

ABELMON DA SILVA GESTEIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOGÊNICO DE CULTIVARES DE SOJA  
E TRANSFORMAÇÃO COM O GENE DA CITRATO SINTASE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Genética e Melhoramento, para obtenção do título de "*Doctor Scientiae*".

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
FEVEREIRO - 2002

ABELMON DA SILVA GESTEIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOGÊNICO DE CULTIVARES DE SOJA  
E TRANSFORMAÇÃO COM O GENE DA CITRATO SINTASE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Genética e Melhoramento, para obtenção do título de "*Doctor Scientiae*".

APROVADA: 20 de fevereiro de 2002

---

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Conselheiro)

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Conselheiro)

---

Dra. Ana Lilia Alzate-Marin

---

Prof. Valterley Soares Rocha

---

Prof. Maurilio Alves Moreira  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade concedida.

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

À Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa de estudo.

À minha mãe Zenaide pelo amor, carinho e incentivo.

À Rita Andrade, pelo carinho em todos os tempos.

Ao Professor Maurilio Alves Moreira, pela amizade, pela confiança, pela orientação durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, pelas valiosas sugestões e pela amizade.

Ao Professor Wagner Campos Otoni, pelo intenso aconselhamento que tanto aprimoram este trabalho, pela amizade, pela agradável convivência e confiança.

Ao demais participantes da Banca Dra. Ana Lilia Alvate-Marin e Prof. Valterley Soares Rocha, pela colaboração.

À amiga Inês Chamel José, pela amizade, pela agradável convivência.

Ao Newton Diniz Piovesan, pela amizade, pela manutenção das plantas na casa de vegetação.

Ao amigo Jay Wallace, pela amizade e sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de laboratório de Sequenciamento e Análise de Fragmentos de DNA Andréia, Anna Cristina, Cândida, Cynthia, Francismar, Maria Luiza, Márcia, Marcio Antonio, Márcio Mendes, Marta, Ricardo, Valéria.

Aos amigos do laboratório de Cultura de Tecidos: Ana Paula, Edgard, Fabiana, Juliana, Leo, Lili, Luciano, Márcio, Miranda, Rodrigo e Vespasiano.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular Antônio, Arlindo, Fernanda, Francisco, Gerardo, Hannuar, Ivan Schuster, Kleber, Luciano, Marcelo, Pedro Ivo, Reginaldo, Tais, Tatiana, Telma, Thiago, Vagner, Valéria e Vilmar.

Aos Amigos de outros laboratórios Inês, Lucimara, Jander, João Paulo, Cristina, Rita

Aos meus amigos de república Alex, Alan, George, Victor Brasil, Walder.

À todos professores e colegas do curso de Genética e Melhoramento

Enfim a todos que participaram, de forma direta e indireta, para que este trabalho pudesse ser realizado.

## BIOGRAFIA

ABELMON DA SILVA GESTEIRA, filho de Fábio de Jesus Gesteira e Zenaide da Silva Gesteira, nasceu em Cruz das Almas, Estado da Bahia,

Cursou o primeiro e segundo grau em Cruz das Almas – BA.

Em setembro de 1994, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal da Bahia, em Cruz das Almas – BA.

Em março de 1995, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, tendo defendido tese em 28 de julho de 1997.

Em agosto de 1997, iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, tendo defendido tese em 20 de fevereiro de 2002.

## CONTEÚDO

	Página
EXTRATO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO.....	1
REFERÊNCIAS.....	4
CAPÍTULO 1- RESPOSTA DE NOVE CULTIVARES DE SOJA [Glycine max (L.) Merrill] À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA .....	6
ABSTRACT.....	6
RESUMO.....	6
INTRODUÇÃO .....	7
MATERIAL E MÉTODOS.....	9
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
REFERÊNCIAS .....	17
CAPÍTULO 2- DETECÇÃO DA INSTABILIDADE GENÉTICA EM PLANTAS DE SOJA DERIVADAS DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DETERMINADA POR RAPD.....	20
ABSTRACT.....	20
RESUMO.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
REFERÊNCIAS .....	30
CAPÍTULO 3- EXPRESSÃO TRANSITÓRIA DE GENE <i>GUS</i> EM DOIS CULTIVARES DE SOJA E TRANSFORMAÇÃO COM O GENE CITRATO SINTASE.....	36
ABSTRACT.....	36
RESUMO.....	36

INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
Material vegetal.....	41
Cepa da bactéria, plasmídio e condições de cultivos.....	41
Transformação com o gene <i>GUS</i> .....	42
Transformação com o gene da <i>Citrato sintase</i> .....	43
Ensaio histoquímico de GUS.....	43
Confirmação das plantas transformadas com o gene <i>CS</i> .....	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
Estudo de expressão transitória.....	46
Transformação com o gene da <i>Citrato Sintase (CS)</i> .....	48
REFERÊNCIAS.....	52

## EXTRATO

GESTEIRA, Abelmon da Silva, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2002. **Avaliação do Potencial Embrionário de Cultivares de Soja e Transformação com o Gene *Citrato Sintase***. Professor Orientador: Maurilio Alves Moreira. Professores Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e Wagner Campos Otoni.

Avaliou-se o potencial genético de nove cultivares de soja em relação à embriogênese somática utilizando 2,4-D como agente indutor a fim de selecionar os genótipos mais responsivos para serem transformados com o gene que codifica a *citrato sintase* (CS). Foi verificado um efeito marcante do genótipo nas respostas morfogênicas. Os cultivares Spring, CAC-1 e COODETEC 201 apresentaram as melhores respostas, com médias de produções de embriões por cotilédone de 32,63, 27,60 e 26,80, respectivamente. Cinco cultivares foram utilizados na fase de proliferação. Destes, os cultivares CAC-1 e Spring apresentaram altas frequências de formação de agregados de embriões secundários, 90,6% e 91,6%, respectivamente. Para avaliar a fidelidade genética das plantas regeneradas por este sistema embrionário foram utilizados marcadores RAPD. Vinte “primers” foram usados para avaliar 44 regenerantes do cultivar Spring e 28 do cultivar CAC-1. Três “primers” apresentaram bandas polimórficas para dois regenerantes do cultivar Spring, em relação à planta matriz, com uma frequência de variação somaclonal de 4,5%. Para ‘CAC-1’, quatro “primers” mostraram polimorfismos em um regenerante, com frequência de variação de 3,5%. Estes resultados mostram que marcadores RAPD podem ser utilizados para assegurar a estabilidade genética de plantas regeneradas via sistema de embriogênese somática em soja, garantindo a fidelidade genética dos regenerantes. A taxa de variação somaclonal, avaliada em nível molecular, foi relativamente baixa para as plantas regeneradas (menor que 5%) quando comparado às relatadas para outras espécies. Portanto, o protocolo de embriogênese somática com 180  $\mu$ M de 2,4-D foi usado para obter plantas de soja geneticamente modificadas com o gene CS. Após seleção dos cultivares mais responsivos à embriogênese, seguiu-se a transformação genética. Cotilédones dos cultivares Spring e CAC-1 foram utilizados para avaliar o nível de expressão transitória em resposta à transformação mediada por *Agrobacterium* com o auxílio da sonicação. O tempo de sonicação foi de 2 segundos e os cotilédones foram co-cultivados em meio MSD40 suplementados e não-suplementado com acetossiringona (100  $\mu$ M). A frequência relativa da expressão transitória de gene *GUS*, na face adaxial dos cotilédones, foi de 13,9% e 19,3% para os cultivares CAC-1 e Spring, respectivamente, quando acetossiringona foi empregado. Porém, na ausência de acetossiringona, a frequência relativa reduziu para 0,37% e 1,46% para CAC-1 e Spring, respectivamente. A avaliação da expressão transitória na otimização de sistemas de transformação serviu como suporte para transformação com o gene CS. Agregados de embriões do cultivar CAC-1 foram transformados com o gene (CS) de *Daucus carota* e de *Escherichia coli*. Um total de 26 embriões transformados com o gene CS de *D. carota* e 31 com o gene CS de *E. coli* chegaram à fase final para conversão em plantas. Quando colocados no meio de conversão e germinação o processo de conversão foi iniciado com a emissão dos primeiros folíolos. No entanto, logo em seguida

iniciava um forte processo de necrose dos folíolos com conseqüente morte das plântulas. Sugere-se que o efeito necrótico observado nos folíolos das plântulas transgênicas poderia estar associado ao nível de expressão do gene CS. Uma superexpressão desse gene levaria ao acúmulo de citrato nas folhas, inibindo a respiração o que acarretaria acúmulo de piruvato. Piruvato em excesso na folha é utilizado na síntese de lactato, causando elevação na acidez. Este fato promoveria a necrose observada nos folíolos das plântulas de soja transformadas com o transgene CS.

## ABSTRACT

GESTEIRA, Abelmon da Silva, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2002. **Evaluation of the embryogenic potential of soybean cultivars and transformation with the *citrate sintase* gene.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Committee Members: Everaldo Gonçalves de Barros and Wagner Campos Otoni.

The genetic potential of nine soybean cultivars were evaluated in relation to the somatic embryogenesis using 2,4-D as inductor in order to select the most responsive genotypes to be transformed with the gene that codifies citrate synthase (CS). It was observed a strong effect of the genotype in the morphogenic response. Spring, CAC 1 and COODETEC 201 cultivars showed the best answers, with averages of embryo production for cotyledon of 32.6, 27.6 and 26.8, respectively. Five cultivars were used in the proliferation phase. Of these, CAC 1 and Spring showed the highest frequencies in the formation of secondary embryo clusters, 90.6% and 91.6%, respectively. It was concluded that the embryogenic system optimized in this work can be employed for soybean transformation once a responsive cultivar is used. RAPD markers were used to evaluate genetic stability of regenerants of soybean plants obtained via somatic embryogenesis using 180  $\mu$ M 2,4-D. Twenty primers were used for screening 44 regenerants from cultivar 'Spring' and 28 from cultivar 'CAC 1'. Three primers were polymorphic for two of the Spring-derived regenerants, with a somaclonal frequency of 4.5 %. Four primers were polymorphic for the CAC 1-derived regenerant, with a somaclonal frequency of 3.57%. The present results indicate the usefulness of RAPD markers to detect genetic instability in soybean primary regenerant plants derived from somatic embryogenesis, and as a certification tool for monitoring genetic stability during the regeneration process. Therefore, the somatic embryogenesis protocol with 180  $\mu$ M 2,4-D was used to obtain genetically modified soybean plants with the CS gene. Cotyledons of the cultivar Spring and CAC-1 were used to evaluate the transient expression level in response to sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. The time of sonication was of two seconds and the cotyledons were co-cultivated in MSD40 medium supplemented or not with acetosyringone (100  $\mu$ M). The relative frequency of transient expression of *GUS* gene, in the adaxial face of the cotyledons, was 13.9% and 19.3% for cultivar CAC-1 and Spring, respectively, when acetosyringone was used. However, in the absence of acetosyringone, the relative frequency reduced to 0.37% and 1.46% for CAC-1 and Spring, respectively. Optimization of the transient expression in transformation systems gave support for transformation with the CS gene. Embryo clusters of cultivar CAC-1 were transformed with CS gene from *Daucus carota* and from *Escherichia coli*. A total of 26 transformed embryos with the CS gene from *D. carota* and 31 with the CS gene from *E. coli* was obtained for conversion into plants. When these embryos were placed in the conversion and germination medium, the conversion process was initiated by emitting the first leaflets. However, soon after it began a strong necrosis took place of the leaflets with consequent death of the plants. It is suggested that the necrotic effect observed in the leaflets could be associated with the level of expression of the CS gene. Over expression of this gene would lead to citrate accumulation in the leaflets, inhibiting the respiratory process. That would induce piruvate accumulation. Piruvate in excess would be used for lactate

synthesis, causing an increase of the acidity. This fact would promote the necrosis observed in the leaflets of the transformed soybean plants with the CS gene.

## INTRODUÇÃO GERAL

A exsudação de ácidos orgânicos por raízes tem importante papel na nutrição mineral de plantas (Delhaize et al., 2001) estando relacionado com os mecanismos de tolerância ao alumínio e de aquisição de fósforo pela planta (López-Bucio et al., 2000, Delhaize et al., 2001). O mecanismo de tolerância ao alumínio pela exsudação de ácidos orgânicos foi proposto por Miyasaka et al. (1991). Estes autores mostraram que o sistema radicular do cultivar de feijão Rade, tolerante ao alumínio, quando crescido em solução contendo alumínio exsuda dez vezes mais citrato que o cultivar de feijão Romano, sensível ao alumínio. Os ácidos orgânicos quelam o alumínio fora da membrana plasmática, impedindo assim sua absorção (Miyasaka et al. 1991). Além disso, algumas espécies vegetais exsudam grande quantidade de ácidos orgânicos quando em deficiência de fósforo (López-Bucio et al., 2000, Delhaize et al., 2001). Em solos alcalinos, o fósforo é pouco disponível para planta uma vez se que complexa com cálcio (Schachtman et al., 1998). Os ácidos orgânicos podem deslocar fósforo de complexos insolúveis tornando-o mais disponível para absorção da planta (López-Bucio et al., 2000).

Na América do Sul, onde cerca de 850 milhões de hectares são solos ácidos (Herrera-Estrella, 1998) a toxicidade do alumínio é compartilhada por vários países e chega a afetar cerca de 40% das terras cultiváveis no mundo (Foy, 1988). Só no Brasil, solos ácidos, com baixa capacidade de troca catiônica e alta saturação de alumínio tóxico, atingem 205 milhões de hectares (Herrera-Estrella, 1998). Embora a produção de culturas em solos ácidos possa ser sustentada por aplicações de calcário, isto, muitas vezes, não é economicamente viável (Foy, 1988).

A produção de plantas transgênicas tolerantes ao alumínio pode ser considerada uma importante estratégia para aumentar a produção de culturas agrônômicas em solos ácidos (Herrera-Estrella, 1998). A superprodução de citrato é uma estratégia ideal para produção de plantas tolerantes ao alumínio (de la Fuente et al., 1997). Com esta finalidade foi demonstrado que plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), transformadas para superproduzir citrato aumentaram o efluxo de citrato com correspondente aumento na tolerância a alumínio (de la Fuente et al., 1997). Além disso, López-Bucio et al. (2000) verificaram que estas mesmas plantas de tabaco foram mais eficientes na assimilação de fósforo que plantas controle crescidas em solos alcalinos.

A transformação de plantas com genes de interesse, tal como gene que codifica citrato sintase (*CS*) que confere tolerância ao alumínio tóxico, passa por um sistema de

regeneração *in vitro*. De acordo com Finer (1994), para obter transformação eficiente faz-se necessário introduzir o DNA exógeno em células totipotentes. Entretanto, atingir estas células é um processo difícil. Além disso, quando as células competentes à regeneração são transformadas, as plantas regeneradas podem ser estéreis, provavelmente como consequência do longo tempo de manipulação *in vitro* (Santarém e Ferreira, 1997). Duas vias regenerativas têm sido utilizadas para a regeneração de soja: a organogênese e a embriogênese somática (Barwale et al., 1986). Ambas indicam a ocorrência de genótipo-especificidade nas respostas morfogênicas *in vitro* (Santarém e Ferreira, 1997). A regeneração via embriogênese somática em soja tem sido bastante estudada (Lazzeri et al., 1985; Ranch et al., 1985; Finer e Nagasawa, 1988), com reconhecido potencial para produção de grande quantidade de embriões de plantas independentemente transformadas (Finer e McMullen, 1991). Esta metodologia tem sido a mais utilizada para a transformação de soja devido a rápida proliferação em meio de cultura e pela baixa frequência de produção de plantas quiméricas (Finer, 1988).

Um método rápido de indução de embriões somáticos em soja foi recentemente descrito por Santarém et al. (1997). Os tecidos embriogênicos são induzidos a partir de cotilédones imaturos em meio MS semi-sólido suplementado 180  $\mu$ M de 2,4-D e proliferados em meio MS semi-sólido contendo 90  $\mu$ M de 2,4-D (Bailey et al., 1993). Os tecidos embriogênicos proliferativos são obtidos quatro semanas após a indução, e podem ser usados como tecido alvo para transferência de genes em células de soja, evitando problemas associados com o longo tempo com culturas em suspensão (Santarém et al., 1997; Santarém e Finer, 1999).

A transformação de soja foi relatada pela primeira vez em 1988 por dois grupos independentes, usando métodos diferentes. Hinchee et al. (1988) usaram transformação de nós cotiledonares mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, enquanto McCabe et al. (1988) transformaram ápices meristemáticos usando bombardeamento de partículas. Apesar disto, o processo de transformação ainda está longe de se tornar rotina (Trick et al. 1997). Atualmente ambos os métodos têm sido usados para transformação (Aragão et al., 2000; Hadi et al., 1996; Santarém et al., 1998, Santarém e Finer, 1999; Trick et al., 1997; Zhang et al., 1999). Problemas associados ao bombardeamento de partículas incluem a integração de múltiplas cópias ou cópias fragmentadas do DNA introduzido no genoma (Hadi et al., 1996; Trick et al., 1997). Por outro lado, o uso de transformação mediada por *Agrobacterium* integra um baixo número de cópias do gene no genoma da planta (Santarém et al., 1998).

Vários esforços têm sido feitos para otimizar a transformação mediada por *Agrobacterium* (Trick et al., 1997; Zhang et al., 1999; Yan et al., 2000). Um novo procedimento, no qual os explantes são expostos por breve período de tempo ao ultrassom, na presença de *Agrobacterium*, o que provoca microferimentos na superfície do tecido foi relatada por Trick et al. (1997). Esses microferimentos possibilitam a *Agrobacterium* atingir camadas de células potencialmente regenerativas mais profundamente nos tecidos, aumentando a probabilidade de infecção das células da planta. Além de auxiliarem na produção de sinais fenólicos (Stachel et al., 1985), induzindo os genes de virulência (*vir*) da bactéria.

Este trabalho teve como objetivos selecionar cultivares de soja mais responsivos ao protocolo de embriogênese somática usando 180 µM de 2,4-D para serem utilizados em protocolos de transformação, avaliar a fidelidade genética das plantas regeneradas por este sistema embriogênico, e obter soja tolerante ao alumínio pela integração do transgene *citrato sintase* de *Escherichia coli* e *Daucus carota*.

## REFERÊNCIAS

- Aragão, F.J.L.; Sarokin, L.; Vianna, G.R.; Rech, E.L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* L. Merrill] plants at a high frequency. *Theor. Appl. Genet.* 101:1-6; 2000.
- Bailey, M.A., Boerma, H.R., Parrott, W.A. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 29: 102-108, 1993.
- Barwale, U.B., Kerns, H.R., Widholm, J.M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167:473-481, 1986.
- de la Fuente, J.M., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera-Ponce, J.L., Herrera-Estrella, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276:1566-1568, 1997.
- Delhaize, E., Hebb, D.A., Ryan, P.R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol.* 125: 2059-2067, 2001.
- Finer, J.J. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell. Rep.* 7:238-241, 1988.
- Finer, J.J. Plant regeneration via embryogenic suspension cultures. In: Dixon, R.A. and Gonzales, R.A. (Eds.) *Plant Cell Culture: a practical approach.* Oxford University Press, Oxford. P.67-102, 1994.
- Finer, J.J., McMullen, M.D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension tissue culture. *In Vitro Cell Dev. Biol - Plant* 27:175-182, 1991.
- Finer, J.J., Nagasawa, A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 15:125-136, 1988.
- Foy, C.D. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. *Commun Soil Sci. Plant Anal.* 19: 959-987, 1988.
- Hadi, M.Z., McMullen, M.D., Finer, J.J. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 15:500-505, 1996.
- Herrera-Estrella, L. Transgenic plants for tropical regions: some considerations about their development and their transfer to the small farmer. In: *Plants and population: is there time?* NAS Colloquium, Beckman Center of the National Academy of Sciences, UC Irvine. 5-6 December 1998.
- Hinchee, M.A.W., Connor-Ward, D.V.; Newell, C.A., McDonnell, R.E. Sato, S.J., Gasser, C.S., Fischhoff, D.A., Re, D.B, Fraley, R.T., Horsch, R.B. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Bio Technol.* 6:916-922, 1988.
- Lazzeri, P.A., Hildebrand, D.F., Collins, G.B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Mol. Biol. Rep.* 3:160-167, 1985.

- López-Bucio, J. Martínez de la Vega, O., Guevara-García, A., Herrera-Estrella, L. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants overproduce citrate. *Nat. Biotech.* 18:450-453, 2000.
- McCabe, D.E., Swain, W.F., Martinell, B.J., Christou, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio Technol.* 6:923-926, 1988.
- Miyasaka, S.C., Buta, J.G., Howell, R.K., Foy, C.D. Mechanism of aluminum tolerance in Snapbeans. *Plant Physiol.* 96: 737-743, 1991.
- Ranch, J.P., Oglesby, L., Zielinski, C. Plant regeneration from embryo derived tissue cultures of soybeans. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 21:653-658, 1985.
- Santarém, E. R., Ferreira, A.G. Transformação de soja via bombardeamento de partículas. *ABCTP Notícias* 29: 2-9, 1997.
- Santarém, E.R.; Finer, J.J. Transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35:451-455, 1999.
- Santarém, E. R., Pelissier, B., Finer, J. J. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 33: 13-19, 1997.
- Santarém, E. R., Trick, H.N., Essig, J.S., Finer, J.J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Rep.* 17:752-759, 1998.
- Schachman, D.P., Reid, R.J., Ayling, S.L. Phosphorus uptake by plants: from soil to cells. *Plant Physiol.* 116:447-453, 1998.
- Stachel, S.E., Messens, E., Van Montagu, M., Zambryski, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells which activate the T-DNA transfer process in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318:624-629, 1985.
- Trick, H.N., Dinkins, R.D., Santarém, E.R., Di, R., Samoylov, V., Meurer, C.A., Walker, D.R., Parrott, W.A., Finer, J.J., Collins G. B. Recent advances in soybean transformation. *Plant Tiss. Cult. Biotech.* 3:9-27, 1997.
- Yan, B.; Reddy, M.S.; Collins, G.B.; Dinkins, R.D. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using immature zygotic cotyledon explants. *Plant Cell Rep.* 19:1090-1097; 2000.
- Zhang, Z., Xing, A. Staswick, P., Clemente, T.E. The use of glufosinate as a selective in *Agrobacterium*-mediated transformation soybean. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 56:37-46, 1999.

## CAPÍTULO 1

### RESPOSTA DE NOVE CULTIVARES DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill] À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

ABSTRACT - The genetic potential of nine soybean cultivars were evaluated in relation to the somatic embryogenesis using 2,4-D as inductor in order to select the most responsive genotypes to be transformed with the gene that codifies citrate synthase (CS). It was observed a strong effect of the genotype in the morphogenic response. Spring, CAC 1 and COODETEC 201 cultivars showed the best answers, with averages of embryo production for cotyledon of 32.6, 27.6 and 26.8, respectively. Five cultivars were used in the proliferation phase. Of these, CAC 1 and Spring showed the highest frequencies in the formation of secondary embryo clusters, 90.6% and 91.6%, respectively. It was concluded that the embryogenic system optimized in this work can be employed for soybean transformation once a responsive cultivar is used.

**Additional index terms** : somatic embryogenesis; soybean; *Glycine max*.

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial genético de nove cultivares de soja em relação a respostas à embriogênese somática utilizando 2,4-D como agente indutor. Foi verificado um marcante efeito do genótipo nas respostas morfológicas. Os cultivares Spring, CAC-1 e COODETEC 201 apresentaram as melhores respostas, com médias de produções de embriões por cotilédones de 32,6, 27,6 e 26,8, respectivamente. Cinco cultivares foram utilizados na fase de proliferação. Destes, os cultivares CAC-1 e Spring apresentaram altas frequências de formação de agregados de embriões secundários, 90,6% e 91,6%, respectivamente. Conclui-se que o sistema embriogênico utilizado pode ser empregado em trabalhos de transformação desde que um cultivar responsivo seja usado.

**Termos adicionais para indexação**: embriogênese somática, soja, *Glycine max*.

## INTRODUÇÃO

A soja ainda permanece particularmente recalcitrante para manipulação genética e o processo de transformação ainda não pode ser considerado como rotina (Trick et al., 1997). Um dos fatores limitantes à transformação é a resposta desta espécie ao cultivo *in vitro*. De acordo com Finer (1994), para obter transformação eficiente faz-se necessário introduzir o DNA exógeno em células totipotentes. Duas vias regenerativas têm sido utilizadas para regeneração desta espécie, a organogênese e embriogênese somática (Barwale et al., 1986). Ambas indicam a ocorrência de genótipo-especificidade nas respostas morfogênicas *in vitro* (Santarém e Ferreira, 1997).

A via organogênica tem sido estudada extensivamente (Cheng et al., 1980; Barwale et al., 1986; Wright et al., 1991; Meurer et al., 1998) e usada em protocolos de transformação para recuperar plantas transgênicas de soja (Hinchee et al., 1988; Di et al., 1996; Zhang et al., 1999; Donaldson e Simmonds, 2000). Também a regeneração via embriogênese somática em soja tem sido bastante estudada (Lazzeri et al., 1985; Ranch et al., 1985; Finer e Nagasawa, 1988) com reconhecido potencial para produção de grande quantidade de embriões de plantas independentemente transformadas (Finer e McMullen, 1991). Esta última tem sido mais utilizada para transformação de soja, devido a sua rápida proliferação em meio de cultura e pela baixa frequência de produção de plantas quiméricas (Finer, 1988). Isto porque, observações histológicas indicam que os embriões somáticos secundários proliferam a partir de uma única célula na superfície dos embriões primários (Finer, 1988). Entretanto, o tempo necessário para o estabelecimento de uma linhagem de células competentes à transformação pode levar de seis a doze meses, e, muitas vezes, as plantas regeneradas a partir destas linhagens apresentam fertilidade reduzida ou são estéreis (Hadi et al., 1996).

Vários trabalhos de otimização do sistema embriogênico demonstram que vários fatores influenciam a embriogênese somática em soja, dentre eles, destacam-se o agente solidificante (Huang et al., 1995), o tipo de explante (Hartweck et al., 1988; Buchheim et al., 1989; Calvo, 1989), o pH (Komatsuda e Ko, 1990), e o genótipo (Komatsuda e Ohyama, 1988; Komatsuda et al., 1992). Os tecidos embriogênicos podem ser proliferados em meio líquido (Finer, 1988) ou semissólido (Santarém et al., 1997). Esse último permite um menor tempo de obtenção e proliferação de tecidos embriogênicos usados para a transformação (Santarém e Ferreira, 1997).

Existem muitas variações entre diferentes laboratórios quanto ao sistema embriogênico utilizado para transformação, o que denota a dificuldade de identificação de condições ótimas para transformação e regeneração de plantas de soja (Meurer et al., 2001). Assim a otimização do sistema embriogênico pode aumentar o potencial para produção de um grande número de linhas transgênicas independentes. Até o presente, um número limitado de cultivares de soja tem mostrado respostas embriogênicas satisfatórias (Parrott et al., 1989; Simmonds e Donaldson, 2000; Meurer et al., 2001). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial genético de nove cultivares de soja em resposta ao cultivo *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Nove cultivares comerciais de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] foram usados neste trabalho: UFV 16, CAC-1, COODETEC 203 (CD 203), CS 303, Doko, Spring, COODETEC 201 (CD 201), IAC100 e Conquista. As plantas se desenvolveram sob fotoperíodo natural em casa de vegetação, sob aquecimento controlado, em vasos (34 X 15 cm) contendo uma mistura de terra com esterco de curral, na proporção 3:1. Foram cultivadas três plantas por vaso.

As vagens, contendo sementes imaturas, foram coletadas de plantas vigorosas e sadias, entre 15 a 20 dias após o florescimento e armazenadas durante a noite a 4 °C. A desinfestação das vagens constou da imersão em álcool 70%, por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) e três gotas/100mL de Tween 20, por 20 minutos. Em seguida, foram feitos três enxágües em água destilada estéril, a fim de remover o excesso de hipoclorito. As vagens foram dissecadas com um auxílio de pinças e bisturi, as sementes foram individualizadas e o embrião retirado. Os pares cotilédones foram transferidos para meio de indução com a face abaxial em contato com o meio (Santarém et al., 1997). Todos os procedimentos relatados foram feitos sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar.

O cultivo foi dividido em indução e proliferação. No processo de indução da embriogênese somática, foram cultivados 10 pares de cotilédones em placas de Petri (90 × 15 mm), com 25 ml de meio MSD40 (Finer e Nagasawa, 1988), contendo sais de MS (Murashige e Skoog, 1962) meia força, vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), 100 mg/L inositol, 3 % de sacarose, 0,2 % de Gelrite®, 180 µM de 2,4-D e pH 7. Em seguida, as placas de Petri foram fechadas com filmes transparentes de PVC. Cada placa com 10 pares de cotilédones constituía uma repetição, totalizando 40 cotilédones. As culturas foram incubadas à temperatura de 28 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 25-30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Os explantes permaneceram nesse meio por um período de 30 dias conforme descreve Santarém et al., (1997). Em seguida, os embriões, porventura diferenciados, foram transferidos para meios de manutenção e proliferação.

Selecionou-se os agregados de embriões primários na fase globular para prosseguir para fase de proliferação das culturas embriogênicas e foi utilizado o meio MSD20 (Wright et al., 1991) contendo sais MS meia força, vitaminas B5, 100 mg/L de inositol, 3 % de sacarose, 0,2 % de Gelrite®, 90 µM de 2,4-D e pH 5,8. Cinco placas com 20 grupos de embriões primários foram colocados no meio de proliferação dos cultivares Spring, CAC-1, UFV16, COD203 e COD201. As culturas foram mantidas sob subcultivos quinzenais, sob as mesmas condições conforme descrito para fase de indução. Em cada subcultivo procedeu-se à seleção dos tecidos embriogênicos, onde foram escolhidos os embriões na fase globular.

A avaliação das culturas na fase de indução levou em consideração os seguintes parâmetros: frequência de embriogênese (número de cotilédones embriogênicos por número de cotilédones utilizados); média de embriões produzidos por cotilédone (número total de embriões produzidos por número de cotilédones) e eficiência (frequência de embriogênese vezes a média de embriões produzidos), conforme descrito por Calvo (1989). Os experimentos de indução foram repetidos uma vez. A avaliação das culturas na fase de proliferação levou em consideração a frequência de formação de agregados embriogênicos acima de 0,4 cm. Para avaliar o efeito de tratamento na indução da embriogênese somática e na proliferação fez-se análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey, com  $P=0,01$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de embriões na superfície adaxial foi observada a partir de duas semanas de indução (Figura 1 e 2). A média de embriões por cotilédone variou de 4,60 a 32,63 para os cultivares CS 303 e Spring, respectivamente. Os cultivares mais responsivos à indução embriogênica foram CAC-1, Spring e CD 201 que produziram médias cinco vezes superiores aos genótipos CS 303 e Doko (Figura 1). As fracas respostas para os cultivares CS303 e Conquista podem ser atribuídas à baixa qualidade das sementes na época de colheita (15 a 20 dias após o florescimento) as quais encontravam-se enrugadas, apesar da aparência normal de suas vagens. Portanto, o estágio de desenvolvimento dos cotilédones imaturos é crítico para o sucesso da indução (Lippmann e Lippmann, 1984, Lazzeri et al., 1985, Ranch et al., 1985). Como pode ser visto, a seleção de explante de tamanho uniforme não assegura o estágio de desenvolvimento uniforme entre diferentes genótipos (Bailey et al., 1993). Assim, diferenças genotípicas para capacidade de indução podem ser minimizadas por seleção de explantes baseada em critérios diferentes ao comprimento da semente (Bailey et al., 1993). Um bom parâmetro é utilizar cotilédones, entre 4 a 7 mm, que apresentam cor verde e translúcida.

Na Figura 3 encontra-se a frequência de cotilédones com embriões e a eficiência da embriogênese. A frequência de indução entre os diferentes cultivares variou de 76,25%, para CS 303, a 100% para os cultivares CAC-1, Spring e CD 201. Bailey et al. (1993) trabalhando com cinco genótipos encontraram frequência de indução variando de 46% a 94% para o genótipo PI 417138 e Centennial, respectivamente. No presente trabalho apenas os cultivares CS303 e Conquista apresentaram frequências abaixo de 80%. Os cultivares que apresentaram as maiores médias de embrião também apresentaram maiores frequências. Calvo (1989), trabalhando com vários níveis de 2,4-D, concluiu que a elevação da concentração da auxina aumentou o número de embriões formados, permanecendo relativamente constante a frequência da embriogênese. Deste modo, pode se admitir que o potencial embriogênico do explante já estaria pré-determinado e que a auxina só estaria contribuindo para que um grupo destas células entrasse e se mantivesse coordenadamente em divisão celular (Calvo, 1989, Finer, 1988).

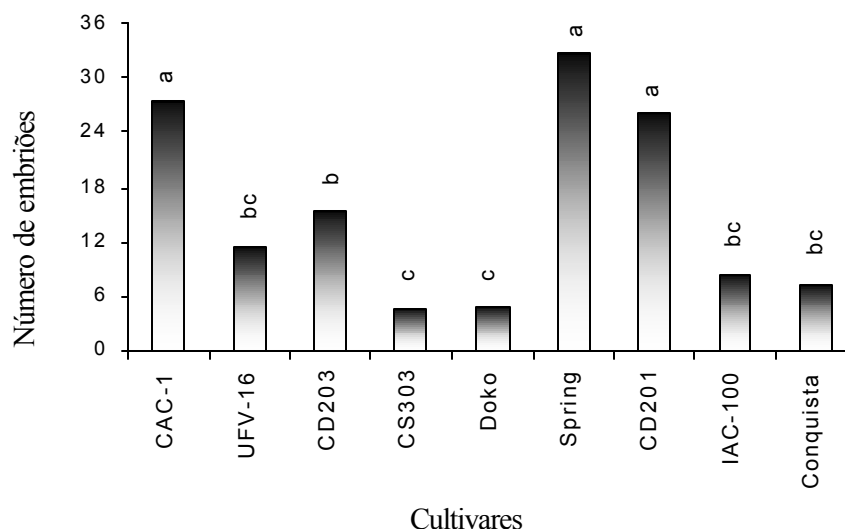


Figura 1 – Médias do número de embriões somáticos aos 21 dias de cultivo no meio de indução (MSD40). Médias seguidas pela menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 1 % de probabilidade.

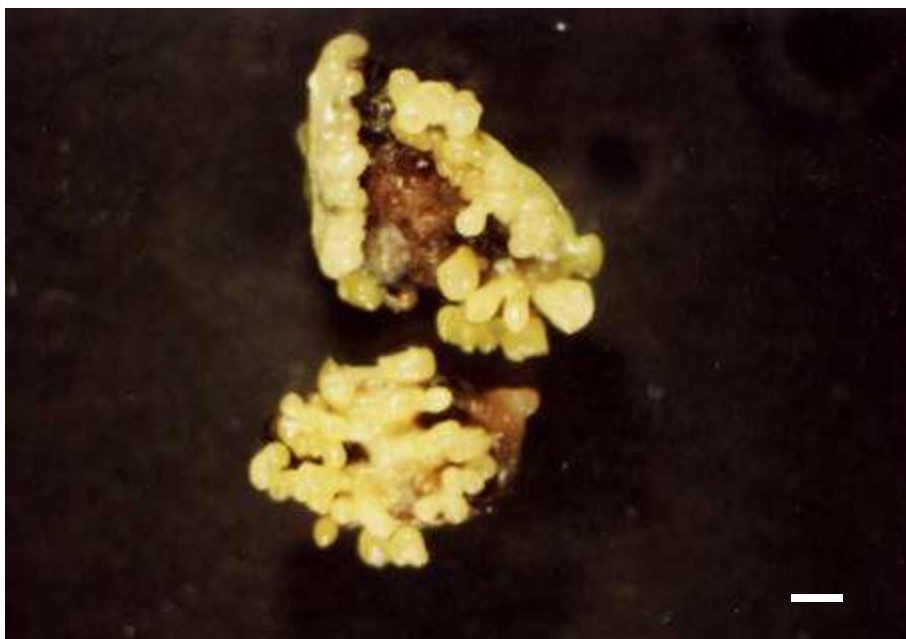


Figura 2 – Resposta embriogênica primária em cotilédones imaturos do cultivar Spring em meio de indução (MSD40), aos 21 dias de cultivo. (Barra = 1 mm)

A eficiência da indução embriogênica diferiu entre os cultivares variando de 3,51 para o cultivar CS 303 a 32,63 no cultivar Spring (Figura 3). A eficiência reflete muito mais o comportamento da média do que da frequência de indução. Calvo (1989)

trabalhando com 5 genótipos encontrou uma variação na eficiência de 0,27 no cultivar IAC-9 a 4,281 no cultivar IAS-1, em meio suplementado com 45  $\mu$ M de 2,4-D.

Uma vez induzida a embriogênese em cotilédones imaturos, não é necessário manter estes tecidos sob as mesmas condições para proliferação (Santarém et al., 1997). De acordo com Meurer et al. (2001), a mensuração da embriogênese na fase de proliferação é muito difícil e pouco precisa comparativamente à de indução. Devido a essa dificuldade para mensurar a formação de embriões secundários, avaliou-se apenas a frequência de formação de agregados de embriões secundários para os cultivares mais responsivos (Spring, CAC-1, UFV 16, COD 203 e COD 201) na fase de indução. Selecionou-se os agregados dos embriões primários que apresentavam embriões bem definidos na fase globular para prosseguir a fase de proliferação. A frequência de formação de agregados de embriões secundários foi maior nos cultivares CAC-1 e Spring (Figura 4). A ausência de correlação entre as fases de indução e proliferação tem sido observada em alguns trabalhos (Bailey et al., 1993, Simmonds e Donaldson, 2000). O cultivar CD 201, que na fase de indução apresentou a terceira maior média entre os nove cultivares, foi o que teve a menor frequência de proliferação entre os cinco avaliados na fase de proliferação.

Como se pode observar em nosso estudo, o genótipo teve um efeito marcante na indução da embriogênese. Estudos prévios têm documentado o efeito do genótipo na indução da embriogênese somática em soja usando diferentes protocolos (Ranch et al., 1985, Calvo, 1989, Komatsuda e Ohyama, 1988, Komatsuda et al., 1991, Shoemaker et al., 1991, Bailey et al., 1993, Santarém et al., 1997, Simmonds e Donaldson, 2000, Meurer et al., 2001.).

Meurer et al. (2001) relataram que o uso apropriado de um protocolo pode permitir a repetição da indução embriogênica em qualquer localização, contanto que um genótipo responsivo seja usado. Este forte efeito do genótipo da planta doadora do explante também pode ser consequência do estado fisiológico da mesma, levando-se em consideração que cada genótipo apresenta sua maior ou menor adaptação a uma determinada condição ambiental (Calvo, 1989, Bailey et al., 1993). Entretanto, a base genética para resposta à embriogênese somática não está bem definida, uma vez que estudos com cultivares relacionados geneticamente não apresentaram os mesmos padrões de respostas (Bailey et al., 1993; Tian et al., 1994, Simmonds e Donaldson, 2000, Meurer et al., 2001, ). No presente estudo, o cultivar CS 303, que é uma seleção do cultivar CAC-1, não apresentou uma resposta satisfatória à indução quando comparado ao cultivar CAC-1. Resultados semelhantes foram obtidos por Meurer et al.

(2001) que recomendam o uso do cultivar Kunitz em protocolos de embriogênese somática. Entretanto, Kunitz é uma linha isogênica muito próxima ao cultivar Williams (Bernard et al., 1991), e este ainda permanece recalcitrante com respeito a embriogênese somática (Meurer et al., 2001).

Entre vários cultivares testados nos mais diversos trabalhos de embriogênese somática o cultivar Jack tem-se mostrado superior aos demais (Santarém et al., 1997, Meurer et al., 2001). Santarém et al. (1997) trabalhando com esse cultivar conseguiram uma média de 44,2 embriões somáticos utilizando 180  $\mu$ M de 2,4-D. Meurer et al. (2001) avaliando a embriogênese somática em três regiões dos EUA mostram que o cultivar Jack, juntamente com os cultivares Kunitz e Fayette, apresentaram as maiores médias de embriões primários. Em nosso estudo os cultivares CAC-1 e Spring que foram os mais responsivos à embriogênese somática, apresentaram respostas à indução embriogênica equivalentes aos valores obtidos por Santarém et al. (1997) para o cultivar Jack. Principalmente se considerarmos que vários cotilédones podem ser utilizados com certa facilidade para indução embriogênica, e mesmo que não apresentem uma excelente resposta, esta pode ser suficiente para expansão e propagação da cultura, porém em longo prazo (Bailey et al., 1993)

Um dos fatores que contribuem para otimização do sistema embriogênico em soja e que pouco se comenta na literatura é o estado fisiológico da planta doadora. A indução da embriogênese somática a partir de plantas que sofreram algum tipo de estresse geralmente é mal sucedida. Neste trabalho, as tentativas de induzir embriogênese em plantas em épocas de baixas temperaturas, mesmo em plantas em casa de vegetação com aquecimento, foram mal sucedidas (dados não mostrados).

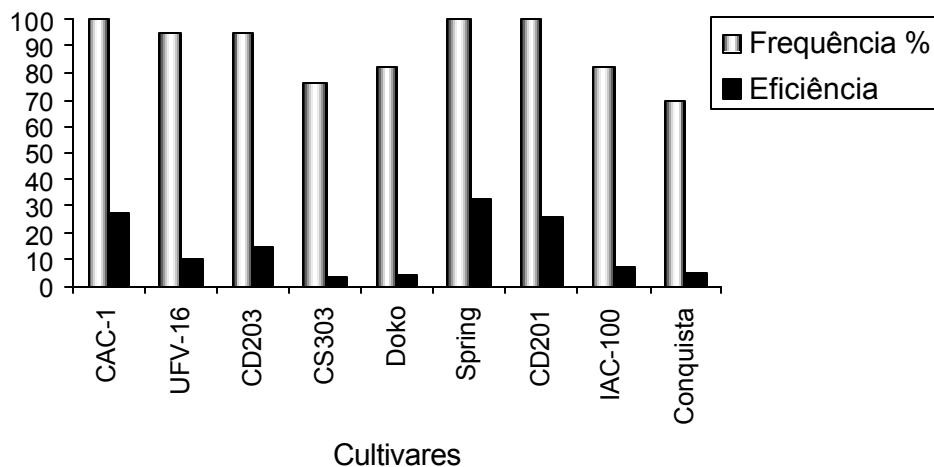


Figura 3 - Frequência e eficiência da produção de embriões somáticos em cultivares de soja aos 21 dias no meio de indução (MSD40).

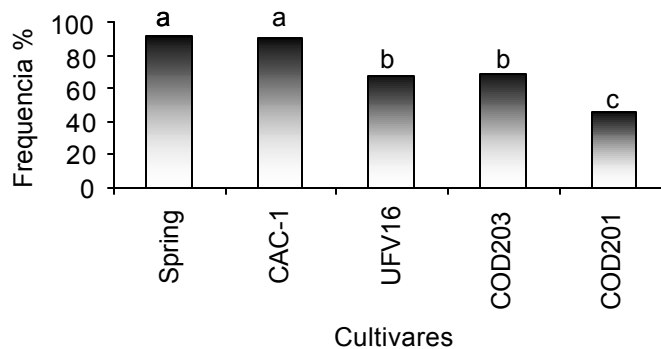


Figura 4 - Frequência da proliferação de cultivares de soja (formação de embriões secundários). Médias seguidas pela menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 1 % de probabilidade.

O protocolo utilizado neste experimento englobou informações disponíveis na literatura que buscam otimizar o processo de embriogênese somática em soja. A implantação do experimento levou em consideração principalmente o estado fisiológico da planta doadora do explante, orientação do explante, pH do meio, concentração de 2,4-D e agente solidificante a fim de selecionar genótipos para serem utilizados em protocolos de transformação genética. Existem duas estratégias principais para aumento de linhas transgênicas férteis a partir de culturas embriogênicas: a seleção de cultivares com potencial embriogênico e/ou o uso de cultivares mais responsivos à embriogênese

para manipulação genética com transferências dos transgenes para outros cultivares por retrocruzamentos (Meruer et al. 2001). O presente trabalho sugere que os cultivares Spring, CAC-1 e CD 201 podem ser usados com estas finalidades, com grande possibilidade de sucesso para obtenção de tecidos embriogênicos e linhagens transgênicas.

## REFERÊNCIAS

- Bailey, M.A., Boerma, H.R., Parrott, W.A. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 29: 102-108, 1993.
- Barwale, U.B., Kerns, H.R., Widholm, J.M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167:473-481, 1986.
- Bernard, R. L., Hymowitz, T., Cremeens, C. R. Registration of 'Kunitz' soybean. *Crop Sci.* 31:232-233, 1991.
- Buchheim, J. A., Colburn, S. M., Ranch, J. P. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol.* 89: 768-775, 1989.
- Calvo, E.B. Embriogênese somática em soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. Tese (Mestrado), ESALQ- USP, Piracicaba, 146p. 1989.
- Cheng, T.Y., Saka, H., Voqui-Dinh, T.H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. *Plant Sci. Lett.* 19:91-99, 1980.
- Di, R., Purcell, V., Collins, G. B., Ghabrial, S.A. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. *Plant Cell Rep.* 15:746-750, 1996.
- Donaldson, P.A., Simmonds, D.H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. *Plant Cell Rep.* 15:746-750, 2000.
- Finer, J.J. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Rep.* 7:238-241, 1988.
- Finer, J.J. Plant regeneration via embryogenic suspension cultures. In: Dixon, R.A and Gonzales, R.A. (Eds.) *Plant Cell Culture: a practical approach.* Oxford University Press, Oxford. p. 67-102, 1994.
- Finer, J.J., Finer, K., Santarém, E.R. Physical methods for plant cell transformation. In: *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine.* VCH Publishers, Weinheim p. 458-465, 1996.
- Finer, J.J., McMullen, M.D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension tissue culture. *In Vitro Cell Dev. Biol - Plant* 27:175-182, 1991.
- Finer, J.J., Nagasawa, A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 15:125-136, 1988.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158, 1968.
- Hadi, M.Z.; McMullen, M.D., Finer, J.J. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 15:500-505, 1996.
- Hartweck, L.M., Lazzeri, P.A., Cui, D., Collins, G.B. and Willians, E.G. Auxin-orientation effects and histological analysis of soybean somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Dev. Biol. - Plant* 24:821-828, 1988.
- Hinchee, M.A.W., Connor-Ward, D.V.; Newell, C.A., McDonnell, R.E. Sato, S.J., Gasser, C.S., Fischhoff, D.A., Re, D.B, Fraley, R.T., Horsch, R.B.

Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Bio Technol.* 6:916-922, 1988.

Komatsuda, T., Ko, S. W. Screening of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] genotypes for somatic embryo production from immature embryo. *Jpn. J. Breed.* 40:249-251, 1990.

Komatsuda, T., Lee, W., Oka, S. Maturation and germination of somatic embryo in soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 28:103-113, 1992.

Komatsuda, T., Ohyama, K. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*. *Theor. Appl. Genet.* 75:695-700, 1988.

Lazzeri, P.A., Hildebrand, D.F., Collins, G.B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Mol. Biol. Rep.* 3:160-167, 1985.

Lazzeri, P.A., Hildebrand, D.F., Collins, G.B. Soybean somatic embryogenesis: effects of hormones and culture manipulations. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 10:197-208, 1987.

Lipmann, B., Lippmann, G. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Cell Rep.* 3: 215-218, 1984.

Meurer, C.A., Dinkins, R.D., Collins, G.B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. *Plant Cell Rep.* 18:180-186, 1998.

Meurer, C.A., Dinkins, R.D., Redmond, C.T., McAllister, K.P., Tucker, D.T., Walker, D.R., Parrott, W.A., Trick, H.N., Essig, J.S., Frantz, H.M., Finer, J.J., Collins, G.B. Embryogenic response of multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars across three locations. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37:62-67, 2001.

Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-479, 1962.

Parrott, W.A., Williams, E.G., Hildebrand, D.F., Collins, G.B. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 16:15-21, 1989.

Ranch, J.P., Oglesby, L., Zielinski, C. Plant regeneration from embryo derived tissue cultures of soybeans. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 21:653-658, 1985.

Santarém, E. R., Ferreira, A.G. Transformação de soja via bombardeamento de partículas. *ABCTP Notícias* 29: 2-9, 1997.

Santarém, E. R., Pelissier, B., Finer, J. J. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 33: 13-19, 1997.

Simmonds, D.H., Donaldson, P.A. Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes. *Plant Cell Rep.* 19:485-490, 2000.

Tian, L. N., Brown, D. C.W., Voldeng, H., Webb, J. In vitro response and pedigree analysis for somatic embryogenesis of long-day photoperiod adapted soybean. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36:269-273, 1994.

Trick, H.N., Dinkins, R.D., Santarém, E.R., Di, R., Samoylov, V., Meurer, C.A., Walker, D.R., Parrott, W.A., Finer, J.J., Collins G. B. Recent advances in soybean transformation. *Plant Tiss. Cult. Biotech.* 3:9-27, 1997.

Wright, M.S., Launis, K.L., Novitzky, Duesing, R. J.H., Harms, C.T. A simple method for the recovery of multiple fertile plants from individual somatic embryos of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 27:153-157, 1991.

Zhang, Z., Xing, A., Stawick, P., Clemente, T. E. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 56:37-46, 1999.

## CAPÍTULO 2

### DETECÇÃO DA INSTABILIDADE GENÉTICA EM PLANTAS DE SOJA DERIVADAS DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DETERMINADA POR RAPD

ABSTRACT - RAPD markers were used to evaluate genetic instability of regenerants of soybean plants obtained via somatic embryogenesis using 180  $\mu$ M 2,4-D. Twenty primers were used for screening 44 regenerants from cultivar Spring and 28 from cultivar CAC-1. Three primers were polymorphic for two of the Spring-derived regenerants, with a somaclonal frequency of 4.5%. Four primers were polymorphic for the CAC-1-derived regenerant, with a somaclonal frequency of 3.5%. The present results indicate the usefulness of RAPD markers to detect genetic instability in soybean primary regenerant plants derived from somatic embryogenesis, as a certification tool for monitoring genetic fidelity during the regeneration process.

**Additional index terms:** somatic embryogenesis; soybean; somaclonal variation, RAPD

RESUMO – Marcadores RAPD foram usados para avaliar a instabilidade genética de plantas regenerantes de soja obtidas via embriogênese somática usando 180  $\mu$ M 2,4-D. Vinte primers foram usados para avaliar 44 regenerantes do cultivar Spring e 28 do cultivar CAC-1. Três primers apresentaram bandas polimórficas para dois regenerantes em relação ao cultivar Spring, com uma frequência de variação somaclonal de 4,5%. Para ‘CAC-1’, quatro primers mostram polimorfismos em apenas um regenerante, com uma frequência de variação de 3,5 %. Estes resultados mostram que marcadores RAPD podem ser utilizados para avaliar a estabilidade genética de plantas regeneradas via sistema de embriogênese somática em soja, monitorando a fidelidade genética dos regenerantes.

**Termos adicionais para indexação:** embriogênese somática, soja, variação somaclonal, RAPD

## INTRODUÇÃO

A soja é uma espécie vegetal de difícil manipulação *in vitro*. No entanto pode ser regenerada via organogênese ou embriogênese somática (Ranch et al., 1985; Barwale et al., 1986). Ambos os métodos de regeneração podem ser utilizados para a transformação genética. A capacidade de regeneração de embriões somáticos a partir de cotilédone zigótico imaturo foi primeiro relatada por Lippmann e Lippmann (1984) e protocolos foram desenvolvidos e melhorados (Lazzeri et al., 1985, Ranch et al., 1985, Finer e Nagasawa, 1988, Buchheim et al., 1989). Mais recentemente, um processo rápido de indução de embriões somáticos foi descrito por Santarém et al. (1997).

A variação somaclonal é uma variação observada entre plantas regeneradas *in vitro* (Larkin e Scowcroft, 1981). É definida como a variação que surge *de novo* durante um período de diferenciação celular entre o cultivo de um explante e a produção de regenerantes (Munthali et al., 1996). Essas variações são herdáveis, transmitidas pela meiose e são, geralmente, irreversíveis. Podem ser observadas em nível fenotípico ou genotípico (Fourré et al., 1997) e avaliadas por análises fenotípicas, número e estrutura de cromossomos, proteínas ou avaliação direta do DNA das plantas (De Klerk, 1990). Técnicas de RFLP e RAPD têm sido utilizadas para caracterização molecular de plantas derivadas de cultura de tecidos. Entretanto, a complexidade de análise com RFLP, e o alto custo relativo são desvantagens como aplicação rotineira em sistemas de micropropagação (Rani et al. 1995). A análise com RAPD pode evitar esses problemas associados com a análise de RFLP. A vantagem dessa técnica é que um grande número de amostras pode ser analisado de forma rápida e econômica, necessita de pequena quantidade do material, independe da expressão ontogênica, e a maioria do genoma pode ser avaliado potencialmente com número ilimitado de marcadores (Isabel et al., 1993).

A variação somaclonal ocorre em diferentes leguminosas (Barwale e Widholm, 1987) e tem sido observada em várias espécies cultivadas *in vitro* (Patel e Berlyn, 1982; Hakman et al. 1984, Renfroe e Berlyn 1985; Roth et al., 1997). A variação induzida por cultura de tecidos em soja tem sido relatada por Barwale e Widholm (1987), Graybosch et al., (1987), Freytag et al., (1989), Amberger et al., (1992) e Hawbaker et al., (1993). Barwale e Widholm (1987), comparando a frequência de mutações em plantas de soja, regeneradas pelos sistemas embriogênico e organogênico, não observaram diferença significativa entre frequências de mutações entre estes sistemas. Hildebrand et al. (1989) examinaram as progênies R1 e R2 de 10 plantas de soja regeneradas via sistema

embriogênico e não observaram nenhuma variante estável. Shoemaker et al. (1991) concluíram que o nível de 2,4-D influencia a frequência de mutação induzida por cultura de tecidos em soja. Estes autores mostraram que ocorre uma alta frequência de variação induzida por cultura de tecidos quando cotilédones imaturos são iniciados em meio de MS (Murashige e Skoog, 1962) com baixos níveis de 2,4-D. Porém, não encontraram correlação entre a concentração de 2,4-D no meio e o tipo de variantes observados.

O processo de obtenção de soja transgênica geralmente passa pelo sistema de embriogênese somática (Sato et al., 1993, Trick e Finer, 1998, Finer e Finer, 2000, Yan et al., 2000). Portanto, faz-se necessário que as plantas regeneradas, via embriogênese somática, sejam similares à planta matriz. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a fidelidade genética de plantas regeneradas em nível molecular, via embriogênese somática, utilizando-se 2,4-D (180  $\mu$ M) como auxina indutora, mediante triagem com marcador tipo RAPD em dois cultivares de soja.

## MATERIAL E MÉTODOS

Dois cultivares de soja, 'Spring' e 'CAC-1', foram utilizados neste experimento. Vagens jovens com sementes de 4 a 6 mm de comprimento foram coletadas de plantas cultivadas em casa-de-vegetação, aproximadamente 15 a 20 dias após o florescimento. As vagens foram desinfestadas por dois minutos em etanol 70% (v/v), seguido de 20 minutos em água sanitária comercial (1% de hipoclorito de sódio), contendo três gotas/100mL de Tween 20. Após três lavagens em água destilada estéril as sementes foram dissecadas com o auxílio de pinça e bisturi e excisados os pares cotiledonares, os quais foram transferidos para o meio de indução com a face abaxial em contato com o meio (Santarém et al., 1997). Foram colocados 10 pares cotiledonares por placa de Petri e o número de cotilédones por cultivar foi de 30.

O cultivo foi dividido em fases de indução, maturação e conversão. O meio de indução incluía o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 180  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, 3% de sacarose e 0,2% de gelrite. As condições de incubação constaram da temperatura de  $28 \pm 1$  °C, 16 horas de fotoperíodo e irradiância de 25-30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As mesmas condições de incubação foram utilizadas nos três estádios. Após um mês de indução os embriões somáticos foram transferidos para meio de histodiferenciação MSM6AC (sais MS, vitaminas B5, 6% de maltose, 0,5 % de carvão ativado, 0,2 % de Gelrite® e pH 5,8) conforme descrito por Bailey et al. (1993), onde permaneceram por 10 dias. Em seguida os embriões foram transferidos para o meio de maturação conforme Bailey et al. (1993).

Foram coletadas duas ou três folhas de plantas individuais propagadas *in vitro*, devidamente identificadas, totalizando 44 plantas para 'Spring' e 28 plantas para 'CAC-1'. Também foram coletadas, em casa-de-vegetação, folhas jovens de duas plantas controle para cada cultivar. O DNA das folhas foi extraído e purificado, seguindo a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro, considerando-se que uma  $\text{OD}_{260}$  é equivalente a, aproximadamente, 50 ng/ $\mu\text{l}$  de DNA fita dupla. A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio.

As plantas regeneradas foram avaliadas com 20 ‘primers’ decâmeros. Cada reação de amplificação de 25 µl continha 25 ng de DNA, 0,1 mM de cada um dos deoxinucleotídios (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM; Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM e 0,4 µM de um oligonucleotídio iniciador ou “primer” (Operon Technologies, Alameda, CA, EUA); e uma unidade de Taq DNA polimerase.

As reações de amplificação foram efetuadas em termociclador (Perkin-Elmer modelo 9600), de acordo com Williams et al. (1990). Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma etapa de desnaturação a 94 °C, por 15 segundos, uma etapa de ligação do “primer” ao DNA molde a 35 °C, por 30 segundos, e uma etapa de extensão a 72 °C, por um minuto. Depois de 40 ciclos, efetuou-se uma última etapa de extensão a 72 °C, por sete minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,2% contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídio, imerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação “Eagle Eye II” (STRATAGENE). Apenas bandas fortes foram consideradas na análise dos géis.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados 20 “primers” para avaliar a fidelidade das plantas regeneradas de dois cultivares. Um total de 98 e 108 bandas foram geradas com estes “primers” para os cultivares Spring e CAC-1, respectivamente. Três “primers” foram polimórficos para o cultivar ‘Spring’ e seus regenerantes (OPA07, OPC07, e OPAD11) e quatro “primers” com o cultivar ‘CAC-1’ e seus regenerantes (OPC07, OPW09, OPBA10 e OPBA14). Consideraram-se apenas as bandas fortes (Figuras 1 e 2). O número de bandas para cada “primer” utilizado, variou de duas para o ‘primer’ OPQ02, nos dois cultivares, a oito para o “primer” OPC07 no cultivar Spring e nove para o “primer” OPT04, no cultivar CAC-1.

Apenas o “primer” OPC07 apresentou polimorfismo nos dois cultivares analisados. Para o cultivar ‘Spring’ o polimorfismo foi caracterizado pela ausência de banda no regenerante variante RSpring-9 e presença de banda no regenerante variante RSpring-18 (Figura 1, setas “d” e “f”, respectivamente). Já no cultivar CAC-1 o polimorfismo foi caracterizado por ausência de banda (seta “a”) no regenerante variante RCAC1-25 (Figura 2).

O “primer” OPA07 gerou três bandas polimórficas no cultivar ‘Spring’, uma banda no regenerante variante, RSpring-9, e duas no regenerante variante RSpring-18. O polimorfismo associado a este “primer” caracterizou-se pela presença e ausência de bandas no regenerante RSpring-18, (Figura 1, setas “b” e “c”), e intensidade de banda no regenerante variante RSpring-9, (Figura 1, seta “a”). O polimorfismo gerado pelo “primer” OPAD11 caracterizou-se por ausência de banda e presença de banda no regenerante RSpring-9, caracterizado, (Figura 1, seta “f”).

O “primer” OPAW09 gerou duas bandas polimórficas no RCAC1-25, as setas “b” e “c” indicam ausência de banda (Figura 2). Com o “primer” OPBA10 foi detectada a perda de três bandas no regenerante RCAC1- 25, (Figura 2, setas “d”, “e” e “f”). Já com o “primer” OPBA14 foi detectada perda de uma banda neste regenerante (Figura 2, seta “g”).

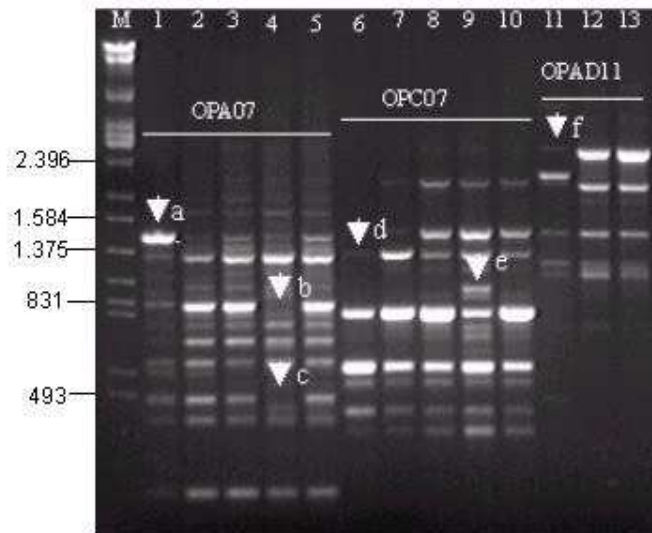


Figura 1 – Análise eletroforética de fragmentos RAPD obtidos com os “primers” OPA07, OPC07 e OPAD11 a partir do cultivar ‘Spring’ e seus regenerantes. As linhas 5, 10 e 13 mostram produtos de RAPD da ‘Spring’, as linhas 1, 6 e 11 mostram produtos de RAPD do regenerante variante RSpring-9, e as linhas 4, 9 e 12 do regenerante variante RSpring-18. As linhas 2, 3, 7 e 8 são dos regenerantes normais. M – DNA lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*. As setas indicam ausência ou presença de bandas polimórficas.

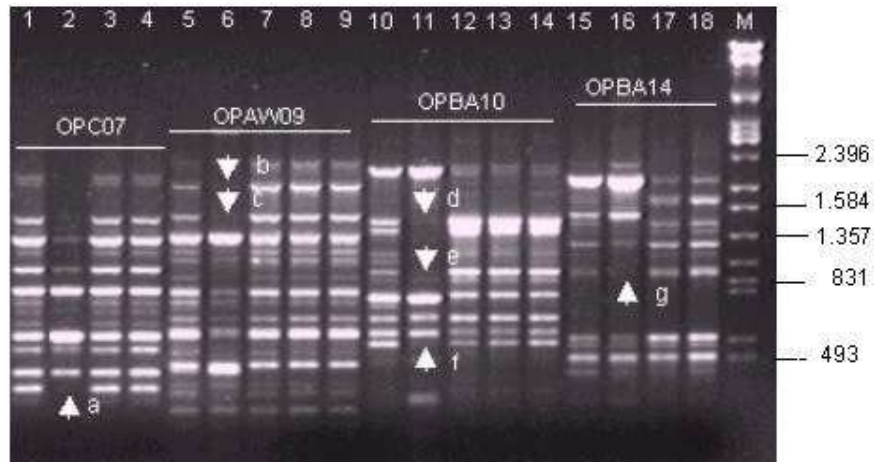


Figura 2 – Análise eletroforética dos fragmentos RAPD obtidos com os “primers” OPC07, OPCW09, OPBA10 e OPBA14 a partir da cultivar CAC-1 e seus regenerantes. Linhas 4, 9, 14 e 18 mostram produtos de RAPD do cultivar CAC-1, as linhas 2, 6, 11 e 15 do regenerante variante RCAC1-25. As linhas 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 15 e 17 são dos regenerantes normais. M – DNA lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*. As setas indicam ausência ou presença de bandas polimórficas.

Duas plantas de um total de 44 apresentaram variações no padrão de bandas amplificadas para o cultivar ‘Spring’: RSpring-9 e RSpring-18. Isto equivale a uma frequência de variação somaclonal de 4,5% com um total de

15% de “primers” polimórficos e aproximadamente 7% de bandas polimórficas. Para ‘CAC-1’ apenas uma planta de um total de 28 apresentou variações no padrão de bandas, RCAC1-25, com freqüência de variação somaclonal de 3,57% com um total de 20% “primers” polimórficos e aproximadamente 6% de bandas polimórficas. Hawbaker et al. (1993) relataram que as porcentagens de linhas que eram significativamente diferentes do controle para uma gama de características variaram de 2,7% para conteúdo de óleo a 25,7% para grupo de maturação. A freqüência de possíveis mutações varia de 0 a 4% em planta de soja R0 quando determinada por estudos em famílias R1, R2, R3 e R4 correspondentes (Barwale e Widholm, 1987). Diversos variantes fenotípicos foram encontrados por Amberger et al. (1992) e pouca variação fenotípica foi observada em plantas nas gerações R0 e R1, e a segregação para características sob controle genético só foi observada na geração de R2.

Para os regenerantes derivados de ‘Spring’, o variante RSpring-9 apresentou polimorfismo nos três “primers” polimórficos, já o variante RSpring-18 não apresentou polimorfismo para o “primer” OPAD11. Os dois variantes derivados de ‘Spring’ não apresentaram padrão similar de bandas em nenhum dos “primers” polimórficos. Entretanto, Rani et al. (1995) estudaram a variação genética de plantas micropropagadas de *Populus deltoides* e encontraram o mesmo padrão de banda para os regenerantes “variantes”, os quais diferiram dos demais regenerantes. Brown et al. (1993) encontraram variações entre plantas regeneradas via embriogênese somática, da mesma cultivar de *Triticum aestivum*, usando marcador RAPD. Bouman et al. (1992) também encontraram polimorfismo utilizando marcador RAPD entre *Begonia* micropropagada, mas com baixa freqüência quando comparada a variações fenotípicas. Isto provavelmente deve-se ao fato de que a variação oriunda do estresse da cultura de tecidos esta associada à metilação do DNA, podendo resultar na repressão do gene, de modo que as mudanças na metilação podem imitar um ponto de mutação no efeito fenotípico, o que se denomina como perda funcional da proteína (Fouéré, 2000). A cultura de tecidos, por si só, age como um sistema mutagênico, uma vez que as células sofrem experiências traumáticas de isolamento, e podem ser reprogramadas durante a regeneração da planta, que é diferente quando comparada às condições naturais (Jain, 2001). Mudanças fenotípicas encontradas em plantas regeneradas e em suas progênies são observadas como mutações qualitativas, que são mutações

gênicas simples, herdadas mendelianamente, e são freqüentemente recessivas (Philips et al., 1994).

Exceto mudanças nos produtos de ampliações dos dois regenerantes variantes de 'Spring' e um de 'CAC-1', todos os "primers" testados revelaram o mesmo número de bandas entre os cultivares 'Spring' e 'CAC-1' e os seus regenerantes. Resultados semelhantes foram obtidos por Rani et al. (1995) que encontraram variação em triagem feita com marcadores RAPD em plantas micropropagadas de *P. deltoides*.

Dois tipos de polimorfismos foram observados no presente estudo: presença e ausência de bandas e intensidade de bandas quando comparados regenerantes com os respectivos cultivares. A presença de marcadores RAPD em dois genótipos indica alto nível de homologia para este sítio (Williams et al. 1990). No caso em que o marcador está presente em um genótipo e ausente em outro, existe certamente seqüências diferentes, ou seja, a variação somaclonal resultou em diferença na seqüência de bases da molécula de DNA. As falhas de amplificação para os genótipos podem ser devido a uma simples mudança de base ou por seqüências completamente diferentes (Vierling e Nguyen, 1992, Williams et al., 1990). O variante RSpring-9 foi caracterizado pela presença e ausência de bandas bem como intensidade de banda quando comparado com o cultivar Spring. Entretanto, o variante RSpring-18 foi caracterizado apenas pela presença ou ausência de bandas.

A taxa de variação somaclonal, avaliada em nível molecular, foi relativamente baixa para as plantas regeneradas, menor que 5%, quando comparado às relatadas para outras espécies. Nos estudos de Amberger et al., (1992) menos de 8% das plantas regeneradas via cultura tecidos deram origem a progênie que apresentava variações herdáveis. Porém, esta taxa foi altamente dependente da concentração de auxina usada no meio de indução da embriogênese somática (Shoemaker et al., 1991). Neste estudo, de 44 plantas regeneradas e avaliadas de 'Spring', duas apresentaram variação com base nos marcadores RAPD e uma das 28 plantas regeneradas de 'CAC-1'. Com base nesses resultados, concluiu-se que o protocolo de embriogênese somática onde se usa 180 µM de 2,4-D pode ser considerado bom para obter plantas de soja geneticamente modificadas. Entretanto, tem-se que estar atento para as variações que possam surgir pelo estresse causado pela cultura de tecidos na indução da embriogênese somática. Estudos em outras espécies

mostram que o genótipo da planta pode afetar a quantidade de variabilidade que ocorre em consequência do sistema de cultivo *in vitro* (McCoy et al., 1982; Hashmi et al., 1997).

A embriogênese somática é extremamente vantajosa para obtenção de plantas geneticamente transformadas devido à grande quantidade de material que pode ser produzido de um único explante. Entretanto, é preciso bastante atenção a qualquer sistema de cultivo *in vitro*, pois, apesar do baixo risco de instabilidade genética, esta pode ocorrer, como foi demonstrado neste estudo. O presente estudo provê informações de polimorfismo detectado com marcadores RAPD em soja. O polimorfismo em produtos amplificados que representam um alelo por loco pode resultar de mudanças na seqüência do sítio de ligação do primer ou mudanças que alteram o tamanho ou impedem o sucesso da amplificação (Rani et al., 1995). Em nossos estudos o polimorfismo foi devido à ocorrência de variação nos dois cultivares avaliados.

Esses resultados demonstram que o marcador RAPD, ou outro tipo de marcador molecular, pode ser valioso na identificação de variante gerado por um sistema de cultivo *in vitro*. Ao tempo em que, a embriogênese somática e regeneração de plantas estão condicionadas à disponibilidade de genótipos responsivos, para serem aplicados em protocolos de transformação genética sem que incorra no risco de possíveis variações somaclonais.

## REFERÊNCIAS

Amberger, L.A.; Palmer, R.G.; Shoemaker, R.C. Analyses of culture-induced variation in soybean. *Crop Sci.* 32:1103-1108; 1992.

Aragão, F.J.L.; Sarokin, L.; Vianna, G.R.; Rech, E.L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* L. Merrill] plants at a high frequency. *Theor. Appl. Genet.* 101:1-6; 2000.

Bailey, M.A.; Boerma, H.R.; Parrot, W.A. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 29:102-108; 1993.

Barwale, U.B.; Kerns, H.R.; Wildholm, J.M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167:473-481; 1986.

Barwale, U.B.; Wildholm, J.M. Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean. *Plant Cell Rep.* 6:365-368; 1987.

Boumam, H.; Kuijpers, A.M.; de Klerk, G.J. The influence of tissue culture methods on somaclonal variation in *Begonia*. *Physiol. Plant.* 85: A45; 1992.

Brown, P.T.H.; Lange, F.D.; Kranz, E.; Lörz, H. Analysis of single protoplast and regenerated plants by PCR and RAPD technology. *Mol. Gen. Genet.* 237:311-317; 1993.

Buchheim, J.A.; Colburn, S.M.; Ranch, J.P. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol.* 89:768-775; 1989.

Damasco, O.P.; Graham, G.C.; Henry, R.J.; Adkins, S.W.; Smith, M.K.; Godwin, I.D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection in dwarf off-types in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. *Plant Cell Rep.* 16:118-123; 1996.

De Klerk, G. J. How to measure somaclonal variation. *Acta Bot. Neerl.* 39:129-144; 1990.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15; 1990.

Finer, K.R.; Finer, J.J. Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation-tread soybean cotyledons. *Lett. Appl. Microb.* 30:406-410; 2000.

Finer, J.J.; McMullen, M.D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 27:175-182; 1991.

Finer, J.J.; Nagasawa, A. Development of an embryogenic suspension culture of [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 15:125-136; 1988.

Fourré, J.L. Somaclonal variation and genetic molecular markers in woody plants. In: S.M. Jain and S.C. Minocha (eds). *Molecular Biology of Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht; 2000:425-449.

Fourré, J.L.; Berger, P.; Niquet, L.; André, P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theor. Appl. Genet.* 94:159-169; 1997.

Freytag, A.H.; Rao-Arelli, A.P.; Anand, S.C.; Wrather, J.A.; Owens, L.D. Somaclonal variation in soybean plants regenerated from tissue culture. *Plant Cell Rep.* 8:199-202; 1987.

Godwin, I.D.; Sangduen, N.; Kunanuvatchaidach, R.; Piperdis, G.; Adkins, S.W. RAPD polymorphism among variants and phenotypically normal rice (*Oryza sativa* var 'indica') somaclonal progenies. *Plant Cell Rep.* 16:624-627; 1997.

Graybosch, R.A.; Edge, M.E.; Delannay, X. Somaclonal variation in soybean plants regenerated from the cotyledonary node tissue culture system. *Crop Sci.* 27:803-806; 1987.

Hashmi, G.; Huttel, R.; Meyer, R.; Krusberg, L.; Hammerschlag, F. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Rep.* 16:624-627; 1997.

Hawbaker, M.S.; Fher, W.R.; Manusur, L.M.; Shoemaker, R.C.; Plamer, R.G. Genetic variation for quantitative traits in soybean lines derived from tissue culture. *Theor. Appl. Genet.* 87:49-53; 1993.

Hildebrand, D.F.; Adams, T.R.; Dahmer, M.L.; Williams, E.G.; Collins G.B. Analysis of lipid composition and morphological characteristics in soybean regenerants. *Plant Cell Rep.* 7:701-703; 1989.

Jain, S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118:153-166; 2001.

Isabel, N.; Tremblay, L.; Mchaud, M.; Tremblay, F.M.; Bousquet, J. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. *Theor. Appl. Genet.* 86:81-87; 1993.

Kaeppeler, S.M., Kaeppeler, H.F., Rhee, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* 43:19-188, 2000.

Karp, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85:295-302; 1995.

Ke, J.; Khan, R.; Johnson, T.; Somers, D.A.; Das, A. High-efficiency gene transfer to recalcitrant plants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 20:150-156; 2001.

Jain, S.M.; De Klerk, G.J. Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops. *Plant Tiss. Cult. Biotech.* 4:63-75; 1998.

Larkin, P.J.; Scowcroft, W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-214; 1981.

Lazzeri, P.A.; Hildebrand, D.F.; Collins, G.B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean Plant Mol. Biol. Rep. 3:160-167; 1985.

Meurer, C.A.; Dinkins, R.D.; Collins, G.B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. Plant Cell Rep. 18: 180-186; 1998.

Meurer, C.A.; Dinkins, R.D.; Redmond, C.T.; McAllister, K.P.; Tucker, D.T.; Walker, D.R.; Parrot, W.A.; Trick, H.N.; Essig, J.S.; Frantz, H.M.; Finer, J.J.; Collins, G.B. Embryogenic response of multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars across three locations. In Vitro Cell.Dev. Biol.-Plant 37:62-67; 2001.

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-479; 1962.

Parrott, W.A.; Hildebrand, D.F.; Williams, E.G.; Collins, G.B. Recovery of primary transformants of soybean. Plant Cell Rep., 615-617; 1989a.

Parrott, W.A.; Williams, E.G.; Hildebrand, D.F.; Collins, G.B. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. Plant Cell Tiss. Org. Cult.16:15-21; 1989b.

Phillips, R.L.; Kaepler, S.M.; Olhoft, P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5222-5226; 1994.

Ranch, J.P.; Oglesby, L.; Zielinski, C. Plant regeneration from embryo derived tissue cultures of soybeans. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 21:653-658; 1985.

Rani, V.; Parida, A.; Raina, S.N. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoids* Marsh. Plant Cell Rep. 14:459-462; 1995.

Santarém, E.R.; Pelissier, B.; Finer, J.J. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 33:13-19; 1997.

Santarém, E.R.; Finer, J.J. Transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35:451-455; 1999.

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

Shoemaker, R.C.; Amberger, L.A.; Palmer, R.G.; Oglesby, L.; Ranch, J.P. The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. In *Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 27:84-88; 1991.

Simmonds, D.H.; Donaldson, P.A. Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes. *Plant Cell Rep.* 19:485-490; 2000.

Stadelmann, F.J.; Boler, B.; Spangenberg, G.; Kölliker, R.; Messerli, M.; Wang, Z.Y.; Nösberger, J. Fertility and growth in the field of *Lolium perenne* and *Festuca rubra* plants regenerated from suspension cultured cells and protoplasts. *Plant Breed.* 117:37-43; 1998.

Trick, H.N.; Dinkins, R.D.; Santarém, E.R.; Di, R.; Samoylov, V.; Meurer, C.A.; Walker, D.R.; Parrott, W.A.; Finer, J.J.; Collins, G.B. Recent advances in soybean transformation. *Plant Tiss. Cult. Biotech.* 3:9-26; 1997.

Trick, H.N.; Finer, J.J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Rep.* 17:482-488; 1998.

Vierling, R.A.; Nguyen, H.T. Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid wheat genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 84:835-838; 1992.

Yan, B.; Reddy, M.S.; Collins, G.B.; Dinkins, R.D. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using immature zygotic cotyledon explants. *Plant Cell Rep.* 19:1090-1097; 2000.

Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Ac. Res. 18:6531-6535; 1990.

### CAPÍTULO 3

#### EXPRESSÃO TRANSITÓRIA DO GENE *GUS* EM DOIS CULTIVARES DE SOJA E TRANSFORMAÇÃO COM O GENE DA CITRATO SINTASE

**ABSTRACT** - The somatic embryogenesis protocol with 180  $\mu$ M 2,4-D was used to obtain genetically modified soybean plants with the CS gene. Cotyledons of the cultivar Spring and CAC-1 were used to evaluate the transient expression level in response to sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. The time of sonication was of two seconds and the cotyledons were co-cultivated in MSD40 medium supplemented or not with acetosyringone (100  $\mu$ M). The relative frequency of transient expression of *GUS* gene, in the adaxial face of the cotyledons, was 13.9% and 19.3% for cultivar CAC-1 and Spring, respectively, when acetosyringone was used. In the absence of this substance, the relative frequency fell down to 0.37% and 1.46% for CAC-1 and Spring, respectively. Optimization of the transient expression gave support for transformation with the CS gene. Embryo clusters of cultivar CAC-1 were transformed with CS gene from *Daucus carota* and from *Escherichia coli*. A total of 26 transformed embryos with the CS gene from *D. carota* and 31 with the CS gene from *E. coli* was obtained for conversion into plants. When these embryos were placed in the conversion and germination medium, the conversion process was initiated by emitting the first leaflets. However, soon after it began a strong necrosis took place on the leaflets with consequent death of the plants. It is suggested that the necrotic effect observed in the leaflets could be associated with the level of expression of the CS gene. Over expression of this gene would lead to citrate accumulation, inhibiting the respiratory process. This would induce pyruvate accumulation. Pyruvate in excess would be used for lactate synthesis, causing an increase of the acidity. This fact would promote the necrosis observed in the leaflets of the transformed soybean plants with the CS gene.

**Additional index terms:** Transformation; SAAT; aluminum tolerance; *Glycine max*

RESUMO – Os cultivares de soja Spring e CAC-1 foram utilizados para avaliar o nível de expressão transitória do gene *GUS* em resposta a transformação mediada por *Agrobacterium* com o auxílio da sonicação. A frequência relativa da expressão transitória de gene *GUS*, na face adaxial dos cotilédones, foi de 13,9% e 19,3% para os cultivares CAC-1 e Spring, respectivamente, quando acetossiringona foi empregado. Porém, na ausência desta substância, a frequência relativa cai para 0,37% e 1,46% para os cultivares CAC-1 e Spring, respectivamente. Neste trabalho, a avaliação da expressão transitória na otimização de sistemas de transformação serviu como suporte para transformação com o gene *Citrato Sintase* (CS) que confere resistência ao alumínio tóxico em solos ácidos. Agregados de embriões do cultivar CAC-1 foram transformados com o gene CS de *Daucus carota* e *Escherichia coli*. Um total de 26 embriões transformados com o gene CS de *D. carota* e 31 com o gene CS de *E. coli* chegaram à fase final para conversão em plantas. Quando colocados no meio de conversão e germinação o processo de conversão foi

iniciado com a emissão dos primeiros folíolos, entretanto, logo em seguida iniciava um forte processo de necrose dos folíolos e sua conseqüentemente morte. A morte dos folíolos culminava na morte da plântula. Este efeito necrótico observado nos folíolos das plântulas transgênicas está associada ao nível de expressão do gene CS.

**Termos adicionais para indexação:** transformação, SAAT, tolerância ao alumínio, *Glycine max*.

## INTRODUÇÃO

A introdução de genes em plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tem sido amplamente descrita (Wordragen e Dons 1992; Fisk e Dandekar 1993; Isilda et al. 1996; Hiei et al. 1994) a partir da publicação do trabalho pioneiro de Horsch et al. (1985). Entretanto, muitas espécies permanecem recalcitrantes à transformação, tal como a soja, cuja transformação está longe de se tornar rotina (Trick et al. 1997). Os dois primeiros relatos de transformação de soja usaram dois métodos diferentes: Hinchee et al. (1988) usaram transformação mediada por *Agrobacterium* de nós cotiledonares, enquanto McCabe et al. (1988) usaram bombardeamento de partículas de ápices meristemáticos. As transformações de soja relatadas por esses artigos iniciais são limitadas e de baixa eficiência.

Bombardeamento de partículas tem sido usado com sucesso na obtenção de soja transgênica fértil a partir de broto apical e culturas embriogênicas em suspensão como tecidos alvo (Finer e McMullen 1991; Parrott et al 1994; Stewart et al., 1995; McCabe et al. 1998; Maughan et al., 1999). Entretanto, problemas com este método de transformação incluem a baixa eficiência e a integração no genoma de múltiplas ou cópias fragmentadas do DNA de interesse (Hardi et al. 1996; Trick et al. 1997). Por outro lado, o uso de transformação mediada por *Agrobacterium* integra um baixo número de cópias do gene no genoma da planta (Trick et al. 1997).

Para aumentar as taxas de transformação mediada por *Agrobacterium*, bactérias e vetores têm sido modificados para que se obtenha a expressão constitutiva dos genes *vir* (Hansen et al. 1994; Ishida et al. 1996). Embora a taxa de transformação tenha melhorado significativamente usando estas modificações, aumento na eficiência ainda é necessário (Santarém et al. 1998). Mais recentemente, a sonicação começou a ser usada para aumentar a transformação de muitas espécies vegetais mediada por *Agrobacterium* (Trick et al. 1997). Nessa técnica, chamada "Sonicated-Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation" (SAAT), os explantes são expostos por um breve período de tempo ao ultrassom, na presença de *Agrobacterium* (Trick e Finer, 1998; Santarém et al., 1998). A eficiência deste método está no grande número de microferimentos provocados pela sonicação na superfície do tecido alvo. Estes ferimentos possibilitam ao *Agrobacterium* penetrar mais profundamente nos tecidos, aumentando a probabilidade de infecção das células da planta. O que tem proporcionado aumento na frequência da expressão transitória em cotilédones imaturos de soja (Santarém et al. 1998). A avaliação da expressão transitória na otimização de sistemas de transformação pode servir como suporte a transformação de genes que expressam características de

interesse, dentre estes o gene *CS* que confere resistência ao alumínio tóxico em solos ácidos.

A maioria das terras agrícolas é afetada por fatores edáficos que drasticamente limitam o crescimento da planta e a sua produtividade (López-Bucio et al. 2000). A toxicidade do alumínio é o principal fator que limita o crescimento de plantas em solos ácidos (Foy, 1988, Miyasaka et al., 1991). Nestes solos, o alumínio se apresenta na forma  $Al^{+3}$ , sendo tóxico para a maioria das culturas (de la Fuente, 1997) e chegando a afetar cerca de 40% das terras cultiváveis no mundo (Foy et al., 1978). Embora a produção de culturas em solos ácidos possa ser sustentada por aplicações de calcário, isto, muitas vezes, não é economicamente viável (Foy, 1988).

A exsudação de ácidos orgânicos pela raiz de várias espécies vegetais pode induzir tolerância ao alumínio (Foy, 1988, Ma, 2000). Esses ácidos orgânicos, tais como o ácido cítrico, quelam o alumínio no espaço extracelular, impedindo assim sua absorção (Miyasaka et al. 1991). Experimentos *in vitro* demonstram que os ácidos orgânicos realmente diminuem o efeito tóxico do alumínio, sendo o citrato mais eficaz que o succinato ou malato (Hue et al., 1986). Além de quelar o alumínio, o citrato pode disponibilizar fósforo de complexos insolúveis, aumentando a absorção deste nutriente pela planta. Algumas espécies vegetais exsudam grande quantidade de ácidos orgânicos quando em deficiência de fósforo (López-Bucio et al., 2000, Delhaize et al., 2001). Aumento na exsudação de ácidos orgânicos, particularmente citrato, foi verificado em *Brassica napus*, *Lupinus albus* e na família Proteácea, como mecanismo para aumentar a absorção de fósforo (Hoffland et al., 1989, Dinkeaker et al., 1989, Dinkeaker et al., 1995).

Linhagens de tabaco transgênicas (CSb), superexpressando o gene *citrato sintase* de *Pseudomonas aeruginosa* produziram dez vezes mais citrato na raiz que plantas controle. Quando crescidas em condições ácidas e com altas concentrações de alumínio estas linhas CSb tiveram um maior aumento no crescimento da raiz quando comparadas a plantas não transformadas (de la Fuente, 1997). Segundo López-Bucio et al. (2000), estas mesmas linhas transgênicas CSb foram mais eficientes na absorção de fósforo em solos alcalinos do que plantas controle.

A obtenção de plantas tolerantes ao alumínio e mais hábeis em adquirir fósforo, por melhoramento convencional ou engenharia genética, parece ser a melhor solução para adaptar plantas nestes solos ricos em  $Al^{+3}$  e deficientes em fósforo (López-Bucio et al. 2000; Delhaize et al., 2001). O objetivo deste estudo foi avaliar o nível de expressão transitória em resposta à transformação mediada por *Agrobacterium* em dois cultivares

de soja, e transformar soja com o gene de citrato sintase, visando obter plantas tolerantes ao alumínio tóxico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Material vegetal**

Vagens imaturas de soja, com aproximadamente 15 a 20 dias após o florescimento e com sementes de 4 a 6 mm de comprimento, foram coletadas de plantas dos cultivares CAC-1 e Spring cultivadas em casa de vegetação com fotoperíodo de 14 horas de luz e temperatura de 27°C. As vagens foram desinfestadas por imersão em etanol 70% (v/v) por dois minutos, seguidos de 20 minutos em água sanitária comercial (1% de hipoclorito de sódio) contendo três gotas/100mL de Tween 20. Após três lavagens em água destilada e estéril as sementes foram dissecadas com o auxílio de pinça e bisturi e os pares cotiledonares foram excisados. Em seguida foram transferidos para meio de indução com a face abaxial em contato com o meio MSD40 (Finer e Nagasawa, 1988), contendo sais de MS (Murashige e Skoog, 1962) meia força, vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), 100 mg/L inositol, 3 % de sacarose, 0,2 % de Gelrite<sup>®</sup>, 180 µM de 2,4-D e pH 7. Os explantes foram mantidos em meio MSD40 até o tratamento pela técnica de SAAT para estudo da expressão transitória de *GUS*. Para transformação com gene da citrato sintase, os explantes permaneceram no meio de indução por um mês e depois foram transferidos para meio de proliferação MSD20 (sais MS, vitamina B5, 3% de sacarose, 0,2 % de Gelrite<sup>®</sup> e pH5,8), conforme descrito por Wright et al. (1991).

### **Cepa da bactéria, plasmídeo e condições de cultivos**

*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 foi usada como hospedeira para todos os plasmídeos. Para estudo de expressão transitória, foi usado o plasmídeo binário pCAMBIA 1301 portador dos genes *htp*, que confere resistência à higromicina e o gene  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) contendo um íntron para impedir a sua expressão na bactéria. Para transformação visando tolerância ao alumínio tóxico, foram utilizadas duas construções fornecidas pelo pesquisador Dr. Newton Portilho da Embrapa – Milho e Sorgo: a primeira com o plasmídeo pCAMBIA 1303 munido com o gene *CS* de *Daucus carota* sem o peptídeo sinal de mitocôndria, isolado por RT-PCR; e a segunda com o plasmídeo pCAMBIA 1303 carregando o gene *CS* de *Escherichia coli*, isolado por PCR a partir do DNA genômico. O gene *CS* de *D. carota* ligava-se ao promotor

específico de raiz ToRB7 (S45406) de tabaco e o gene CS de *Escherichia coli*, ligado ao promotor CaMV35S. Todas as construções continham o sítio de poliadenilação do gene de *nopalina sintase* (NOS). As posições relativas dos genes estão mostradas na Figura 1.

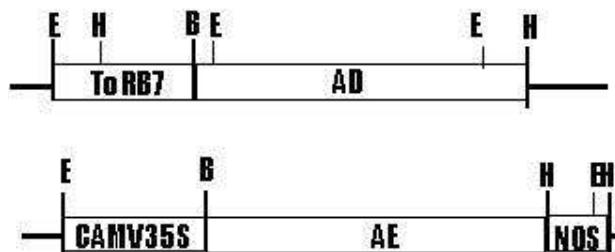


Figura 1 - Mapa das construções gênicas inseridas no plasmídeo pCAMBIA 1303. Promotores CaMV35S e ToRB7; AD: CS de *Dauca carota* sem peptídeo sinal de mitocôndria; AE: CS de *Escherichia coli*; NOS: Sítio de poliadenilação NOS; E: *EcoRI*; B: *BamHI*; H: *HindIII*

As células de *Agrobacterium* foram crescidas por 14-16 horas, sob agitação de 180 rpm e temperatura de 28 °C, em meio MYA (Tepfer e Casse-Delbart, 1987) contendo os antibióticos estreptomicina (100 µg/ml) e canamicina (50 µg/ml). As bactérias foram centrifugadas a 1500 g por 10 min, lavadas duas vezes com igual volume de meio líquido MSD40 (para transformação com o gene *GUS*) ou com meio MSD20 (para transformação com o gene CS) e recentrifugadas nas mesmas condições acima. O precipitado foi ressuspensionado em meio líquido MSD40 ou MSD20, e a densidade ótica (OD<sub>600nm</sub>) foi determinada e ajustada para 0,2.

### **Transformação com o gene *GUS***

Dez cotilédones imaturos foram colocados em tubos de vidros estéreis de 13 × 100 mm juntamente com 1 ml de suspensão de *Agrobacterium*. Os tubos contendo os cotilédones foram colocados no centro do sonicador (BRANSON 1210). O tempo de sonicação foi dois segundos conforme sugerido por Santarém et al. (1998). Os cotilédones imaturos permaneceram na suspensão de *Agrobacterium* por mais 5 minutos após a sonicação e em seguida foram transferidos para meio MSD40 suplementado ou não-suplementado com acetossiringona (100 µM), onde permaneceram durante três dias. Finalmente os cotilédones foram transferidos para o meio MSD40 suplementado com 400 mg/L de Timentin (Smithkline Beecham).

### **Transformação com o gene da Citrato sintase**

Dez agregados de embriões foram colocados em tubos de vidro estéreis de 13 × 100 mm, juntamente com 1 ml de suspensão de *Agrobacterium*. Os tubos contendo os agregados de embriões foram colocados no centro do sonicador, conforme sugerido por Trick et al. (1998). Após 5 segundos de sonicação, os agregados permaneceram por mais 5 minutos na suspensão de *Agrobacterium* sendo, em seguida, transferidos para meio MSD20 contendo acetoseringona 100 µM e aí permanecendo por três dias. Após o co-cultivo com *Agrobacterium*, os agregados foram cultivados em meio MSD20 contendo 400 mg/L de Timentin por duas semanas. Em seguida, foram transferidos para meio MSD20 contendo 400 mg/L de Timentin e 20 mg/L de higromicina. Os agregados foram transferidos semanalmente para meio recém-preparado, durante seis semanas. Após este período, os embriões foram transferidos para o meio de histodiferenciação (sais MS, vitamina B5, 6% de maltose, 0,5% de carvão ativado, 0,2% de gelrite e pH5,8) (Bailey et al., 1993), onde permaneceram por 10 dias. Finalmente, os embriões foram transferidos para o meio MSM6 (MSM6AC sem carvão ativado). As plantas foram regeneradas conforme descrito por Finer e McMullen (1991).

### **Ensaio histoquímico de GUS**

O ensaio histoquímico foi realizado dois dias após a transferência dos cotilédones para o meio contendo 400 mg/L de Timentin. Os cotilédones foram colocados em solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-gluronídeo (X-Gluc) para ensaio de *GUS* de acordo com Jefferson (1987) e incubados durante a noite a 37°C, sob agitação orbital a 80 rpm. A solução de X-Gluc foi removida e os cotilédones foram lavados duas vezes com etanol 70%. A partir de fotos dos cotilédones tiradas em lupa estereoscópica (OLYMPUS SZH 10), determinou-se a atividade *GUS* por análise de imagem, pelo programa QUANT Versão 1.0 (Vale et al., 2001), estimando-se a percentagem de área coberta com setores azuis.

Os experimentos foram formados com seis repetições, com 10 cotilédones por repetição. Médias da percentagem da superfície coberta por setores azuis foram calculadas e comparadas pelo teste Tukey, com P= 0,01.

### **Confirmação das plantas transformadas com o gene CS**

A confirmação das plantas transformadas com o gene *CS* foi baseada em PCR. Amostras de DNA das folhas foram extraídas e purificadas, seguindo a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro, considerando-se que uma OD<sub>260</sub> é equivalente a, aproximadamente, 50 ng/µl de DNA fita dupla. A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em géis de agarose 0,8%, corados com brometo de etídio.

O DNA genômico das plantas transformadas foi amplificado com primers específicos. Para o gene *CS* de *D. carota* o par de “primers” utilizado foi o cenoura F (CGC AAG CTT AAA TTG AAT GTA TTT ATT) e o cenoura R (CGC GGA TCC ATG CTC GAT CTT CGT TCT). Já para o gene *CS* de *E. Coli* o par de “primers” empregado foi o ecoli F (GCG GGA TCC TTA AAT GGC TGA TAC) e o ecoli R (GCC AAG CTT AAC GCT TGA TAT CGC). Com o promotor de raiz, o par “primers” foi o raiz F (GGC GAA TTC GGT CAT ACG GTA TAT CAT) e o raiz R (GGC GCA TCC GGC AAT CCT CAC CAT TTT). Todos os “primers” foram fornecidos pelo pesquisador Newton Portilho. Cada reação de amplificação de 25 µl continha 30 ng de DNA, 0,1 mM de cada um dos deoxinucleotídios (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; 0,5 µM de primer e uma unidade de Taq DNA polimerase.

As reações de amplificação foram efetuadas em termociclador Perkin-Elmer, (modelo 9600), de acordo com Wang et al. (1993). Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma etapa de desnaturação a 94 °C, por 30 segundos; uma etapa de ligação do primer ao DNA molde a 50 °C, por 40 segundos; e uma etapa de extensão a 72 °C, por 90 segundos. Depois de 35 ciclos, efetuou-se uma última etapa de extensão a 72 °C, por sete minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,2% contendo 0,2 µg/ml de brometo de etídio, imerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação “Eagle Eye II” (STRATAGENE).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ***Estudo de expressão transitória***

Os resultados obtidos no ensaio de expressão transitória do gene *GUS* encontram-se na Figura 2. A presença da acetossiringona resultou no aumento da expressão nos cotilédones imaturos de soja (Figuras 2 e 3). Segundo Atkinson e Gardner (1991), o efeito da acetossiringona tem proporcionado um aumento na expressão transitória de *GUS* em várias espécies. Quando os cotilédones foram sonicados sem acetossiringona a frequência relativa média da expressão transitória foi menor que 2% (Figura 2). De acordo com os resultados de Santarém et al. (1998), a transformação de cotilédones imaturos de soja, mediada por *Agrobacterium* com o uso de acetossiringona, apresenta baixos níveis de expressão transitória de *GUS* se a sonicação não for empregada. Em nosso trabalho, as tentativas de transformação de cotilédones imaturos sem o uso do ultrassom mesmo na presença de acetossiringona apresentaram baixos níveis de expressão transitória de *GUS*, menores que 1% (dados não apresentados). Entretanto, quando combinado com a sonicação, conforme recomendado por Trick e Finer (1998), a expressão transitória foi expressivamente aumentada, alcançando níveis aproximadamente equivalentes àqueles obtidos com bombardeamento de partículas nos mesmos tecidos-alvo (Vain et al. 1993a). Atribuem-se esses resultados aos ferimentos causados pela sonicação que auxiliam na produção de sinais fenólicos (Stachel et al. 1985), aumentando a ativação dos genes *vir*.

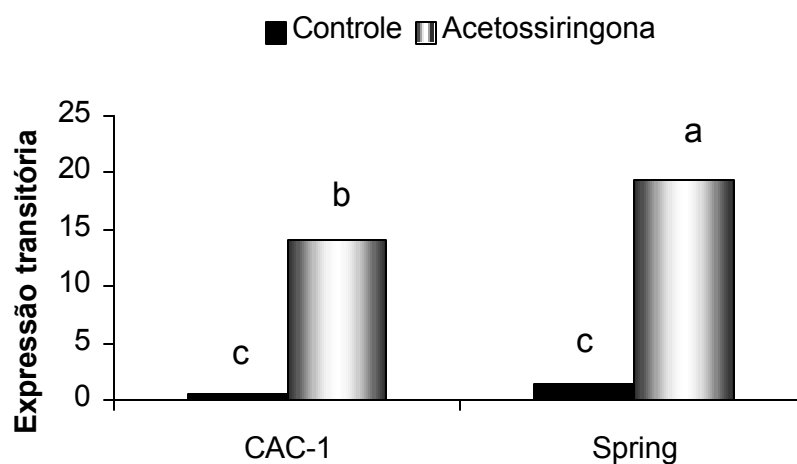


Figura 2 - Frequência relativa da expressão transitória de *GUS* em cotilédones de soja imaturos na presença ou ausência de acetossiringona. Médias identificadas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1 % de probabilidade.

Observou-se uma pequena diferença na expressão transitória de *GUS* entre os cultivares utilizados, a favor do cultivar Spring. Entretanto, Santarém et al. (1998) não encontraram diferenças na expressão transitória de *GUS* com tratamento com SAAT em três cultivares testados. O efeito do genótipo tem sido observado em várias espécies vegetais. Wordragen e Dons (1992) sugerem que a diferença na resposta entre cultivares pode ser causada pela resposta diferencial ao estresse provocado pela transformação. Entretanto, os resultados de Santarém et al. (1998) indicam que o uso da sonicação para mediar a infecção da *Agrobacterium* pode minimizar estas diferenças. Mas, a média da expressão transitória obtida com dois e dez segundos de sonicação não diferiram estatisticamente (Santarém et al. 1998).

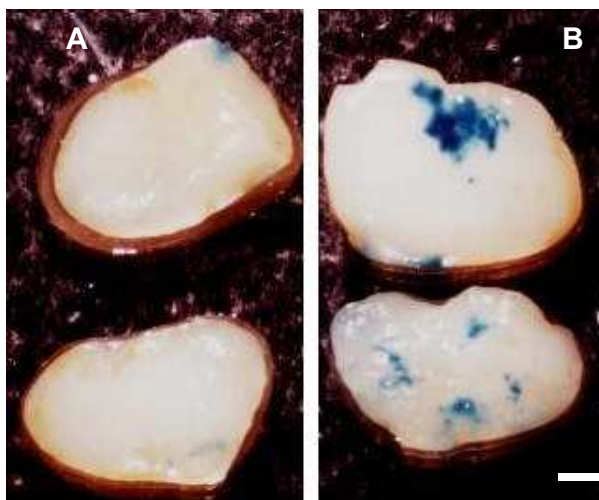


Figura 3 – Detalhes da face adaxial de cotilédones imaturos do cultivar CAC-1 evidenciando a expressão transitória do gene *GUS*. A - sem acetosseringona. B – com acetosseringona. (Barra = 1 mm)

### **Transformação com o gene da Citrato Sintase (CS)**

Eventos independentes de transformação foram obtidos. Um total de 26 embriões transformados com o gene *CS* de *D. carota* e 31 com o gene *CS* de *E. coli* chegaram à fase final para conversão em plantas. Estes embriões apresentavam aparência normal de um embrião na fase torpedão. Quando colocados no meio de conversão e germinação o processo de conversão foi iniciado com a emissão dos primeiros folíolos, entretanto, logo em seguida iniciava um forte processo de necrose dos folíolos e sua conseqüentemente morte. A morte dos folíolos culminava na morte da plântula (Figura 4).

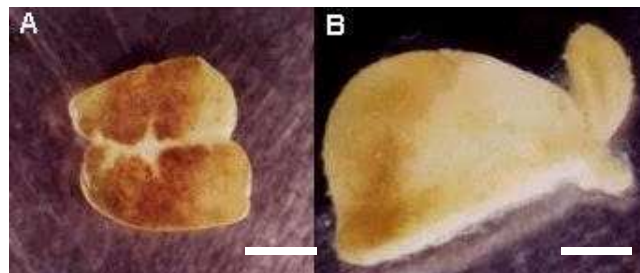




Figura 4 – Sintomas necróticos apresentados pelas plântulas transformadas com o gene CS. A e B – transformação do cultivar de soja CAC –1 com o gene CS de *E. coli* e C – com o gene CS de *D. carota*. (Barra = 1 mm)

De acordo com o Dr. Herrera-Estrella do Centro de Investigación y de Estudios y Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato, Guanajuato, México (comunicação pessoal), dependendo do nível de expressão da citrato sintase na folha, a necrose pode ser induzida. De fato, linhas transgênicas de tabaco transformadas com o gene CS de *P. aeuroginosa* com altas atividades de citrato sintase apresentaram necrose nas folhas (Delhaize et al., 2001). Em nossos experimentos, devido ao efeito necrótico nas plântulas de soja transformadas, com a conseqüente morte prematura dos folíolos, não foi possível extrair quantidade de DNA suficiente para análise de hibridização por Southern-blot. Com isto, não foi possível determinar o número de cópias dos genes inseridos nos transformantes. Em face desta limitação, determinou-se apenas a presença dos transgenes nestas plântulas via PCR (Figura 5).

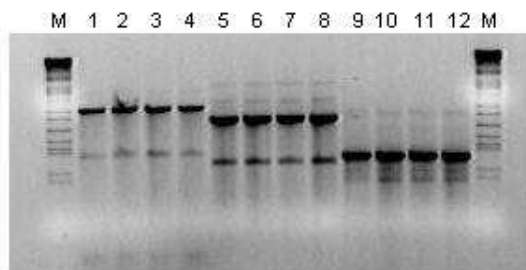


Figura 5 – Análise eletroforética de fragmentos de PCR obtidos de DNA de plântulas de soja do cultivar CAC – 1 transformadas com o transgene CS. As linhas de 1 a 4 mostram produtos de PCR de plântulas transformadas com o gene CS de *D. carota*, as linhas de 5 a 8 mostram produtos PCR de plântulas transformadas com o gene CS de *E. coli*, e as linhas de 9 a 12 mostram os

produtos de PCR do promotor de raiz ToRB7 em plântulas transformadas com o gene *CS* de *D. carota*. M – DNA lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII*.

Dependendo do nível de expressão do gene *CS* de *P. aeruginosa* a concentração de citrato nas linhas de tabaco transgênicas CSb aumentou em até dez vezes quando comparado ao controle (de la Fuente et al., 1997). Entretanto, Delhaize et al. (2001) não encontraram nenhum efeito da expressão do gene *CS* de bactéria sobre a concentração de citrato nas raízes das linhas transgênicas de tabaco CSb18 e CS47 transformadas por de la Fuente et al. (1997). As linhas denominadas PA, com altos níveis de expressão de citrato sintase (até 100 vezes mais que as linhas CSb), apresentaram concentração de citrato similar à linha controle (Delhaize et al., 2001). Duas destas linhas PA49 e PA12, possuíam altos níveis de atividade de citrato sintase citosólica avaliada na raiz, e conseqüentemente apresentaram sintomas necróticos nas folhas, sendo que a linha PA49 com maior atividade desta enzima apresentou sintomas necróticos mais fortes, resultando em má formação das folhas (Delhaize, et al., 2001).

Aventou-se a possibilidade do etileno estar envolvido no efeito necrótico observado nos folíolos. No intuito de reverter esse efeito, utilizou-se AVG (2,0 mg/L), inibidor da biossíntese de etileno. Entretanto, não se observou nenhum efeito benéfico na supressão do efeito necrótico.

As enzimas reguladoras do ciclo do ácido cítrico são controladas por três mecanismos básicos: (1) disponibilidade de substrato, (2) inibição pelo produto e (3) inibição competitiva por retroalimentação dos intermediários ao longo do ciclo (Heldt, 1997). Por conseguinte, se as células das folhas estão produzindo citrato em excesso, a respiração celular pode estar "inibida", uma vez que acúmulo de citrato inibe o ciclo do ácido cítrico (Heldt 1997, Popova e Carvalho, 1998), o que, possivelmente, pode acarretar em acúmulo de piruvato. O piruvato acumulado em excesso na folha é possível que seja utilizado na síntese de lactato o que pode acarretar acidez (Bray et al., 2000). Este fato pode ser a causa da necrose observada nos folíolos das plântulas de soja transformadas com o gene *CS*. O acúmulo de citrato pode não ocorrer na raiz uma vez que nesse órgão o mecanismo de exsudação está presente. O acúmulo de piruvato pode ocorrer também quando o fluxo de carbono para a mitocôndria excede à capacidade da cadeia transportadora de elétrons em aceitar elétrons (Siedow e Day, 2000).

Em condições normais, a maior parte do citrato produzido na mitocôndria é exportada para o citosol e convertida em  $\alpha$ -cetoglutarato pelas enzimas citosólicas aconitase e NADP-isocitrato desidrogenase (Heldt, 1997; Popova e Carvalho, 1998). O  $\alpha$ -cetoglutarato serve como esqueleto de carbono para assimilação de  $\text{NH}_4^+$  (Heldt, 1997, Popova e Carvalho, 1998). Como as plântulas de soja transformadas com o gene *CS* possivelmente produzem

citrato em excesso no citosol, este pode inibir a enzima NADP-isocitrato desidrogenase, que converte isocitrato em  $\alpha$ -cetogluturato (Popova e Carvalho, 1998). Isso provocaria um acúmulo nos níveis de  $\text{NH}_4^+$  livre que pode atingir níveis tóxicos. Este possível acúmulo de  $\text{NH}_4^+$  pode ser responsável também pela necrose observada nas plântulas de soja que contém o transgene CS.

Uma outra hipótese seria a de que o citrato citosólico produzido em excesso nas plântulas transgênicas poderia interferir com o transporte de metabólitos e íons pelo sistema simporte/antiporte entre mitocôndria, cloroplasto e citosol, desta forma provocando alterações na homeóstase de cátions, o que possivelmente pode interferir em processos biossintéticos importantes, resultando na morte celular. Estas possíveis interferências podem ser a causa da necrose observada nas plântulas de soja portadora do transgene CS.

## REFERÊNCIAS

- Bailey, M.A., Boerma, H.R., Parrott, W.A. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 29: 102-108, 1993.
- Barwale, U.B., Kerns, H.R., Widholm, J.M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167:473-481, 1986.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland. p.1158-1202, 2000.
- de la Fuente, J.M., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera-Ponce, J.L., Herrera-Estrella, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276:1566-1568, 1997.
- Delhaize, E., Hebb, D.A., Ryan, P.R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol.* 125: 2059-2067, 2001.
- Dinkelaker, B., Romheld, B., Marshner, H. Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupine (*Lupinus albus* L.). *Plant Cell Environ.* 12, 285-292, 1989.
- Dinkelaker, B., Hengeler, B., Marshner, H. Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. *Bot. Acta* 108: 183-200, 1995.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15; 1990.
- Finer, J.J. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Rep.* 7:238-241, 1988.
- Finer, J.J., McMullen, M.D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension tissue culture. *In Vitro Cell Dev. Biol - Plant* 27:175-182, 1991.
- Fisk, H.J., Dandekar, A.M. The introduction and expression of transgenic in plant. *Sci. Hortic.* 55:5-36, 1993.
- Foy, C.D. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19: 959-987, 1988.
- Hadi, M.Z.; McMullen, M.D., Finer, J.J. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 15:500-505, 1996.
- Hansen, G., Das, A., Chilton M.D. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7603-7606, 1994.
- Heldet H.W. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press, Oxford, 522p., 1997.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T. Efficient transformation mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6:271-282, 1994.

- Hinchee, M.A.W., Connor-Ward, D.V.; Newell, C.A., McDonnell, R.E. Sato, S.J., Gasser, C.S., Fischhoff, D.A., Re, D.B, Fraley, R.T., Horsch, R.B. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Bio Technol.* 6:916-922, 1988.
- Hoffland, E., Findenegg, G.R., Nelemans, J.A. Solubilization of rock phosphate by rape. 2. Local root exudation of organic acids as a response to P starvation. *Plant Soil* 113: 161-165, 1989.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eicholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231, 1985.
- Hue N.V., Craddock, G.R., Adams, F. Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Sci. Am. J.* 50: 28-34, 1986.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T., Kumashiro, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat. Biotechnol.* 14:745-750, 1996.
- Jefferson, R.A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405, 1987.
- Liu, W., Moore, P.J., Collins, G.B. Somatic embryogenesis in soybean via somatic embryo cycling. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 28:153-160, 1992.
- López-Bucio, J. Martínez de la Vega, O., Guevara-García, A., Herrera-Estrella, L. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants overproduce citrate. *Nat. Biotech.* 18:450-453, 2000.
- Ma, J. F. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol.* 41:383-390, 2000.
- Maughan, P. J., Philip, R., Cho, M.J., Widholm, J.M., Vodkin, L.O. Biolistic transformation, expression and inheritance of  $\beta$ -casein in soybean (*Glycine max*). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35:334-349; 1999.
- McCabe, D.E., Swain, W.F., Martinell, B.J., Christou, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio Technol.* 6:923-926, 1988.
- Meurer, C.A., Dinkins, R.D., Redmond, C.T., McAllister, K.P., Tucker, D.T., Walker, D.R., Parrott, W.A., Trick, H.N., Essig, J.S., Frantz, H.M., Finer, J.J., Collins, G.B. Embryogenic response of multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars across three locations. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37:62-67, 2001.
- Miyasaka, S.C., Buta, J.G., Howell, R.K., Foy, C.D. Mechanism of aluminum tolerance in Snapbeans. *Plant Physiol.* 96: 737-743, 1991.
- Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-479, 1962.
- Parrott, W.A., All, J.N., Adang, M.J., Bailey M.A., Boerma, H.R., Stewart Jr, C.N., Recovery and evaluation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki insecticidal gene. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 30:144-149, 1994.
- Popoya, T.N., Carvalho, M.A.A.P., Citrate and isocitrate in plant metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1394:307-325, 1998.

- Samoylov, V.M., Tucker, D.M., Parrott, W.A. A liquid medium-based protocol for rapid regeneration from embryogenic soybeans cultures. *Plant Cell Rep.* 18:49-54, 1998a.
- Samoylov, V.M., Tucker, D.M., Parrott, W.A. Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 34:8-13, 1998b.
- Santarém, E.R.; Finer, J.J. Transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35:451-455; 1999.
- Santarém, E. R., Pelissier, B., Finer, J. J. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 33: 13-19, 1997.
- Santarém, E. R., Trick, H.N., Essig, J.S., Finer, J.J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Rep.* 17:752-759, 1998.
- Santos, K.G.B, Mundstock, E., Bodanese-Zanettini, M.H. Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. *Plant Cell Rep.* 16:859-864, 1997.
- Siedow J.N., Day, D.A. Respiration and photorespiration In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, Maryland p676-729, 2000.
- Stachel, S.E., Messens, E., Van Montagu, M., Zambryski, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells which activate the T-DNA transfer process in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318:624-629, 1985.
- Stewart Jr, C.N., Adang, M.J., All, J.N., Barmy, H.R., Cardineau G., Tucker, D., Parrott, W.A. Genetic transformation, recovery and characterization of fertile soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] transgenic for *Bacillus thuringiensis* cryIAC gene. *Plant Physiol.* 112:121-129, 1995.
- Takita, E. Koyama, H., Hara, T. Organic acid metabolism on aluminum-phosphate utilizing cells of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Physiol.* 40: 489-495, 1999.
- Tepfer, M., Casse-Delbart, F. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. *Microbiol. Sci.*, 4:24-28, 1987.
- Trick, H.N., Dinkins, R.D., Santarém, E.R., Di, R., Samoylov, V., Meurer, C.A., Walker, D.R., Parrott, W.A., Finer, J.J., Collins G. B. Recent advances in soybean transformation. *Plant Tiss. Cult. Biotech.* 3:9-27, 1997.
- Trick, H.N.; Finer, J.J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Rep.* 17:482-488; 1998.
- Vain, P., Keen, N., Murillo, J., Rathus, C., Nemes, C., Finer, J.J. Development of the particle inflow gun. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33:237-246, 1993.
- Vale, F.X.R., Zambolim, L., Fernandes Filho, E.I., Liberato, J.R. QUANTV.1.0 Software para quantificação de doenças de plantas. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- Wang, H., Qi, M., Cutler, J. A simple method of preparing plant sample for PCR. *Nucl. Ac. Res.* 21:4153-4154, 1993.

- Wright, M.S., Launis, K.L. Novitzky, Duesing, R. J.H., Harms, C.T. A simple method for the recovery of multiple fertile plants from individual somatic embryos of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. In *Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 27:153-157, 1991.
- Wordragen, M.F., Dons, H.J.M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of recalcitrant crops. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10:12-36, 1992.

