pode ser reflexo da baixa disponibilidade desses aminoácidos nas sementes de soja. Recentemente, uma variedade transgênica de soja apresentando altos níveis de triptofano livre foi desenvolvida por Ishimoto *et al.* (2010).

Herman *et al.* (2003) relataram o silenciamento gênico da maior proteína alergênica da soja (P34) por meio da cossupressão do gene que a codifica. A composição, desenvolvimento, estrutura e ultraestrutura das sementes não foram alteradas, exceto pela remoção da P34.

Kinney *et al.* (2001) também promoveram a cossupressão dos genes que codificam as subunidades  $\alpha$  e  $\alpha'$  da  $\beta$ -conglucina. O conteúdo protéico total não foi alterado visto que mais glicina foi produzida nessas sementes. Quando uma linhagem expressando um gene que codifica GFP foi cruzada com a linhagem deficiente em  $\beta$ -conglucina, o acúmulo de GFP, que originalmente representava 1,6% passou a representar >7% do conteúdo total de proteínas das sementes das linhagens obtidas. Isso sugere que o rebalanceamento do proteoma pode ser explorado para a produção de proteínas heterólogas em sementes de soja (Schmidt e Herman, 2008).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Material vegetal**

Neste trabalho foram utilizadas sementes de soja da variedade comercial CAC-1, desenvolvida pela COOPADAP (Cooperativa Agropecuária do Alto Paranaíba LTDA). CAC-1 é uma variedade semi-tardia (ciclo de 126-145 dias), com teor protéico de ~40%, hábito de crescimento determinado, produtividade em torno de 3360 kg/ha e resistente ao cancro da haste e à mancha olho-de-rã. Além disso, essa variedade se mostra bastante responsiva à cultura de tecidos tanto para indução de embriogênese somática (Gesteira, 2002; Lima, 2005) como para regeneração de brotos induzidos a partir de nós cotiledonares (Mendonça, 2010).

#### **3.2. Plantio, coleta e desinfestação**

Foram plantadas 3 sementes por vaso, cada um deles contendo três litros de solo previamente adubado. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, sob aquecimento controlado ( $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) e fotoperíodo de 14 horas de luz.

Após o amadurecimento fisiológico das sementes, vagens foram coletadas e desinfestadas com etanol 70% (v/v) por 30 s e em solução de hipoclorito de sódio 1% acrescida de Tween 20 (0,01%) por 20 min. Em seguida, as vagens foram lavadas com água destilada estéril, secas e as sementes foram individualizadas e mantidas em dessecador a  $4^{\circ}\text{C}$  até sua posterior utilização.

#### **3.3. Esterilização e germinação das sementes**

Sementes maduras foram superficialmente esterilizadas por 24 h utilizando uma câmara de gás cloro (Di et al. 1996).

As sementes esterilizadas foram inoculadas em meio de germinação (GM, Tabela 01). As placas de Petri (90 X 15 mm) foram vedadas com filme plástico PVC e mantidas a  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sob um fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de  $90 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  até que os cotilédones adquirissem coloração verde e as primeiras folhas verdadeiras tivessem de 4 a 10 mm de comprimento (Olhoft et al. 2006).

**Tabela 1:** Lista de componentes dos meios de cultura utilizados para a transformação de soja utilizando nós cotiledonares como explante.

	<b>GM</b>	<b>CCM</b>	<b>SIM</b>	<b>SEM</b>	<b>RM</b>
Sais MS	-	-	-	1X	-
Sais B5	1X	1/10X	1X	-	1/2X
Fe-EDTA MS	1X	1X	1X	1X	1X
Vitaminas B5	1X	1X	1X	1X	-
Mes	3 mM	20 mM	3 mM	3 mM	3 mM
Sacarose	2%	3%	3%	3%	2%
Gelrite®	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
pH	5,8	5,4	5,6	5,6	5,6
BAP* <sup>1</sup>	-	7,5 µM	7,5 µM	-	-
GA <sub>3</sub> * <sup>2</sup>	-	0,25 mg.L <sup>-1</sup>	-	0,5 mg.L <sup>-1</sup>	-
Acetosseringona*	-	200µM	-	-	-
L-Cisteína*	-	8,8 mM	-	-	-
Tiosulfato de Sódio*	-	1 mM	-	-	-
DTT*	-	1 mM	-	-	-
Glufosinato de Amônio*	-	-	0 e 3 mg.L <sup>-1</sup>	0 e 3 mg.L <sup>-1</sup>	-
Ticarcilina*	-	-	50 mg.L <sup>-1</sup>	50 mg.L <sup>-1</sup>	-
Cefotaxima*	-	-	100 mg.L <sup>-1</sup>	100 mg.L <sup>-1</sup>	-
Vancomicina*	-	-	50 mg.L <sup>-1</sup>	50 mg.L <sup>-1</sup>	-
Asparagina*	-	-	-	50 mg.L <sup>-1</sup>	-
Ácido Piroglutâmico*	-	-	-	100 mg.L <sup>-1</sup>	-
AIA* <sup>3</sup>	-	-	-	0,1 mg.L <sup>-1</sup>	-
Zeatina-ribosídeo*	-	-	-	1 mg.L <sup>-1</sup>	-
AIB* <sup>4</sup>	-	-	-	-	1 mg.L <sup>-1</sup>

\* Filtro-estéreis.

**GM:** Meio de Germinação

1. 6-benzil-aminopurina;

**CCM:** Meio de Co-Cultivo

2. Ácido Giberélico;

**SIM:** Meio de Indução de Brotos

3. Ácido 3-indol acético;

**SEM:** Meio de Alongamento de Brotos

4. Ácido 3-indol butírico

**RM:** Meio de Enraizamento

**Sais MS:** (Murashigue e Skoog 1962) **Sais B5:** (Gamborg et al 1968)

### 3.4. Vetores de transformação e linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*

O vetor pBBIAi (Barros 2006) foi inserido em *Agrobacterium tumefaciens*, linhagem KYTR1 (Torisky et al. 1997) por meio de eletroporação (Sambrook et al. 1989) e utilizado para experimentos de transformação de soja. Esse vetor contém as seqüências invertidas do gene que codifica o inibidor de protease BBI do tipo A sob o controle do promotor 35S (constitutivo). Foi utilizada uma construção para silenciamento de BBI-A porque, segundo Deshimaru et al (2004), BBI-A, em *Glycine soja*, é duas vezes mais exposto que os outros tipos de BBI.

O estoque de *A. tumefaciens*, carregando o vetor binário, foi estriado em meio YEP [peptona (10 g.L<sup>-1</sup>), NaCl (5 g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (5 g.L<sup>-1</sup>), ágar 1,5 % (p/v), pH 7,0] contendo canamicina (50 mg.L<sup>-1</sup>) e rifampicina (100 mg.L<sup>-1</sup>). A cultura foi incubada em BOD a 28°C até a formação de colônias. No dia anterior ao preparo dos explantes, uma colônia foi inoculada em 200 mL de meio YEP líquido acrescido de canamicina (50 mg.L<sup>-1</sup>) e rifampicina (100 mg.L<sup>-1</sup>) e crescida sob agitação (175 rpm) a 28°C até que atingisse uma OD<sub>600</sub> de 0,8. Em seguida, a cultura foi dividida em alíquotas de 50 mL e as células foram concentradas por centrifugação (3270 g/10 min/20°C), ressuspensas em 25 mL de meio de co-cultivo (CCM, Tabela 01) e incubadas à temperatura ambiente por 30 min antes da infecção (Olhoft et al. 2006).

### 3.5. Preparo do explante e infecção

Para a obtenção dos explantes, a raiz e parte do hipocótilo (3-5 mm abaixo do nó cotiledonar) foram excisadas e desprezadas. Os cotilédones foram separados por meio de um corte vertical ao longo do hipocótilo e o epicótilo foi removido para que houvesse quebra da dominância apical e indução *de novo* da proliferação de meristemas axilares. A região do nó cotiledonar foi ferida por meio de cortes realizados perpendicularmente ao hipocótilo e cerca de 50 explantes foram incubados por 30 min em suspensão bacteriana (25 mL). Como o controle negativo da transformação, os explantes foram incubados em 25 mL de meio de co-cultivo líquido. Foram plaqueados 5 explantes por placa, com o lado adaxial voltado para baixo, sobre papel filtro estéril em contato com meio de co-cultivo sólido. As placas foram dispostas em pilhas de cinco, vedadas com filme plástico PVC e incubadas por 5 dias no escuro a 26±1°C (Olhoft et al. 2006; Mendonça, 2010).

### 3.6. Seleção e regeneração de plantas

Após o período de co-cultivo, papel filtro estéril foi utilizado para retirar o excesso de *A. tumefaciens* dos explantes que, em seguida, foram embebidos perpendicularmente em meio de indução de brotos (SIM, Tabela 1) sem agente seletivo de forma que o hipocótilo e o tecido ferido ficavam submersos no meio. Foram colocados 5 explantes por placa e estes permaneceram nesse meio por 10 dias. Após este período, o hipocótilo dos explantes foi retirado e os cotilédones com brotos foram sub-cultivados em meio SIM fresco, acrescido de 5 mg.L<sup>-1</sup> de glufosinato de amônio (Finale<sup>®</sup>, Bayer SA), por 14 dias para a seleção de transformantes (Olhoft et al. 2006). Os explantes controle foram sub-cultivados em meio SIM fresco sem agente seletivo.

Após 28 dias de cultivo em meio SIM, os cotilédones foram excisados, o tecido morto foi retirado e os explantes foram transferidos para o meio de alongamento de brotos (SEM, Tabela 1), contido em frasco do tipo Magenta<sup>®</sup> (Sigma). Esse meio continha 3 mg.L<sup>-1</sup> de glufosinato de amônio no caso de explantes transformados. Após 14 dias, os explantes foram sub-cultivados em meio SEM fresco sem agente seletivo enquanto houvesse brotos alongando. Novos subcultivos em meio fresco foram feitos sempre que necessário (Olhoft et al 2006; Mendonça, 2010).

Brotos alongados, saudáveis e vigorosos foram excisados e inoculados em meio de enraizamento (RM, Tabela 1), contido em tubos de vidro (25 x 150 mm), até que houvesse a formação de raízes (Olhoft et al. 2006), o que demorava, aproximadamente, 10 dias (Mendonça, 2010).

Durante as etapas de seleção e regeneração, as placas, magentas e tubos foram vedadas com Micropore<sup>®</sup> 3M. Todo o processo foi conduzido em sala de cultivo a 26±1°C, sob um fotoperíodo de 16 horas de luz e uma irradiância de 90 μE/m<sup>2</sup>/s.

### 3.7. Aclimação das plantas transformadas

Quando as plântulas apresentaram sistema radicular bem desenvolvido, elas foram retiradas do meio de cultura e mantidas por 3 dias em copos plásticos de 100 mL contendo água, cobertos com plástico e sob condições da sala de cultivo, já

descritas no item anterior. Em seguida, foram transferidas para copos contendo uma mistura de substrato agrícola e casca de coco (1:1). Elas foram mantidas por mais 5 dias em condições de laboratório em um sistema de prateleiras sob 16 horas diárias de iluminação utilizando lâmpadas fluorescentes de 40W.

Posteriormente, as plantas foram transferidas para uma câmara de vidro fechada e mantidas sob um sistema de irrigação artificial tipo nevoeiro, com pulverização de água a cada 12 h por cerca de 8 dias.

Após esse período, as plantas foram transplantadas para vasos com solo, previamente adubado, e mantidas em casa de vegetação a  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$  sob um fotoperíodo de 16 horas de luz até a produção de sementes.

### 3.8. Análise molecular dos transformantes

Para a análise dos transformantes, pequenas amostras de folha foram coletadas e submetidas à extração de DNA de acordo com Doyle e Doyle (1990). O conteúdo de DNA foi estimado em espectrofotômetro ( $A_{260\text{ nm}}$ ) e a sua qualidade foi verificada por eletroforese em minigéis de agarose 0,8%.

A identificação dos transformantes foi realizada por meio de reações de PCR, utilizando os *primers*: 35SF: 5' CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG 3' e BBIA sense R: 5' GGCGGTACCTATCTGAACAGCGGCATTGA 3'. Cada reação de amplificação continha 10ng de DNA genômico; 2,0  $\mu\text{L}$  de PCR Buffer 10X (Invitrogen);  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM; 125  $\mu\text{M}$  de cada um dos quatro dNTPs; 0,25  $\mu\text{M}$  de cada *primer* e 0,5 U de Platinum<sup>®</sup> *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), em um volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma etapa inicial de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 2 min seguida por 35 ciclos ( $94^{\circ}\text{C}$  por 30 s,  $60^{\circ}\text{C}$  por 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  por 45 s) e uma última etapa de extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 min. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, contendo  $0,2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de brometo de etídeo. O padrão de bandas foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

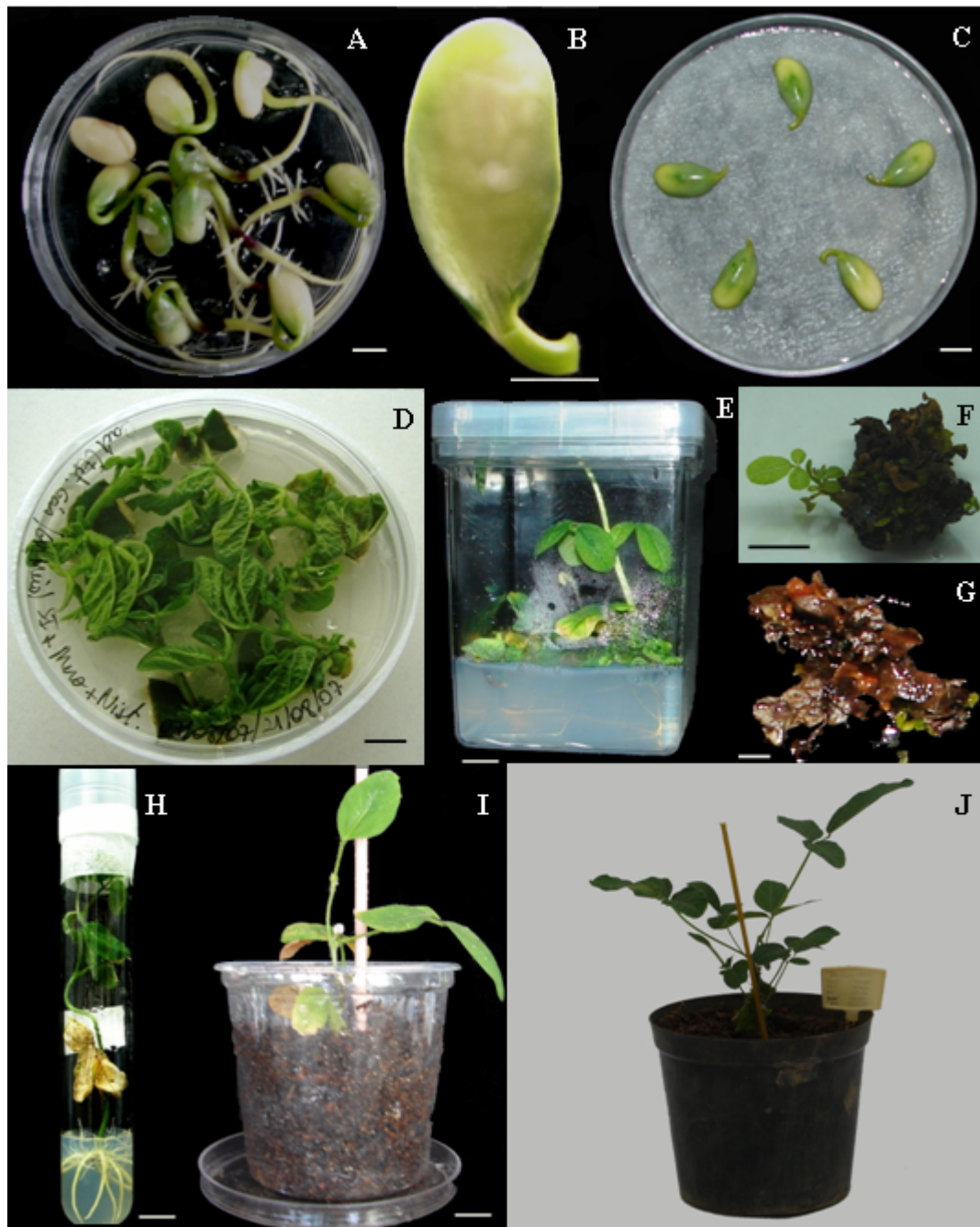
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os experimentos de transformação foram utilizados o clone pBBIAi que foi inserido com sucesso na linhagem KYRT1 de *Agrobacterium tumefaciens*. Em um estudo comparativo Meurer et al. (1998) avaliaram a virulência de diferentes linhagens de *Agrobacterium* em explantes de soja e a linhagem KYRT1 foi considerada mais virulenta que outras linhagens que são frequentemente utilizadas na transformação de plantas, como a EHA105 e a LBA4404.

Foram realizados 12 experimentos utilizando o vetor pBBIAi. Cada experimento foi constituído de 200 explantes – 150 expostos à *Agrobacterium* e 50 controles. As sementes utilizadas para germinação foram desinfestadas eficientemente em câmara de gás cloro. Segundo Paz et al. (2004) a desinfestação a seco (câmara de gás cloro) é eficiente para sementes produzidas em casa de vegetação ou em condições de campo.

Os explantes foram preparados a partir de plântulas de soja de 8 dias de germinação (Figura 1A) e feridos na região do nó cotiledonar (Figura 1B). Após a infecção com *Agrobacterium* e o período de co-cultivo (Figura 1C), a produção *de novo* de brotos foi induzida por 14 dias em meio de cultura sem agente seletivo. Esse período de espera, antes de iniciar a seleção, foi importante para a indução de brotos a partir dos explantes submetidos ao processo de transformação (Figura 1D) (Olhoft et al. 2003). A etapa de seleção foi iniciada transferindo-se os brotos para o mesmo meio de indução, agora contendo 5 mg.L<sup>-1</sup> de glufosinato de amônio. Após mais 14 dias, os brotos já apresentavam folhas amareladas. De acordo com Zeng et al. (2004) a utilização de uma alta concentração de agente seletivo nos primeiros dias de seleção reduz bastante a sobrevivência de plantas parcialmente transformadas (quimeras).

Todos os brotos foram transferidos para o meio de alongação contendo o agente seletivo na mesma concentração (Figura 1E). Após 28 dias nesse meio, os brotos sensíveis ao glufosinato de amônio já estavam completamente necróticos (Figura 1F) e os potencialmente resistentes apresentavam algumas partes verdes (Figura 1G).



**Figura 1: Etapas da transformação de nós cotiledonares de soja.** Germinação (A), preparo do explante (B), co-cultivo com *A. tumefaciens* (C), indução de brotos (D), alongamento dos brotos (E), broto potencialmente transformado (F), brotos sensíveis a glufosinato de amônio completamente necróticos (G), enraizamento (H) e aclimação (I, J). Barra: (A, C, D, E, H e I = 1 cm), (B, F e G = 5 mm).

Os brotos que conseguiram alongar foram, então, submetidos às condições de enraizamento. Cerca de 8-10 dias foram suficientes para o desenvolvimento de raízes saudáveis (Figura 1H) e as plântulas, então, aclimatizadas em sala de cultivo (Figura 1I) e depois em casa de vegetação (Figura 1J).

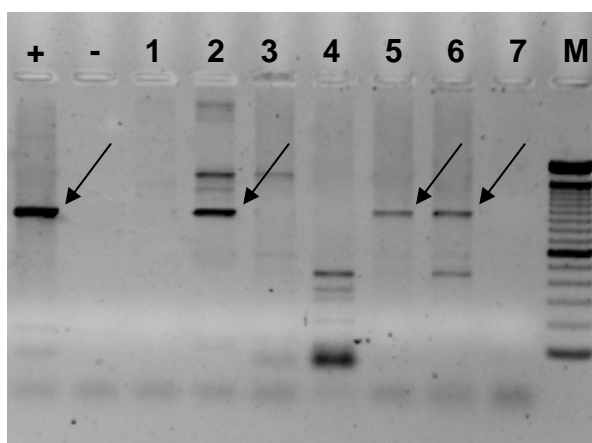
Para o sistema de seleção envolvendo higromicina B, as plântulas que conseguem desenvolver raízes não apresentam dificuldade de se estabelecer como plantas transgênicas férteis (Olhoft et al. 2003). Para sistemas que utilizam seleção baseada em glufosinato de amônio essa correlação não foi relatada e, neste trabalho, não observamos nenhuma relação entre enraizamento e estabelecimento em casa de vegetação.

Nos experimentos utilizando o clone pBBIAi, 1800 nós cotiledonares foram transformados, 16 brotos alongaram e desses, 11 desenvolveram raízes. Sete plântulas foram aclimatizadas e, posteriormente, estabelecidas em casa de vegetação. Os eventos foram denominados CB1, CB2, CB3, CB4, CB5, CB6 e CB7.

Pequenas amostras de folhas foram coletadas de todos os eventos e a extração de DNA foi realizada com sucesso. As reações de PCR positivas geraram um amplicon esperado de ~1000 pb. Três eventos – CB2, CB5 e CB6 – apresentaram as bandas de tamanho esperado (Figura 2), o que representa uma eficiência de transformação inicial de 0,16%. A baixa eficiência e alta frequência de escapes estão de acordo com relatos de alguns trabalhos que utilizaram um sistema de seleção baseado em glufosinato de amônio (Zhang et al. 1999; Olhoft et al. 2001; Paz et al. 2004). Todas as plântulas que constituíram a T0 apresentaram desenvolvimento frágil, maturação fisiológica precoce e quase nenhuma produção de sementes. Além disso, as sementes apresentaram aspecto fenotípico anormal: elas eram bem pequenas e com tegumento enrugado. Por isso, todos os esforços foram direcionados para a multiplicação dessas sementes e nenhuma análise molecular adicional foi feita.

Nós cotiledonares são os explantes mais utilizados para a transformação de soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Uma das maiores vantagens apresentadas por esses explantes é sua facilidade de propagação (Ma e Wu, 2008). Várias adaptações têm sido feitas nesse protocolo para aumentar a eficiência de transformação (Clemente et al. 2000; Olhoft et al. 2001; Paz et al. 2004). Entretanto, a frequência na obtenção de soja transgênica ainda permanece muito

pequena devido principalmente à: (i) ineficiência na transferência do T-DNA da *A. tumefaciens* para as células da região do nó cotiledonar; (ii) ineficiência na seleção de células transgênicas em proliferação; (iii) dificuldades na regeneração das plantas (Olhoft et al 2003).



**Figura 2: Análise molecular dos eventos transformantes por PCR.** Nas duas primeiras canaletas estão os controles positivo (+) e negativo (-) e os números de 1 a 7 indicam as sete plantas aclimatadas. As setas apontam o amplicom de interesse (~1000 pb) e M se refere a uma marcador de 100 pb (INVITROGEN).

A eficiência na transferência do T-DNA tem sido melhorada com a utilização de linhagens supervirulentas de *A. tumefaciens* e a adição de compostos tiol ao meio de co-cultivo. Compostos tiol, como DTT, L-cisteína e tiosulfato de sódio, quando adicionados ao meio de co-cultivo, inibem as respostas de defesa induzidas por ferimentos e patógenos aumentando a capacidade de transformação da *A. tumefaciens* (Olhoft et al. 2001). Além disso, esses compostos inibem a necrose e a morte celular que são induzidas pelo ferimento na região do nó cotiledonar.

Uma estratégia de seleção efetiva é muito importante para o desenvolvimento de um sistema de transformação. A efetividade do sistema de seleção depende de muitos fatores incluindo o tipo de tecido, o tamanho do explante, propriedades químicas e concentração do agente seletivo e o tempo de seleção (Bowen, 1993).

Os principais marcadores de seleção utilizados em sistemas baseados em nós cotiledonares que produziram plantas transgênicas são o gene *bar* que codifica a fosfinotricina acetil transferase (PAT) (Zang et al. 1999; Paz et al. 2004; Zeng et al. 2004; Paz et al. 2006) e o gene *hpt* que codifica a higromicina fosfotransferase (HTP) (Olhoft et al. 2003; Liu et al. 2008).

O herbicida glufosinato de amônio (fosfinotricina), é estruturalmente similar ao L-glutamato, substrato da glutamina sintetase (GS) e atua como um inibidor da GS. A GS catalisa a conversão de glutamato em glutamina, removendo amônia livre da célula. Essa enzima tem um papel essencial no metabolismo de nitrogênio e na regulação da assimilação da amônia. Quando GS é inibida, o acúmulo de amônia associado com a desestruturação dos cloroplastos promove a inibição da fotossíntese e a morte celular. A acetilação do herbicida pela enzima PAT impede a sua ligação com GS e, conseqüente, a inativação desta enzima (Aragão et al. 2002). Já a enzima HTP catalisa a fosforilação da higromicina e a inativa. Quando ativa, a higromicina ocupa o sítio de ligação ao ribossomo do fator de alongação 2 (EF2) interrompendo a síntese de proteínas em células procarióticas ou mitocôndrias e cloroplastos em células eucarióticas. Na presença do antibiótico, o tecido vegetal apresenta clorose causada pela inibição da síntese de clorofila e do crescimento (Aragão et al. 2002). As diferenças nos modos de ação dos agentes seletivos e de sua desintoxicação podem explicar a maior eficiência de seleção quando se utiliza higromicina B, especialmente quando se considera o tamanho da região produtora de brotos que se forma na região do nó cotiledonar (Olhoft et al. 2003). Como a higromicina B é um antibiótico potente que inibe o alongamento do peptídeo, células transformadas não provêm as células não-transformadas com metabólitos que possam sobrepor o efeito do agente seletivo, o que pode ocorrer quando se utiliza seleção com glufosinato de amônio (D'Halluin et al. 1992). O regime de seleção baseado em glufosinato de amônio resulta em morte lenta dos brotos não transformados, indução de calos nos explantes, alta frequência de escapes (plantas não transformadas que sobrevivem à seleção) e brotos cloróticos com crescimento lento. A rápida morte celular dos brotos sensíveis a higromicina permite o crescimento e o desenvolvimento de brotos saudáveis e resistentes, o que aumenta a eficiência de transformação e probabilidade da produção de plantas transgênicas férteis (Olhoft et al. 2003).

No entanto, apesar de mais eficiente, a estratégia de seleção baseada em higromicina é vista com restrições quando o objetivo é a obtenção de variedades para liberação ao mercado. Isso por causa da possibilidade, embora pequena, da transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos para a microbiota no ambiente. No Brasil, por exemplo, as quatro variedades transgênicas liberadas para plantio apresentam marcas de seleção baseadas em herbicidas - GTS 40-3-2 (Tolerante ao Glifosato), Soja CV 127 (tolerante a herbicidas do grupo químico das imidazolinonas), Soja A 5547-127 (tolerante a Glufosinato), Soja A 2704-12 (tolerante a Glufosinato) (<http://www.agricultura.gov.br>).

Mesmo com todas essas modificações, a frequência de regeneração de brotos ainda permanece baixa e o período de regeneração muito longo (Ma e Wu, 2008). A produção de plantas transgênicas férteis requer um curto período de regeneração (Liu et al. 2004). A principal causa desses problemas durante a regeneração pode ser devido principalmente ao preparo do explante. Antes da infecção bacteriana, é necessário que a região do nó cotiledonar seja ferida para que haja a liberação dos compostos fenólicos indutores das funções *vir* da agrobactéria (Villemont et al. 1997) e ocorra a desorganização tecidual estimulando a indução *de novo* de brotos próxima à superfície das regiões feridas (Wright et al. 1986) e promovendo acesso às células alvo (Olhoft et al. 2003). Assim, as células danificadas rapidamente se desdiferenciam em calos quando expostas a altas concentrações de BAP, o que acontece quando os explantes são transferidos para o meio de indução de brotos. Calos em proliferação podem competir com os meristemas axilares na absorção de nutrientes, comprometendo a capacidade de regeneração dos brotos.

Considerando todas estas questões, pode-se concluir que o sistema adotado no presente trabalho é adequado, no entanto, para trabalhos futuros, modificações relacionadas principalmente ao processo de seleção e ao tempo de regeneração dos brotos transformados devem ser consideradas e refinadas.

## 5. CONCLUSÕES

- Foi possível transformar nós cotiledonares e induzir e alongar brotos a partir dos mesmos. Sete plantas foram regeneradas e aclimatadas: 3 transformadas e 4 escapes;
- As três plantas transformadas apresentaram desenvolvimento frágil, maturação fisiológica precoce e quase nenhuma produção de sementes. E, ainda, as sementes produzidas apresentaram aspecto fenotípico anormal.
- Para futuros experimentos de transformação, modificações no sistema de seleção e no tempo de regeneração dos brotos transformados devem ser consideradas e refinadas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams-Phillips L, Barry C, Giovannoni J (2004) Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends Plant Sci* 9: 331-338.

Aragão FJL, Sarokin L, Vianna GR, Rech EL (2000) Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theor Appl Genet* 101.

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

Auer C, Frederick R (2009) Crop improvement using small RNAs: applications and predictive ecological risk assessment. *Trend Biotechnol* 27: 644-651.

Barros BA (2006) Construção de cassetes de expressão para silenciamento gênico de fatores antinutricionais da soja, via interferência por RNA. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa.

Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363.

Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J (2007) Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol* 25: 1322-1326.

Bilyeu KD, Zheng P, Coello P, Zhang ZJ, Krishnan HB, Bailey A, Beuselinck PR, Polacco JC (2008) Quantitative conversion of phytase to inorganic phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase. *Plant Physiol* 146: 468-477.

Bohn L, Meyer AS, Rasmussen SK (2008) Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J Zhejiang Univ Sci B* 9:165-191.

Bowen BA (1993) Markers for plant gene transfer. In: Kung S, Wu R (eds) *Transgenic plants: engineering and utilization*, vol 1, Academic Press, San Diego, pp 89-123.

Buhr T, Sato S, Ebrahim F, Xing A, Zhou Y, Mathiesen M, Schweiger B, Kinney AJ, Staswick P, Clemente T (2002) Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulated seed fatty acid genes in transgenic soybean. *Plant J* 30: 155-163.

Chan SW (2008) Inputs and outputs of chromatin-targeted RNAi. *Trends Plant Sci* 13: 383-389.

Chiera JM, Finer JJ, Grabau EA (2004) Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability. *Plant Mol Biol* 56: 895-904.

Clemente TE, Vallee BJ, Howe AR, Connor-Ward D, Rozman RJ, Hunter PE, Broyles DL, Kasten DS, Hinchee MA (2000) Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Sci* 40: 797-803.

Cober ER, Rioux S, Rajean I, Donaldson P, Simmonds DH (2003) Partial resistance to white mould in a transgenic soybean line. *Crop Sci* 43: 92-95.

Crowe TC, Seligman SA, Copeland L (2000) Inhibition of enzymatic digestion of amylose by free fatty acids *in vitro* contributes to resistant starch formation. *J Nutr* 130: 2006-2008.

Dang W, Wei ZM (2007) An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. *Plant Sci* 173: 381-389.

Davuluri GR, van Tuinen A, Fraser PD, Manfredonia A, Newman R, Burgess D, Brummell DA, King SR, Palys J, Uhlig J (2005) Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nature Biotechnol* 23: 890-895.

Denbow DM, Grabau EA, Lacy GH, Kornergay ET, Russell DR, Umbeck PF (1998) Soybean transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers. *Poult Sci* 77: 878-881.

D'Halluin K, De-Block M, Denecke J, Janssens J, Leemans J, Reynaerts A, Botterman J (1992) The *bar* gene as selectable and screenable marker in plant engineering. *Methods Enzymol* 216: 415-426.

Dinkins RD, Reddy MSS, Meurer CA, Yan B, Trick HN, Finer JJ, Thibaud-Nissen F, Parrot WA, Collins GB (2001) Increase sulfur amino acids in soybean plants overexpression the maize 15 kDa zein protein. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 742-747.

Di R, Purcell V, Collins GB, Ghabrial SA (1996) Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. *Plant Cell Rep* 15: 746-750.

Donaldson PA, Anderson T, Lane BG, Davidson AI, Simmonds DH (2001) Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 59: 297-307.

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

El-Shemy H, Teraishi M, Khalafalla MM, Katsube-Tanaka T, Utsumi S, Ishimoto M (2004) Isolation of soybean plants with stable transgenic expression by visual selection based on green fluorescent protein. *Mol Breed* 14: 227-238.

Escobar MA, Civerolo EL, Summerfelt KR, Danderkar AM (2001) RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci* 98: 13437-13442.

Falco SC, Guida T, Locke M, Mauvais J, Sanders C, Ward RT, Webber P (1995) Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Bio/Technology* 13: 577-582.

Farbairn DJ, Cavallaro AS, Bernard M, Mahalinga-Iyer J, Graham MW, Botella JR (2007) Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. *Planta* 226: 1525-1533.

Finer JJ, McMullen MD (1991) Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 27: 115-182.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostos SA, Driver SE, Mell CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.

Fitch MMM, Manshardt RM, Gonsalves D, Slighton L, Sanford JC (1992) Virus resistant papaya plants derived from tissues bombardment with the coat protein gene of Papaya Ringspot Virus. *Nature Biotechnol* 10: 1466-1472.

Friedman M, Brandon DL (2001) Nutritional and health benefits of soy proteins. *J Agric Food Chem* 49: 1069-1086.

Fuller VL, Lilley CJ, Urwin PE (2008) Nematode resistance. *New Phytol* 180: 27-44.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158.

Gascioli V, Mallory AC, Bartel DP, Vaucheret H (2005) Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Curr Biol* 15: 1494-1500.

Gesteira AS (2002) Avaliação do potencial embriogênico de cultivares de soja e transformação com o gene da citrato sintase. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa.

Gheysen G, Vanholme G (2007) RNAi from plants to nematodes. *Trends Biotechnol* 25: 89-92.

Ghildiyal M, Zamore PD (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature* 10: 94-108.

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

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.

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

Hinchee MAW, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, Fichhoff DA, Re DB, Fraley RT, Horsh RB (1988) Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Technology* 6: 915-922.

Huang G, Allen R, Davi EL, Baum TJ, Hussey RS (2006) Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proc Natl Acad Sci* 103: 14302-14306.

Ibrahim HMM, Alkharouf NW, Meyer SLF, Aly MAM, El-Din AEFYG, Hussein EHA, Matthews BF (2010) Post-transcriptional gene silencing of root-knot nematode in transformed soybean roots. *Exp Parasitol*, doi:10.1016/j.exppara.2010.06.037 (*Article in press*).

Ishimoto M, Rahman SM, Hanafy MS, Khallafalla MM, El-Shemy HA, Nakamoto Y, Kita Y, Takanashi K, Matsuda F, Murano Y, Funabashi T, Miyagawa H, Wakasa K (2010) Evaluation of amino acid content and nutritional quality of transgenic soybean seeds in high-level tryptophan accumulation. *Mol Breed* 25: 313-326.

Kang BC, Yeam I, Jahn MM (2005) Genetics of plant virus resistance. *Annu Rev Phytopathol* 43: 581-591.

Khalafalla MM, Rahman SM, El-Shemy HA, Nakamoto Y, Wasaka K, Ishimoto M (2005) Optimization of particle bombardment conditions by monitoring of transient sGFP(S65Y) expression in transformed soybean. *Breed Sci* 55: 257-263.

Kinney AJ (1996) Development of genetically engineered soybean oils for food applications. *J Food Lipids* 3: 273-292.

- Kinney AJ, Jung R, Herman EM (2001) Cosuppression of the  $\alpha$  subunits of  $\beta$ -conglycinin in transgenic soybean seeds induces the formation of endoplasmic reticulum-derived protein bodies. *Plant Cell* 13: 1165-1178.
- Kita Y, Nishizawa K, Takahashi M, Kitayama, Ishimoto M (2007) Genetic improvement of the somatic embryogenesis and regeneration in soybean and transformation of the improved breeding lines. *Plant Cell Rep* 26: 439-447.
- Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X (2005) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 15: 1501-1507.
- Lindbo JA, Dougherty WD (2005) Plant pathology and RNAi: A brief history. *Annu Rev Phytopathol* 43: 191-204.
- Li Z, Meyer S, Essig JS, Liu Y, Schapaugh MA, Muthukrishnan S, Hainline BE, Trick HN (2005) High-level expression of maize-zein protein in transgenic soybean (*Glycine max*) *Mol Breed* 16: 11-20.
- Lima ABP (2005) Construção de cassete para a co-supressão do gene da oleoil dessaturase e transformação genética de embriões somáticos de soja. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa.
- Liu H-K, Yang C, Wei, Z-M (2004) Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. *Planta*, 219: 1042-1049.
- Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates III JR, Parker R, Hannon GJ (2005) A role for the P-body component GW 182 in microRNA function. *Nature Cell Biol* 7: 1161-1166.
- Liu Q, Singh SP, Green AG (2002) High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. *Plant Physiol* 129: 1732-1743.
- Liu SJ, Wei ZM, Huang JQ (2008) The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties. *Plant Cell Rep* 27: 489-498.

Ma XH, Wu TL (2008) Rapid and efficient regeneration in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] from whole cotyledonary node explants. *Acta Physiol Plant* 30: 209-216.

Macrae TC, Baur ME, Boethel DJ, Fitzpatrick BJ, Gao AG, Gamundi JC, Harrison LA, Kabuye VT, McPherson RM, Miklos JA, Paradise MS, Toedebusch AS, Viegas A (2005) Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for control of lepdoptera. *J Econ Entomol* 98: 577-587.

Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY (2007) Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat Biotechnol* 25: 1307-1313.

McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ, Christou P (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6: 923-926.

Mendonça MAC (2010) Padronização de metodologias de regeneração, via embriogênese somática e organogênese, e de aclimatização de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). (Comunicação Pessoal) Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa.

Meurer CA, Dinkins RD, Collins GB (1998) Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. *Plant Cell Rep* 18: 180-186.

Meyer JDF, Silva DCG, Yang C, Pedley KF, Zhang C, van de Mortel M, Hill JH, Shoemaker RC, Abdelnoor RV, Whitham SA, Graham MA (2009) Identification and analyses of candidate genes for *Rpp4*-mediated resistance to Asian soybean rust in soybean. *Plant Physiol* 150: 295-307.

Miklos JA, Alibhai MF, Bledig SA, Connor-Ward DC, Gao AG, Holmes BA, Kolacz KH, Kabuye VT, Macrae TC, Paradise MS, Toedebusch AS, Harrison LA (2007) Characterization of soybean exhibiting high expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1Ac* transgene that confers a high degree of resistance to lepdoptera pests. *Crop Sci* 47: 148-157.

Murashigue T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Nagamatsu A, Masuta C, Senda M, Matsuura H, Kasai A, Hong JS, Kitamura K, Abe J, Kanazawa A (2007) Functional analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing. *Plant Biotechnol J* 5: 778-790.

Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY, Voinnet O (2008) Suppression of the miRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* 582: 2679-2684.

Newell-McGloughlin M (2008) Nutritionally improved agricultural crops. *Plant Physiol* 147: 939-953.

Nunes ACS, Vianna GR, Cuneo F, Farfán JA, Capdeville G, Rech EL, Aragão FJL (2006) RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPS1*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta* 224: 125-132.

Olhoft PM, Bernal LM, Grist LB, Hill S, Mankin L, Shen Y, Kalogerakis M, Wiley H, Toren E, Song HS, Hillebrand H, Jones T (2007) A novel *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation method of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using primary-node explants from seedlings. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 43: 536-549.

Olhoft PM, Donovan CM, Somers SA (2006) Soybean (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary node explants. In: Wang K (ed) *Agrobacterium* protocol, 2<sup>nd</sup> ed. Springer, Dordrecht, pp 473-498.

Olhoft PM, Flagel LE, Donovan CM, Somers DA (2003) Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta*, 216: 723-735.

Olhoft PM, Somers DA (2001) L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep* 20: 706-711.

Padgett SR, Kolacz KH, Deleaney X, Re RB, LaVallee BJTinius CN, Rhodes WK, Otero YI, Barry GF, Eichholtz DA, Reschke VM, Nida DL, Taylor NB, Kishore GM

(1995) Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci* 34: 1451-1416.

Paz MM, Martinez JC, Kalvig AB, Fonger TM, Wang K (2006) Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep*, 25: 206-213.

Paz MM, Shou H, Guo Z, Zhang Z, Banerjee AK, Wang K (2004) Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica*, 136: 167-179.

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

Price DR, Gatehouse JA (2008) RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends Biotech* 26: 393-400.

Rech EL, Vianna GR, Aragão FJL (2008) High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols* 3: 410-418.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

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

Schmidt MA, Herman EM (2008) Proteome rebalancing in soybean seeds can be exploited to enhance foreign protein accumulation. *Plant Biotechnol J* 6: 832-842.

Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003) Asymmetry in the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 199-208.

Segal G, Song R, Messing J (2003) A new opaque variant of maize by a single dominant RNA-interference-inducing transgene. *Genetics* 165: 387-397.

Sheehy R, Kramer M, Hiatt W (1988) Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci* 85: 8805-8809.

Sheferd DN, Martin DP, Thomson JA (2009) Transgenic strategies for developing crops resistant to geminiviruses. *Plant Sci* 176: 1-11.

Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RH, Fire A (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107: 465-476.

Smith NA (2000) Total silencing by an intron-spliced hairpin RNA. *Nature* 407: 319-320.

Soosaar JL, Burch-Smith TM, Dinesh-Kumar, SP (2005) Mechanisms of resistance to viruses. *Nat Rev Microbiol* 3: 789-798.

Stewart CN, Adang MJ, All /jn, Boerma R, Cardineau G, Tucker D, Parrot WA (1996) Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene. *Plant Physiol* 112: 121-129.

Sunilkumar G, Campbell LM, Puckhaber L, Stipanovic RD, Rathore KS (2006) Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. *Proc Natl Acad Sci* 103: 18054-18059.

Tang G, Galili G, Zhuang X. RNAi and microRNA: breakthrough technologies for the improvement of plant nutritional value and metabolomic engineering. *Metabolomics*, 3: 357-369, 2007.

Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Gene Dev* 17: 49-63.

Torisky RS, Kovacs L, Avdiushko S, Newman JD, Hunt AG, Collins GB (1997) Development of a binary vector system for plant transformation based on the supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Cry5. *Plant Cell Rep* 17: 102-108, 1997.

Tougou M, Furutani N, Yamagishi N, Shizukawa Y, Takahata Y, Hidaka S (2006) Development of resistant transgenic soybeans with inverted repeat-coat protein genes of soybean dwarf virus. *Plant Cell Rep* 25: 1213-1218.

Tricoll DM, Carney KM, Russell PF, McMaster JR, Groff DW, Hadden KC, Himm PT, Hubbard JP, Boeshore ML, Quemada HD (1995) *Nature Biotechnol* 13: 1458-1465.

Vaucheret H (2006) Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev* 20: 759-771.

Villemont E, Dubois F, Sangwan RS, Vasseur G, Bourgeois Y, Sangwan-Norreel BS (1997) Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta* 201: 160-172.

Walker DR, All JN, McPherson RM, Boerma HR, Parrot WA (2000) Field evaluation of soybean engineered with a synthetic *cry1Ac* for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepdoptera: Noctuidae) and lesser cornstalk borer (Lepdoptera: Pyralidae). *J Econ Entomol* 93: 613-622.

Wang X, Eggenberger AL, Nutter FW Jr, Hill JH (2001) Pathogen-derived transgenic resistance to soybean mosaic virus in soybean. *Mol Breed* 8: 119-127.

Wang Y, Chen X, Qiu L (2008) Novel alleles among soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor gene families. *Sci Chi Series: Life Sci* 51: 687-692.

Widholm JM, Finer JJ, Vodkin LO, Trick HN, LaFayette P, Li J, Parrot W (2010) Soybean. In: Kempkem J, Jung C (ed) *Genetic Modification of Plants*. Vol 64, Springer, Dordrecht, pp 473-498.

Wright MS, Koehler SM, Hinchee MA, Carnes MG (1986) Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. *Plant Cell Rep* 5: 150-154.

Xue RG, Xie HF, Zhang B (2006) A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells. *Biotechnol Lett* 28: 1551-1557.

Yadav BC, Vethambi K, Subramaniam K (2006) Host-generated double-stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. *Mol Biochem Parasitol* 148: 219-222.

Yi X, Yu D (2006) Transformation of multiple soybean cultivars by infecting cotyledonary-node with *Agrobacterium tumefaciens*. *Afr J Biotechnol* 5: 1989-1993.

Yu O, Shi J, Hession AO, Maxwell CA, McGonigle B, Odell JT (2003) Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. *Phytochem* 63: 753-763.

Zamore PD, Tuschl TS, Sharp PA, Bartel DP (2000) RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33.

Zeng P, Vadnais Da, Zhang Z, Polacco JC (2004) Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Rep* 22: 478-482.

Zhang Z, Xing A, Staswick P, Clemente TE (1999) The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 56: 37-46.

<http://www.agricultura.gov.br>