

FLÁVIO SANTOS LOPES

**CULTIVO *IN VITRO* E TRANSFORMAÇÃO DE SOJA
VISANDO O SILENCIAMENTO DA OLEOIL
DESSATURASE POR RNAi**

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
2014**

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

T

L864c
2014
Lopes, Flávio Santos, 1979-
Cultivo *in vitro* e transformação de soja visando o
silenciamento do gene da oleoil dessaturase por RNAi / Flávio
Santos Lopes. – Viçosa, MG, 2014.
viii, 68f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luiz Orlando de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Soja - Melhoramento genético. 2. Células -
Transformação. 3. Cultivo *in vitro*. 4. Engenharia genética
vegetal. 5. Ácidos graxos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 633.34

FLÁVIO SANTOS LOPES

**CULTIVO *IN VITRO* E TRANSFORMAÇÃO DE SOJA
VISANDO O SILENCIAMENTO DA OLEOIL
DESSATURASE POR RNAi**

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: 24 de fevereiro de 2014.

Marcelo de Oliveira Santos

Valeria Monteze Guimarães

Ana Paula Gomes Soares

Wagner Campos Otoni
(Coorientador)

Luiz Orlando de Oliveira
(Orientador)

DEDICO

Ao Professor Maurilio, que aceitou me orientar e que me proporcionou chegar a este momento. Por ter se dedicado até os últimos instantes da sua vida a formar profissionais e pessoas melhores, capacitados para dar prosseguimento ao trabalho que ele tanto valorizou. Obrigado por me permitir fazer parte desta sua família. Que você descanse em paz, jovem!

“Quanto mais aumenta nosso
conhecimento, mais evidente
fica nossa ignorância.”
John F. Kennedy

AGRADECIMENTOS

Neste momento tão especial da minha vida, em que realizo um sonho, quero primeiramente agradecer a Deus, que permitiu que eu vivesse esse momento. Agradeço por me sustentar e por me confortar nos momentos difíceis, pela saúde, a alegria e por renovar a fé a cada dia.

Aos meus pais que sempre me apoiaram, acreditaram e muitas vezes sacrificaram seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Aos meus irmãos e seus pares, com quem sempre pude contar nesta conquista. Aos meus sobrinhos, que encheram minha vida de alegria. A Cláudia, com quem sempre pude contar, por estar presente nos momentos de alegria e nos momentos de tensão, que não foram poucos. Aos demais familiares, que apoiaram e torceram por mim. Eu não teria conseguido sem vocês.

Ao programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento e a Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade para realização deste curso. Quero agradecer também aos órgãos financiadores CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico) pelo auxílio financeiro.

Aos professores Frederico de Pina Matta, Andreia Passos Lima Gontijo e Taís Cristina Bastos Soares, por terem sido os grandes incentivadores e responsáveis por eu estar realizando o meu doutoramento na UFV. Vocês me convenceram a participar do processo seletivo, no último dia!

A família do laboratório de Filogeografia com quem sempre pude contar e que me proporcionaram momentos inesquecíveis durante esses anos de convívio. Vocês fazem parte desta conquista! Aos amigos e funcionários dos laboratórios Biomol, Proteína, Análises Bioquímicas, Cultura de Tecidos e Casa de Apoio, pelo apoio e a amizade.

A todos os professores que colaboram para minha formação e que contribuíram para que eu chegasse até aqui, desde a tia Margarete e a tia Zezé, até aqueles que colaboraram para a realização deste trabalho, Wagner, Everaldo, Luiz Orlando, Valéria e Newton.

A Ana Cláudia por compartilhar seu conhecimento, colaborar com sugestões e com a parte da anatomia.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e da minha formação, muito obrigado!

BIOGRAFIA

FLÁVIO SANTOS LOPES, filho de Otacílio de Sousa Lopes e Maria Expedita dos Santos Lopes, nasceu em 01 de outubro de 1979, em Timóteo, Minas Gerais.

Em maio de 2001, iniciou o curso de Agronomia, na Universidade Federal do Espírito Santo, concluindo no 2º semestre de 2005.

Em março de 2007, iniciou o curso de Mestrado em Produção Vegetal, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, concluindo em março de 2009.

Em fevereiro de 2010, iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa, MG, submetendo-se à defesa da tese em fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
Introdução geral	1
Capítulo 1 - Cultivo <i>in vitro</i> de soja (<i>Glycine max</i> L. Merrill) a partir de eixos embrionários	5
Capítulo 2 - Sacarose e trocas gasosas interferem no desenvolvimento <i>in vitro</i> de plântulas de soja (<i>Glycine max</i> L. Merrill) a partir de eixos embrionários	28
Capítulo 3 - Transformação de soja (<i>Glycine max</i> L. Merrill) a partir de eixos embrionários imaturos	48

RESUMO

LOPES, Flávio Santos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, 24 de fevereiro de 2014. **Cultivo *in vitro* e transformação de soja visando o silenciamento da oleoil dessaturase por RNAi.** Orientador: Luiz Orlando de Oliveira. Coorientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Wagner Campos Otoni.

Este estudo teve como objetivo avaliar o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de soja obtidos a partir de eixos embrionários crescidos sob diferentes condições e realizar a transformação de eixos embrionários imaturos para silenciar o gene oleoil dessaturase usando RNA de interferência. Os resultados demonstram que as concentrações dos componentes do meio de cultivo (sais, sacarose, agentes de gelificantes) e as variações de pH afetam o desenvolvimento inicial do eixo embrionário de soja, o que sugere que estas adaptações sejam genótipo-específicas. O ensaio troca gasosa em presença de sacarose mostraram que a oferta de sacarose deu suporte para o desenvolvimento *in vitro* dos eixos embrionários de soja. Além disso, as plântulas cultivadas em recipientes com membranas alternativas (preparadas com um filme de politetrafluoroetileno e três camadas de fita micropore) apresentaram desenvolvimento semelhante ao das plântulas cultivadas em frascos com membranas comerciais (MilliSeal® AVS -045 Air Vent), tendo como vantagem o baixo custo. Durante o ensaio de transformação, para a descontaminação de vagens imaturas, foi usado um tratamento adaptado da descontaminação de sementes de soja. As estratégias utilizadas neste estudo permitiu uma obtenção de 29 plantas aclimatizadas. Sete plantas destas apresentando produtos de amplificação com o tamanho esperado (421 pb), evidenciando a transformação. Entre estas, quatro plantas produziram sementes. O protocolo baseado em transformação do eixo de embrionário imaturo proporcionou uma eficiência de transformação 1,3-2,6 %.

ABSTRACT

LOPES, Flávio Santos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. ***In vitro* cultivation and transformation of soybean for silencing of oleoyl desaturase by RNAi.** Advisor: Luiz Orlando de Oliveira. Co-advisors: Everaldo Gonçalves de Barros and Wagner Campos Otoni.

This study aimed to evaluate the *in vitro* development of soybean seedlings obtained from the embryonic axis grown under different conditions and perform the transformation of immatures embryonics axis to silencing the oleyl desaturase gene by using RNA of interference. The results revealed that the concentrations of the components of growth medium (salt, sucrose, gelling agents) and the pH variations affected the initial development of the soybean embryonic axis, suggesting that these adaptations are genotyp-specific. The gas exchange assay in presence of sucrose showed that the supply of sucrose gave support to the *in vitro* development of the embryonic axis of soybean. Furthermore, the seedlings grown inside jars with alternative membranes (prepared with polytetrafluoroethylene film and three layers of microporus tape) exhibited similar development as such seedlings grown inside jars with comercial membranes (MilliSeal® AVS-045 Air Vent), with the advantage of low cost. During the transformation assay, we succeeded in decontaminating immature pods by using an adapted treatment for descontamination of soybean seeds. The strategies used in this study allowed us to obtain 29 acclimatized plants. Seven plants were transformed, owning amplicons with the expected size (421 pb), which confirmed the transformation. Among these, four plants produced seeds. The protocol based on transformation of the immature embryonic axis exhibited an efficiency of transformation from 1.3 to 2.6%.

INTRODUÇÃO

O cultivo de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é de grande importância para o agronegócio brasileiro, por se tratar da leguminosa mais cultivada no mundo. O seu valor mercadológico está relacionado principalmente ao seu alto conteúdo de proteína (40 %) e óleo (20 %), além da alta produtividade (2.939 kg ha^{-1}) (CONAB, 2014b) e o relativo baixo custo de produção (R\$ 1.200,00 a 1.500,00 ha^{-1}). Essas excelentes características, aliadas às suas múltiplas utilidades, geram uma demanda mundial elevada e crescente, com estimativa superior a 285 milhões de toneladas para o período 2013/2014 (CONAB, 2014a). No país, o complexo soja é um dos que mais se destaca, tanto pela sua expressiva participação na pauta de exportações sob a forma de farelo, óleo e grãos, como também por sua contribuição para o abastecimento do mercado interno de óleos comestíveis e derivados proteicos. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial, sendo que a estimativa de produção para a safra de 2013/2014 é de aproximadamente 90,02 milhões de toneladas, correspondentes a 30 % da produção mundial (CONAB, 2014b).

A soja é uma das mais importantes culturas produtoras de óleo do mundo, contribuindo com 48 % da produção mundial, os quais são destinados principalmente para o consumo humano e atualmente tem sido utilizado também para a produção de biodiesel. O conteúdo de óleo no grão de soja é uma das suas principais características, e geralmente o teor varia de 18 % a 22 % entre as cultivares. O óleo de soja é composto essencialmente de triacilgliceróis, os quais são constituídos por três ácidos graxos esterificados a uma molécula de glicerol. Os principais ácidos graxos encontrados no óleo de soja de variedades comerciais são: ácido palmítico (11 %), ácido esteárico (4 %), ácido oléico (24 %), ácido linoléico (54 %) e ácido linolênico (7 %) (YADAV, 1996), podendo ser encontrados mutantes com teores alterados desses ácidos graxos.

Os elevados teores de ácido linoléico e linolênico são os principais responsáveis pela alta instabilidade oxidativa do óleo (ANDERSON; BAKER, 1983). Isso ocorre porque os ácidos graxos polinsaturados são mais suscetíveis às hidroxilações resultando em cetonas e aldeídos voláteis, que modificam as características físico-químicas do óleo (GERMAN; KINSELLA, 1985). Desta forma a composição de ácidos graxos determina o uso final do óleo, o qual pode ser destinado à alimentação, à produção de biodiesel ou outros fins.

Para a produção de óleo com a composição de ácidos graxos alterados, tem se lançado mão tanto de técnicas de Melhoramento Convencional como de técnicas de Engenharia Genética. A manipulação através da Engenharia Genética possibilitam obter cultivares de soja com teores de ácidos graxos modificados pelo silenciamento de enzimas do tipo dessaturases (LIMA, 2005), este processo propiciado pela técnica de RNAi reduz o acúmulo de ácidos graxos polinsaturados ou incrementa o acúmulo de ácidos graxos monoinsaturados (BUHR et al., 2002; FLORES et al., 2008; WANG; XU 2008; LI et al., 2010), melhorando assim a qualidade do óleo para os diversos usos.

O sucesso da manipulação genética no melhoramento de plantas está diretamente ligado à utilização de um protocolo de regeneração de plantas eficiente. Entretanto, a cultura da soja tem sido considerada como recalcitrantes para a regeneração *in vitro* (YAMADA; TAKAGI; ISHIMOTO, 2012). Respostas de cultura de tecidos são muito influenciados por três fatores principais: a fisiologia da planta doadora, a manipulação *in vitro* e a fisiologia do estresse *in vitro* (BARWALE; KEANS; WIDHOLM, 1986; MARIASHIBU et al., 2013). A busca por um protocolo que possibilite a transformação eficiente da soja está diretamente relacionada a redução da interferência desses fatores.

Os programas de melhoramento da soja têm se preocupado cada vez mais com o desenvolvimento de variedades produtivas, buscando agregar qualidade nutricional e elevado conteúdo de características desejáveis no grão. Programas de Melhoramento Genético da Qualidade da Soja, como o desenvolvido no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), sediado na Universidade Federal de Viçosa (UFV), tem concentrado esforços para aumentar o conteúdo de óleo de cultivares de soja, assim como a qualidade do mesmo, através de técnicas de melhoramento clássicas e estratégias biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. D.; BAKER, J. E. Deterioration of seeds during aging. **Phytopathology**, v. 73, n. 2, p. 321-325, 1983.
- BARWALE, U. B; KEANS, H. R.; WIDHOLM, J. M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. **Planta**, v. 167, p. 473- 481, 1986.
- BUHR, T.; SATO, S.; EBRAHIM, F.; XING, A.; ZHOU, Y.; MATHIESEN, M.; SCHWEIGER, B.; KINNEY, A.; STASWICK, P.; CLEMENTE, T. Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean. **Plant J**, v. 30, p. 155–163, 2002.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos. Safra 2013/2014. Quarto levantamento, Janeiro de 2014.** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 05 fev. 2014a.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Central de Informações Agropecuárias: Safras 2013/2014.** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 30 jan. 2014b.
- FLORES, T.; KARPOVA, O.; SU, X.; ZENG, P.; BILYEU, K.; SLEPER, D. A.; NGUYEN, H. T.; ZHANG, Z. J. Silencing of GmFAD3 gene by siRNA leads to low α -linolenic acids (18: 3) of fad3-mutant phenotype in soybean [*Glycine max* (Merr.)]. **Transg Res**, v.17, p. 839–850, 2008.
- GERMAN, J. B.; KINSELLA, J. E. Lipid oxidation in fish tissue. Enzymatic initiation via lipoxygenase. **J Agric Food Chem**, v. 33, p. 680-683, 1985.
- LI, R., YU, K.; HATANAKA, T.; HILDEBRAND, D. F. Vernonia DGATs increase accumulation of epoxy fatty acids in oil. **Plant Biotechnol J**, v. 8, p. 184–195, 2010.
- LIMA, A. B. P. **Construção de cassete para a co-supressão do gene da oleoil dessaturase e transformação genética de embriões somáticos de soja.** Viçosa: UFV, 117p. [Tese de Doutorado Genética e Melhoramento], Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.
- MARIASHIBU, T. S.; ANBAZHAGAN, V. R.; JIANG, S.-Y.; GANAPATHI A.; RAMACHANDRAN, S. *In vitro* Regeneration and genetic transformation of soybean: current status and future prospects. In BOARD, J. E. (Ed.) **A comprehensive survey of international soybean research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships.** Rijeka. Intech. p. 413 – 446, 2013.
- WANG, G.; XU, Y. Hypocotyl-based Agrobacterium-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference. **Plant Cell Rep**, v. 27, p. 1177–1184, 2008.
- YADAV, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. In VERMA, D. P. S.; SHOEMAKER, R. C. (Eds) **Soybean genetics, molecular biology and biotechnology.** USA: CAB INTERNATIONAL, p.127-188, 1996.

YAMADA, T.; TAKAGI, K.; ISHIMOTO, M. Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis. **Breed Science**, v. 61, p.480–494, 2012.

CULTIVO *IN VITRO* DE SOJA (*Glycine max* L. Merrill) A PARTIR DE EIXOS EMBRIONÁRIOS

RESUMO

A cultura de tecidos vegetais tem se mostrado como importante ferramenta associada aos programas de melhoramento vegetal, e a sua aplicação tem sido cada vez mais constante. A utilização da engenharia genética acelera o processo da introgressão de genes, mas requer um sistema eficiente de cultivo *in vitro*. Isso ocorre porque a partir do momento que o gene de interesse introduzido no tecido alvo é necessário que as células ou tecidos transformados sejam regenerados em plantas. A regeneração *in vitro* é dependente de muitos fatores e de suas interações. Os constituintes do meio de cultivo, o balanço ideal entre eles, o tecido ou órgão utilizado, a sua idade e a condição fisiológica, as condições climáticas e de assepsia do ambiente de cultivo interferem para a obtenção de um bom resultado. Assim, o desenvolvimento de um protocolo de regeneração, associado à escolha de genótipos mais responsivos *in vitro*, constituem fatores que determinam o sucesso deste processo em diversas espécies vegetais. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes constituintes do meio de cultura e condições de desenvolvimento de eixos de embriões zigóticos de soja na fase de introdução *in vitro*. Os resultados demonstram que os constituintes do meio de cultivo e os valores de pH afetam o desenvolvimento inicial de diferentes variedades de soja, sugerindo que estas adaptações são genótipo-específica. Em geral, a variedade CAC-1 apresentou melhor desempenho em todas as condições avaliadas, mostrando-se bastante responsiva às condições de cultivo. A metade da concentração dos sais do meio MS proporcionou um maior desenvolvimento dos eixos embrionários para os parâmetros avaliados. Variação de pH (5,0; 5,2; 5,4; 5,6 e 5,8) não proporcionou diferenças no desenvolvimento de eixos embrionários dos genótipos avaliados. O melhor desenvolvimento dos eixos embrionários foi observado nas concentrações de sacarose de 30, 45 e 60 g L⁻¹. A utilização de diferentes agentes gelificantes se mostrou variável em função do genótipo estudado, mas para a variedade CAC-1 os melhores resultados foram obtidos com o uso de 6, 7 e 8 g L⁻¹ de ágar Sigma.

PALAVRAS-CHAVE: Sacarose; pH; Agentes gelificantes; Embriões zigóticos, Soja.

INTRODUÇÃO

Originária da China, a soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma das principais commodities agrícolas do mundo e, cada vez mais, tem sido utilizada na alimentação humana, animal e atualmente também na produção de biocombustíveis (CANAKCI; VAN GERPEN, 2001; OSAKI; BATALHA, 2008). Para suprir a demanda mundial deste grão os avanços nas técnicas de cultivo e no melhoramento da cultura têm sido cada vez mais necessários.

A utilização de métodos convencionais de melhoramento aliado às técnicas moleculares de transferência de genes *in vitro* tem permitido um rápido desenvolvimento de novas variedades para a agroindústria (JOSHI; DHAWAN, 2007). A melhoria da qualidade dos alimentos, quanto aos níveis nutricionais, para homens e animais domésticos, e a obtenção de variedades tolerantes a deficiência de nutrientes e ao estresse do ambiente, representam a grande perspectiva do uso da biotecnologia na agricultura (BARROS; MOREIRA, 2001).

Dentro deste contexto, a cultura de tecidos vegetais tem se mostrado uma importante ferramenta (OLHOFT; SOMMERS, 2007) associada aos programas de melhoramento vegetal (ANGRA et al., 1999; DANTAS et al., 2001; LATADO et al., 2002; CARVALHO et al., 2007), e a introdução de genes através de técnicas biotecnológicas. Uma vez que o gene de interesse tenha sido introduzido no tecido alvo é necessário que as células ou tecidos transformados sejam regenerados em plantas, sendo esta uma limitação para a obtenção da soja geneticamente modificada, uma vez que a espécie apresenta dificuldades para a regeneração *in vitro* (TRICK et al., 1997; DROSTE et al., 2001; YAMADA; TAKAGI; ISHIMOTO, 2012; MARIASHIBU et al., 2013).

Diferentes partes da planta de soja têm sido utilizadas como explantes para morfogênese em plantas de soja. Estes incluem nó cotiledonar (CHENG; SAKA; VOQUI-DINH, 1980; BARWALE; MAYER JR.; WIDHOLM, 1986; WRIGHT et al., 1986; PAZ et al., 2006; HINCHEE et al., 2009), ápices meristematicos (MCCABE et al., 1988), axilas foliares (SAKA; VOQUI-DINH; CHENG, 1980; KIM; LAMOTTE; HACK, 1990), Hipocótilo (WRIGHT et al., 1987a; LIU et al., 2013), folha primária (WRIGHT et al., 1987b), cotilédones (MANTE; SCORZA; CORDTS, 1989; FRANKLIN et al., 2004; KIM et al., 2013), plúmulas (YANG; CHRISTOU, 1990), hipocótilos (DAN;

REICHERT, 1998; YOSHIDA, 2002) e Eixos embrionários (MCCABE et al., 1988; LIU; YANG; WIE, 2004).

A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* está associada não apenas ao genótipo e as condições da planta matriz (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998) e ao explante, mas também as condições do ambiente de cultivo, e fatores como a fonte e a quantidade de carbono, o balanço de nutrientes, quantidade e qualidade da luz, a temperatura, a combinação adequada de orientação do explante, o pH e o agente solidificante podem afetar o desenvolvimento do explante *in vitro* (SANTAREM, PELISSIER; FINER, 1997).

Para o cultivo de embriões, quanto mais jovem este for, maior será a exigência nutricional para o seu desenvolvimento (HU; FERREIRA, 1998), para suprir essa exigência é necessário que os nutrientes estejam disponíveis no meio (WILLIAMS, 1993). Por terem funções definidas no metabolismo da planta, a deficiência ou excesso desses nutrientes podem comprometer a morfogênese. Diferentes combinações de nutrientes têm sido utilizadas para introdução dos explantes no cultivo *in vitro*, entretanto o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) ou suas variações tem apresentado bons resultados para várias espécies (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Trabalhando com soja Kanamori et al. (2011) obtiveram sucesso ao introduzir eixos embrionários da variedade BR-16 em meio MS com 50% da concentração original de sais.

Para que a taxa de nutrientes presentes no meio possam estar prontamente disponível para as plantas, é necessário que estes possam difundir-se pelo meio, estas características são afetadas pela concentração e o tipo de agentes gelificantes (RIBEIRO, 2006). A utilização de tipos inadequados de agentes gelificantes e concentrações muito altas podem influenciar no desenvolvimento *in vitro* do explante (BERRIOS et al., 1999; RIBEIRO, 2006).

A disponibilidade de nutrientes e as condições para o desenvolvimento *in vitro* são afetados também pelos níveis de pH do meio. O intervalo de pH entre 5 e 6 favorece um bom desenvolvimento dos embriões da maioria das espécies (HU; FERREIRA, 1998; CALDAS; HARIDASSAN; FERREIRA, 1998).

Para Lippmann e Lippmann (1993) tanto sacarose quanto glicose, podem ser utilizadas como fonte de carbono para o desenvolvimento de cotilédones de embriões de soja *in vitro*. Entretanto, a sacarose é o carboidrato mais utilizado como fonte energética (HU; FERREIRA, 1998). Em trabalhos comparando crescimento e recuperação de plantas de soja, sacarose a 2,5% proporcionou melhores resultados quando comparado com a glicose a 3% (LIPPMANN; LIPPMANN, 1993). Os açúcares exercem um papel importante na manutenção de uma osmolaridade adequada do meio (HU; FERREIRA, 1998)

O objetivo deste trabalho foi avaliar componentes e condições do meio de cultura visando melhorar o desenvolvimento de eixos de embriões zigóticos de quatro variedades (CAC-1, CD-219, Msoy-8400 e Conquista) de soja na fase de introdução *in vitro*. Para isso foram avaliados três concentrações de sais do meio MS, cinco faixas de pH, cinco concentrações de sacarose, três agentes gelificantes e 5 doses de ágar.

MATERIAL E MÉTODOS

A condução deste trabalho foi realizada utilizando a estrutura dos laboratórios de Biologia Molecular e Filogeografia, Laboratório de Biologia molecular de Plantas, Laboratório de Análises Bioquímicas, Laboratório de Genética Molecular de Plantas e Laboratórios de Cultura de Tecidos I e II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), sediados na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Material vegetal

Para a realização deste trabalho sementes das variedades CAC-1, CD-219, Msoy-8400 e Conquista, do Programa de Melhoramento Genético da Qualidade da Soja em desenvolvimento no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) foram plantadas visando obter materiais com boas características fisiológicas e de sanidade, para que o processo de desinfestação fosse eficiente e para que o nível de contaminação *in vitro* fosse o mais reduzido possível. Foram plantados 10 vasos com 3 sementes por variedade. As sementes maduras foram colhidas e, em seguida acondicionadas em envelope de papel pardo identificado e mantidas em sala climatizada a 18 °C.

Preparo dos explantes

Para a realização dos experimentos foram utilizados eixos embrionários de sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill). Em todos os experimentos as sementes foram desinfestadas em câmara de gás por 6 h (DI et al., 1996) e, posteriormente, imersas em água destilada estéril por 16 h para iniciar o processo germinativo e facilitar a excisão dos eixos embrionários. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, estes foram isolados com o auxílio de bisturi e pinças esterilizadas.

Análise variação da concentração de sais em meio de cultura

Vinte eixos embrionário, sendo cinco de cada variedade, foram inoculados em placas de Petri (90x15mm) com 20 mL de meio de cultura. Foram avaliadas as concentrações de 25%, 50% e 100% da concentração de sais do meio MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962) suplementados com vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968), 30 g L⁻¹ de sacarose, 8 g L⁻¹ de ágar (Sigma) e 0,64 mg L⁻¹ de MES e o pH foi ajustado para 5,4 ± 0,02. Os explantes permaneceram na posição horizontal nessas placas por 7 dias, sendo 5 dias no escuro e 2 dias sob condições temperatura ambiente 25 ± 2 °C e 60 µmol m⁻² s⁻¹ de irradiância provida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares por um fotoperíodo de 16 h de luz. ,

O experimento foi realizado em um esquema fatorial 3x4, em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

Análise da variação dos valores de pH

Para verificar qual a melhor faixa de pH para a introdução de eixos embrionários *in vitro*, foi utilizado o meio com 50% da concentração de sais avaliados no experimento anterior, variando apenas os valores de pH (5,0; 5,2; 5,4; 5,6; 5,8) do meio.

O experimento foi realizado em um esquema fatorial 5x4, em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

Análise da variação da concentração de sacarose

Para verificar qual a melhor concentração de sacarose para a introdução dos eixos embrionários *in vitro*, foi utilizado o meio com pH de 5,4 ± 0,02, avaliado no

experimento anterior. Foram estudadas as concentrações de sacarose 0, 15, 30, 45 e 60 g L⁻¹.

O experimento foi realizado em um esquema fatorial 5x4, em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

Avaliação de agentes gelificantes

Para este experimento foi utilizado o meio com 30 g L⁻¹ de sacarose, avaliado no experimento anterior. Foram avaliados os agentes gelificantes Agar Sigma (8 g L⁻¹), Agar Merck (8 g L⁻¹) e de Phytigel (2 g L⁻¹).

O experimento foi realizado em um esquema fatorial 3x4, em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

Avaliação das diferentes concentrações de ágar

Para este experimento utilizou-se as condições do experimento anterior, variando apenas as concentrações do Agar Sigma (5, 6, 7, 8 e 9 g L⁻¹).

O experimento foi realizado em um esquema fatorial 5x4, em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

Análise estatística

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado, seguindo um esquema fatorial específico para cada ensaio, com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 1 e 5% de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade usando programa ASSISTAT versão 7.7 beta (SILVA e AZEVEDO, 2009).

Avaliação do desenvolvimento

A avaliação do desenvolvimento foi realizada com uso dos parâmetros: Diâmetro do Hipocótilo (DH), Comprimento Total (CT), Massa de Matéria Fresca (MMF) e Massa de Matéria Seca (MMS).

O comprimento total e o diâmetro do hipocótilo foram mensurados em paquímetro digital (Western) com resolução de 0,01 mm, logo após o período de cultivo *in vitro* (sete dias). Os dados de massa fresca e massa seca foram obtidos pela pesagem dos eixos embrionários em balança analítica (SHIMADZU) com precisão de 0,001 g. Antes da pesagem de MMS, o material foi seco em estufa com circulação de ar a 50 ± 1 °C até peso constante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Variação da concentração de sais em meio de cultura

A composição dos meios de cultura tem um papel fundamental no processo de morfogênese, o meio basal MS tem se mostrado bastante responsivo para cultivo de soja *in vitro* (SANTAREM; PELISSIER; FINER, 1997; LIU et al., 2013; SOTO et al., 2013). Os resultados encontrados no nosso trabalho demonstraram que não houve interação entre as variedades de soja e as diferentes concentrações de sais de MS (Tabela 1). A análise dos fatores mostrou que os parâmetros DH, CT e massa de MMF foram influenciados pela concentração de sais no meio. Já o DH também demonstrou ser influenciado pelo genótipo (Tabela 1).

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para Diâmetro do Hipocótilo (DH), Comprimento Total (CT), Massa de Matéria Fresca e Massa de Matéria Seca (MMS) de eixos embrionários de diferentes variedades de soja em diferentes concentrações de sais.

FV	GL	Quadrado Médio			
		DH	CT	MMF	MMS
Variedade	3	0,2835 *	1,7668 ^{ns}	0,2530 ^{ns}	0,1241 ^{ns}
Sais	2	6,7398 *	227,3032 *	0,2725 *	0,2900 ^{ns}
Variedade X Sais	6	0,6038 ^{ns}	3,1513 ^{ns}	0,1831 ^{ns}	0,1604 ^{ns}
Resíduo	11	1,3357	43,5286	0,5745	0,1741
Total	35				

* Significativo pelo teste de F a 5% de probabilidade, ^{ns} não significativo.

A Tabela 2 apresenta os valores de diâmetro do hipocótilo dos eixos embrionários em função das diferentes variedades de soja. Observa-se que a variedade CAC-1, apresentou um incremento de crescimento radial maior, embora sem diferir estatisticamente da variedade Msoy- 8400. Este fato reforça a observação de outros pesquisadores que a variedade CAC-1 apresenta boa resposta no desenvolvimento *in*

vitro para diversas finalidades (GESTEIRA, 2002; LIMA, 2005; BARROS, 2010; MENDONÇA, 2010; SOUSA, 2012).

Tabela 2 - Valores de Diâmetro do Hipocótilo (DH), de eixos embrionários em função das diferentes variedades de soja

Variedades	Médias
	DH (mm)
CD-219	2,2267C
Conquista	2,3411BC
Msoy-8400	2,5089AB
CAC-1	2,6278 ^a

CV (%)=8,6545

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV corresponde ao coeficiente de variação dos dados.

Neste estudo mostramos que a metade da concentração de sais originalmente proposta por Murashige e Skoog (1962) foi aquela que proporcionou maior desenvolvimento das plantas, mensuradas pelo aumento no DH, CT e MMF (Tabela 3). O excesso de sal em soluções de cultivo ou mesmo no solo pode interferir com diversos processos bioquímicos e fisiológicos da planta, favorecendo problemas relacionados ao desbalanço de íons, deficiência de minerais, estresse osmótico, entre outros (RAI et al., 2011).

Tabela 3 - Valores de Diâmetro do Hipocótilo (DH), Comprimento Total (CT) e Massa de Matéria Fresca (MMF) dos eixos embrionários em função das diferentes concentrações de sais.

Tratamentos	Médias		
	DH (mm)	CT (mm)	MMF (mg)
MS	2,5058B	23,6833B	0,4299AB
MS/2	3,1325A	25,8583A	0,5928A
MS/4	1,6400C	17,4717C	0,2917B
CV (%)=	8,6545	9,3074	37,2610

Médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de tukey. CV corresponde ao coeficiente de variação dos dados.

Variação de pH do meio de cultura

As condições de pH interferem no desenvolvimento da planta, pois alteram a disponibilidade de nutrientes. Além disso, baixos valores de pH (inferiores a 4,0) promovem danos às células vegetais, por afetarem a integridade e permeabilidade das membranas, impedindo a absorção de nutrientes. Já o pH elevado (superiores a 6,5) favorece a precipitação dos nutrientes, indisponibilizando os mesmos para a planta (GOMES et al., 2011).

Os dados mostram que houve interação entre as variedades de soja e os diferentes valores de pH para os seguintes parâmetros: DH, CT e MMF (Tabela 4). Já MMS apresentou diferenças em função da variedade.

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para Diâmetro do Hipocótilo (DH), Comprimento Total (CT), Massa de Matéria Fresca (MMF) e Massa de Matéria Seca (MMS), de eixos embrionários de diferentes variedades de Soja em diferentes valores de pH.

FV	GL	Quadrado Médio			
		DH	CT	MMF	MMS
Variedade	3	0,8737 *	20,4067 *	0,1382 *	0,1107 *
pH	4	0,1281 ^{ns}	93,0318 *	0,8343 *	0,1236 ^{ns}
Variedade X pH	12	0,1535 *	4,9271 *	0,5945 *	0,3629 ^{ns}
Resíduo	19	0,2619	25,9196	0,7694	0,4301
Total	59				

*Significativo pelo teste de F a 5% de probabilidade, ^{ns} não significativo.

A variação do pH não influenciou o desenvolvimento dos eixos embrionários das variedades CD-219, Conquista e Msoy-8400, quando avaliado o crescimento radial na região do hipocótilo e biomassa fresca (Tabela 5). Todavia, a variedade CAC-1 apresentou melhor desenvolvimento em meio com pH entre 5,2 e 5,6, mensurado pelo diâmetro do hipocótilo, comprimento total e biomassa fresca (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores do Diâmetro do Hipocótilo (DH), Comprimento Total (CT) e Massa de Matéria Fresca (MMF) das eixos embrionários em função das variedades de soja e dos diferentes valores de pH do meio de cultura.

dos diferentes valores de pH do meio de cultura.						
Variáveis	Tratamentos					CV (%)
	pH	Variedades				
		CD-219	Conquista	Msoy-8400	CAC-1	
DH (mm)	5,0	2,24Aa	2,34Aa	2,27Aa	2,52Abc	9,6251
	5,2	2,18Ba	2,55Ba	2,39Ba	3,18Aab	
	5,4	2,45Ba	2,68ABa	2,16Ba	3,03ABabc	
	5,6	2,50Aa	2,56Aa	2,53Aa	2,45Ac	
	5,8	2,62ABa	2,42Ba	2,19Ba	3,11ABab	
CT (mm)	5,0	27,06Aab	28,36Aab	28,24Aab	27,55Aa	5,1256
	5,2	27,37Aab	26,92Aab	26,53Aab	28,73Aa	
	5,4	24,58Bab	25,11Bb	25,80Bab	29,82Aa	
	5,6	24,57Bab	24,52Bb	24,99Bb	29,11Aa	
	5,8	22,06Ab	19,41Ac	20,34Ac	21,65Ab	
MMF (mg)	5,0	0,73Aa	0,87Aa	0,66Aa	0,97Aab	18,6170
	5,2	0,91Aa	0,93Aa	0,75Aa	0,88Ab	
	5,4	0,61Aa	0,77Aa	0,56Aa	0,79Ab	
	5,6	0,68Ba	0,78Ba	0,79Ba	1,32Aab	
	5,8	0,88Aa	0,75Aa	0,77Aa	0,70Ab	

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV corresponde ao coeficiente de variação dos dados.

Esses resultados concordam com aqueles obtidos por Ribeiro et al. (1999) que concluíram que intervalos de pH entre 5,0 e 6,0 são adequados para a maioria das espécies. Em trabalhos realizados com soja, em geral a faixa de pH utilizada para a introdução *in vitro* está em ente os pHs de 5,4 a 5,8 (GESTEIRA, 2002; LIMA, 2005; MENDONÇA, 2010; SOUSA, 2012; KIM et al., 2013; LIU et al., 2013; SONG et al., 2013)

Com relação ao acúmulo de biomassa seca, a variedade CAC-1 foi aquela que apresentou maior incremento, embora, não tenha diferido estatisticamente dos valores apresentados pela variedade Conquista (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores de Massa da Matéria Seca (MMS) de eixos embrionários em função das diferentes Variedades de soja.

Variedade	Médias
	MMS (mg)
CD-219	0,0592B
Conquista	0,0626AB
Msoy-8400	0,0543B
CAC-1	0,0745 ^a
CV (%)=21,8690	

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV corresponde ao coeficiente de variação dos dados.

Variação da dose de sacarose em meio de cultura

Plantas cultivadas *in vitro* apresentam baixa capacidade fotossintética, assim é necessário fornecer uma fonte de carbono na solução de cultivo para suprir suas necessidades metabólicas, seja para geração de energia ou para fonte de monômeros, para processos de biossíntese requeridos para diferenciação e crescimento celular (LEIFERT; MURPHY; LUMSDEN, 1995).

Não foi evidenciada interação entre as variedades de soja e as doses de sacarose para nenhum dos parâmetros analisados (Tabela 7). Entretanto, as diferentes doses de sacarose interferiram nos parâmetros DH, MMF e MMS. Além disso, as variedades interferiram no DH e no CT.

Tabela 7 – Resumo da análise de variância para Diâmetro do Hipocótilo (DH), Comprimento Total (CT), Massa de Matéria Fresca (MMF) e Massa de Matéria Seca (MMS) de eixos embrionários de diferentes variedades de Soja em diferentes doses de sacarose.

FV	GL	Quadrado Médio			
		DH	CT	MMF	MMS
Variedade	3	0,3572 *	13,7971 *	0,5523 ^{ns}	0,2681 ^{ns}
Sacarose	4	0,4302 *	9,4142 ^{ns}	0,5422 *	0,1264 *
Variedade x Sacarose	12	0,2282 ^{ns}	4,4866 ^{ns}	0,1411 ^{ns}	0,1675 ^{ns}
Resíduo	19	0,1614	6,9941	0,1318	0,2809
Total	59				

*Significativo pelo teste de F a 5% de probabilidade, ^{ns} não significativo.

As maiores concentrações de sacarose utilizadas (30, 45 e 60 g L⁻¹) demonstraram maior eficiência para o crescimento dos eixos embrionários de soja, mensurado pelo crescimento radial do hipocótilo (Tabela 8). Comparando resposta entre diferentes fontes de açúcares Lippmann e Lippmann (1993) obteve maiores incrementos de hipocotilo quando utilizou entre 20 e 30 g L⁻¹ de sacarose, já a maior recuperação de plantas foi obtida quando a cancentração de sacarose no meio foi entre 25 e 30 g L⁻¹.

Tabela 8 - Valores do Diâmetro do Hipocótilo (DH), Massa de Matéria Fresca e Massa de Matéria Seca (MMS) dos eixos embrionários em função das diferentes doses de sacarose.

Tratamento (g L ⁻¹)	Médias		
	DH (mm)	MMF (mg)	MMS (mg)
60	2,2217A	0,3302AB	0,0431A
45	2,4092A	0,3664A	0,0369B
30	2,3267A	0,3515AB	0,0328B
15	2,0083B	0,2934B	0,0244C
0	1,9833B	0,1982C	0,0170D
CV (%)	8,2027	16,4060	15,4620

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV corresponde ao coeficiente de variação dos dados.

Para as diferentes variedades utilizadas, CAC-1 e Msoy-8400 foram as que obtiveram as maiores médias quanto avaliado o DH. Já quando se avaliou o CT, CAC-1 e Msoy-8400 foram estatisticamente diferentes (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores do Diâmetro do Hipocótilo (DH) Comprimento Total (CT) dos eixos embrionários em função das diferentes Variedades de soja.

Variedades	Médias	
	DH (mm)	CT (mm)
CD-219	2,0047C	16,7800AB
Conquista	2,1540BC	17,0907AB
Msoy-8400	2,2247AB	18,1760A
CAC-1	2,3760A	15,8500B
CV (%)=	8,2027	11,5750

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV corresponde ao coeficiente de variação dos dados.

Variação de agentes gelificantes para o meio de cultura

O agente solidificante é importante componente dos meios de cultura sólido ou semissólido, por atuar como base para sustentação dos explantes, devendo exercer sua função sem interferir na disponibilidade de nutrientes para as plantas. Nossos dados mostram que houve interação entre os agentes solidificantes utilizados e as diferentes variedades avaliadas. Na tabela 10 estão apresentados os resultados da análise de variância, onde verificamos que para todos os parâmetros avaliados houve interação entre os fatores.

Tabela 10 – Resumo da análise de variância para Diâmetro do Hipocótilo (DH), Comprimento Total (CT), Massa de Matéria Fresca (MMF) e Massa de Matéria Seca (MMS) de eixos embrionários de diferentes variedades de Soja crescidas em meio com diferentes agentes gelificantes.

FV	GL	Quadrado Médio			
		DH	CT	MMF	MMS
Variedade	3	0,0970**	115,7961**	0,0438*	0,0001*
Gelificantes	2	0,3521**	146,5239**	0,0251**	0,0001*
Var. x Solidif.	6	0,0491**	156,9512**	0,0417**	0,0001*
Resíduo	24	0,0064	22,0394	0,0054	0,0000
Total	35				

**Significativo pelo teste de F a 1% de probabilidade, *Significativo pelo teste de F a 5% de probabilidade, ^{ns} não significativo.

Avaliando o DH verificamos que os eixos embrionários da variedade CAC-1 apresentaram maior crescimento radial nos meios com diferentes agentes solidificantes, embora estes valores não tenham diferido daqueles apresentados pela variedade CD-219 em meio solidificado com Ágar Sigma ou da variedade Conquista e CD-219 em meio com Fitagel.

Ao analisarmos os dados do mesmo parâmetro avaliando os agentes solidificantes, observamos que o ágar Sigma promoveu os melhores resultados para todas as variedades, apesar de não apresentar diferenças significativas do Fitagel, na variedade Conquista.

Já quando o desenvolvimento foi avaliado com o CT, a variedade Conquista foi a que mais se destacou, independente do agente solidificante utilizado. Todavia, tais valores não diferiram significativamente daqueles apresentados por CAC-1 em meio com ágar Sigma, ou de CD-219, em meio com ágar Merck, ou de Msoy-8400 em meio com Fitagel.

Com relação ao acúmulo de biomassa fresca, observou-se um maior destaque na variedade CAC-1 em meio com ágar Sigma. Enquanto que para a variedade CD-219 esse comportamento ocorreu em meio com Fitagel, e na variedade Conquista em meio com ágar Merck. Dentre os diferentes agentes solidificantes, observou-se que não há como determinar o melhor agente para todas as variedades para este parâmetro, sendo que cada variedade destacou-se em meio com um determinado tipo de agente. CAC-1 foi a variedade com maior desenvolvimento para este parâmetro. Quanto ao parâmetro de MMS não houve diferença estatística entre as variedades para os meios com ágar Sigma ou Fitagel. Em meio com ágar Merck, houve maior desenvolvimento da variedade Conquista.

Trabalhando com a variedade de soja Incasoy-36, Soto et al. (2013) avaliaram a formação de calos e a regeneração de rebentos a partir do nó cotiledonar e verificaram que as melhores respostas foram obtidas quando o meio foi solidificado com ágar. Entretanto, há estudos que afirmam que o uso de ágar como agente gelificante modificaria a composição do meio indisponibilizando alguns solutos em função de algumas interações químicas (BRAND, 1993), outro trabalho também apresenta a possibilidade de o ágar também formar quelatos com os íons cálcio, desta forma a quantidade de cálcio disponível para a plântula estaria abaixo da quantidade oferecida pelo meio MS (SCHOLTEN; PIERIK, 1998). Entretanto, outra questão levantada por Reis, Costa e Otoni (2005), é que o Fitagel é dependente de cálcio para a sua polimerização, desta forma deste nutriente oferecido as explante também estaria indisponível.

Tabela 11 – Análise do desenvolvimento de eixos embrionários de diferentes variedades de soja cultivadas *in vitro* em meio solidificado com diferentes agentes gelificantes. Diâmetro Hipocótilo (DH), Comprimento Total (CT), Massa de Matéria Fresca (MMF) e Massa de Matéria Seca (MMS).

E Massa de Matéria Seca (MMB),						
Variáveis	Tratamentos					CV(%)
	Gelificantes	Variedades				
		CD-219	Conquista	Msoy-8400	CAC-1	
DH(mm)	Agar Sigma	2,20Aa	1,93Ba	1,91Ba	2,20Aa	4,248
	Agar Merk	1,70Bb	1,60Bb	1,70Bb	1,89Ab	
	Fitagel Sigma	1,85BCb	2,04Aa	1,68Cb	1,94ABb	
CT(mm)	Agar Sigma	28,22Ba	40,08Aa	26,11Bb	42,93Aa	14,820
	Agar Merk	27,36ABa	35,13Aa	28,28ABab	20,11Bb	
	Fitagel Sigma	36,10Aa	35,71Aa	35,97Aa	24,14Bb	
MMF(g)	Agar Sigma	0,36Bb	0,37Bb	0,33Ba	0,56Aa	16,576
	Agar Merk	0,41Bb	0,63Aa	0,37Ba	0,32Bb	
	Fitagel Sigma	0,57ABa	0,61Aa	0,41BCa	0,38Cb	
MMS(g)	Agar Sigma	0,02ABb	0,03ABb	0,02ABa	0,04Aa	18,170
	Agar Merk	0,03Bab	0,04Aa	0,03Ba	0,03Ba	
	Fitagel Sigma	0,04Aa	0,04Aa	0,03Aa	0,03Aa	

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúscula na horizontal diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV (%) corresponde ao coeficiente de variação dos dados em porcentagem.

Variação da concentração de ágar em meio de cultura

O ágar é um dos principais reagentes utilizados para o cultivo *in vitro* em meio sólido ou semissólido. Este agente geleificante apresenta a vantagem de formar um coloide quando adicionado à água, tornando-se líquido a 100 °C, solidificando-se a 45 °C, além de se manter estável nas temperaturas de incubação (GEORGE, 1993). Entretanto, o reagente pode conter inibidores orgânicos e inorgânicos (PIERIK, 1987). Assim, tanto a qualidade quanto a concentração de ágar, afetam as características químicas e físicas do meio de cultura, e, conseqüentemente, as respostas do explante *in vitro* (ROMBERGER e TABOR, 1971).

A análise de variância de diferentes parâmetros de desenvolvimento de variedades de soja, em meios com diferentes concentrações de ágar Sigma, mostra que só houve interação entre as variedades de soja e as doses de ágar para o parâmetro de

comprimento total (Tabela 12). Todavia, houve diferença significativa para os parâmetros diâmetro do hipocótilo, massa de matéria fresca e massa de matéria seca em função das diferentes variedades. Já os valores de massa seca foram influenciados pelas concentrações de ágar (Tabela 12).

Tabela 12 - Resumo da análise de variância para Diâmetro do Hipocótilo (DH), Comprimento Total (CT), Massa de Matéria Fresca (MMF) e Massa de Matéria Seca (MMS), de eixos embrionários de variedades de Soja em diferentes doses de ágar.

FV	GL	Quadrado Médio			
		DH	CT	MMF	MMS
Variedade	3	0,3520 *	84,0810 *	0,8659 *	0,4194 *
Ágar	4	0,2575 ^{ns}	179,6610 *	0,1712 ^{ns}	0,1178 *
Variedade x Ágar	12	0,8520 ^{ns}	7,3252 *	0,1223 ^{ns}	0,4017 ^{ns}
Resíduo	19	0,1636	55,7257	0,2500	0,1164
Total	59				

*Significativo pelo teste de F a 5% de probabilidade, ^{ns} não significativo.

Para as diferentes variedades estudadas os meios com 6, 7 e 8 g L⁻¹ possibilitaram um maior crescimento dos eixos embrionários, mensurado pelo CT e MMS (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13 - Valores do Comprimento Total (CT) das eixos embrionários em função das variedades de soja e das diferentes doses de ágar.

CT (mm)				
Ágar (g L ⁻¹)	Variedades			
	CD-219	Conquista	Msoy-8400	CAC-1
5,0	15,79Ac	18,25Ab	17,37Ab	16,99Ab
6,0	23,77Bab	26,12ABa	27,19ABa	28,52ABa
7,0	23,29Bab	24,23Ba	25,10Ba	29,36Aa
8,0	22,68Bab	25,45Ba	25,69Ba	29,24Aa
9,0	19,57Cb	24,41Ba	26,56ABa	29,76ABa

CV (%)= 6,7415

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV corresponde ao coeficiente de variação dos dados.

Tabela 14 - Valores de Massa de Matéria Seca (MMS), das eixos embrionários em função das diferentes doses de ágar.

Tratamento (g L ⁻¹)	Médias
	MMS (mg)
5	0,0364B
6	0,0440 ^a
7	0,0409AB
8	0,0439 ^a
9	0,0406AB

CV (%)=14,8860

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV corresponde ao coeficiente de variação dos dados.

Em relação ao parâmetro de diâmetro do hipocótilo, houve destaque para a variedade CAC-1. Já para a obtenção de massa fresca e seca, as variedades Conquista e CAC-1 (Tabela 15).

Tabela 15 - Valores de Diâmetro do Hipocótilo (DH), Massa de Matéria Fresca (MMF) e Massa de Matéria Seca (MMS) das eixos embrionários em função das diferentes variedades de soja.

Variedades	Médias		
	DH (mm)	MMF (mg)	MMS (mg)
CD-219	2,1573B	0,4303B	0,0360B
Conquista	2,2113AB	0,5712A	0,0437A
Msoy-8400	2,2007AB	0,5189AB	0,0376B
CAC-1	2,2747A	0,6046A	0,0473A
CV (%)=	4,6755	18,5240	14,8860

Médias seguidas por letras distintas na vertical, diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV corresponde ao coeficiente de variação dos dados.

Tais resultados concordam com aqueles obtidos por Rezende et al. (2008), que recomendaram concentrações entre 5 a 8 g L⁻¹ para crescimento satisfatório da maioria das espécies. Soto et al. (2013) obteve maior frequência de regeneração de soja em meio solidificado com 5, 6 e 7g L⁻¹ de ágar. Este parâmetro é importante, pois, concentrações pequenas (iguais ou inferiores a 5 g L⁻¹) não proporcionam uma adequada consistência ao meio, impedindo o suporte e a fixação necessária aos explantes. Por outro lado, a elevação demasiada nas concentrações do solidificante favorece a redução do potencial osmótico do meio, dificultando a difusão dos nutrientes, e, conseqüentemente, o crescimento (PASQUAL et al., 2002).

CONCLUSÃO

- A variedade CAC-1 apresentou um melhor desempenho em todas as condições avaliadas, mostrando-se bastante responsiva.
- A metade da concentração dos sais do meio MS proporcionou melhor desenvolvimento para os eixos embrionários, na fase de introdução *in vitro*.
- As concentrações de 30, 45 e 60 g L⁻¹ sacarose proporcionaram melhor desenvolvimento dos eixos embrionários.
- Para todos os parâmetros avaliados a utilização de diferentes gelificantes se mostrou variável em função do genótipo estudado, para a variedade CAC-1 os melhores resultados foram obtidos com o uso de 6, 7 e 8g L⁻¹ de ágar Sigma.

REFERÊNCIAS

- ANGRA, D. C.; BARBOSA, M.M.; PRESTES, A.M. et al. Cultivo de embriões em retrocruzamentos entre *Triticum aestivum* Thell. e *Agropyron elongatum* Host. e Beauv. **Pesq Agropec Bras**, v. 34, n. 2, p. 209-215, 1999.
- BARROS, B. A. **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**. Viçosa: UFV, 73 p. [Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento], Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.
- BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Biotecnologia: um breve histórico. **Inf Agropec**, v. 21, n. 204, p. 5-13, 2000.
- BARWALE, U. B.; MAYER Jr., M. M.; WIDHOLM, J. M. Screening of *Glycine max* and *Glycine soja* genotypes for multiple shoot formation at the cotyledonary node. **Theor Applied Gen**, v. 72, p. 423-428, 1986.
- BERRIOS, E. F.; GENTZBITTEL, L.; SEREYS, H.; SALIBERTY, G.; SARRALI, A. Influence of genotype and gelling agentes on *in vitro* regeneration by organogenesis in sunflower. **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 59, p. 65-69, 1999.
- BRAND, M. H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 35, p. 203-209, 1993.
- CALDAS, L. S.; HARIDASSAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH. v.1, p.87-132, 1998.
- CARVALHO, D. C.; FILHO, F. A. A. M.; MENDES, B. M. J. Regeneração de plantas após fusão de protoplastos de tangelo 'Page' e toranja 'Lau Tau'. **Rev Bras Frut**, v. 29, n. 2, p. 329-332, 2007.
- CHENG, T. Y.; SAKA, H.; VOQUI-DINH, T. H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. **Plant Science Letters**, v. 19, p. 91-99, 1980.
- DAN, Y.; REICHERT, N. A. Organogenic regeneration of soybean from hypocotyl explants. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, v. 34, p. 14-21, 1998.
- DANTAS, A. C. de M.; NUNES, J. C. N.; MORAES, L. K. A. Resgate de embriões imaturos *in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Malus spp.*). **Rev Bras Frutic**, v. 23, n. 2, p. 246-249, 2001.
- DI, R., PURCELL, V., COLLINS, G.B., GHABRIL, S.A. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. **Plant Cell Rep**, v.15, p. 746-750, 1996.

DROSTE, A.; LEITE P. C. P.; PASQUALI, G.; MUNDSTOCK, E.C.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Regeneration of soybean via embryogenic suspension culture. **Scientia Agric**, v. 58, p. 753-758, 2001.

FRANKLIN, G.; CARPENTER, L.; DAVIS, E.; REDDY, C. S.; AL-ABED, D.; ALAIWI, W. A.; PARANI, M.; SMITH, B.; GOLDMAN, S. L.; SAIRAM, R. V. Factors influencing regeneration of soybean from mature and immature cotyledons. **Plant Growth Reg**, v. 43, p.73-79, 2004.

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

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. 1 The technology. 2. ed. Edington: Exegetis, 574 p., 1993.

GESTEIRA, A. S. **Avaliação do potencial embriogênico de cultivares de soja e transformação com o gene da citrato sintase**. 55p. [Tese Doutorado Genética e Melhoramento], Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 2002.

GOMES, L. dos S.; MARTINS, C. A. da S.; NOGUEIRA, N. O.; LOPES, F. S.; XAVIER, T. M. T.; CARDOSO, L. C. M. Efeito de diferentes valores de pH da solução nutritiva no desenvolvimento de variedades de melão. **Rev Bras Ciênc Agr**, v. 6, n. 1, p. 73-78, 2011.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH, v. 1, p.183-260, 1998.

HINCHEE, M. A.; CONNOR-WARD, D. V.; NEWELL, C. A.; MCDONNELL, R. E.; SATO, S. J.; GASSER, C. S.; FISCHHOFF, D. A.; RE, D. B.; FRALEY, R. T.; HORSCH, R. B. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer. **Nat Biotechn**, v. 6, p. 915-922, 1988.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH v.1, p. 261-296, 1998.

JOSHI, P.; DHAWAN, V. Analysis of genetic diversity among *Swertia chirayita* genotypes. **Biol Plant**, v. 51, p. 764-768, 2007.

KANAMORI, N.; GIROTTO, L.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Agrobacterium-mediated transformation of Brazilian soybean variety, BR-16. **JIRCAS Work Rep**, v. 71, p. 75-79, 2011.

KIM, H. J.; KIM, M.-J.; PAK, J. H.; JUNG, H. W.; CHOI, H. K.; LEE, Y.-H. ; BAEK, I.-Y.; KO, J.-M.; JEONG, S.-C.; PACK, I.S.; RYU, K. H.; CHUNG, Y.-S. Characterization of SMV resistance of soybean produced by genetic transformation of SMV-CP gene in RNAi. **Plant Biotechn Rep**. p. 1-9, 2013.

KIM, J. H.; LAMOTTE, E.; HACK, E. Plant regeneration *in vitro* from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedling. **J Plant Phys**, v. 136, p. 664-669, 1990.

LATADO, R.R.; DERBYSHIRE, M.T.V.C.; TSAI, S.M. et al. Obtenção de híbridos somáticos de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra'. **Pesq Agropec Bras**, v. 37, n. 12, p. 1745-1741, 2002.

LEIFERT, C.; MURPHY, K. P.; LUMSDEN, P. J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Crit Rev Plant Sciences**, v.14, n. 2, p. 83-109, 1995.

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

LIPPMANN, B.; LIPPMANN, G. Soybean embryo culture: factors influencing plant recovery from isolated embryos. **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 32, p. 83-90, 1993.

LIU, D.; LIU, S.; CHANG, D.; WANG, L.; WANG, D.; WANG, N. N. A simple and efficient method for obtaining transgenic soybean callus tissues. **Acta Physiol Plant**, p. 1 – 13, 2013

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

MANTE, S.; SCORZA, R.; CORDTS, J. A simple, rapid protocol for adventitious shoot development from mature cotyledons of *Glycine max* cv. Bragg. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, v. 25, n. 4, p. 385-388, 1989.

MARIASHIBU, T. S.; ANBAZHAGAN, V. R.; JIANG, S.-Y.; GANAPATHI A.; RAMACHANDRAN, S. *In vitro* Regeneration and genetic transformation of soybean: current status and future prospects. In BOARD, J. E. (Ed.) A comprehensive survey of international soybean research - **Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships**. Rijeka. Intech. p. 413 – 446, 2013.

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

MENDONÇA, M. A. C. **Padronização de metodologias de regeneração, via embriogênese somática e organogênese, e de aclimatização de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Viçosa: UFV, 101p. [Tese de Doutorado Genética e Melhoramento], Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Phys Plant**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PASQUAL, M.; FINOTTI, D. R.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. de O. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira 'poncã' em função do pH e da concentração de ágar. **Rev Bras Agrocien**, v. 8, n. 3, p. 199-202, 2002.

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

PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nyhoff, 1987. 344 p.

RAI, M. K.; KALIA, R. K.; SINGH, R.; GANGOLA, M. P.; DHAWAN, A. K. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recente progress. **Env Exp Bot**, v. 71, p. 89-98, 2011.

REIS, L. B. dos; COSTA, R. R. da; OTONI, W. C. Influência de agentes gelificantes na organogênese *in vitro* de explantes juvenis de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* DEGENER). **Plant Cell Cult Microprop**, v. 1, n. 2, p. 80-88, 2005.

REZENDE, J. C. de; PASQUAL, M.; CARVALHO, S. P. de; PEREIRA, A. R.; VILLA, F. Influência do meio de cultura e concentração de agar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.1, p.21-26, 2008.

RIBEIRO, A. P. O. **Influência de genótipo, agente gelificantes, precursor (ACC) e inibidores (AVG e ATS) do etileno e tipo de vedação na morfogênese *in vitro* de berinjela (*Solanum melongena* L.)**. Viçosa: UFV, 113 p. [Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento], Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

RIBEIRO, V. G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; CARVALHO, G. R. OLIVEIRA JÚNIOR, A. F. Influência do agar e do pH sobre o cultivo *in vitro* de embriões de laranja ‘Natal’. **Ceres**, v. 46, n. 268, p. 587-595, 1999.

ROMBERGER, A.; TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. **American J Bot**, v. 58, p. 131-140, 1971.

SAKA, H.; VOQUI-DINH, T. H.; CHENG, T. Y. Stimulation of multiple shoot formation on soybean stem nodes in culture. **Plant Science Letters**, v.19, p. 193-201, 1980.

SANTAREM, E. R.; PELISSIER, B.; FINER, J. J. Effect of explante orientation, pH, solidifying agente and wounding on initiation of soybean somatic embryos. **In vitro Cell Dev Pl**, v.33, p. 13-19, 1997.

SCHOLTEN, H. J.; PIERIK, R. L. M. Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. **Plant Cell Rep**, [S.l.], v. 17, p. 230-235, 1998

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance**. In: World Congress on Computers in Agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SONG, Z-Y.; TIAN, J-L.; FU, W-Z.; LI, L.; LU, L-H.; ZHOU, L.; SHAN, Z-H.; TANG, G-X.; SHOU, H-X. Screening Chinese soybean genotypes for Agrobacterium-

mediated genetic transformation suitability. **J. Zhejiang Univ-Sci B** (Biomed e Biotechnol), v.14, n.4, p. 289-298, 2013.

SOTO, N.; FERREIRA, A.; DELGADO, C.; ENRÍQUEZ, G. A. *In vitro* regeneration of soybean plants of the Cuban Incasoy-36 variety. **Biotechnol Aplic**, v. 30, n.1, 34-38, 2013.

SOUSA, C. S. **Caracterização in silico de genes da biossíntese de lipídeos e utilização de eixos embrionários e nós-cotiledonares na transformação genética de soja Viçosa**: UFV, 80p. [Tese de Doutorado em Bioquímica Agrícola], Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

TRICK, H. N.; DINKINS, R. D.; SANTAREM, E. R.; SAMOYOOV, R. D. V.; MEURER, C.; WALKER, D.; PAIROT, W.A.; FINER, J. J.; COLLINS, G. B. Recent advances in soybean transformation. **Plant Tiss Cult Biotechnol**. v. 3, p. 9-26, 1997.

WEBBER, R. L. M. **Transformação genética de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] com um gene que codifica uma osmotina de *Solanum nigrum* var. *americanum*, visando a resistência a moléstias fungicas**. 2007, 67 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition *in vitro* – a mechanistic approach. **Aust J Bot**, v. 41, p. 237-251, 1993.

WRIGHT, M. S.; KOEHLER, S. M.; HINCHEE, M. A.; CARNES, M. G. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. **Plant Cell Rep**, v. 5, p. 150-154, 1986a.

WRIGHT, M. S.; WILLIAMS, M. H.; PIERSON, P. E.; CARNES, M. G. Initiation and propagation of *Glycine max* L. Merrill; Plants from tissue-cultured epicotyls. **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 8, p. 83-90, 1987a.

WRIGHT, M. S.; WARD, D. V.; HINCHEE, M. A.; CARNES, M. G.; KAUFMAN, R. J. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merr.) from cultured primary leaf tissue. **Plant Cell Rep**, v. 6, p. 83-89, 1987b.

YAMADA, T.; TAKAGI K.; ISHIMOTO, M. Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis. **Breed Science**, v. 61, p.480–494, 2012.

YANG, N.; CHRISTOU, P. Cell type specific expression of a CaMV 35s-GUS gene in transgenic soybean plants. **Dev Gen**, v. 11, p. 289-293, 1990.

YOSHIDA, T. Adventitious shoot formation from hypocotyl sections of mature soybean seeds. **Breeding Science**, v. 52, p. 1-8, 2002.

**SACAROSE E TROCAS GASOSAS INTERFEREM NO DESENVOLVIMENTO
IN VITRO DE PLÂNTULAS DE SOJA (*Glycine max* L. Merrill) A PARTIR DE
EIXOS EMBRIONÁRIOS**

RESUMO

A O ambiente *in vitro* tem grande potencial a ser explorado para melhorar as condições de desenvolvimento das plântulas de soja *in vitro* e para o processo de aclimatização. Este trabalho teve por objetivo estudar a interferência de diferentes níveis de trocas gasosas proporcionados por membranas comerciais (MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão) de 0,22 µm e membranas alternativas (confeccionadas em laboratório usando fita de politetrafluoretileno Amanco® e três camadas de fita micropore Missiner e Missiner®) e a interação com a presença de sacarose. O fornecimento de 30 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultivo para alongamento de ramos de soja, proporciona maior desenvolvimento quando comparado ao meio sem sacarose. O uso de membranas alternativas permitem trocas gasosas semelhantes às membranas comerciais, apresentando como vantagem o seu baixo custo. As plântulas desenvolvidas em recipientes com membranas alternativas apresentaram desenvolvimento iguais às plântulas desenvolvidas em recipientes com membranas comerciais.

PALAVRAS-CHAVE: Membranas; Trocas gasosas; Plântulas, Eixos embrionários.

INTRODUÇÃO

O grupo das leguminosas, também denominada de Fabaceae, é uma grande família de plantas distribuída por todo o mundo, compreendendo aproximadamente 19.000 espécies, divididas em mais de 700 gêneros (ALLEN; ALLEN, 1981). Esta família destaca-se por sua importância econômica, perdendo apenas para a família das gramíneas, sendo considerada a terceira maior família de Angiospermae, apresentando números menores apenas que as famílias Asteraceae e Orchidaceae. A família Fabaceae é subdividida em três subfamílias (Faboideae/Papilionoideae, Mimosoideae e Caesalpinoideae).

As leguminosas constituem-se numa família que apresenta espécies de interesse florístico e econômico (OLIVEIRA, 1999), dentre as quais se destaca o uso na alimentação e a aplicação como plantas medicinais, ornamentais e para indústria madeireira. A principal espécie dentre as leguminosas usadas para a alimentação é a soja (*Glycine max* L. Merrill). Esta espécie é a oleaginosa com maior importância econômica no mundo e está presente na composição da maioria dos alimentos industrializados (LEAL-COSTA, 2008).

Por apresentar essa grande importância em diversas aplicações e usos, a demanda por melhoramento desta espécie tem sido crescente. Para acelerar estes avanços, modernas técnicas biotecnológicas têm sido utilizadas buscando reduzir o tempo para que tais melhorias sejam disponibilizadas aos produtores e ao mercado consumidor. Entretanto se faz necessário também a melhoria das técnicas acessórias a estes processos. Dentre estas, a micropropagação tem merecido especial atenção, por ser extensivamente usada para propagação rápida de muitas espécies de plantas (BADR; ANGERS; DESJARDINS, 2011). A propagação *in vitro* é uma alternativa promissora para o fornecimento de plantas de alta qualidade, livres de doenças e com características homogêneas em um curto período de tempo (MOSALEEYANON et al., 2004). As plântulas ao crescerem *in vitro* são expostas a condições constantes de estresse, como alta umidade relativa, baixo nível de trocas gasosas, baixo nível de luz, baixa concentração de CO₂, altas concentrações de açúcar, nitrogênio e fitormônios no meio de cultura (BADR; ANGERS; DESJARDINS, 2011).

Assim, a melhoria das condições de cultivo *in vitro* favorece um melhor desenvolvimento das plantas. Tem-se observado que a ocorrência de trocas gasosas está

significativamente relacionada a esta melhora no desenvolvimento (IVANOVA; VAN STADEN, 2010; RODRIGUES et al., 2012; IAREMA et al., 2012; SALDANHA et al., 2012). Além disso, esse processo também parece ser importante para o desenvolvimento *ex vitro*, além de atuar sobre a morfogênese, as taxas de propagação, de aclimatização e redução de senescência e hiperidricidade (IVANOVA; VAN STADEN, 2010; RODRIGUES et al., 2012; IAREMA et al., 2012; SALDANHA et al., 2012).

Desta forma a influência das trocas gasosas em ambiente *in vitro* tem um grande potencial a ser explorado para melhorar as condições de desenvolvimento das plântulas de soja *in vitro* e o processo de Aclimatização.

Este trabalho teve por objetivo estudar a interferência de diferentes níveis de trocas gasosas proporcionados por membranas comerciais (MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão) de 0,22 μm e membranas alternativas (confeccionadas em laboratório usando fita de politetrafluoretileno Amanco® e três camadas de fita micropore Missiner e Missiner®) em interação com a presença de 0 ou 30 g L^{-1} de sacarose.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram utilizados eixos embrionário obtidos de sementes maduras de soja (*Glycine max* L. Merrill) da variedade CAC-1, proveniente de cultivo em casa de vegetação. As sementes foram desinfestadas usando gás clorídrico por 6 h (DI et al., 1996), e posteriormente imersas água destilada estéril por 16 h para iniciar o processo germinativo. A excisão dos eixos embrionários foi realizada em câmara de fluxo laminar.

Vinte e cinco eixos embrionários foram inoculados em placa de Petri (90x15mm) com 25 mL de meio com pH $5,4 \pm 0,2$, ajustado com KOH 1M, contendo $\frac{1}{2}$ das concentrações de sais do meio MS (MURASHIGE e SKOOG 1962) suplementado com vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968), 30 g L^{-1} de sacarose, 7 g L^{-1} de ágar (Sigma) e 0,64 mg L^{-1} de MES. Os explantes permaneceram nessas placas por 7 dias, sendo 5 dias no escuro e 2 dias sob condições fotomixotróficas (temperatura ambiente 25 ± 2 °C e 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância provida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares por um fotoperíodo de 16 h de luz).

O experimento para avaliação da interferência da sacarose e das trocas gasosas foi montado com a transferência dos eixos embrionários para frascos do tipo Magenta™ (Sigma®) contendo 50 mL de meio de alongamento com pH $5,7 \pm 0,2$, ajustado com KOH 1M, composto por sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968), 7 g L^{-1} de ágar Sigma e $0,64 \text{ mg L}^{-1}$ de MES e 25 mg L^{-1} de antibiótico Meropenem. Os explantes foram mantidos 14 dias sob condições fotomixotróficas (temperatura ambiente $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $60 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de irradiância provida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares por um fotoperíodo de 16 h de luz).

Sob câmara de fluxo laminar os eixos embrionários foram inoculados nos diferentes meios de cultura e os frascos vedados com cinco tipos de vedações, sendo estas: tampa rígida de polipropileno autoclavável (V1), tampa rígida de polipropileno autoclavável com um orifício de 10 mm e com dois orifícios de 10 mm cada, cobertas por membranas confeccionadas em laboratório conforme proposto por Saldanha et al. (2012) (V2 e V4 respectivamente) e cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas (MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão) de $0,22 \text{ } \mu\text{m}$ (V3 e V5), conforme a figura 1.

Os tratamentos consistiram-se da interação entre as 5 diferentes vedações e da adição ou não de 30 g L^{-1} de sacarose na composição do meio.

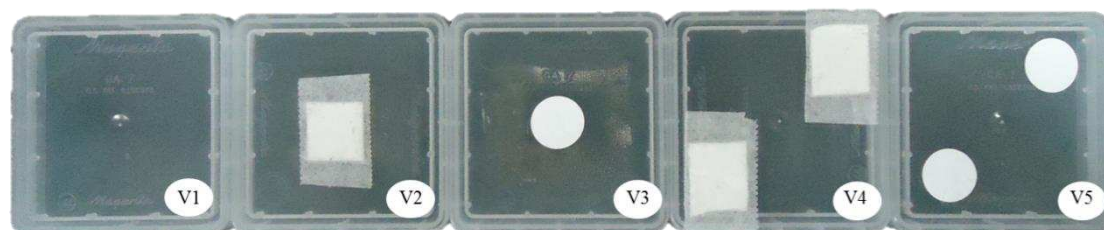


Figura 1 – Tampas de frascos tipo Magenta® (Sigma) preparadas com diferentes tipos de membranas. V1 - tampa rígida de polipropileno autoclavável, V2 e V4 - tampa rígida de polipropileno autoclavável com um e dois orifícios de 10 mm respectivamente cobertos com membranas alternativas (confeccionadas em laboratório usando fita de politetrafluoretileno Amanco® e três camadas de fita micropore Missiner e Missiner®) e V3 e V5 - tampa rígida de polipropileno autoclavável com um e dois orifícios de 10 mm respectivamente cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas (MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão) de $0,22 \text{ } \mu\text{m}$.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, seguindo um esquema fatorial 5×2 , com 3 repetições. Para a avaliação do desenvolvimento foi

mensurado Diâmetro médio do Hipocótilo (DMH), Comprimento Médio de Raiz (CMR), Comprimento Médio de Parte Aérea (CMPA), Comprimento Médio da Plântula (CMP), Massa de Matéria Fresca (MMF), Massa de Matéria Seca (MMS).

Para avaliar a densidade estomática foi realizada a impressão epidérmica abaxial e adaxial das folhas em lâminas de vidro, e as imagens capturadas foram analisadas usando o Software ANAT QUANT (AGUIAR et al, 2007). Os dados coletados permitiram avaliar a Densidade Estomática Adaxial (DEAD), Densidade Estomática Abaxial (DEAB), Índice Estomático Adaxial (IEAD), Índice Estomático Abaxial (IEAB).

Para avaliação histológica das plantas, amostras dos tecidos *in vitro* foram coletadas e fixadas em FAA 50 % (Formaldeído + Ácido Acético + Álcool 50 %), pelo período de 24 h e armazenadas em álcool 70 % (JOHANSEN, 1940). Posteriormente, estas amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin[®], Leica). Secções transversais foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2255, Leica[®]), com utilização de navalhas de vidro descartáveis. Os cortes (5 µm de espessura) foram corados com azul de toluidina pH 4,4 (O'BRIEN; MCCULLY, 1981) para caracterização estrutural. Observações anatômicas foram realizadas utilizando um fotomicroscópio (Olympus[®] AX70TRF), equipado com um sistema de U-foto (Olympus[®]), as imagens obtidas foram analisadas com o Software ANAT QUANT (AGUIAR et al, 2007) para obtenção da média das medidas das Células Epidérmicas do Eixo (CEE), Células Corticais do Eixo (CCE), Espessura do Feixe Vascular de Raiz (EFVR), Espessura do Córtex da Raiz (ECR), Espessura Media da Nervura Principal (EMNP), Diâmetro de Células Epidérmicas do Caule (DEC) e Diâmetro de Células Corticais do Caule (DCC).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste de F a 1 e 5% de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade usando programa ASSISTAT versão 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de sacarose no meio de cultivo influenciou significativamente o desenvolvimento dos eixos embrionários de soja (Figura 2). Embora, haja relatos na literatura indicando que a presença do açúcar no meio altere a maquinaria bioquímica, fisiologia e a morfologia das plântulas cultivadas *in vitro* (BADR; ANGERS; DESJARDINS, 2011). Eixos embrionários cultivados em meio de cultura sem o carboidrato, não apresentaram bom desenvolvimento, mesmo em condições que possibilitavam trocas gasosas com o ambiente externo. A presença de uma fonte de carboidrato no meio afeta características que interferem com os processos de absorção de nutrientes, como a osmolaridade, e, conseqüentemente, influenciam no desenvolvimento do embrião (HU e FERREIRA, 1998), como comprovado em *Heliconia rostrata* (TORRES et al., 2005).

Contrariamente, em *Pfaffia glomerata* a remoção da fonte de carboidratos do meio não teve efeito sobre o seu crescimento, quando os recipientes permitiam as trocas de gases por meio de membranas do sistema de vedação (IAREMA et al., 2012). Tais resultados ocorreram pelo elevado potencial de cultivo em condições fotoautotróficas da espécie utilizada no trabalho (IAREMA et al., 2012). As respostas de crescimento em função de trocas gasosas em meio de cultura dependem da espécie e o efeito das trocas gasosas varia com a presença ou ausência de sacarose no meio (SHIM, HAHN, PAEK, 2003).

Alguns autores relatam que o cultivo em condições fotoautotróficas melhora as condições das plântulas *in vitro*, as taxas de crescimento de explantes, as características fisiológicas. A geração de plântulas com competência fotossintética promove uma maior rusticidade das plântulas, colaborando para a produção de mudas com características morfológicas e fisiológicas desejáveis, favoráveis para aclimação (IAREMA et al., 2012; AFREEN et al., 2002; DENG e DONNELLY, 1993; DESJARDINS et al., 1987)

A ocorrência de trocas gasosas entre os ambientes interno e externo ao frasco de cultivo favoreceu a redução do volume de meio nos frascos (Figura 2), tanto para os tratamentos com membranas comerciais quanto com membranas alternativas. Em ausência de membranas nos frascos, este comportamento não foi evidenciado. A permeabilidade da membrana aos gases possibilita também uma maior dissipação da

umidade do ambiente interno para o ambiente externo, como previamente demonstrado por (SALDANHA et al., 2012).

Para todos os parâmetros analisados foi evidenciada interação positiva entre a promoção de trocas gasosas e a adição de sacarose ao meio, exceto para CMT (Tabela 1). Só foram analisados os parâmetros mensurados nas plântulas que se desenvolveram nos tratamentos em presença de sacarose. Apenas os parâmetros DEAB, IEAB e DEC não foram influenciados pelos tratamentos, enquanto os demais apresentaram diferenças significativas (Tabela 2).



Figura 2 – Plântulas de soja (*Glycine max* L. Merrill) cultivadas *in vitro*, 14 dias após transferência para o meio com diferentes sistemas de vedações na presença de 0 ou 30 g L⁻¹ de sacarose. V1 - tampa rígida de polipropileno autoclavável, V2 e V4 - tampa rígida de polipropileno autoclavável com um e dois orifícios de 10 mm respectivamente cobertos com membranas alternativas (confeccionadas em laboratório usando fita de politetrafluoretileno Amanco® e três camadas de fita micropore Missiner e Missiner®) e V3 e V5 - tampa rígida de polipropileno autoclavável com um e dois orifícios de 10 mm respectivamente cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas (MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão) de 0,22 µm

O tratamento com presença de sacarose e sem trocas gasosas proporcionou maior desenvolvimento das plântulas em todos os parâmetros de crescimento avaliados.

Para o comprimento médio total (CMT), observa-se que nos tratamentos com adição de sacarose as plantas cresceram até oito vezes mais que as plântulas dos tratamentos sem sacarose.

O máximo acúmulo de biomassa das plântulas foi observado no tratamento sem trocas gasosas (V1) e com sacarose, que apresentaram um acúmulo de massa fresca (MMF) 33%, em média, maior que os demais tratamentos, enquanto o acúmulo de massa seca (MMS) foi, em média, 36% maior.

A análise dos parâmetros micromorfométricos dos cortes histológicos dos eixos embrionários demonstram que o diâmetro das células epidérmicas do eixo (CEE) foram maiores nos tratamentos com uma membrana e sacarose, já para os tratamentos sem sacarose, o maior desenvolvimento das células epidérmicas foi observado no tratamento com uma membrana alternativa (Tabela 3). Quando avaliado o diâmetro das células do córtex do eixo (CCE) o tratamento com a vedação V2 apresentou melhor desenvolvimento que os demais tratamentos quando foi adicionado 30 g L⁻¹ de sacarose no meio. Observa-se que as células provenientes deste tratamento apresentaram tamanho 53 % maior que as células de plântulas cultivadas em meio sem sacarose.

Tabela 1 – Resumo da análise de variância para Diâmetro médio do Hipocótilo (DMH), Comprimento Médio de Parte Aérea (CMPA), Comprimento Médio da Plântula (CMT), Massa de Matéria Fresca (MMF), Massa de Matéria Seca (MMS), Células Epidermicas do Eixo (CEE), Células Corticais do Eixo (CCE), de plântulas de soja cultivadas *in vitro* em ambientes com variação dos tipos de vedação e na presença ou não de sacarose.

FV	GL	Quadrado Médio						
		DMH	CMPA	CMT	MMF	MMS	CEE	CCE
Vedação	4	0,0094 ^{ns}	387,3931 [*]	734,8002 [*]	0,0763 [*]	0,0006 [*]	261,2055 [*]	2786,269 [*]
Sacarose	1	0,0474 ^{ns}	66260,29 ^{ns}	175797,6 ^{ns}	4,2782 ^{ns}	0,0430 ^{ns}	46,6260 [*]	225,9379 ^{ns}
Vedação x Sacarose	4	0,0668 ^{**}	190,2722 ^{ns}	355,2980 [*]	0,0517 [*]	0,0005 [*]	342,3339 [*]	4268,067 [*]
Resíduo	20	0,0120	74,3230	78,7327	0,0180	0,0001	5,2139	57,3085
Total	29							

^{**} Significativo pelo teste de F a 1% de probabilidade, ^{*} Significativo pelo teste de F a 5% de probabilidade, ^{ns} não significativo.

Tabela 2 – Resumo da análise de variância para Espessura da Medula da Raiz (EMR), Espessura do Feixe Vascular de Raiz (EFVR), Comprimento Médio de Raiz (CMR), Densidade Estomática Adaxial (DEAD), Densidade Estomática Abaxial (DEAB), Índice Estomático Adaxial (IEAD), Índice Estomático Abaxial (IEAB), Espessura Media da Nervura Principal (EMNP), Diâmetro de Células Epiteliais do Caule (DEC), Diâmetro de Células Corticais do Caule (DCC) de plântulas de soja cultivadas *in vitro* em ambientes com diferentes tipos de vedação.

FV	GL	Quadrado Médio									
		EMR	ECR	CMR	DEAD	DEAB	IEAD	IEAB	EMNP	DEC	DCC
Vedação	4	53215,907 ^{**}	235188,3 [*]	219,609 ^{**}	0,100 ^{**}	0,103 ^{ns}	3,795 [*]	3,519 ^{ns}	102712,2408 ^{**}	11,571 ^{ns}	393,496 [*]
Resíduo	10	1932,174	1563,326	6,695	0,002	0,033	0,810	1,741	11,1974	5,546	105,022
Total	14										

^{**} Significativo pelo teste de F a 1% de probabilidade, ^{*} Significativo pelo teste de F a 5% de probabilidade, ^{ns} não significativo.

Tabela 3 – Análise do desenvolvimento de plântulas de soja cultivadas *in vitro* sob diferentes tipos de vedação e na presença ou não de sacarose. Diâmetro médio do Hipocótilo (DMH), Comprimento Médio da Plântula (CMT), Massa de Matéria Fresca (MMF), Massa de Matéria Seca (MMS), Células Epiderme do Eixo (CEE), Células Corticais do Eixo (CCE). V1 - tampa rígida de polipropileno autoclavável, V2 e V4 - tampa rígida de polipropileno autoclavável com um e dois orifícios de 10 mm respectivamente cobertos com membranas alternativas (confeccionadas em laboratório usando fita de politetrafluoretileno Amanco® e três camadas de fita micropore Missiner e Missiner®) e V3 e V5 - tampa rígida de polipropileno autoclavável com um e dois orifícios de 10 mm respectivamente cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas (MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão) de 0,22 µm

		Tratamentos					
Variáveis	Sacarose (g L ⁻¹)	Vedações					CV(%)
		V1	V2	V3	V4	V5	
DMH	30	2,55ABa	2,31ABa	2,16Bb	2,37ABa	2,30ABa	4,778
(mm)	0	2,19Ab	2,29Aa	2,38Aa	2,19Aa	2,25Aa	
CMT	30	210,55Aa	176,02Ba	161,93Ba	178,57Ba	169,33Ba	8,637
(mm)	0	30,65Ab	28,12Ab	20,07Ab	27,32Ab	24,75Ab	
MMF (g)	30	1,27Aa	0,93Ba	0,73Ba	0,82Ba	0,89Ba	24,338
	0	0,20Ab	0,19Ab	0,15Ab	0,18Ab	0,16Ab	
MMS(g)	30	0,13Aa	0,09Ba	0,07Ba	0,08Ba	0,09Ba	18,697
	0	0,02Ab	0,02Ab	0,01Ab	0,02Ab	0,01Ab	
CEE	30	46,11Bb	63,54Aa	67,57Aa	41,77Bb	43,17Bb	4,250
(µm)	0	57,46Ba	64,44Aa	44,35Cb	53,01Ba	55,36Ba	
CCE	30	108,99Cb	214,92Aa	109,49Cb	105,27Cb	141,77Ba	5,670
(µm)	0	127,43BCa	114,91Cb	123,91BCa	134,97ABCa	151,77ABa	

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV (%) corresponde ao coeficiente de variação dos dados em porcentagem.

Quando o meio não foi suplementado com sacarose o tratamento V5 apresentou maior desenvolvimento junto com os tratamentos V1, V3 e V4.

A diferença das condições *in vitro* em função da promoção das trocas gasosas proporcionaram alterações no desenvolvimento das plântulas (Tabela 4). A elevada umidade relativa do ambiente interno dos frascos de cultivo pode influenciar as

características anatômicas fisiológicas e morfológicas dos tecidos, resultando em alta mortalidade *ex vitro* (RIBEIRO, 2006). A densidade dos estômatos e índice estomático variou em função dos tratamentos. No desenvolvimento foliar, houve redução na Densidade Estomática Adaxial (DEAD) nos tratamentos com duas membranas. A densidade estomática pode ser considerada um fator de alta plasticidade em decorrência da exposição das plantas a diferentes ambientes (DOUSSEAU et al., 2008). De acordo com OSÓRIO et al., (2005) diferenças no número e formato dos estômatos afetam a eficiência fotossintética da planta.. Uma plântula *in vitro* que apresentando uma boa eficiência fotossintética tem melhores condições de sobrevivência durante a fase de Aclimatização. Avaliando o Índice Estomático Adaxial (IEAD %) observa-se que só houve diferença entre o tratamento sem membranas e o tratamento com duas membranas alternativas.

A análise micromorfométrica da folha na figura 3, evidenciou que no tratamento com uma membrana alternativa a nervura mediana teve um desenvolvimento em média 55 % maior que os demais tratamentos . Ainda na parte aérea, os dados nos permitem afirmar que o maior CMPA foi observado para os tratamentos sem membrana e com uma membrana alternativa (Tabela 4).

O maior comprimento médio da raiz (CMR) foi observado no tratamento V1, embora sem diferir estatisticamente do tratamento V4. Para as avaliações micromorfométricas da espessura do córtex da raiz (ECR) verificou-se que o tratamento V3 apresentou o melhor resultado, enquanto que para a espessura do feixe vascular da raiz (EFVR) os melhores resultados foram obtidos no tratamento V4 (Tabela 4).

A observação dos cortes anatômicos nos permitiu analisar as características dos órgãos avaliados. As folhas de soja são classificadas como anfi-hipoestomáticas, pois a maior concentração de estômatos foi verificada na face abaxial da epiderme, contendo estômatos tipo paracítico. As células epidérmicas exibem paredes sinuosas e apêndices, tricomas tectores unisseriados (LOURENÇO et al., 2011). O mesofilo é heterogêneo e dorsiventral.

O parênquima paliçádico foi constituído por camadas de células que variaram de uma a três células, bem justapostas no tratamento V2 (Figura 3). Os espaços intercelulares neste tratamento foram reduzidos, diferindo dos demais. A presença de múltiplas

camadas no tecido paliádico representa uma estratégia para maximizar a interceptação do fóton de luz para o processo de fotossíntese.

Analisando os cortes podemos observar que na nervura mediana um feixe vascular envolvido por uma bainha de células parenquimáticas, as quais se arranjam de forma justaposta estendendo-se até a epiderme, com região convexa voltada para a face abaxial. Os feixes vasculares das nervuras de menor calibre são colaterais com bainha de células parenquimáticas que se confundem com as células do parênquima lacunoso (MUSSURY et al., 2012).

Tabela 4 – Análise do desenvolvimento de plântulas de soja cultivadas *in vitro* sob diferentes de tipos de vedação com 30 g L⁻¹ de sacarose. Comprimento Médio de Parte Aérea (CMPA), Espessura do Feixe Vascular de Raiz (EFVR), Espessura do Córtex da Raiz (ECR) Comprimento Médio de Raiz (CMR), Densidade Estomática Adaxial (DEAD), Densidade Estomática Abaxial (DEAB), Índice Estomático Adaxial (IEAD), Índice Estomático Abaxial (IEAB), Espessura Media da Nervura Principal (EMNP), Diâmetro de Células Epiteliais do Caule (DEC), Diâmetro de Células Corticais do Caule (DCC). V1 - tampa rígida de polipropileno autoclavável, V2 e V4 - tampa rígida de polipropileno autoclavável com um e dois orifícios de 10 mm respectivamente cobertos com membranas alternativas (confeccionadas em laboratório usando fita de politetrafluoretileno Amanco® e três camadas de fita micropore Missiner e Missiner®) e V3 e V5 - tampa rígida de polipropileno autoclavável com um e dois orifícios de 10 mm respectivamente cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas (MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão) de 0,22 µm

Variáveis	Vedações					CV(%)
	V1	V2	V3	V4	V5	
EFVR (µm)	1360,842bc	1442,563b	1344,721bc	1627,234a	1283,348c	3,11
ECR (µm)	1688,259b	1631,463b	2152,349a	1377,186c	1686,636b	2,32
CMR (mm)	67,405a	57,160c	45,798d	65,655ab	59,515bc	4,38
DEAD	0,534a	0,512a	0,462a	0,119b	0,245b	13,62
IEAD (%)	4,406a	3,628ab	2,844ab	1,440b	2,511ab	30,34
CMPA (mm)	86,899a	73,491ab	68,098b	70,116b	67,286b	11,781
EMNP (µm)	409,009b	730,313a	337,161c	319,516d	265,494e	0,81

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na horizontal diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV (%) corresponde ao coeficiente de variação dos dados em porcentagem.

Analisando os cortes transversais do eixo, a epiderme apresentou camada bisseriada de células, o córtex foi composto por 6 a 13 camadas de células bem justapostas, com diferentes tamanhos. O cilindro vascular apresentou maior diferenciação nos tratamentos em presença de sacarose (Figura 4 F a J).

Avaliando os cortes transversais do caule, observamos que a epiderme e os eixos embrionários apresentaram camada bisseriadas de células, enquanto o córtex apresentou de 3 a 4 camadas de células justapostas. O desenvolvimento secundário do caule também foi evidenciado, como ilustrado na figura 4 (K a O).

Observando os cortes transversais da raiz, verificou-se que esta apresenta formato circular. O córtex foi composto por três a cinco camadas de células, apresentando espaços intercelulares, necessários para a aeração das células da raiz (RAVEN; EVERT; EICHHORN,1999). O cilindro central foi composto por diversas camadas de células, formado pelo xilema, floema e o cambio. O xilema apresenta vasos com tamanhos irregulares, sendo que em alguns cortes foi possível evidenciar os raios medulares (Figura 4 P a T).

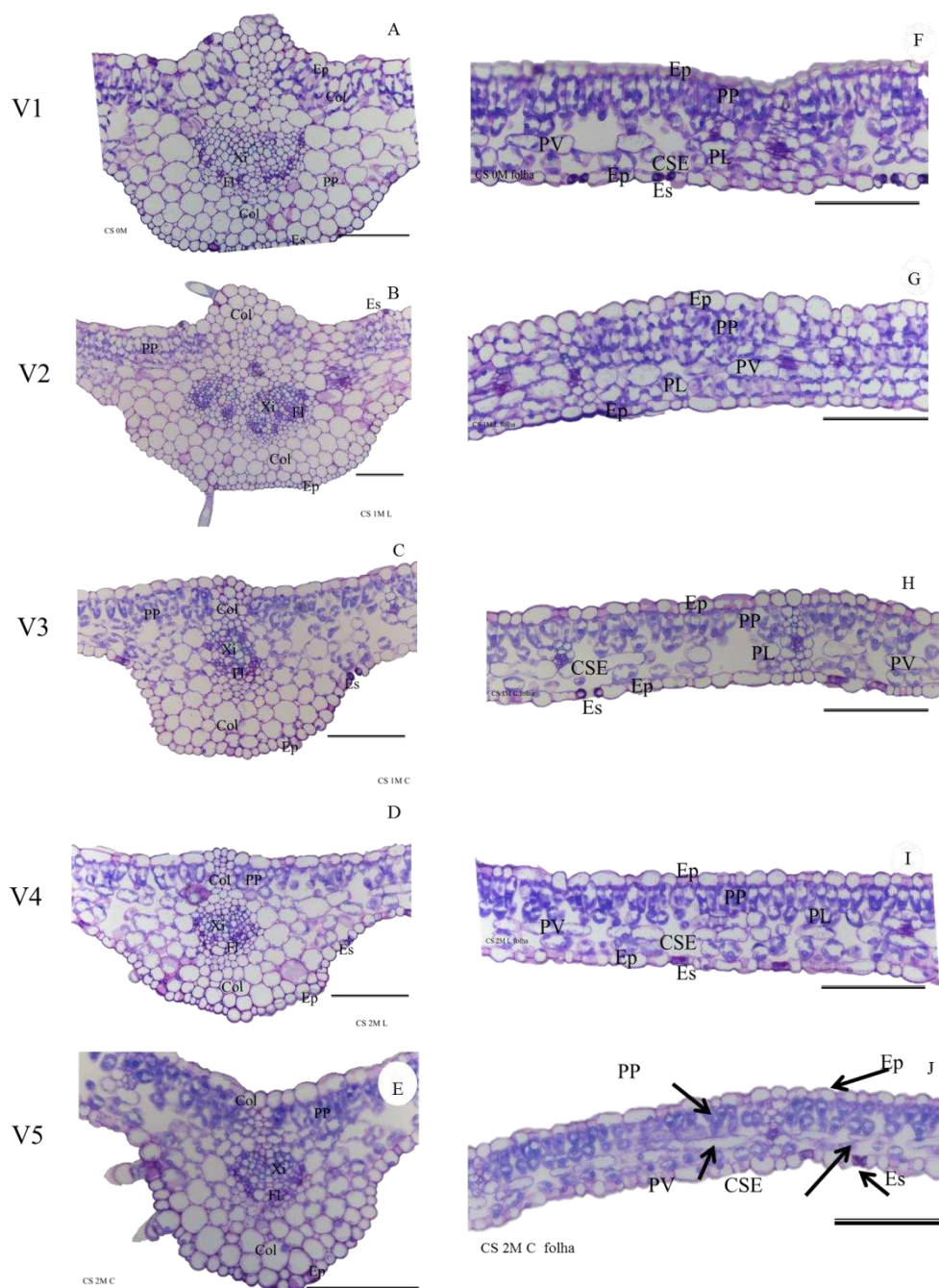


Figura 3- Seções transversais de folhas de plântulas de soja (*Glycine max* L. Merrill) cultivadas *in vitro* por 22 dias, em diferentes sistemas de vedações na presença de 30 g L⁻¹ de sacarose. A-E Seções da nervura mediana, F-J Seções do limbo foliar. Col – Colênquima, CSE – Câmara Subestomática, Es- Estômato, Ep – Epiderme, Fl – Floema, PL – Parênquima Lacunoso, PP – Parênquima paliçádico, PV – Parênquima paravenal, Xi – Xilema. Barras correspondem a 100μm. V1 - tampa rígida de polipropileno autoclavável, V2 e V4 - tampa rígida de polipropileno autoclavável com um e dois orifícios de 10 mm respectivamente cobertos com membranas alternativas (confeccionadas em laboratório usando fita de politetrafluoretileno Amanco® e três camadas de fita micropore Missiner e Missiner®) e V3 e V5 - tampa rígida de polipropileno autoclavável com um e dois orifícios de 10 mm respectivamente cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas (MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão) de 0,22 μm

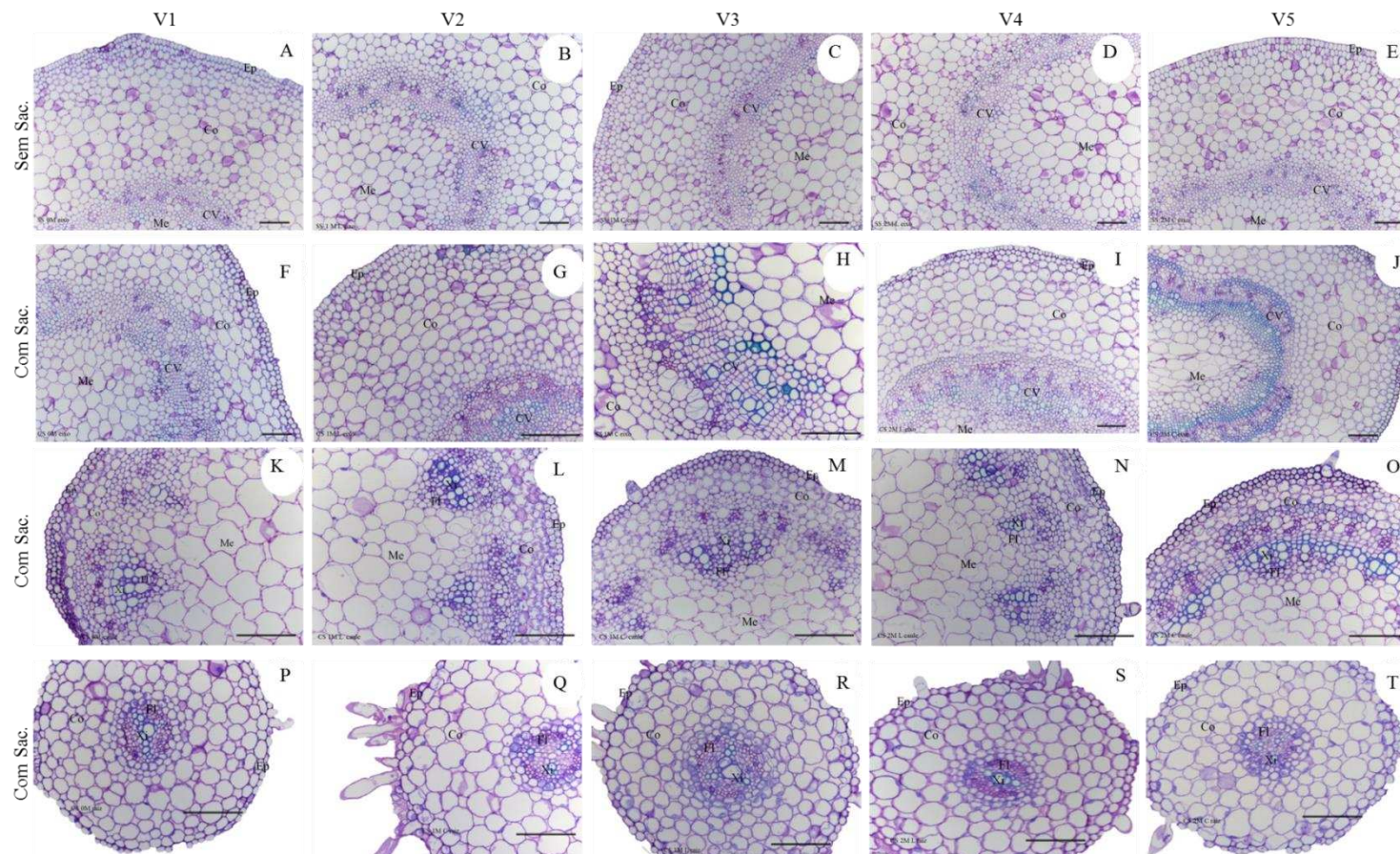


Figura 4- Secções transversais de plântulas de soja (*Glycine max* L. Merrill) cultivadas *in vitro* por 22 dias, em diferentes sistemas de vedações na presença de 0 ou 30 g L⁻¹ de sacarose. A-J - Secções do eixo embrionário, K-O - Secções de caule, P-T - Secções de raízes. Co – Córtex, CV – Cilindro Vascular, Ep – Epiderme, Fl – Floema, Me – Medula, PL – Parênquima Lacunoso, PP – Parênquima paliádico, Xi – Xilema. Barras correspondem a 100µm. V1 - tampa rígida de polipropileno autoclavável, V2 e V4 - tampa rígida de polipropileno autoclavável com um e dois orifícios de 10 mm respectivamente cobertos com membranas alternativas (confeccionadas em laboratório usando fita de politetrafluoretileno Amanco® e três camadas de fita micropore Missiner e Missiner®) e V3 e V5 - tampa rígida de polipropileno autoclavável com um e dois orifícios de 10 mm respectivamente cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas (MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão) de 0,22 µm.

CONCLUSÃO

- O fornecimento de 30 g L⁻¹ de sacarose favorece o desenvolvimento *in vitro* de eixos embrionários de soja.
- As plântulas desenvolvidas em recipientes com membranas alternativas (confeccionadas em laboratório usando fita de politetrafluoretileno Amanco® e três camadas de fita micropore Missiner e Missiner®) apresentaram desenvolvimento semelhantes às plântulas desenvolvidas em recipientes com membranas comerciais ((MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão) de 0,22 µm), tendo como vantagem o seu baixo custo.

REFERÊNCIAS

- AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A.; KOZAI, T. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stages of embryos. **Ann Bot**, v. 90, p. 11–19, 2002.
- AGUIAR, T. V.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; AZEVEDO, A. A.; FERREIRA, R. S. ANATI QUANTI: Software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. **Plant Dan**, v. 25, n. 4, p. 649-659, 2007.
- ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. **The Leguminosae: a source book of characteristics, uses, and nodulation**. 744 p. 1981.
- BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v.107, p. 13–24, 2011.
- DENG, R.; DONNELLY, D. J. *In vitro* hardening of red raspberry through CO² enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. **Can J Plant Sci**, v. 73, p. 1105–1113, 1993.
- DESJARDINS Y.; GOSSELIN, A.; YELLE, S. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂ enriched environments and supplementary lighting. **J Am Soc Hortic Sci**, v.112, p.846–851, 1987.
- DI, R.; PURCELL, V.; COLLINS, G.B.; GHABRIL, S.A. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. **Plant Cell Rep**, v. 15, p. 746-750, 1996.
- DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A. de; CASTRO, E. M. de; SOARES, R. P.; EMRICH, E. B.; MELO L. A. de. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciênc Agrotec**, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, 2008.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Exp Cell Res**, v. 50, p. 151-158, 1968.
- HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: Torres, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPq, v.1, p. 371-393, 1998.
- IAREMA, L.; CRUZ, A. C. F. da; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; VIEIRA, R. F.; OLIVEIRA, E. J. de; OTONI, W. C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 110, n. 2, p. 227-238, 2012.
- IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schonland ex Pillans. **Plant Growth Regul**, v. 60, p. 143–150, 2010.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. Mc Graw-Hill, New York, 1940.

LEAL-COSTA, M. V.; ARAGÃO, F. J. L.; REINERT, F.; TAVARES, E. S. Anatomia foliar de plantas transgênicas e não transgênicas de *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae). **Rev Biociên**, v. 14, n. 1, p. 23-31, 2008.

LOURENÇO, H. A. de O.; FILHO, S. C. V.; VASCONCELOS, J. M.; CAMPOS, H. D. Anatomia foliar de diferentes cultivares de soja e sua relação com incidência e severidade de doenças. **GI Sci Technol**, v. 4, n. 3, p.37 – 47, 2011.

MOSALEEYANON, K.; CHAN-UM S.; KIRMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO²-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Sci Horticult**, v. 103, p. 51–63, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures." **Physiol Plant**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MUSSURY, R. M.; BETONI, R.; SILVA, M. A.; SCALON, S. P. Q. Anatomia foliar de soja infectada por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow e Sydow e tratadas com extratos vegetais. **Rev Bras Pl Med**, v.14, n.1, p.18-25, 2012

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure: Principles and selected methods**. Termarcarphi Pty. Ltd., Melbourne, 344 p., 1981.

OLIVEIRA, D. M. T. Morfologia de plântulas e plantas jovens de 30 espécies arbóreas de *Leguminosae*. **Acta Bot Bras**, v. 13, n. 3, 1999.

OSÓRIO, M. L.; GONÇALVES, S.; OSÓRIO, J.; ROMANO, A. Effects of CO² concentration on acclimatization and physiological responses of two cultivars of carob tree. **Biol Plant**, s. 1, v. 49, n. 2, p. 161-167, 2005.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6^a. ed. Coord. Trad. KRAUS, J. E. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

RIBEIRO, A. P. O. **Influência de genótipo, agente gelificantes, precursor (ACC) e inibidores (AVG e ATS) do etileno e tipo de vedação na morfogênese *in vitro* de berinjela (*Solanum melongena* L.)**. Viçosa: UFV, 113 p. [Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento], Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

RODRIGUES, M.; COSTA, T. H. F.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, v.48, p.67–72, 2012.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L. F. de; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M.; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 110, n. 3, p. 413–422, 2012.

SHIM, S. W.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. *In vitro* and ex vitro growth of grapevine rootstock '5BB' as influenced by number of air exchanges and the presence or absence of sucrose in culture media. **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 75, p. 57–62, 2003.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance**. In: World Congress on Computers in Agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

TORRES, A. C.; DUVAL, F. D.; RIBEIRO, D. G.; BARROS, A. F. F.; ARAGÃO, F. A. D. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata* *in vitro*. **Hortic Bras**, v.23, n. 3, p. 789-792, 2005.

TRANSFORMAÇÃO DE SOJA (*Glycine max* L. Merrill) A PARTIR DE EIXOS EMBRIONÁRIOS IMATUROS

RESUMO

Os primeiros trabalhos para a transformação de soja utilizaram embriões zigóticos imaturos para a indução de embriogênese somática. Outros explantes como os nós cotiledonares, passaram a serem utilizados, poucos trabalhos tem explorado a transformação de embriões zigóticos imaturos, usando a organogênese direta para obtenção de plantas. Este trabalho teve como objetivo estudar a transformação genética usando como explantes eixos de embriões zigóticos imaturos de cultivares de soja, utilizando a construção para o silenciamento do gene oleoil dessaturase (FAD2:1) e aclimatizar as plantas oriundas destes embriões transformados. A adaptação do tratamento de descontaminação de sementes com o gás clorídrico foi eficiente para desinfestar vagens imaturas. As estratégias adotadas no cultivo *in vitro* e no processo de aclimatização possibilitaram obter 29 plantas aclimatizadas, das quais 19 produziram sementes. Sete plantas apresentaram amplificação de fragmentos do tamanho esperado para análise molecular, e quatro produziram sementes. A utilização deste protocolo baseado na transformação de eixos embrionários imaturos nos permitiu alcançar uma eficiência de transformação entre 1,3 e 2,6%.

PALAVRAS-CHAVE: Eixos embrionários; RNAi; Transformação; Ácidos graxos.

INTRODUÇÃO

A soja é uma das mais importantes culturas produtoras de proteína e óleo do mundo (KIM et al, 2013; MEDIC; ATKINSON; HURBURGH JR., 2014), contribuindo com aproximadamente 48 % da produção mundial de óleo, os quais são destinados principalmente para o consumo humano e mais recentemente também para a produção de biodiesel. O conteúdo de óleo no grão da soja é uma das suas principais características, e geralmente seu teor varia de 18 % a 22 % entre as cultivares (MINUZZI et al., 2009). O óleo de soja é composto essencialmente de triacilgliceróis, sendo que em variedades comerciais estes são formados principalmente pelos ácidos palmítico (11 %), esteárico (4 %), oleico (24 %), linoleico (54 %) e linolênico (7 %) (YADAV, 1996). São encontrados mutantes com teores alterados desses ácidos graxos (PHAM et al., 2011).

Os elevados teores de ácido linoleico e linolênico são os principais responsáveis pela alta instabilidade oxidativa do óleo (ANDERSON e BAKER, 1983), pois ácidos graxos polinsaturados são mais suscetíveis às hidroxilações que produzem cetonas e aldeídos voláteis, os quais modificam as características físico-químicas do óleo (GERMAN e KINSELLA, 1985). Desta forma, a composição de ácidos graxos direciona a melhor adequação do óleo para alimentação ou produção de biodiesel, entre outros.

O desenvolvimento de produtos vegetais com características superiores, que atendam a demanda do consumidor final e da indústria, muitos esforços têm sido empregados na utilização da engenharia de vias metabólicas visando alterar a constituição nutricional das plantas. Para a redução dos níveis de produtos gênicos indesejáveis, dois métodos têm sido comumente utilizados: a interrupção da expressão do gene e o silenciamento pós-transcricional do gene (TANG et al., 2007), levando a obtenção de transgênicos. O silenciamento gênico transcricional (TGS) ou knockout está relacionado ao bloqueio na transcrição do gene alvo promovido por uma metilação na região promotora, em nível nuclear. Já o silenciamento gênico pós-transcricional é um mecanismo de degradação de RNA sequência-específica no citoplasma levando a não tradução do gene de interesse (FAGARD; VAUCHERET, 2000; SINGH et al., 2000; WASSENEGGER, 2000; VAUCHERET et al., 2001).

O ano de 2012 foi o 16º ano de comercialização destas culturas biotecnológicas (1996-2012). Após 16 anos consecutivos de crescimento da área plantada com OGMs (Organismos Geneticamente Modificados), o aumento de 5,8 % em 2012 elevou a área plantada para 170 milhões hectares, uma área 100 vezes maior que a área plantada em 1996 (JAMES, 2013).

Existem diversos métodos que são utilizados para a transformação de soja, os quais variam o tipo de explante utilizado, o método para introdução da construção (WANG e WATERHOUSE, 2001; SILVA et al., 2004; WATSON et al., 2005) e o uso de ferramentas para aumentar a eficiência da transformação. Entretanto, existem poucos trabalhos que exploram a transformação de embriões zigóticos imaturos, usando a organogênese direta para obtenção de plantas.

Este trabalho teve como objetivo transformar geneticamente eixos de embriões zigóticos imaturos de quatro cultivares de soja (CAC-1, BR16, Embrapa 48 e VX04-569) com o vetor p β CB Dessaturase RNAi, o qual possui sequências sense e antisense do gene da oleoil dessaturase (FAD2:1) e aclimatizar as plantas transformadas.

MATERIAL E MÉTODOS

A condução deste trabalho foi realizada utilizando a estrutura dos laboratórios de Biologia Molecular e Filogeografia, Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Laboratório de Análises Bioquímicas, Laboratório de Genética Molecular de Plantas e Laboratório de Cultura de Tecidos I e II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), sediado na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Material vegetal e cultura bacteriana

Para os ensaios de transformação foram utilizadas sementes das variedades CAC-1, BR16, Embrapa 48 e VX04-569, do Programa de Melhoramento Genético da Qualidade da Soja em desenvolvimento no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO).

Como via de transformação foi utilizada a estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* KYTR1, contendo o vetor p β CB Dessaturase RNAi, o qual possui sequências sense e

antisense do gene da oleoil dessaturase (372 pb) sob o controle do promotor da sub-unidade α da β -conglucininina transformada por meio de eletroporação por Sousa (2007), de acordo com protocolo de Torisky et al. 1997. Para confirmação, as células foram crescidas em meio YEP [peptona (10 g L^{-1}), NaCl (5 g L^{-1}), extrato de levedura (5 g L^{-1}), ágar 1,5 % (p/v), pH 7,0] contendo canamicina (50 mg L^{-1}) e rifampicina (100 mg L^{-1}), a 28°C até a formação de colônias. Após a confirmação da inserção da construção, as colônias foram repicadas em ágar YEP. Para armazenamento dos estoques, colônias características foram inoculadas em meio YEP acrescido de canamicina (50 mg L^{-1}) e rifampicina (100 mg L^{-1}) a 28°C a 180 rpm até DO_{600} de 0,6 a 0,8. Os estoques foram acrescidos de glicerol (50 %), congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C (SOUSA, 2007).

Para os ensaios de transformação, a cultura foi pré-ativada por 24 h em 200 mL de meio YEP acrescido de canamicina (50 mg L^{-1}) e rifampicina (100 mg L^{-1}) a 28°C e 180 rpm, até obtenção de DO_{600} entre 0,6 e 0,8. Em seguida, a cultura foi dividida em alíquotas de 50 mL e as células concentradas por centrifugação (3300 g, 10 min, 20°C). O meio de co-cultivo utilizado para resuspensão do pellet foi composto de $\frac{1}{2}$ da concentração de sais de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), 30 g L^{-1} de sacarose e $0,64 \text{ mg L}^{-1}$ de MES e suplemento de vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968), com pH $5,4 \pm 0,2$ ajustado com KOH 1M e 5 mg L^{-1} de BAP, $0,2 \text{ }\mu\text{M}$ de Acetoseríngona, $1 \text{ }\mu\text{M}$ de Tiosulfato de sódio e $1 \text{ }\mu\text{M}$ de Diotreitól, adicionados após a esterilização.

Transformação soja a partir de eixos embrionários imaturos

Plantas das cultivares VX 04-5692, BR16, Embrapa 48 e CAC-1, foram conduzidas em casa de vegetação e após o início da floração (± 50 dias) foram monitoradas as etapas de desenvolvimento para determinar os estágios reprodutivos para colheita das vagens para possibilitar a extração adequada de eixos embrionários de sementes imaturas, conforme Figura 1.



Figura 1 – Grão e vagens de soja (*Glycine max* L. Merrill) da variedade CAC-1 cultivadas em casa de vegetação, colhidas em diferentes estádios fenológicos. A- Grão extraído da vagem no estágio R4; B- R5.1; C- R5.3; D- R5.4; E- R6 e F- R7.

Para a produção de material axênico foram utilizadas sementes imaturas. Para isso, vagens foram colhidas nos estádios R5 e R6 e desinfestadas em gás clorídrico, produzido pela mistura de 3,5 mL de HCl 12N e 100 mL de hipoclorito de sódio (NaClO) com 2,0 a 2,5 % de cloro ativo, em câmara de gás (DI et al., 1996) por 6 h. Em seguida, foi feita a transferência das vagens para câmara de fluxo laminar e, após enxágue em água estéril, a secção longitudinal para extração das sementes, que foram excisadas promovendo a extração dos eixos embrionários, com o auxílio de bisturi e pinças estéreis.

Para a transformação, 75 eixos embrionários de cada variedade foram incubados por 30 min em suspensão bacteriana (25 mL). Como controle negativo, cinco explantes de cada variedade foram incubados em 25 mL de meio de co-cultivo.

Após secagem em papel filtro, foi realizado o plaqueamento dos explantes em meio de co-cultivo solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar (Sigma). Em cada placa foram inoculados 25 explantes, cultivados por sete dias, sendo cinco dias no escuro e dois dias sob condições fotomixotróficas (temperatura ambiente 25 ± 2 °C e 60 µmol m⁻² s⁻¹ de irradiância provida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares por um fotoperíodo de 16 h de luz).

Para crescimento, 12 a 13 explantes foram transferidos para frascos tipo Magentas[®] (Sigma) e mantidos na posição vertical, observando a polaridade fisiológica, em meio

de alongamento composto por sais de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968), 30 g L⁻¹ de sacarose e 0,64 mg L⁻¹ de MES, solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar (Sigma) e pH de 5,7 ± 0,2 ajustado com KOH 1M, acrescido de 25 mg L⁻¹ do antibiótico meropenem, após a autoclavagem (121 °C, 1,5 atm, 20 min). Passados 14 dias, os eixos embrionários foram transferidos para o meio de alongamento acrescido do agente seletivo glufosinato de amônio (2 mg L⁻¹) (Finale®, Bayer S/A), onde permaneceram por mais 14 dias. As plântulas sobreviventes tiveram seus brotos seccionados e transferidos para o meio de enraizamento com seleção composto por ½ da concentração de sais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968), 15 g L⁻¹ de sacarose e 0,64 mg L⁻¹ de MES, solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar (Sigma), e pH 5,7 ± 0,2 ajustado com KOH 1M, acrescido de meropenem (25 mg L⁻¹), AIB (1 mg L⁻¹) e glufosinato de amônio (2 mg L⁻¹), após a autoclavagem (121 °C, 1,5 atm, 20 min), no qual permaneceram por 15 dias.

Aclimatização das plântulas

Para Aclimatização, os ramos foram transferidos para recipientes plásticos com capacidade para 50 mL, contendo substrato Maxplant® esterilizado por autoclavagem (121 °C, 1,5 atm, 20 min) e mantidos em salas de crescimento (25 ± 2 °C e 60 µmol m⁻² s⁻¹ de irradiância provida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares por um fotoperíodo de 16 h de luz) durante 5 dias. Posteriormente, as plantas foram transferidas para uma câmara de nevoeiro, onde recebiam vapor de água por 15 s a cada 2 h por 10 dias. Na etapa final, as plantas foram transferidas para vasos, com capacidade de 3 litros contendo uma mistura 1:1 de substrato Maxplant® e solo, previamente adubado com nitrogênio, fósforo e potássio, e mantidas em casa de vegetação até a finalização do seu ciclo reprodutivo.

Análise Molecular

Para a detecção dos transformantes, as amostras de DNA foram extraídas de folhas coletadas das plantas mantidas em casa de vegetação, segundo a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990). A quantidade de DNA foi estimada em espectrofotômetro (A260nm) e a qualidade avaliada em gel de agarose a 0,8 % em TBE 1X (Tris Base 0,089 M, ácido bórico 0,089 e EDTA pH 8,0 0,05 M), com brometo de etídeo 0,1 µg mL⁻¹, visualizados sob luz ultravioleta.

Foram utilizados primers específicos para a detecção do gene GUS (β -Glucoronidase), GusF 5'TTGGGCAGGCCAGCGTATCGT3' e GusR 5'ATCACGCCAGTTCAACGCTGAC3'. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler Pro[®] (Eppendorf) sob as seguintes condições: período inicial de desnaturação a 94 °C, (2 min), seguido por 35 ciclos de polimerização, (94 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg e 72 °C por 45 seg) e período adicional de polimerização a 72 °C por 2 min.

Os fragmentos amplificados por PCR foram analisados em gel de agarose 1,2 % em TBE 1X, com brometo de etídeo, visualizados sob luz ultravioleta, e posteriormente fotodocumentados.

Teste de GUS nas sementes

Para a identificação e seleção de sementes transformadas, fragmentos de sementes daquelas plantas positivas na reação de PCR foram coletados e submetidos ao teste histoquímico da atividade da enzima β -glucuronidase (GUS) em microplacas de 96 poços. Foi utilizada a solução de X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil--D-glucuronídeo; Gold BioTechnology, Inc. USA) em quantidade suficiente para cobrir o fragmento. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h no escuro para permitir a análise da expressão do gene GUS (JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987).

Determinação da composição do grão

A determinação dos teores de óleo e proteína foi realizada simultaneamente em espectrômetro de infravermelho próximo, FT-NIR, modelo Antaris II[®] (Thermo Scientific) utilizando-se sementes inteiras.

Análise do teor de ácidos graxos

Para a análise dos ácidos graxos, amostras de 15 mg de sementes trituradas foram adicionadas a 1 mL de hexano, e a mistura mantida a 4 °C por cerca de 16 h, sob atmosfera de N₂. Após esse tempo, a solução de lipídios foi transferida para outro tubo e o solvente, evaporado por borbulhamento de N₂. Para a obtenção dos ésteres metílicos, foi utilizada a metodologia descrita por Bubeck; Fehr; Hammond (1989). À fração lipídica foi adicionado 0,4 mL de metóxido de sódio 1M, sendo os tubos mantidos em banho-maria, a 30 °C, por cerca de 1 h. Em seguida, foram acrescentados 1 mL de água

deionizada e 1,5 mL de hexano. Após 1 h, com o auxílio de uma pipeta, cerca de 0,75 mL da fase orgânica foi transferida para outros tubos, aos quais foram adicionados 2 mg de sulfato de sódio anidro. Após a derivatização, 1 µl da fase orgânica foi injetada em cromatógrafo a gás GC-2010 Plus (SHIMADZU), equipado com auto-injetor AOC-20i integrador C-R7A e detector, com coluna tipo Carbowax (30 m X 0,32 mm). As condições de análise empregadas foram as seguintes: temperatura da coluna igual a 225 °C; do injetor, 245 °C; e do detector, 280 °C. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio, com um fluxo de 1,3 mL min⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Assepsia do material vegetal

A utilização de vagens originadas de ambiente controlado associada à desinfestação em câmara com gás clorídrico possibilitou 100 % de eficiência na descontaminação. A eficácia desta técnica para a descontaminação de sementes maduras já havia sido descrita em outros trabalhos (KIM et al, 2013; LIU et al 2013; BARROS, 2010; PAZ et al. 2005, DI et al, 1996), entretanto até o presente momento não há relatos na literatura de sua utilização na descontaminação de vagens de soja.

Obtenção das plantas transgênicas

A escolha dos embriões imaturos ocorreu em função da fase de desenvolvimento, visto que estes explantes constituem um tecido mais novo, pouco diferenciado, além de terem uma quantidade menor de células, com potencial organogênico maior. Por outro lado, embriões de sementes em ponto de maturação fisiológica possuem tecidos mais diferenciados e maduros, e nesse estágio o processo de desenvolvimento é interrompido temporariamente por um período de secagem e dormência (KAPLAN e COOKE, 1997).

Desta forma quanto mais cedo o embrião for transformado, maior a possibilidade de sucesso na obtenção de plantas transformadas, pois o plano corporal do embrião não é baseado em linhagem celular, mas na posição de células individuais dentro do embrião (VOGLER e KUHLEMEIER, 2003). Assim, se inserimos a construção de interesse em uma célula em posição favorecida dentro do embrião, reduzimos a possibilidade de obtenção de quimeras. A fonte de explantes para a transformação é altamente variável,

devido aos (DEVI et al., 2012; WANG e XU, 2008; HONG et al., 2007; XUE; XIE; ZHANG, 2006; PAZ et al., 2005; LIU; YANG; WEI, 2004; KO et al., 2003; HINCHEE et al., 1988) fatores que interferem na eficiência de transformação.

Após a infecção com *Agrobacterium* e o período de co-cultivo (Figura 2 B), os eixos embrionários foram transferidos para o meio de elongação onde permaneceram por 14 dias (Figura 2 C). Posteriormente, os brotos que se desenvolveram, foram seccionados e transferidos para o meio de elongação com seleção, onde permaneceram por até 14 dias (Figura 2 D e E). Durante este período, geralmente após 7 dias, observou-se que os ramos não transformados e o tratamento controle começaram a amarelar e necrosar. Os ramos sobreviventes foram transferidos para o meio de enraizamento com seleção (Figura 2 F). De acordo com Zeng et al. (2004) a utilização de uma alta concentração de agente seletivo nos primeiros dias de seleção reduz consideravelmente a sobrevivência de plantas parcialmente transformadas (quimeras).

Após 50 dias as plantas selecionadas (Figura 2 F) iniciaram o procedimento de aclimatização (Figura 2 G).

Aclimatização das plântulas

Ao final deste experimento foram obtidas 29 plantas aptas à aclimatização, das quais 19 produziram sementes, conforme apresentado no gráfico 1 e figuras 2 L e 2 M . As plantas de soja propagadas *in vitro* apresentam floração precoce, como esperado (MENDONÇA, 2010). Desta forma, quando a floração inicia as plantas ainda não estão preparadas para suportar o processo reprodutivo. Entretanto, isso é minimizado quando as plantas estão bem estabelecidas, com um sistema radicular abrangente e rico em nodulações. Assim os tratos culturais como irrigação e adubação adequadas, condução do crescimento da planta e a manutenção da temperatura em casa de vegetação possibilitou a obtenção de plantas produtivas (Figura 2 L e M), com a produção de 61 sementes em média por planta, conforme apresentado no gráfico 1.

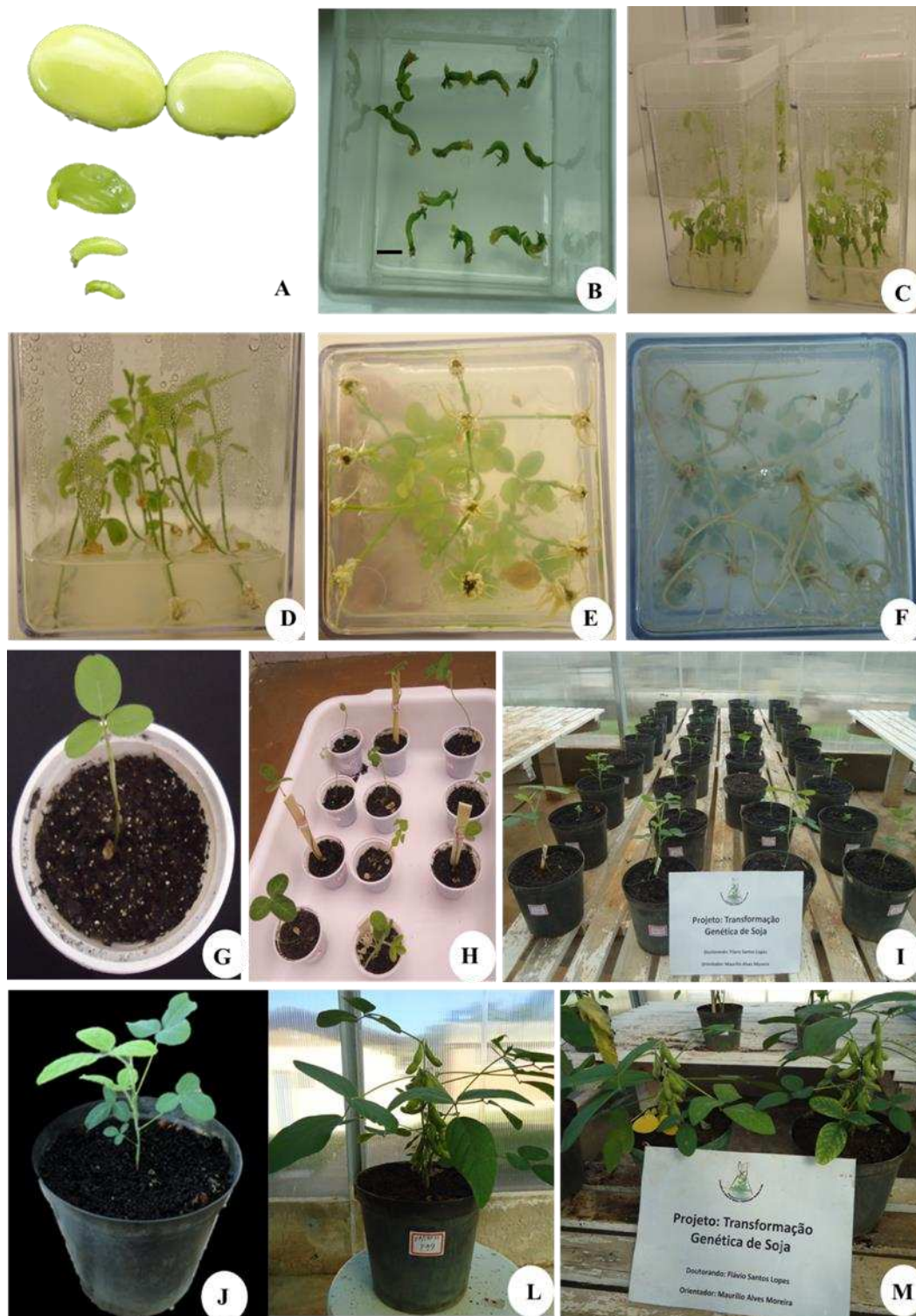


Figura 2 – Fases do cultivo de eixos embrionários e aclimatização de plântulas de soja (*Glycine max* L. Merrill) no processo de obtenção dos transgênicos. A- Eixos embrionários de sementes imaturas, B e C – Plântulas se desenvolvendo em meio de elongação, D e E – Ramos se desenvolvendo em meio de elongação com seleção com 2 mg L^{-1} de glufosinato de amônio, F – Plântulas enraizadas em meio de enraizamento com seleção com 2 mg L^{-1} de glufosinato de amônio. G e H – Plântulas em câmara de nevoeiro, I e J – Plantas aclimatizadas, desenvolvendo-se em vasos em casa de vegetação, L e M – Plantas originadas de processo de transformação, cultivadas *in vitro*, com produção de vagens.

No gráfico 1 podemos observar que as plantas #67 e #79 foram a mais e a menos produtivas com 92 e 36 sementes, respectivamente (Figura 3). A média de sementes por vagem foi de 2,06, sendo proporcional o número de vagens e de sementes em todas as plantas obtidas.

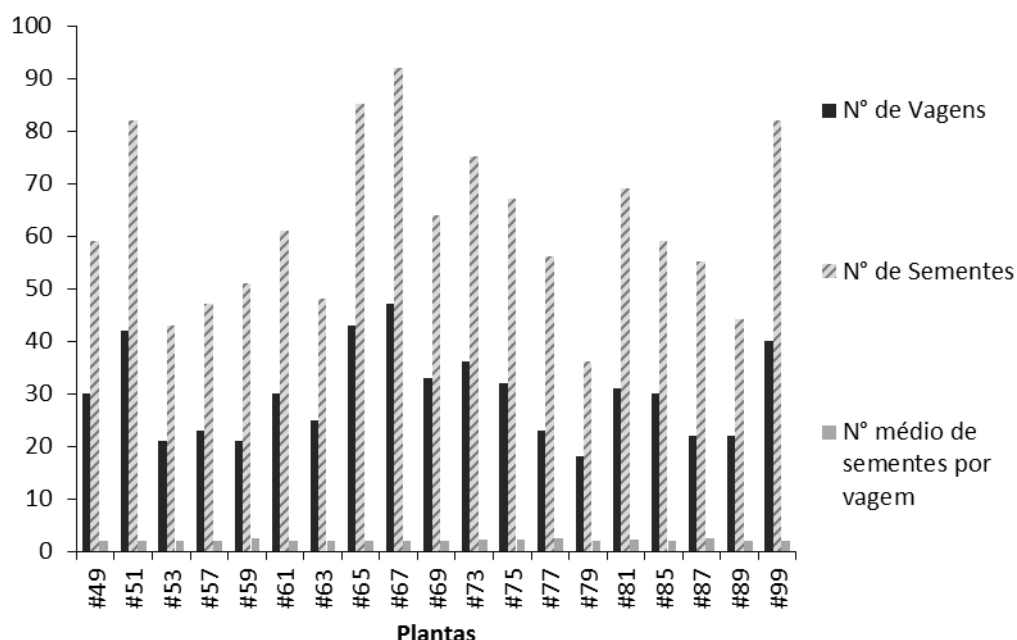


Figura 3 – Produção de vagens e sementes por plantas de soja originadas de cultivo *in vitro*.

Análise Molecular

As 29 plantas T0 geradas durante a produção dos transgênicos, foram submetidas a análise de PCR, a qual demonstrou que sete plantas apresentaram fragmento do tamanho esperado. Entretanto, somente quatro plantas sobreviveram até o final do ciclo.

Os quatro eventos - #99 (CAC-1), # 59 e #89 (BR-16) e #85 (EMBRAPA-48) apresentaram amplificação de fragmento com tamanho de ~420pb, como esperado (Figura 4). A variedade CAC-1 teve uma eficiência de transformação de 1,33% assim como a variedade EMBRAPA-48 e a variedade BR-16 apresentou eficiência de 2,66%. A baixa eficiência e alta frequência de escapes estão de acordo com relatos de trabalhos que utilizaram o sistema de seleção baseado em glufosinato de amônio (ZHANG et al., 1999; OLHOFT et al., 2001; PAZ et al., 2004). A utilização de agentes seletivos nas fases iniciais de transformação favorece uma seleção mais rápida das células transgênicas (SAWAHEL, 1994), enquanto que durante os estágios de desenvolvimento

seguintes a influência exercida pelo agente seletivo deve ser mínima para as células transformadas (ARAGÃO; BRASILEIRO, 2002).

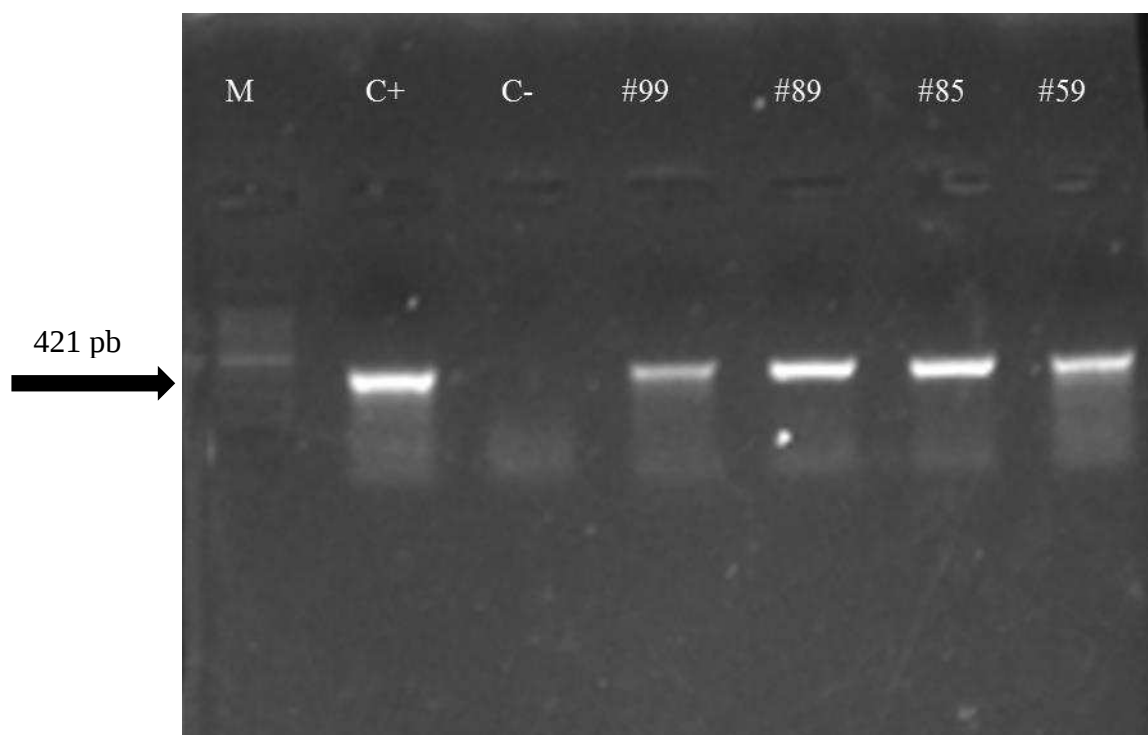


Figura 4 – Análise molecular por PCR dos eventos transformantes. Nas três primeiras canaletas do gel estão M se referindo a uma marcador de 100 pb (Invitrogen), o C+ ao controle positivo (DNA do plasmídeo usado na transformação) e C- ao controle negativo (DNA de plantas não transformadas). A seta aponta fragmento amplificado, com tamanho esperado (420 pb)

Teste de Gus nas sementes

Examinamos as sementes T_1 das quatro plantas T_0 transformadas independentes, com a integração confirmada por PCR do gene *GUS*. Todas as plantas T_0 apresentaram sementes T_1 positivas no teste de GUS (Tabela 1), entretanto as segregações apresentadas não obedecem a uma proporção mendeliana de 3:1 ou 15:1 (GUS^+ : GUS^-), como observado por Song et al. (2013). Chistou et al. (1990) encontraram proporções diferentes das proporções mendelianas e atribuíram os resultados encontrados a falta de viabilidade do pólen contendo o transgene, como possível resultado de uma mutação ou de uma aberração cromossômica. As sementes T_1 que apresentaram coloração positiva (Figura 5) foram selecionadas e plantadas em casa de vegetação. Folíolos dessas plantas T_1 foram coletados e a extração de DNA foi realizada.

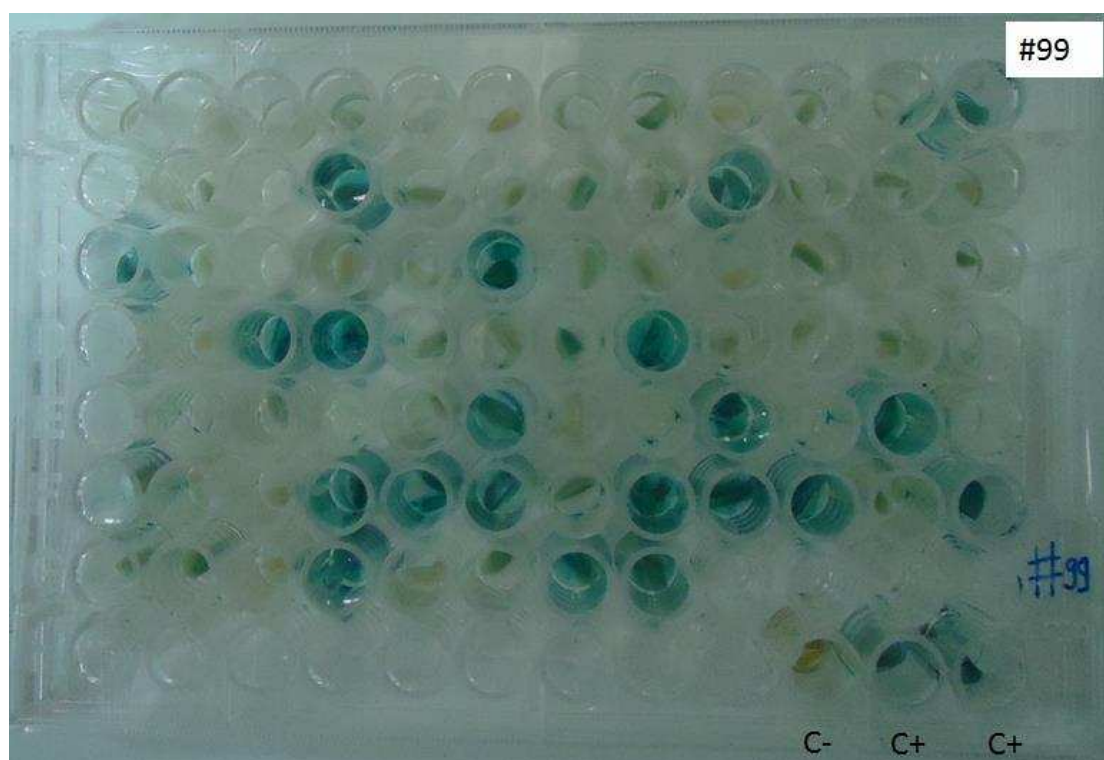


Figura 5 – Teste de GUS para sementes da planta #99.

Tabela 1 – Segregação do gene *GUS* em sementes T₁ de quatro plantas PCR positivas

Plantas	Variedade	Nº de sementes T ₁	Segregação		
			GUS ⁺	GUS ⁻	Proporção
#99	CAC-1	80	21	59	1:3
#89	EMBRAPA-48	44	10	34	1:3
#85	EMBRAPA-48	59	14	45	1:3
#59	BR-16	51	31	20	outra

A análise dos resultados de PCR das plantas T₁ apresentou resultado contraditório com o teste de GUS realizado nas sementes T₁ (dados não mostrados). De acordo com dados da literatura, a técnica de coloração baseada no gene marcador seletivo (GUS) é a ferramenta mais indicada para a detecção de transgênicos, por apresentar menor resultado falso positivo do que a reação de PCR, além da maior facilidade de execução e do baixo custo (SONG et al., 2013). Entretanto Tör, Mantell e Ainsworth (1992) trabalhando com transformação de espécies de *Dioscorea* encontraram falsos positivos para o teste de GUS, o qual foi relacionado a presença de duas espécies de *Curtobacterium* na planta. Desta forma, consideramos os dados inconclusivos.

Determinação da composição do grão e do teor de ácidos graxos

Nossos resultados para a análise da composição de óleo e proteína apresentaram uma ligeira redução para estes teores, nas sementes da planta #89 (Figura 6). Estudos mostram que a metodologia NIRs tem possibilitado a diferenciação entre plantas transgênicas e não transgênicas. Esta técnica tem permitido analisar o conteúdo de ácidos graxos, proteína, amino ácidos e vitaminas diferencialmente expressos em plantas transgênicas (RAO e HILDEBRAND, 2009; JIAO et al., 2010).

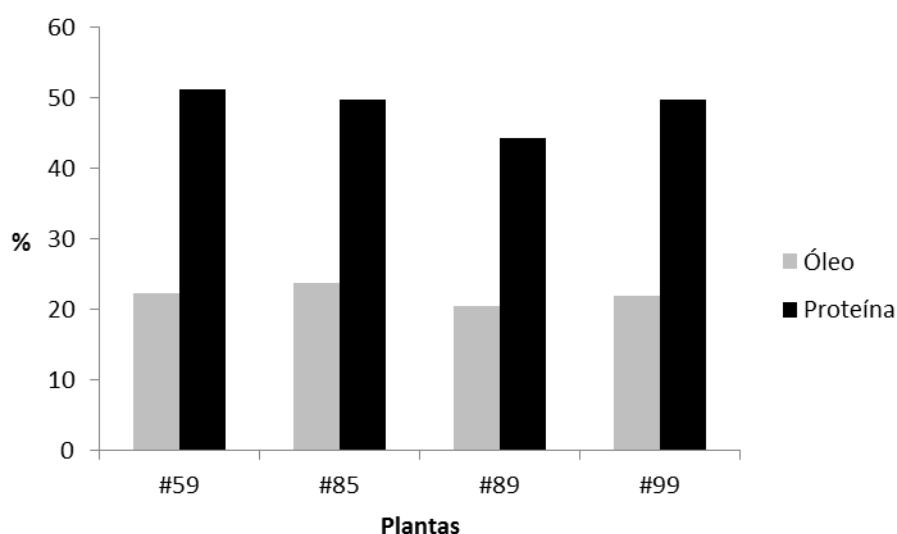


Gráfico 6 – Comparativo da composição de óleo e proteína de sementes de soja transformadas para silenciamento do gene da oleoil dessaturase.

A avaliação da composição dos cinco principais ácidos graxos da fração óleo das sementes T1, não apresentaram diferenças para as quatro plantas avaliadas. As diferenças observadas para a planta #59 são relacionadas ao genótipo utilizado para a transformação. Tanto o genótipo quanto o ambiente e a sua interação podem influenciar o perfil de ácidos graxos e concentração de óleo em soja (LEE; BYLEU; SHANON, 2010).

Tabela 2 – Proporção da composição de ácidos graxos de sementes de plantas transformadas para o silenciamento da oleoil dessaturase.

Ácidos Graxos	Plantas			
	#99	#89	#85	#59
Ac. Palmítico	10,25	11,47	11,00	11,79
Ac. Esteárico	3,64	3,72	3,61	3,99
Ac. Oleico	17,66	17,93	17,64	20,75
Ac. Linoleico	60,82	59,68	60,58	56,88
Ac. Linolênico	7,60	7,18	7,14	6,57

Avaliando os resultados alcançados, concluímos que o protocolo utilizado apresenta vantagens em sua utilização, entretanto, para os próximos trabalhos, devem ser realizadas alterações na concentração de agente seletivo, visando reduzir o número de plantas escapes.

CONCLUSÕES

- A adaptação do tratamento de descontaminação possibilitou a obtenção de vagens imaturas em boas condições de assepsia;
- As estratégias adotadas no cultivo *in vitro* e no processo de aclimatização possibilitaram obter 29 plantas aclimatizadas, das quais 19 produziram sementes;
- Sete plantas apresentaram fragmento de DNA amplificado no tamanho esperado para a análise molecular, as quatro que produziram sementes;.
- A utilização deste protocolo baseado na transformação de eixos embrionários imaturos, nos permitiu alcançar uma eficiência de transformação entre 1,3 e 2,6%.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. D.; BAKER, J. E. Deterioration of seeds during aging. **Phytopathology**, v. 73, n. 2, p. 321-325, 1983.
- ARAGÃO, F. J. L., BRASILEIRO, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. **Braz J Plant Physiol**, v. 14, p. 1-10, 2002.
- BARROS, B. A. **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**. Viçosa: UFV, 73 p. [Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento], Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.
- BUBECK, D. M.; FEHR, W.R.; HAMMOND, E.G. Inheritance of palmitic and stearic acid mutants of soybean. **Crop Science**, v. 29, p. 652-656, 1989.
- DEVI, M-K.; SAKTHIVELU, G.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G. A. Protocol for augmented shoot organogenesis in selected variety of soybean [*Glycine max* L. (Merr.)]. **Indian J Exp Biol**, v. 50, n. 10, p.729-734, 2012.
- DI, R., PURCELL, V., COLLINS, G.B., GHABRIL, S.A. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. **Plant Cell Rep**, v. 15, p. 746-750, 1996.
- FAGARD, M.; VAUCHERET, H. (Trans) gene silencing in plants: How many mechanism? **A Rev Plant Phys Plant Mol Biol**, v. 51, p. 487-496, 2000.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Exp Cell Res**, v. 50, p. 151-158, 1968.
- GERMAN, J. B.; KINSELLA, J. E. Lipid oxidation in fish tissue. Enzymatic initiation via lipoxygenase. **J Agric Food Chem**, v. 33, p. 680-683, 1985.
- HINCHEE, M. A. W.; CONNER-WARD, D. V.; NEWELL, C. A.; MCDONNELL, R. E.; SATO, S. J.; GASSER, C. S.; FISCHHOFF, D. A.; RE, D. B.; FRALEY, R. T.; HORSCH, R. B. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer. **Bio/Technology**. v. 6, p. 915-922,1988.
- HONG, H. P.; ZHANG, H.; OLHOFT, P. M.; WILEY, H.; TOREN, E.; HILDEBRAND, H.; JONES, T.; CHENG, M. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via Agrobacterium in soybean [*Glycine max* (L.) MERR.]. **In Vitro Cell Dev Biol Pl**, v. 43, p. 558-568, 2007.
- JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011**. ISAAA Brief No. 43. ISAAA: Ithaca, NY. 2011.
- JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO J**, v. 6, p. 3901-3907, 1987.

- JIAO, Z.; SI. X. X., LI, G. K.; ZHANG, Z. M.; XU, X. P. Unintended compositional changes in transgênica rice seeds (*Oryza sativa* L.) studied by spectral and chromatographic analysis coupled with chemometrics methods. **J Agric Food Chem**, n. 58, v. 3, p. 1746-1754, 2010.
- KAPLAN, D. R.; COOKE, T. J. Fundamental concepts in the embryogenesis of dicotyledons: a morphological interpretation of embryo mutants. **Plant Cell**, v. 9, p. 1903–1919, 1997.
- KIM, H. J.; KIM, M.-J.; PAK, J. H.; JUNG, H. W.; CHOI, H. K.; LEE, Y.-H. ; BAEK, I.-Y.; KO, J.-M.; JEONG, S.-C.; PACK, I.S.; RYU, K. H.; CHUNG, Y.-S. Characterization of SMV resistance of soybean produced by genetic transformation of SMV-CP gene in RNAi. **Plant Biotech Rep**, p. 1 – 9, 2013
- KO, T.; LEE, S.; KRASNYANSKI, S; KORBAN, S. S. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. **Theor Appl Gen**, v. 107, p. 439-447, 2003.
- LEE, J. D.; BILYEY, K. D.; SHANNON, J. G. Genetics and breeding for modified fatty acid profile in soybean seed oil. **J Crop Science Biotech**, v. 10, n. 4, p. 201-210, 2007.
- LIU, D.; LIU, S.; CHANG, D.; WANG, L.; WANG, D.; WANG, N. N. A simple and efficient method for obtaining transgenic soybean callus tissues. **Acta Physiol Plant**, p. 1 – 13, 2013
- LIU, H-K.; YANG, C.; WEI, Z-M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. **Planta**, v. 219, p. 1042-1049, 2004.
- MEDIC, J.; ATKINSON, C.; HURBURGH JR., C. R. Current Knowledge in Soybean Composition. **J Am Oil Chem Soc**, p. 1 -22, 2014
- MENDONÇA, M. A. C. **Padronização de metodologias de regeneração, via embriogênese somática e organogênese, e de aclimatização de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Viçosa: UFV, 101p. [Tese de Doutorado Genética e Melhoramento], Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.
- MINUZZI, A.; RANGEL, M. A. S.; BRACCINI, A. de L. e; SCAPIM, C. A., MORA, F.; ROBAINA, A. D. Rendimento, teores de óleo e proteínas de quatro cultivares de soja, produzidas em dois locais no estado do Mato Grosso do Sul. **Ciência Agrotecnol**, v. 33, n. 4, p. 1047-1054, 2009.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Phys Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OLHOFT, P. M.; FLAGEL, L. E.; DONOVAN, C. M.; SOMERS, D. A. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. **Planta**, v. 216; p.723-735, 2003

- PAZ M. M.; MARTINEZ, J. C.; KALVIG, A. B.; FONGER, T. M.; WANG; K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. **Plant Cell Rep**, v. 25, p. 206–213, 2005.
- PAZ, M. M.; SHOU, H.; GUO, Z.; ZHANG, Z.; BANERJEE, A. K.; WANG, K. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. **Euphytica**, v. 136, p. 167-179, 2004.
- PHAM, A-T.; LEE, J. D.; SHANNON, J. G.; BILYEU, K. A novel FAD2-1A allele in a soybean plant introduction offers an alternate means to produce soybean seed oil with 85% oleic acid content. **Theor Appl Gen**, v. 123, p. 793–802, 2011.
- RAO, S. S.; HILDEBRAND, D. Changes in oil content of transgenic soybeans expressing the yeast SLC1 gene. **Lipids**, v. 44, p. 945-951, 2009.
- SAWAHEL, W. A. Transgenic plants: performance, release and containment. *World J Microbiol Biotech*, v. 10, p. 139-144, 1994.
- SILVA, J.; CHANG, K.; HANNON, G. J.; RIVAS, F. V. RNA-interference based functional genomics in mammalian cells: reverse genetics coming of age. **Oncogene**, v. 23, p. 8401–8409, 2004.
- SINGH, S.; GREEN, A.; STOUTJESDIJK, P.; LIU, Q. Inverted-repeat DNA: a new gene-silencing tool for seed lipid modification. **Biochem Soc Trans**, v. 28, p. 925-927, 2000.
- SONG, Z-Y.; TIAN, J-L.; FU, W-Z.; LI, L.; LU, L-H.; ZHOU, L.; SHAN, Z-H.; TANG, G-X.; SHOU, H-X. Screening Chinese soybean genotypes for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation suitability. **J. Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)**, v.14, n.4, p. 289-298, 2013.
- SOUSA, C. S. **Caracterização in silico de genes da biossíntese de lipídeos e utilização de eixos embrionários e nós-cotiledonares na transformação genética de soja**, Viçosa: UFV, 80p. [Tese de Doutorado em Bioquímica Agrícola], Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012
- TANG, G.; GALILI, G.; ZHUANG, X. RNAi and microRNA: breakthrough Technologies for the improvement of plant nutritional value and metabolic engineering. **Metabolomics**, v. 3, p. 357-369, 2007.
- TANG, W.; NEWTON, R. J.; WEIDNER, D. A. Genetic transformation and gene silencing mediated by multiple copies of a transgene in eastern white pine. **J Exper Bot**, v. 58, p. 545-554, 2007.
- TÖR, M.; MANTELL, S. H.; AINSWORTH, C. Endophytic bacteria expressing β -glucuronidase cause false positives in transformation of *Dioscorea* species. **Plant Cell Rep**, v. 11, p. 452-456, 1992.
- VAUCHERET, H.; BECLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **J Cell Science**, v. 114, p. 3083-3091, 2001.

VOGLER, H.; KUHLEMEIER, C. Simple hormones but complex signaling. **Curr Op Plant Biol**, v. 6, p. 51–56, 2003.

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

WANG, M. B.; WATERHOUSE, P. M. Application of gene silencing in plants. **Cur Opin Plant Biol**, v.5, p. 146-150, 2001.

WASSENEGGER, M. RNA-direct DNA methylation. **Plant Mol Biol**, v. 43, p. 203-220, 2000.

WATSON, J. M.; FURASO, A. F.; WANG, M.; WATERHOUSE, P. M. RNA silencing platforms in plants. **FEBS Letters**, v. 579, p. 5982-5987, 2005.

XUE, R. G.; XIE, H. F.; ZHANG, B. A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells. **Biotechnol Lett**, v. 28, p. 1551–1557, 2006.

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

YANG, N.; CHRISTOU, P. Cell type specific expression of a CaMV 35s-GUS gene in transgenic soybean plants. **Dev Gen**, v. 11, p. 289-293, 1990.

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

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