

CASSIANA SEVERIANO DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE GENES DA BIOSSÍNTESE
DE LIPÍDEOS E UTILIZAÇÃO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS E
NÓS-COTILEDONARES NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA
DE SOJA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

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

T

S725c
2012

Sousa, Cassiana Severiano de, 1980-

Caracterização *in silico* de genes da biossíntese de lipídeos e utilização de eixos embrionários e nós-cotiledonares na transformação genética de soja / Cassiana Severiano de Sousa – Viçosa, MG, 2012.
xii, 81f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maurílio Alves Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Engenharia genética vegetal. 2. *Glycine max*.
3. Biossíntese. 4. Ácidos graxos. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 660.65

CASSIANA SEVERIANO DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE GENES DA BIOSÍNTESE
DE LIPÍDEOS E UTILIZAÇÃO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS E
NÓS-COTILEDONARES NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA
DE SOJA**

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

APROVADA: 15 de junho de 2012.



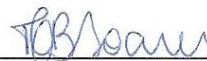
Everaldo Gonçalves de Barros
(Coorientador)



Wagner Campos Otoni



Luciano Gomes Fietto



Taís Cristina Bastos Soares



Maurílio Alves Moreira
(Orientador)

*Aos meus pais, Maurílio e Maria das Graças.
Às minhas irmãs Maria e Júlia.
Ao Tarço Murilo.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por ter me segurado quando eu passei por situações que eu jamais pensava enfrentar na vida. Sem Ele eu não teria conseguido alcançar mais esse objetivo.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do meu doutorado. Sou muito grata a essa instituição de ensino de excelência. Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela oportunidade da realização desse trabalho. Foram nove anos trabalhando nesse lugar onde eu aprendi não só a disciplina e o gosto de se trabalhar no laboratório e conduzir experimentos, mas também a dividir experiências com pessoas que marcaram essa fase tão importante para o meu crescimento.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela criação do curso de Bacharelado em Bioquímica, do qual eu fiz parte da primeira turma. Obrigada pela graduação, mestrado e doutorado. Ao secretário e amigo Eduardo Monteiro, não tenho palavras para agradecer tamanha presteza, competência e carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Maurilio Alves Moreira, pela orientação desde a iniciação científica, pela confiança, pelo exemplo de profissionalismo e de vida. Obrigada, “jovem”, por tudo que eu aprendi com o senhor.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros pela coorientação, apoio, incentivo e pela ajuda nos momentos que eu precisei.

Ao professor Wagner Campos Otoni, pela coorientação, pelas valiosas contribuições sobre cultura de tecidos de plantas e por abrir as portas do laboratório.

Ao Professor Luciano Gomes Fietto, pelas sugestões para as análises *in silico* e pela participação na banca.

À Professora Taís Cristina Bastos Soares pela participação na banca.

Aos amigos do SEQDNA, do BIOMOL e da PROTEÍNA, pelo apoio técnico, pela amizade e pelo ótimo ambiente de trabalho. Um agradecimento

especial às companheiras de projeto Maria Andréia e Beatriz, pela amizade e grande ajuda nos experimentos. Também às amigas Maíra, Magali e Christina.

Aos funcionários da cozinha, do almoxarifado e da casa de apoio, pelo auxílio profissional e pela atenção. Agradeço especialmente ao Newton, Klever e José Carlos pelo grande apoio nos trabalhos na casa de vegetação.

Às minhas queridas irmãs de Viçosa, Ana Paula e Juliana. Foram muitos anos morando juntas e dividindo coisas boas e ruins.

Aos meus pais, Maurílio e Maria das Graças, pelo amor, apoio e compreensão durante a minha ausência. Obrigada por acreditarem que eu conseguiria. À minha avó, Elvira, pelas orações e amor. Às minhas irmãs, Maria e Júlia, pelo amor, apoio, confiança e pelos momentos felizes em casa. Ao meu cunhado, Fernando, sempre feliz e disposto a me ajudar. Foram eles que me incentivaram e me impulsionaram.

Ao Tarço, pelo amor, cuidado, apoio e confiança. Obrigada por ter me feito renovar para a vida.

À querida Naná, grande pessoa que a vida colocou no meu caminho. Obrigada pelas palavras sempre sábias, pelas orações e pelo carinho especial.

Enfim, a todos os amigos e familiares, que de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento profissional e humano.

BIOGRAFIA

CASSIANA SEVERIANO DE SOUSA, filha de Maurílio Ferreira de Sousa e Maria das Graças Severiano de Sousa, nasceu no dia vinte e sete de outubro de 1980, em Cataguases, MG.

Em março de 2001, ingressou no curso de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se como Bacharel em Bioquímica em janeiro de 2005. Durante a graduação teve oportunidade de realizar iniciação científica, desenvolvendo trabalhos de pesquisa por 2 anos no Laboratório de Genética Molecular de Plantas, no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) – UFV.

Em março de 2005, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, em nível de mestrado, na mesma instituição. Durante esse período, atuou na área de Biologia Molecular e Engenharia Genética de Plantas, no Laboratório de Clonagem e Sequenciamento de DNA, submetendo-se à defesa da dissertação em fevereiro de 2007.

Em março de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola da UFV, em nível de doutorado, submetendo-se a defesa da tese em junho de 2012.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Biossíntese do óleo e enzimas-chave envolvidas.....	4
2.1.1. Ácido-graxo dessaturases.....	5
2.1.2. 1,2-Diacilglicerol colinafosfotransferase (CPT) e Lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT).....	8
2.2. Transformação genética de soja.....	10
2.3. Tipos de explantes.....	11
2.4. Transformação de plantas via silenciamento gênico.....	12
2.5. Identificação e caracterização de genes que codificam proteínas/enzimas de importância para a soja.....	13
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo Geral.....	15
3.2. Objetivos Específicos.....	15
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
Capítulo 1.....	27
CARACTERIZAÇÃO <i>IN SILICO</i> DOS GENES QUE CODIFICAM AS ENZIMAS 1,2-DIACILGLICEROL COLINAFOSFOTRANSFERASE E LISOFOSTADILCOLINA ACILTRANSFERASE ENVOLVIDAS NA BIOSSÍNTESE DE LIPÍDEOS EM SOJA.....	27
RESUMO.....	27
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1. Identificação e caracterização <i>in silico</i>	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1. Identificação <i>in silico</i> e análise das sequências nucleotídicas e peptídicas.....	33

3.2. Análise da expressão dos genes.....	37
3.3. Análise das sequências aminoacídicas, identificação de domínios e localização subcelular.....	43
4. CONCLUSÕES.....	48
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
Capítulo2.....	53
UTILIZAÇÃO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS E DE NÓS- COTILEDONARES DE SOJA COMO EXPLANTES EM PROTOCOLOS DE CULTURA DE TECIDOS PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA VIA RNA DE INTERFERÊNCIA.....	53
RESUMO.....	53
1. INTRODUÇÃO.....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1. Materiais Vegetais.....	58
2.2. Plantio, coleta e desinfestação das vagens.....	58
2.3. Desinfestação das sementes.....	59
2.4. Preparo das sementes para a obtenção dos explantes	59
2.4.1. Embebição das sementes (eixos embrionários).....	59
2.4.2. Germinação das sementes (nós-cotiledonares).....	59
2.5. Vetores de transformação genética.....	62
2.6. Linhagens de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	64
2.7. Preparos dos eixos embrionários, nós-cotiledonares e Infecção.....	64
2.8. Seleção e Regeneração das Plantas.....	65
2.8.1. Experimentos com eixos embrionários.....	65
2.8.2. Experimentos com nós-cotiledonares.....	66
2.9. Aclimatização das Plantas.....	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4. CONCLUSÕES.....	76
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

RESUMO

SOUSA, Cassiana Severiano de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2012. **Caracterização *in silico* de genes da biossíntese de lipídeos e utilização de eixos embrionários e nós-cotiledonares na transformação genética de soja.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Coorientador: Everaldo Gonçalves de Barros.

As atividades das enzimas oleoil dessaturase, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase (CPT) e a lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT) regulam a biossíntese de lipídeos em plantas. Dessa forma, um melhor conhecimento dos genes que codificam essas enzimas é importante no processo de melhoramento genético da qualidade do óleo de soja. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar *in silico* os genes que codificam as enzimas CPT e LPCAT em soja e avaliar a utilização de eixos embrionários e nós-cotiledonares como explantes em protocolos de cultura de tecidos para transformação genética, via RNA de interferência, com cassetes de silenciamento do gene da oleoil dessaturase. Análises computacionais mostraram que o genoma da soja apresenta dois genes que codificam a CPT e dois genes que codificam a LPCAT, sendo que um desses genes apresentou um transcrito alternativo. Nas regiões promotoras foram identificados *cis*-elementos responsáveis pela expressão semente-específica e também de resposta a estresses biótico e abiótico. A análise *in silico* indica que os genes são expressos em diferentes condições de estresse, em embriões somáticos em diferenciação, em sementes imaturas, em tecidos de raiz e em calos. A análise das sequências aminoacídicas revelou a presença de domínios transmembrana e a busca da localização celular indicou que as enzimas CPT e LPCAT estão localizadas no retículo endoplasmático. Como esses genes se expressam em sementes, eles são possíveis candidatos à manipulação genética visando a melhoria da qualidade do óleo. Dois protocolos de transformação de soja foram avaliados para a possível obtenção de soja com óleo que apresente maior estabilidade oxidativa. Nesse sentido, as variedades comerciais CAC-1 (de ciclo tardio) e CD-201 (de ciclo precoce) foram submetidas à infecção via *Agrobacterium tumefaciens* da linhagem KYRT1. O protocolo utilizado para os eixos

embrionários foi mais rápido, com meios de cultura menos elaborados em relação à composição e um maior número de plantas foi transferido para a casa de vegetação, onde permaneceram até a produção de vagens e sementes. Foi possível realizar todas as etapas, desde a infecção até regeneração e aclimação das plantas, para as variedades utilizadas, pelos protocolos descritos.

ABSTRACT

SOUSA, Cassiana Severiano de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2012. ***In silico* characterization of genes involved in lipid biosynthesis and use of embryonic axes and cotyledonary nodes in genetic transformation of soybean.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Co-adviser: Everaldo Gonçalves de Barros.

The activities of the enzymes oleoyl desaturase, 1,2-diacylglycerol cholinephosphotransferase (CPT) and lysophosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT) regulate the biosynthesis of lipids in plants. Thus, a better understanding of the genes encoding these enzymes is important in the genetic manipulation of the soybean oil quality. Therefore, the first chapter presents the *in silico* characterization of the genes encoding the enzymes CPT and LPCAT in soybean. The second chapter presents an evaluation of the use of embryonic axes and cotyledonary nodes as explants in tissue culture protocols for genetic transformation, via RNA interference, with silencing cassettes of the oleoyl desaturase gene. Computer analysis showed that the soybean genome has two genes encoding CPT and two genes encoding LPCAT, with one of these models showing an alternative transcript. *Cis*-elements in the promoter regions were identified that are responsible for seed-specific expression and also in response to biotic and abiotic stresses. *In silico* analysis suggested the expression of the genes in different stress conditions, in differentiating somatic embryos, in immature seeds, in root tissue and callus. The amino acid sequence analysis revealed the presence of transmembrane domains and searching for subcellular localization indicated that CPT and LPCAT are located in the endoplasmic reticulum. Since these genes are expressed in seeds, they are possible candidates for genetic manipulation aim the improvement of oil quality. Two soybean transformation protocols were evaluated for the possibility of obtaining soybean oil with greater oxidation stability. The commercial varieties CAC-1 (late cycle) and CD-201 (early cycle) were subjected to infection via *Agrobacterium tumefaciens* strain KYRT1. The protocol used for the embryonic axis transformation was faster, with less elaborate culture

media in relation to composition and a greater number of plants were transferred to the greenhouse, where they remained until the production of pods and seeds. It was possible to perform all stages, from infection to regeneration and acclimatization of plants, for the varieties used with the protocols described.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A biossíntese de ácidos graxos é uma via metabólica essencial para as células vegetais. Seus produtos servem como os principais constituintes das membranas celulares e, em células especializadas, os ácidos graxos ou seus derivados, podem agir como moléculas de sinalização e como armazenamento de carbono e energia (TAIZ & ZEIGER, 2004).

A biossíntese de lipídeos em vegetais superiores envolve o retículo endoplasmático e os plastídios. A via plastidial é responsável pela biossíntese de ácidos graxos destinados a membranas celulares, enquanto que a via do retículo endoplasmático destina-se à biossíntese de ácidos graxos de armazenamento (BUCHANAN *et al.*, 2000).

Alterações genéticas que causam alterações na composição dos ácidos graxos do óleo de soja com o objetivo de obter óleos com características melhoradas tem sido alvo de vários grupos de pesquisa (WANG & XU, 2008). Buhr *et al.* (2002) descreveram uma das primeiras transformações genéticas realizadas com sucesso para a soja, considerando-se a via de ácidos graxos. Os autores obtiveram soja com acúmulo de ácido oleico, por meio da diminuição da expressão do gene *Fad2-1*, ao utilizarem cassetes com construções *antisense*. A diminuição do conteúdo de ácidos graxos polinsaturados aumenta a estabilidade oxidativa do óleo, diminuindo a necessidade de hidrogenação química, que leva à formação de ácidos graxos do tipo *trans*, cujo consumo está associado à ocorrência de doenças cardiovasculares (WILDHOLM *et al.*, 2010).

Flores *et al.* (2008), obtiveram silenciamento mediado por si-RNA de um gene da família da ômega-3 ácido graxo dessaturase (FAD3). A enzima FAD3 é responsável pela síntese de ácido α -linolênico (18:3, $\Delta^{9,12,15}$) na via de biossíntese de ácidos graxos polinsaturados. Ele é o ácido graxo que mais contribui para a instabilidade do óleo de soja e de outras leguminosas. Dessa forma, a redução do conteúdo desse ácido graxo pode aumentar a estabilidade do óleo e seu valor econômico.

Wang & Xu (2008) utilizaram a técnica de RNAi para silenciamento do gene *FAD2-1*. Foram obtidas algumas linhagens com elevado conteúdo de ácido oléico, variando entre 71,5 e 81,9%.

Além de modificações na proporção da fração óleo, outras características de qualidade têm sido alvo de manipulação genética na soja. Dentre elas, destacam-se aumento do conteúdo de óleo (LARDIZABAL, 2008), redução do conteúdo de fitato (NUNES *et al.*, 2006; SHI *et al.*, 2007), redução no conteúdo de inibidores de proteases (CLARKE & WISEMAN, 2000; LIVINGSTONE *et al.*, 2007), redução no conteúdo de proteínas alergênicas (HERMAN *et al.*, 2003) e aumento do conteúdo de α -tocoferol (TAVVA *et al.*, 2007).

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

O presente trabalho está subdividido em dois capítulos. O primeiro capítulo será submetido à revista *Plant Cell Reports*. Este descreve a identificação, caracterização e análise da expressão *in silico* dos genes que codificam as enzimas 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase envolvidas na biossíntese de ácidos graxos em soja. O segundo capítulo apresenta a utilização de eixos embrionários e de nós cotiledonares de duas variedades de soja em protocolos de cultura de tecidos para a transformação genética via RNA de interferência, da enzima oleoil dessaturase, envolvida na biossíntese de ácidos graxos, buscando aumentar o conteúdo de ácido oléico e diminuir o conteúdo de ácido linolênico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O principal componente lipídico dos óleos vegetais são os triacilgliceróis (TAG), que são moléculas compostas de três ácidos graxos, cada um em ligação éster com o glicerol. Os TAGs são mistos em sua maioria, possuindo um ou mais ácidos graxos diferentes. O ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1, Δ^9), ácido linoléico (18:2, $\Delta^{9,12}$) e ácido linolênico (18:3, $\Delta^{9,12,15}$) são os ácidos graxos predominantes (KINNEY, 1994; LI *et al.*, 2010). Entretanto, uma grande diversidade de ácidos-graxos existe nos TAGs de reserva nas sementes. Algumas espécies de plantas podem conter altos níveis de ácidos graxos não usuais (LI *et al.*, 2010).

A composição e a distribuição dos ácidos graxos no glicerol influenciam diretamente a qualidade do óleo, o valor nutricional, o sabor, a estabilidade oxidativa e o ponto de fusão. Uma maior quantidade de ácidos graxos polinsaturados reduz a estabilidade oxidativa e a qualidade do óleo de soja, pois deles se originam compostos voláteis responsáveis pela produção de “*off-flavor*” e rancidez do óleo (YADAV, 1996).

Nutricionalmente, os óleos polinsaturados apresentam efeitos benéficos. Entretanto, a sua exposição a altas temperaturas por longos períodos de tempo leva à quebra oxidativa das duplas ligações de carbono, resultando na formação de aldeídos de cadeia curta, hidroperóxidos e ceto derivados. Estes compostos causam sabor indesejável e reduzido desempenho de fritura do óleo (WARNER *et al.*, 2001). Segundo Abbadi *et al.* (2004) o teor de ácidos graxos polinsaturados pode ser reduzido a valores muito menores que os naturalmente encontrados, sem que haja prejuízo com relação aos requerimentos nutricionais. Dessa forma, uma redução no teor de ácidos graxos polinsaturados acarreta em aumento da estabilidade do óleo e, conseqüentemente, melhora no seu desempenho (FLORES *et al.*, 2008).

Uma alternativa para diminuir o teor de ácidos graxos polinsaturados é a hidrogenação seletiva do óleo, processo no qual as duplas-ligações de carbono são convertidas em ligações simples, por ação do hidrogênio na

presença de um catalisador (RAY & CARR, 1985). Tal processo reduz o conteúdo de ácidos graxos polinsaturados, principalmente linoléico e linolênico e aumenta a abundância relativa do ácido graxo monoinsaturado oléico. No entanto, a hidrogenação parcial de óleos leva à produção de ácidos graxos *trans* (YADAV, 1996; LIMA, 2005). Esses isômeros *trans* podem constituir mais de 40% do total de ácidos graxos do óleo de soja tratados quimicamente e foram relacionados, juntamente com o ácido palmítico, com a elevação dos níveis de LDL-colesterol sanguíneo e com a diminuição dos níveis de HDL-colesterol no plasma, aumentando o risco de doenças cardiovasculares (WIDHOLM *et al.*, 2010).

Desta forma, uma estratégia seria substituir os óleos hidrogenados na indústria de alimentos por gorduras e óleos que sejam funcionais e nutricionalmente benéficos (LIU *et al.*; 2002a; LIU *et al.*; 2002b). A modificação da composição dos óleos vegetais pode ser realizada por meio de técnicas de melhoramento tradicional ou por transformação genética (KINNEY, 1996, WU *et al.*, 2005).

Uma das estratégias utilizadas para a obtenção de soja com modificação na fração lipídica é a modificação genética da expressão de enzimas-chave da biossíntese de ácidos graxos polinsaturados, através de transformação genética de plantas via silenciamento gênico, transcricional ou pós-transcricional (VENDRUSCOLO, 2003; TANG & GALILI, 2004; TANG *et al.*, 2007).

2.1. Biossíntese do óleo e enzimas-chave envolvidas

A biossíntese do óleo envolve a biossíntese de ácidos graxos e a síntese de triacilgliceróis. Dentre as enzimas que atuam nessas vias metabólicas, destacam-se oleoil dessaturases, 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase (CPT) e lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT).

A Figura 1 a seguir esquematiza as etapas da biossíntese de óleo e destaca as reações catalisadas pelas três principais enzimas mencionadas.

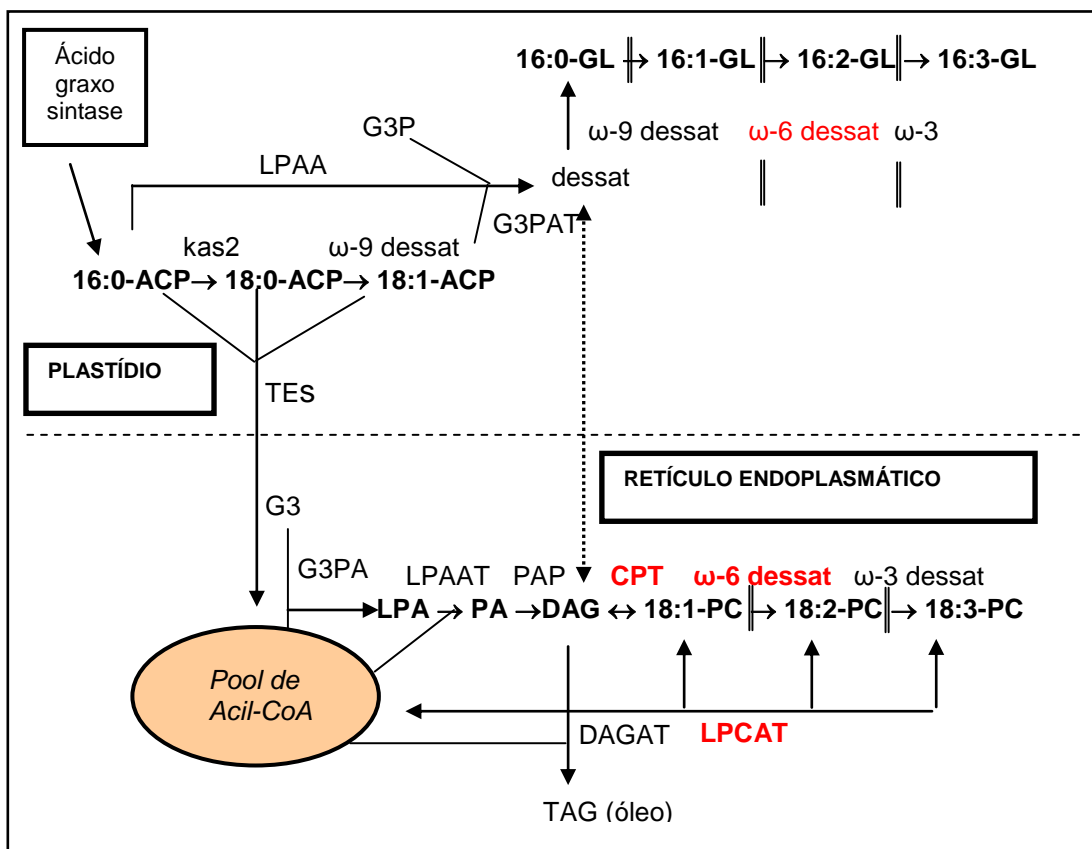


Figura 1: Representação esquemática da biossíntese de óleo em plantas. A linha tracejada entre DAGs (diacilgliceróis) plastidiais e extraplastidiais mostra a troca de glicerolípídeos entre os dois compartimentos por mecanismos ainda desconhecidos. São indicados mutantes nos passos de dessaturações em *Arabidopsis*. CPT - 1,2-Diacilglicerol colinafosfotransferase, LPCAT - Lisofosfatidilcolina aciltransferase e DAGAT - Diacilglicerol aciltransferase. (extraída e adaptada de LIMA, 2005).

2.1.1. Ácido-graxo dessaturases

Na soja, a biossíntese de ácidos graxos inicia-se com a formação dos ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0) e oléico (18:1, Δ^9) em uma seqüência de reações catalisada pela ácido graxo sintase.

As ácido-graxo dessaturases são responsáveis por catalisar a introdução de duplas ligações na porção hidrocarbônica dos ácidos graxos, produzindo ácidos graxos insaturados (KINNEY *et al.*, 2002; CHI *et al.*, 2011)

A dessaturase FAD2, localizada no retículo endoplasmático, está envolvida na síntese de ácidos graxos polinsaturados. Plantas superiores contêm pelo menos uma FAD2, que insere uma dupla ligação entre os

carbonos 12 e 13 do ácido oléico (monoinsaturado), dando origem ao ácido linolênico (polinsaturado). A via catalisada pela FAD2 é a rota principal para a produção de lipídeos polinsaturados (YANG & XU, 2007).

As dessaturases estão diretamente relacionadas com a habilidade das células em modular as características físicas das membranas celulares, pois a introdução de um número apropriado de insaturações em ácidos graxos de glicerofosfolipídios de membrana diminui a temperatura de fusão e provê membranas com a fluidez necessária (HAZEL, 1995; MURATA *et al.*, 1995).

Em *Arabidopsis* foram identificadas sete classes de mutantes para dessaturases. Tais mutantes auxiliaram no entendimento da função dessas enzimas. Mutações no gene *fad2* e *fad3* influenciam principalmente a biossíntese de lipídeos insaturados extra-cloroplastídicos. Mutações nos genes *fad4*, *fad5*, *fad6*, *fad7* e *fad8* afetam a biossíntese de ácidos graxos sintetizados no cloroplasto. Além disso, os genes *fad3*, *fad7* e *fad8* foram caracterizados como responsáveis pela produção de ω -3-dessaturase, enquanto que *fad2* e *fad6* pela ω -6-dessaturase (WALLIS & BROWSE, 2002).

A rota primária para a produção de lipídios polinsaturados nas plantas envolve a oleoil dessaturase, também denominada ω -6 dessaturase (BUCHANAN *et al.*, 2000). O gene *Fad2-2*, que codifica a oleoil dessaturase, é responsável pela produção de ácidos graxos polinsaturados, incluindo os lipídios de membrana tanto em tecidos vegetais quanto em sementes em desenvolvimento. O gene *Fad2-1*, semente-específico, possui um papel mais importante na conversão do ácido oléico em linoléico nos lipídios de armazenamento durante o desenvolvimento da semente (WALLIS & BROWSE, 2002).

Heppard *et al.* (1996) mostraram que as dessaturases são reguladas pós-traducionalmente, em um estudo que analisava a expressão dos genes *Fad2-1* e *Fad2-2*, sob influência de temperatura. A expressão dos genes não foi alterada, mas foi observado aumento no teor de ácidos graxos polinsaturados nas sementes de soja quando a temperatura foi diminuída.

Depois que a cadeia carbônica do ácido graxo é incorporada à molécula do lipídio, ela sofre reações de insaturação, sendo que cada ácido-graxo dessaturase introduz uma ligação insaturada numa posição específica. A primeira reação de dessaturação é catalisada pela esteroil-CoA dessaturase plastidial para produzir o ácido oléico (18:1 Δ^9). A partir deste, são produzidos os ácidos graxos polinsaturados por meio de sucessivas dessaturações. A primeira delas é catalisada pela oleoil-CoA dessaturase (ω -6 dessaturase) plastidial e microssomal, que introduz uma insaturação no ácido oléico para produção do ácido linoléico (18:1 $\Delta^{9,12}$). Um nova insaturação é introduzida pela linoleil-CoA dessaturase (ω -3 dessaturase) plastidial e microssomal ao ácido linoléico para a produção do ácido linolênico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) (CLEMENTE & CAHOON, 2009).

Regulando-se a expressão do gene *Fad2-1* por co-supressão, RNA antisenso ou RNA de interferência foi possível a obtenção de óleos com elevados níveis de ácido oléico (18:1), dentre eles: óleo de soja (KINNEY, 1996; BUHR *et al.*, 2002; KINNEY *et al.*, 2002), canola (KINNEY *et al.*, 2002; STOUTJESDIJK *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2005), algodão (LIU *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2002a) e milho (KINNEY *et al.*, 2002).

Em estudo recente Chi *et al.* (2011) analisaram as dessaturases da soja. Foram identificados 29 genes das dessaturases no genoma da soja, e estes foram caracterizados pela localização cromossômica, estruturas, motivos conservados e padrão de expressão. Os genes foram filogeneticamente agrupados em nove subfamílias com homólogos em *Arabidopsis*, *FAB2*, *FAD2*, *FAD3*, *FAD5*, *FAD6*, *FAD7*, *FAD8*, *SLD1* e *DES1*. Os vinte e nove genes de dessaturases estão distribuídos em 15 dos 20 cromossomos da soja. As estruturas gênicas e os motivos são conservados entre as subfamílias. A maioria das dessaturases mostrou padrões específicos de expressão temporal e espacial entre os diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento com base em análises de dados de microarranjo.

2.1.2. 1,2-Diacilglicerol colinafosfotransferase (CPT) e Lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT)

A enzima 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase (CPT; EC 2.7.8.2) catalisa tanto a síntese de fosfatidilcolina a partir de diacilglicerol quanto a reação inversa, que é uma rota por meio da qual os ácidos graxos polinsaturados são disponibilizados para a incorporação nos TAGs (VOGEL & BROWSE, 1996).

A enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT; EC 2.3.1.23) tem a função de repor o estoque de ácidos graxos polinsaturados do *pool* de acil-CoA no citoplasma. Ela catalisa a acilação da lisofosfatidilcolina (LPC) dependente de acil-CoA para produzir fosfatidilcolina e CoA. A atividade de LPCAT afeta a incorporação de ácidos graxos na posição sn-2 da fosfatidilcolina onde os ácidos graxos polinsaturados são formados e indiretamente influencia a composição de TAGs na semente (FURUKAWA-STOFFER *et al.*, 2000).

As reações catalisadas por ambas as enzimas estão intimamente relacionadas, conforme descrito abaixo:

Durante a biossíntese de triacilgliceróis no retículo endoplasmático, a enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase realiza a adição sequencial de grupamentos acil nas posições 1 e 2 do glicerol-3-fosfato, produzindo ácido fosfatídico. Este sofre a ação da enzima ácido fosfatídico fosfatase sendo convertido a diacilglicerol (DAG). Os DAGs representam o ponto de ramificação para a biossíntese de lipídeos de membrana ou de reserva. Para formar os lipídeos de membrana, os DAGs são reversivelmente convertidos em fosfatidilcolina por uma reação catalisada pela CPT. A fosfatidilcolina, por sua vez, atua como substrato para a biossíntese de ácido-graxos polinsaturados, que podem retornar para o *pool* de acil-CoA citoplasmático pela ação da LPCAT. O DAG pode, ainda, ser convertido em triacilglicerol (TAG) por meio de uma acilação na posição 3 da molécula do glicerol, em uma reação catalisada pela diacilglicerol aciltransferase (DAGAT; EC 2.3.1.20) (LI *et al.*, 2010).

A Figura 2 a seguir esquematiza as reações catalisadas pela CPT e LPCAT durante a biossíntese dos triacilgliceróis.

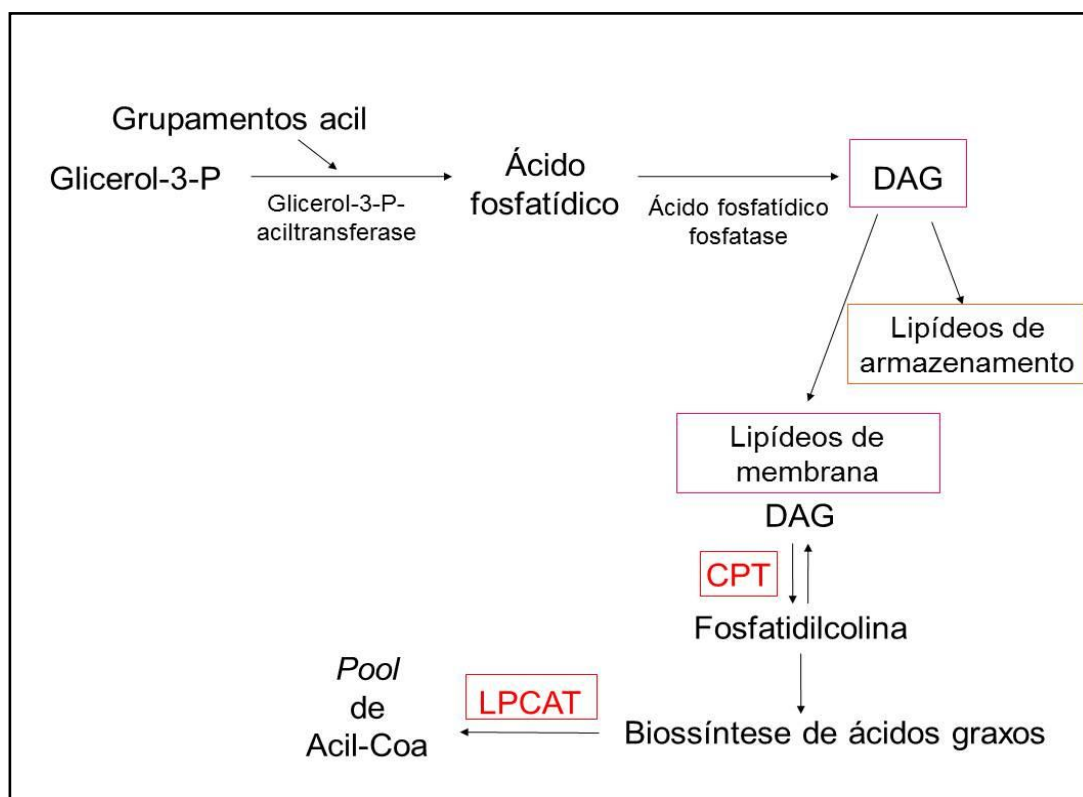


Figura 2: Representação esquemática da utilização de Acil-CoA na síntese de triacilgliceróis em sementes oleaginosas em desenvolvimento. DAG – diacilglicerol; CPT – 1,2-diacilglicerol colinafosfototransferase; LPCAT – lisofosfatidilcolina aciltransferase.

No óleo, os níveis de 18:2 e 18:3 dependem das taxas de biossíntese e de suas disponibilidades para a biossíntese. A disponibilização de ácidos graxos polinsaturados para incorporação em triacilgliceróis de reserva depende das reações reversíveis catalisadas pela CPT e LPCAT (BUCHANAN *et al.*, 2000).

Segundo Lanna (2002) a permuta de grupamentos acil entre grupamentos acil-CoA e fosfatidilcolina representa o mecanismo predominante na regulação da qualidade de ácidos graxos polinsaturados no *pool* de acil-CoA para a síntese do óleo em sementes em desenvolvimento.

2.2. Transformação genética de soja

A transformação genética da soja depende de fatores como variedade, tecidos-alvo, condição do tecido vegetal, métodos de injúria, sistemas de regeneração, marcadores de seleção e genes repórter, que vem sendo estudados e adequados à obtenção de resultados mais eficientes (MELLO-FARIAS & CHAVES, 2008; YAMADA *et al.*, 2012).

Vários métodos de transferência de DNA para plantas já foram descritos, destacando-se a transformação mediada por *Agrobacterium* para tecido de planta excisado (OLHOFT *et al.*, 2006; TZFIRA & CITOVSKY, 2006), o bombardeamento de partículas (SANFORD, 1988, KLEIN *et al.*, 1987; CHRISTOU *et al.*, 1992), a eletroporação (FROMM *et al.*, 1985, SHILLITO *et al.*, 1985; FROMM *et al.*, 1986), a microinjeção (CROSSWAY *et al.*, 1986), a transformação de protoplastos mediada por polietileno glicol ou fostato de cálcio (NEGRUTIU *et al.*, 1987; DATTA *et al.*, 1990) e a transformação mediada por *Agrobacterium* via infiltração a vácuo (BECHTOLD *et al.*, 1993).

Apesar dos vários métodos de introdução de DNA descritos, o bombardeamento de partículas e a transformação mediada por *Agrobacterium* são os mais utilizados (MELLO-FARIAS & CHAVES, 2008). Eles se baseiam em dois métodos diferentes de transferência de DNA (físico *versus* biológico) e a eficiência de cada sistema varia de acordo com a espécie e o tipo de tecido. O bombardeamento de partículas é o método mais conveniente para a transferência de cópias múltiplas do gene, desde que a mistura de DNA contenha as diferentes construções a serem utilizadas na transformação, sem a necessidade de estratégias complexas de clonagem (ALTPETER *et al.*, 2005). A transformação mediada por *Agrobacterium* normalmente resulta em poucas cópias do gene introduzido e os problemas de expressão gênica são reduzidos (GELVIN, 2003).

Para a obtenção de plantas transgênicas de soja têm sido utilizados os sistemas de transformação baseados em *Agrobacterium tumefaciens* (TZFIRA & CITOVSKY, 2006) e no bombardeamento de partículas

(HINCHEE *et al.*, 1988). As vantagens da transformação mediada por *Agrobacterium* incluem protocolos simples, de baixo custo e inserção de uma ou poucas cópias do gene (HANSEN & WRIGHT, 1999).

A transformação mediada por *Agrobacterium* caracteriza-se pela utilização dessa bactéria para a introdução do DNA no genoma da planta, resultando na obtenção de plantas transformadas. O T-DNA desarmado é inserido em um pequeno plasmídeo, que é introduzido e replicado em *Escherichia coli* e posteriormente, transferido para *Agrobacterium* via transformação (TZFIRA & CITOVSKY, 2006).

Foram obtidas plantas transgênicas de soja pelo método de entrega do T-DNA mediada por *Agrobacterium* utilizando-se nós-cotiledonares (HINCHEE *et al.*, 1988; OLHOFT *et al.*, 2003; XUE *et al.*, 2006), cotilédones imaturos (KO *et al.*, 2003; KO & KORBAN, 2004; KO *et al.*, 2004) e culturas de suspensão embriogênica (TRICK & FINER, 1998). Esse método é dependente de genótipo em termos de susceptibilidade à infecção por *A. tumefaciens* e da capacidade de regeneração da planta (OWENS & CRESS, 1985; HINCHEE *et al.*, 1988; DELZER *et al.*, 1990, FINER & FINER, 2000). Além disso, é importante que se consiga infectar o tecido-alvo da planta (ZHANG *et al.*, 1999).

Para obter resultados satisfatórios com as técnicas de transformação, é de grande importância uma metodologia eficiente para a regeneração *de novo* de plantas como embriogênese somática e organogênese (BARWALE *et al.*, 1986). As duas vias regenerativas mostram que as respostas morfológicas *in vitro* ocorrem de modo genótipo-específico (SANTARÉM & FERREIRA, 1997).

2.3. Tipos de explantes

Diferentes tipos de explantes têm sido utilizados como tecidos-alvo em protocolos de transformação de soja. Dentre eles, destacam-se os embriões somáticos (MELLO-FARIAS & CHAVES, 2008), os nós

cotiledonares, os nós primários e o meristema apical do eixo embrionário (WIDHOLM *et al.*, 2010).

Os nós-cotiledonares provenientes de sementes maduras de soja têm se demonstrado responsivos à indução de brotos via organogênese e estes estão sendo utilizados para a obtenção de soja transgênica (OLHOFT *et al.*, 2001, 2003, 2006, 2007; ZENG *et al.*, 2004; PAZ *et al.*, 2004; XUE *et al.*, 2006; YI *et al.*, 2006).

Nós-cotiledonares também podem ser utilizados para transformação mediada por *Agrobacterium*. Apesar de essa metodologia demonstrar ser uma boa técnica de transformação, podem ocorrer problemas relacionados a quimeras. O conceito básico de transformação é transformar uma célula única, proliferar essa célula e induzir novas células a partir dessa. As quimeras são formadas quando as células não são capazes de se proliferar adequadamente e o meristema consiste de uma mistura de células transformadas e não transformadas (MELLO-FARIAS & CHAVES, 2008).

Os eixos embrionários também estão sendo utilizados como explantes para transformação de soja. Estes parecem ser mais responsivos à infecção por *Agrobacterium*, além de serem obtidos facilmente a partir de sementes maduras embebidas, não sendo necessária a etapa inicial de germinação da semente em cultura de tecidos de plantas (KANAMORI *et al.*, 2011).

2.4. Transformação de plantas visando silenciamento gênico

Os genes das principais enzimas que controlam a biossíntese de ácidos graxos de sementes produtoras de óleo vêm sendo estudados e clonados. Dentre eles os genes das oleoil dessaturases que determinam a proporção relativa de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados (LIU *et al.*, 2002a; WANG & XU, 2008; FLORES *et al.*, 2008; LARDIZABAL, 2008).

O silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) é um mecanismo de degradação de RNA seqüência-específica herdado em eucariotos, utilizado com sucesso para o silenciamento da expressão de genes e

produção de características desejáveis na planta (WESLEY *et al.*, 2004; FELIPPES *et al.*, 2012).

Um exemplo é a utilização do silenciamento para diminuir a expressão de enzimas dessaturases que controlam a síntese dos principais ácidos graxos presentes nos óleos obtidos a partir de sementes sem afetar a expressão em outras partes da planta. Em algodão, por exemplo, a composição de ácidos graxos foi geneticamente modificada por meio do silenciamento dessas enzimas, levando à produção de óleo com baixo teor de ácido palmítico e alto conteúdo de ácidos oléico e esteárico (LIU *et al.*, 2002b). Além disso, Liu *et al.* (2002b) demonstraram que o PTGS do gene FAD2-1 pôde silenciar quase completamente a atividade da ω 6-dessaturase em sementes de algodão, sem prejudicar o desenvolvimento normal da semente ou a germinação e crescimento da planta.

Adicionalmente, a transformação de plantas via silenciamento gênico pode ser utilizada como um mecanismo para estudar a função de um gene. Nesse sentido, Felippes *et al.* (2012) descreveram uma metodologia eficiente de silenciamento gênico induzido por miRNA (MIGS) em estudos com *Arabidopsis thaliana*.

2.5. Identificação e caracterização de genes que codificam proteínas/ enzimas de importância para a soja

Estudos *in silico* para identificar, isolar, caracterizar e analisar funcionalmente diferentes genes em soja vem sendo realizados desde que o genoma dessa leguminosa foi divulgado (<http://www.phytozome.net/soybean>) (SCHMUTZ *et al.*, 2010).

Por meio de análises *in silico* podem ser obtidos resultados bastante esclarecedores a respeito de um gene e de sua expressão. Além disso, os estudos *in silico* podem ser ainda ferramentas adicionais para isolamento de genes para posterior análise. Por exemplo, Huang *et al.* (2006) ao relatar o primeiro estudo sobre uma proteína dedo de zinco em soja, fizeram o

isolamento *in silico* do mRNA para posterior análise da expressão dessa proteína nos diferentes tecidos por meio de ensaios de RT-PCR.

Mochida *et al.* (2009) realizaram análises *in silico* de fatores transcricionais e fizeram a predição daqueles de resposta a estresse em soja. Os autores identificaram os fatores transcricionais e criaram um banco de dados que denominaram SoybeanTFDB (<http://soybeantfdb.psc.riken.jp>), que contém uma compilação de fatores transcricionais da soja e informações como motivos funcionais, cDNAs, alinhamento de domínios, regiões promotoras, organização do genoma e funções regulatórias com base em anotações de ontologia de genes.

Barros *et al.* (2012) analisaram a expressão da família multigênica que codifica inibidores do tipo Bowman-Birk (BBI) em soja. Foram detectados 11 potenciais genes que codificam BBI no genoma da soja, identificados os domínios conservados e analisados os *cis*-elementos do promotor.

Em estudo semelhante, Soares (2011) analisou a expressão de genes envolvidos na biossíntese de oligossacarídeos de rafinose em soja. Foi possível detectar 10 potenciais genes que codificam para sintases de oligossacarídeos de rafinose. Também foram realizadas análises de localização celular de tais enzimas, análises dos *cis*-elementos e de expressão dos genes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar *in silico* os genes que codificam as enzimas 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase envolvidas na biossíntese de lipídeos em soja e avaliar a utilização de eixos embrionários e nós-cotiledonares de soja como explantes em protocolos de cultura de tecidos para a transformação genética via RNA de interferência.

3.2. Objetivos Específicos

- Realizar *in silico* a identificação, caracterização e análise da expressão dos genes que codificam as enzimas 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, fazer a busca pelos domínios na proteína e determinar a sua provável localização subcelular.
- Utilizar eixos embrionários e nós-cotiledonares de soja das variedades CAC-1 e CD-201 como explantes em protocolos de cultura de tecidos para transformação genética, via RNA de interferência, utilizando *Agrobacterium tumefaciens* KYRT1 contendo a construção dirigida tanto pelo promotor CaMV35S quanto pelo promotor do gene da subunidade α da β -conglucina (promotor semente-específico).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADI, A.; DOMERG, F.; BAUER, J.; NAPIER, J. A.; WELTI, R.; ZÄHRINGER, U.; CIRPUS, P.; HEINZ, E. Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: constraints on their accumulation. **The Plant Cell**, 16: 2734-2748, 2004.

ALTPETER, F.; BAISAKH, N.; BEACHY, R.; BOCK, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; DANIELL, H.; DATTA, K.; DATTA, S.; DIX, P. J.; FAUQUET, C.; HUANG, N.; KOHLI, A.; MOOIBROEK, H.; NICHOLSON, L.; NGUYEN, T. T.; NUGENT, G.; RAEMAKERS, K.; ROMANO, A.; SOMERS, D. A.; STOGER, E.; TAYLOR, N.; VISSER, R. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. **Molecular Breeding**, 15: 305-327, 2005.

BARROS, B. A.; SILVA, W. G.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. *In silico* characterization and expression analysis of the multigene family encoding the Bowman–Birk protease inhibitor in soybean. **Molecular Biology Reports**, 39:327-334, 2012.

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.

BECHTOLD, N.; ELLIS, J.; PELLETIER, G. In plant *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. **Comptes Rendus Academy of Science of Paris, Life Sciences**, 316: 1194-1199, 1993.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 1ª edição, 1367p. Courier Companies, United States of America, 2000.

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

termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean. **The Plant Journal**, 30: 155-163, 2002.

CHI, X.; YANG, Q.; LU, Y.; WANG, J.; ZHANG, Q.; PAN, L.; CHEN, M.; HE, Y.; YU, S. Genome-wide analysis of fatty acid desaturases in soybean (*Glycine max*). **Plant Molecular Biology Reports**, 2011.

CHRISTOU, P.; FORD, T.L.; KOFRON, M. Rice genetic engineering: a review. **Trends in Biotechnology**, 10: 239-246, 1992.

CLARKE, E. J.; WISEMAN, J. Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans I. Protein and amino acid content. **Journal of Agricultural Science**, 134:111-124, 2000.

CLEMENTE, T. E.; CAHOON, E. B. Soybean oil: genetic approaches for modification of functionality and total content. **Plant Physiology**, 151:1030–1040, 2009.

CROSSWAY, A.; OAKES, J. V.; IRVINE, J. M.; WARD, B.; KNAUF, V. C.; SHEWMAKER, C. K. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. **Molecular & General Genetics**, 202: 179–185, 1986.

DATTA, S. K.; PETERHANS, A.; DATTA, K.; POTRYKUS, I. Genetically engineered fertile Indica-rice plants recovered from protoplasts. **Bio/Technology**, 8: 736-740, 1990.

DELZER, B.W.; SOMERS, D.A.; ORF, J.H. *Agrobacterium tumefaciens* susceptibility and plant regeneration of 10 soybean genotypes in maturity groups 00 to II. **Crop Science**, 30: 320-322, 1990.

FELIPPES, F. F.; WANG, J.; WEIGEL, D. MIGS: miRNA-induced gene silencing. **The Plant Journal**, 70:541–547, 2012.

FINER, K. R.; FINER, J. J. Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation-treated soybean cotyledons. **Letters in Applied Microbiology**, 30: 406-410, 2000.

FLORES, T.; KARPOVA, O. SU, X.; ZENG, P. BILYEU, K.; SLEPER, D. A.; NGUYEN, H. T. ZHANG, Z. J. Silencing of GmFAD3 gene by siRNA leads to low α -linolenic acids (18:3) of fad3-mutant phenotype in soybean [*Glycine max* (Merr.)]. **Transgenic Research**, 2008.

FROMM, M. E.; TAYLOR, L. P.; WALBOT, V. Stable transformation of maize after gene-transfer by electroporation. **Nature**, 319: 791-793, 1986.

FROMM, M.; TAYLOR, L. P.; WALBOT, V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by eletroporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 82: 5824-5828, 1985.

FUKURAWA-STOFFER, T. L.; BOYLE, R. M.; THOMSON, A.L.; SARNA, M. A.; WESELAKE, R. J. Properties of lysiphsphatidylcholine acyltransferase from *Brassica napus* cultures. **Lipids**, 38: 651-656, 2003.

GELVIN, S.B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 1: 16-37, 2003.

HANSEN, G.; WRIGHT, M. Recent advances in the transformation of plants. **Trends in Plant Science**, 4: 226-231, 1999.

HAZEL, J. R. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? **Annual Review of Physiology**, 57: 19–42, 1995.

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

HERMAN, E. M. H.; HELM, R. M.; JUNG, R.; KINNEY, A. J. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. **Plant Physiology**, 132:36–43, 2003.

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 DNA transfer. **Bio/Technology**, 6: 915-922, 1988.

HUANG, F.; CHI, Y.; MENG, Q.; GAI, J.; YU, D. GmZFP1 encoding a single zinc finger protein is expressed with enhancement in reproductive organs and late seed development in soybean (*Glycine max*). **Molecular Biology Reports**, 33:279–285, 2006.

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

KINNEY, A. J., CAHOON, E. B., HITZ, W. D. Manipulating desaturase activities in transgenic crop plants. **Crop Genetics Research and Development**, Dupont Experimental Station, Wilmington, USA, pág 1099, 2002.

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

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

KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; SANFORD, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, 327: 70-73, 1987.

KO, T.; KORBAN, S. S. Enhancing the frequency of somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons of

soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.]. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, 40:552-558, 2004.

KO, T.; NELSON, R. L.; KORBAL, S. S. Screening multiple soybean cultivars (MG00 to MG VIII) for somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons. **Crop Science**, 44:1825-1831, 2004.

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

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

LARDIZABAL, K.; EFFERTZ, R.; LEVERING, C.; MAI, J.; PEDROSO, M. C.; TOM JURY, T.; AASEN, E.; GRUYS, K.; BENNETT , K. Expression of *Umbelopsis ramanniana* DGAT2A in seed increases oil in soybean. **Plant Physiology**, 148:89–96, 2008.

LI, R.; YU, K.; HILDEBRAND, D. F. DGAT1, DGAT2 and PDAT expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. **Lipids**, 45:145–157, 2010.

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

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

LIU, Q.; SINGH, P. S.; GREEN, A. G. High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. **Plant Physiology**, 29: 1732-1743, 2002b.

LIU, Q.; SINGH, S.; GREEN, A. Genetic modification of cotton seed oil using inverted-repeat gene-silencing techniques. **Biotechnological Aspects: Methods**, 297-299, 2000.

LIVINGSTONE, D.; VADIM BEILINSON, V.; KALYAEVA, M.; SCHMIDT, M. A.; HERMAN, E. M.; NIELSEN, N. C. Reduction of protease inhibitor activity by expression of a mutant Bowman-Birk gene in soybean seed. **Plant Molecular Biology**, 64:397–408, 2007.

MARTINS, P. K. **Transformação genética em nós cotiledonares de soja visando à co-supressão do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase.** Viçosa: UFV, 82p. Tese (Doutorado Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

MELLO-FARIAS, P. C.; CHAVES, A. L. S. Advances in *Agrobacterium*-mediated plant transformation with emphasis on soybean. **Scientia Agricola**, 65(1):95-106, 2008.

MOCHIDA, K.; YOSHIDA, T.; SAKURAI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K.; TRAN, L.P. *In silico* analysis of transcription factor repertoire and prediction of stress responsive transcription factors in soybean. **DNA Research**, 16: 353–369, 2009.

MOREIRA, M. A. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Soja.** Embrapa - Soja, Londrina-Paraná, 99-104, 17 a 20 de maio de 1999.

MURATA, N.; WADA, H. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. **Biochemical Journal**, 308: 1–8, 1995.

NEGRUTIU, I.; SHILLITO, R. D.; POTRYKUS, I.; BIASINI, G.; SALA, F. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. I. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. **Plant Molecular Biology**, 8: 363-373, 1987.

NUNES, A. C.; VIANNA, G. R.; CUNEO, F.; MAYA-FARFAN, J., CAPDEVILLE, G.; RECH, E.; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (GmMIPS1) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. **Planta**, 224: 125-132, 2006.

OLHOFT, P. M.; BERNAL, L. M.; GRIST, L. B.; HILL, S.; MANKIN, L.; SHEN, Y.; KALOGERAKIS, M.; WILEY, H.; TOREN, E.; SONG, H.S.; HILLEBRAND, H.; JONES, T. A novel *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation method of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using primary-node explants from seedlings. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 43: 536-549, 2007.

OLHOFT, P. M.; DONOVAN, C. M.; SOMERS, D. A. Soybean (*Glycine max*) Transformation using mature cotyledonary node explants. **Methods in Molecular Biology**, 343, 2006.

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

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

OWENS, L.D.; CRESS, D.E. Genotypic variability of soybean response to *Agrobacterium* strains harboring the Ti or Ri plasmids. **Plant Physiology**, 77: 87-94, 1985.

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

RAY, J. D.; CARR, B. T. Empirical modeling of soybean oil hydrogenation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 62: 1218-1222, 1985.

SANFORD, J. C. The biolistic process. **Trends in Biotechnology**, 6: 299-302, 1988.

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

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

SCHMUTZ, J.; CANNON, S.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, W. NELSON, T.; HYTEN, D.; SONG, Q.; THELEN, J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYYA, M.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X.; SHINOZAKI, S.; NGUYEN, H.; WING, R.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R.; JACKSON, S. Genome sequence of the palaeopolyploid Soybean. **Nature**, 463:178-83, 2010.

SHI, J.; WANG, H.; SCHELLIN, K.; LI, B.; FALLER, M.; STOOP, J. M.; MEELEY, R. B.; ERTL, D. S.; RANCH, J. P.; GLASSMAN, K. Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. **Nature Biotechnology**, 25(8): 930-937, 2007.

SHILLITO, R. D.; SAUL, M. W.; PASZKOWSKI, J.; MULLER, M.; POTRYKUS I. High efficiency direct gene transfer to plants. **Bio/Technology**, 3: 1099-1103, 1985.

SOARES, A. P. G. **Caracterização *in silico* de genes envolvidos na biossíntese de oligossacarídeos de rafinose em soja e construção de cassetes de silenciamento do gene da estaquiose sintase, via interferência por RNA.** Viçosa: UFV, 123p. Tese (Doutorado Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011).

STOUTJESDIJK, P. A., SINGH, P. S.; LIU, Q.; HURLSTONE, C. J.; WATERHOUSE, P. A.; GREEN, A. G. hpRNA-Mediated Targeting of the Arabidopsis *FAD2* Gene gives highly efficient and stable silencing. **Plant Physiology**, 129: 1723–1731, 2002.

TANG, G.; GALILI, G.; ZHUANG, X. RNAi and microRNA: breakthrough technologies for the improvement of plant nutritional value and metabolomic engineering. **Metabolomics**, 3: 357-369, 2007.

TANG, G.; GALILI, G. Using RNAi to improve plant nutritional value: from mechanism to application. **Trends in Biotechnology**, 22: 09, 2004.

TAVVA, V. S.; KIM, Y.; KAGAN, I. A.; DINKINS, R. D.; KIM, K.; COLLINS, G. B. Increased α -tocopherol content in soybean seed overexpressing the *Perilla frutescens* γ -tocopherol methyltransferase gene. **Plant Cell Reports**, 26:61–70, 2007.

TAIZ, L; ZEIGER, L. **Fisiologia Vegetal**. 3^a edição, 719p. Porto Alegre: Artmed, 2004.

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

TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, 17:147-154, 2006.

VENDRUSCOLO, E. C. G., Silenciamento Gênico e Transgênicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 31: julho/dezembro, 2003.

VOGEL, C.; BROWSE, J. Cholinephosphotransferase and diacylglycerol acyl transferase - substrate specificities at a key branch point in seed lipid metabolism. **Plant Physiology**, 110: 923-931, 1996.

WALLIS, J. G.; BROWSE, J. Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. **Progress in Lipid Research**, 41: 254-278, 2002.

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

WARNER, K.; NEFF, W. E.; BYRDWELL, W. C.; GARDNER, H. W. Effect of oleic and linoleic acids on the production of deep-fried odor in heated triolein and triolinolein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 899-905, 2001.

WESLEY, S. V.; HELLIWELL, C.; WANG, M.; WATERHOUSE, P. Posttranscriptional gene silencing in plants. **Methods in Molecular Biology**, 265: 117-129, 2004.

WIDHOLM, J. M.; FINER, J. J.; VODKIN, L. O.; TRICK, H. N.; LAFAYETTE, P.; LI, J.; PARROTT, W.: Soybean. - In: KEMPEN, F.; JUNG, C. (ed.): Genetic Modification of Plants. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, 64: 473-498 - Springer- Verlag, Berlin, 2010.

WU, G.; TRUKSA, M.; DATLA, N.; VRINTEN, P.; BAUER, J.; ZANK, T.; CIRPUS, P.; HEINZ, E.; QIU, X. Stepwise engineering to produce high yields

of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants. **Nature Biotechnology**, 23: 1013-1017, 2005.

XUE R.; XIE, H.; ZHANG, B.: A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells. **Biotechnology Letters**, 28: 1551-1557, 2006.

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

YANG, M.; XU, Y. Oleate accumulation, induced by silencing of microsomal omega-6 desaturase, declines with leaf expansion in transgenic tobacco. **Journal of Plant Physiology**, 164: 23-30, 2007.

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

YI, X., YU, D. Transformation of multiple soybean cultivars by infecting cotyledonary-node with *Agrobacterium tumefaciens*. **African Journal of Biotechnology**, 5: 1989-1993, 2006.

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

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

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DOS GENES QUE CODIFICAM AS ENZIMAS 1,2-DIACILGLICEROL COLINAFOSFOTRANSFERASE E LISOFOSTADILCOLINA ACILTRANSFERASE ENVOLVIDAS NA BIOSÍNTESE DE LIPÍDEOS EM SOJA

RESUMO

As enzimas 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase (CPT) e a lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT) são pontos-chaves no metabolismo de lipídeos em sementes de soja. Desta forma, o conhecimento dos genes que codificam essas enzimas pode permitir a identificação de suas características e sua modificação, do ponto de vista do melhoramento genético, de acordo com interesses na melhoria da qualidade do óleo de soja. Esses genes ainda não foram completamente descritos em soja. O objetivo do presente trabalho foi identificar, caracterizar e analisar a expressão *in silico* desses genes em soja. Foram identificados dois genes que codificam a CPT e dois genes que codificam a LPCAT, sendo que um deles apresentou um transcrito alternativo. As sequências foram posicionadas no mapa físico da soja e suas regiões promotoras foram analisadas em busca de *cis*-elementos regulatórios. Foram identificados elementos responsáveis pela expressão semente-específica e também de resposta a estresses biótico e abiótico. A análise de expressão corroborou os resultados obtidos com o estudo dos *cis*-elementos, uma vez que mostrou que os genes são expressos em diferentes condições de estresse, além de serem expressos em embriões somáticos em diferenciação, em sementes imaturas, em tecidos de raiz e em calos. A análise das sequências aminoacídicas revelou a presença de domínios transmembrana e a busca da

localização celular indicou que as enzimas estudadas estão localizadas no retículo endoplasmático.

Palavras-chave: 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase, lisofosfatidilcolina aciltransferase e caracterização *in silico*.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as enzimas envolvidas na biossíntese de lipídeos em sementes de soja, duas delas podem ser destacadas, a 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase (CPT) e a lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT), importantes na biossíntese dos triacilgliceróis (TAGs).

A busca no genoma da soja pelos genes que governam os passos metabólicos na biossíntese de triacilgliceróis é importante para os esforços que visam a modificação do conteúdo do óleo na semente. Com a finalização do sequenciamento e divulgação do genoma da soja (<http://www.phytozome.net/soybean>), os processos de identificação, isolamento e análise funcional desses genes foram acelerados (SCHMUTZ *et al.*, 2010).

A enzima 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase (CPT; EC 2.7.8.2) é uma das enzimas-chaves no metabolismo de óleo nas sementes de soja porque catalisa tanto a síntese de fosfatidilcolina a partir de diacilglicerol quanto a reação inversa, que é uma rota por meio da qual os ácidos graxos polinsaturados são disponibilizados para a incorporação nos triacilgliceróis (VOGEL & BROWSE, 1996).

Outra enzima importante no metabolismo de lipídeos em sementes de soja é a lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT; EC 2.3.1.23) que tem a função de repor o estoque de ácidos graxos polinsaturados do *pool* de acil-CoA no citoplasma. Ela catalisa a acilação da lisofosfatidilcolina (LPC) dependente de acil-CoA para produzir fosfatidilcolina e CoA. A atividade de LPCAT afeta a incorporação de ácidos graxos na posição sn-2 da fosfatidilcolina onde os ácidos graxos polinsaturados são formados e indiretamente influencia a composição de TAGs da semente (FURUKAWA-STOFFER *et al.*, 2000).

A síntese dos TAGs nas sementes tem despertado grande interesse (LI *et al.*, 2010) e a ação da CPT e da LPCAT são extremamente importantes para a biossíntese dos TAGs.

Nas sementes, a biossíntese de TAGs ocorre na membrana do retículo endoplasmático. Estes se acumulam em corpos lipídicos, os quais são gerados por meio de brotamentos da membrana externa no retículo endoplasmático (LI *et al.*, 2010).

Na biossíntese dos TAGs em sementes oleaginosas em desenvolvimento grupamentos acil são inseridos sequencialmente nas posições 1 e 2 do glicerol-3-fosfato, em uma reação catalisada pela enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase, produzindo ácido fosfatídico. Este é convertido a diacilglicerol (DAG) pela enzima ácido fosfatídico fosfatase. Os DAGs representam o ponto de ramificação para a biossíntese de lipídeos de membrana ou de reserva. Para formar os lipídeos de membrana a enzima CPT converte, de forma reversível, os DAGs em fosfatidilcolina. Esta, por sua vez, atua como substrato para a biossíntese de ácido-graxos polinsaturados, que podem retornar para o *pool* de acil-CoA citoplasmático pela ação da LPCAT. O DAG pode, ainda, ser convertido em TAG por meio de uma acilação na posição 3 da molécula do glicerol, em uma reação catalisada pela diacilglicerol aciltransferase (DAGAT; EC 2.3.1.20) (LI *et al.*, 2010).

A troca de grupamentos acil entre acil-CoA e fosfatidilcolina é um mecanismo de grande importância na regulação da qualidade de ácidos graxos polinsaturados no *pool* de acil-CoA para a síntese de óleo nas sementes em desenvolvimento (LANNA, 2002).

Existe pouca informação na literatura a respeito de como a CPT e a LPCAT contribuem para o acúmulo de TAGs em sementes oleaginosas e como os genes que codificam para tais enzimas são regulados nas sementes em desenvolvimento, o que justifica o estudo *in silico* na busca da caracterização desses genes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Identificação e caracterização *in silico*

A identificação dos genes que codificam as enzimas 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase (CPT) e lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT) foi feita utilizando o algoritmo *blastn* (ALTSCHUL *et al.*, 1999), sob um ponto de corte de E-value = $1e^{-100}$, contra o genoma da soja (Glyma 1.01) (<http://www.phytozome.net>). Para a enzima CPT foi utilizada uma sequência depositada no Genbank (Acesso Nº U12735.1) e para a enzima LPCAT foi utilizado um *contig* formado por EST's (*Expressed Sequence Tags*) de soja, montado por Lima (2005), pois a sequência da LPCAT ainda não está disponível na literatura.

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

A expressão dos genes que codificam ambas as enzimas foi avaliada *in silico*. Para isso, a sequência predita do transcrito de cada um deles foi utilizada para a busca, por meio de *blastn*, no banco de ESTs de soja do NCBI, constituído de 394.070 sequências. O ponto de corte utilizado foi um E-value = $1e^{-100}$. Também foi realizada uma análise de expressão digital a partir de dados de RNA-Seq (<http://www.soybase.org/soyseq>). Essa análise pode ser utilizada para verificação de expressão tecido-específica e também permite uma abordagem quantitativa dos níveis de mRNA de cada gene analisado. Cada *read* (aproximadamente 36 pb) mapeado em determinado gene representa uma molécula de mRNA presente nas condições analisadas (SEVERIN *et al.*, 2010).

As sequências peptídicas foram alinhadas utilizando o software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>).

Os domínios conservados nas sequências protéicas correspondentes aos genes de interesse foram identificados com InterProScan e InterPro DB

(www.ebi.ac.uk/interpro). A predição de hélices transmembrana foi realizada com TMHMM Server, 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)

A busca por peptídeo sinal foi feita utilizando o software SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e a provável localização sub-celular foi determinada por meio dos softwares de predição PREDOTAR (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>), TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) e WoLF PSORT (<http://wolfpsort.org/>).

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação *in silico* e análise das sequências nucleotídicas e peptídicas

Para identificar os genes que codificam as enzimas CPT e LPCAT as sequências nucleotídicas foram analisadas por meio de *blastn* contra o genoma predito da soja (Glyma 1.01). A análise revelou a existência de 2 genes que potencialmente codificam CPT: Glyma12g08720 e Glyma02g14210 e que apresentam 97% de identidade entre si. Para LPCAT também foram observados 2 genes: Glyma17g36670 e Glyma14g08400 que apresentam 96% de identidade entre si. Além disso, Glyma14g08400 apresentou um transcrito alternativo que difere do transcrito primário somente na região 5'UTR (Glyma14g08400.1 e Glyma14g08400.2).

Foi realizado o alinhamento das sequências peptídicas correspondentes a ambas as enzimas. Para a CPT, o alinhamento apresentou 86% de identidade entre Glyma12g08720 e Glyma02g14210 (Figura 1). Para a LPCAT, o alinhamento de proteínas apresentou 95% de identidade tanto entre Glyma17g36670 e Glyma14g08400.1 quanto entre Glyma17g36670 e Glyma14g08400.2. Considerando-se Glyma14g08400.1 e Glyma14g08400.2, a identidade foi de 100%, conforme o esperado (Figura 2).

```

Glyma12g08720      MGYIGTHGVAALHRYKYSQVSDHSYVAKYVLQPFWSRFVNFPLWMPSEYTNLYLFLLFIL 60
Glyma02g14210     MGYIGAHGVAALHRYKYSQVSDHSYVAKYVLQPFWSRFVNFPLWMP----- 46
*****:*****

Glyma12g08720      ISWHSSNLCSPNMITLMGFMFLLSALLGYIYSPQLDTAPPRVWFHAGLLFLYQTFDA 120
Glyma02g14210     -----PNMITLMGFMFLLSALLGYIYSPQLDTAPPRVWFHAGLLFLYQTFDA 96
*****:*****

Glyma12g08720      VDGKQARRINSSSPLGELFDHGCDALACTFEALAFGSTAMCGRTTFWWNLISAITFYGAT 180
Glyma02g14210     VDGKQARRINSSSPLGELFDHGCDALACTFEALAFGSTAMCGRNTFWWWNLISAITFYGAT 156
*****:*****

Glyma12g08720      WEHYFTNTLILPVIINGPTEGLMIYICHFFTAIVGAEWVQQFGKSLPFLNWLPLYLGG-- 238
Glyma02g14210     WEHYFTNTLILPVIINGPTEGLMIYICHFFTAIVGAEWVQQFGKSLPFLNWLPLYLAANV 216
*****:

Glyma12g08720      ----IPTFKAILCLM----IAFGVPTPTV-----CNVSNVYKVV 269
Glyma02g14210     KLVDIPNMDLVYCLKRVHPLLYRICSLMSGMTIFFSQIFCCVLQYVLYFNVCVSNVYKVV 276
**.: : ** : : . : : *****

Glyma12g08720      KGKNGSMPLALAMLYPFVVLVGGVLVWDYLSPSDIMGKYPHLVVIIGTGLTFGYLVGRMIL 329
Glyma02g14210     KAKNGSMPLALAMLYPFVVLVGGVLVWDYLSPLDIMGRYPHLVVIIGTGLTFGYLVGRMIL 336
* . *****

Glyma12g08720      AHLCDPEKGLKTGCMCSLMFLPLAIANVLASRLNDGVPLVDERLVLLGYCAFSVTLYLHF 389
Glyma02g14210     AHLCDPEKGLKTGCMCSLMFLPLAIANVLASRLNDGVPLVDERLVLLGYCAFSVTLYLHF 396
*****

Glyma12g08720      ATSVIHEITNALGIYCFRITRKEA 413
Glyma02g14210     ATSVIHEITNALGIYCFRITRKEA 420
*****

```

Figura 1: Alinhamento de seqüências preditas da enzima 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase (Glyma02g14210 e Glyma12g08720) codificadas no genoma da soja.

```

Glyma14g08400.1 MEVCEPVKSENRLKHRPLTPFRLLRGLICLVVFLSTALMCLVYFVPVAVVGLRLLFSVRCS 60
Glyma14g08400.2 MEVCEPVKSENRLKHRPLTPFRLLRGLICLVVFLSTALMCLVYFVPVAVVGLRLLFSVRCS 60
Glyma17g36670 MEVCEPVKSENRLKHRPLTPIRFLRGLIGLVVFLSTALMCLVYFVPVAVVGLRLLFSIRCS 60
*****:*:*****

Glyma14g08400.1 RKTVSFIFGLWLSLWPSLFEKINKTKVVFSGDSVPMKERVLLIANHRTEVDWMYLWDLAL 120
Glyma14g08400.2 RKTVSFIFGLWLSLWPSLFEKINKTKVVFSGDSVPMKERVLLIANHRTEVDWMYLWDLAL 120
Glyma17g36670 RKTVSFIFGLWLSLWPSLFEKINKTKVVFSGDGVPMKERVLLIANHRTEVDWMYLWDLAL 120
*****

Glyma14g08400.1 RKGRIGCIKYILKSSLMKLPFIFGWGFHILEFIAVERKWEIDEQILQQKLSLTKDPQDPLW 180
Glyma14g08400.2 RKGRIGCIKYILKSSLMKLPFIFGWGFHILEFIAVERKWEIDEQILQQKLSLTKDPQDPLW 180
Glyma17g36670 RKGRIGCIKYILKSSLMKLPFIFGWGFHILEFIAVERKWEIDEQILQQKLSLTKDPQDPLW 180
*****

Glyma14g08400.1 LALFPEGTDYTDQKSKTSKKFAAEAGLPVLTINVLLPKTKGFHACLEALRGS�DAVYDVTI 240
Glyma14g08400.2 LALFPEGTDYTDQKSKTSKKFAAEAGLPVLTINVLLPKTKGFHACLEALRGS�DAVYDVTI 240
Glyma17g36670 LALFPEGTDYTDQKSKNSQKFAAEAGLPVLTINVLLPKTKGFHACLEALRASLDAGYDVTI 240
*****

Glyma14g08400.1 AYKNQCPSFLDNVFGVDPSEVHLHVRRIPVVEIPASETKAASWLIDTFQIKDQLLSDFKI 300
Glyma14g08400.2 AYKNQCPSFLDNVFGVDPSEVHLHVRRIPVVEIPASETKAASWLIDTFQIKDQLLSDFKI 300
Glyma17g36670 AYKNQCPSFLDNVFGVDPPEVHLHVRRIPVVEIPASETKAASWLIDTFQIKDQLLSDFKI 300
*****

Glyma14g08400.1 QGHFPNQLNENEISRFKSLLSFMVIVSFTAMFIYFTFFSVIWFKLYVGLSCAYLTLATRF 360
Glyma14g08400.2 QGHFPNQLNENEISRFKSLLSFMVIVSFTAMFIYFTFFSVIWFKLYVGLSCAYLTLATRF 360
Glyma17g36670 QGHFPNQLNENEISTFKSLVSMVIVSFTAMFTYFTFFSVIWFKLYVGLSCAYLSLATRF 360
*****

Glyma14g08400.1 NFQLMPLSSYVHALHNSKNQKSE 383
Glyma14g08400.2 NFQLMPLSSYVHALHNSKNQKSE 383
Glyma17g36670 NFQLMPLIYYVHALHNSKNQKSE 383
*****

```

Figura 2: Alinhamento de sequências previstas da enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase (Glyma14g08400 e Glyma17g36670) codificadas no genoma da soja.

Os genes identificados foram posicionados utilizando o mapa baseado na sequência consenso do genoma da soja, disponibilizado pelo USDA no banco de dados SoyBase. Cada um deles foi mapeado em um cromossomo: (1) no cromossomo 2 (GL D1b): Glyma02g14210 – flanqueado pelos microssatélites Satt 634 (55,6 cM) e Sat_034 (61,4 cM); (2) no cromossomo 12 (GL H): Glyma12g08720 – posicionado entre os microssatélites Satt 442 (43,4 cM) e Sat_034 (55,7 cM); (3) no cromossomo 14 (GL B2): Glyma14g08400 – flanqueado pelos marcadores microssatélites Sat_086 (104,8 cM) e Satt 386 (110,4 cM); (4) no cromossomo 17 (GL D2): Glyma17g36670 – posicionado entre os microssatélites Sat_086 (104,8 cM) e Satt 386 (110,4 cM). O cromossomo, o GL, a posição, o sentido da transcrição e os marcadores microssatélites que flanqueiam cada gene estão ilustrados na Figura 3.

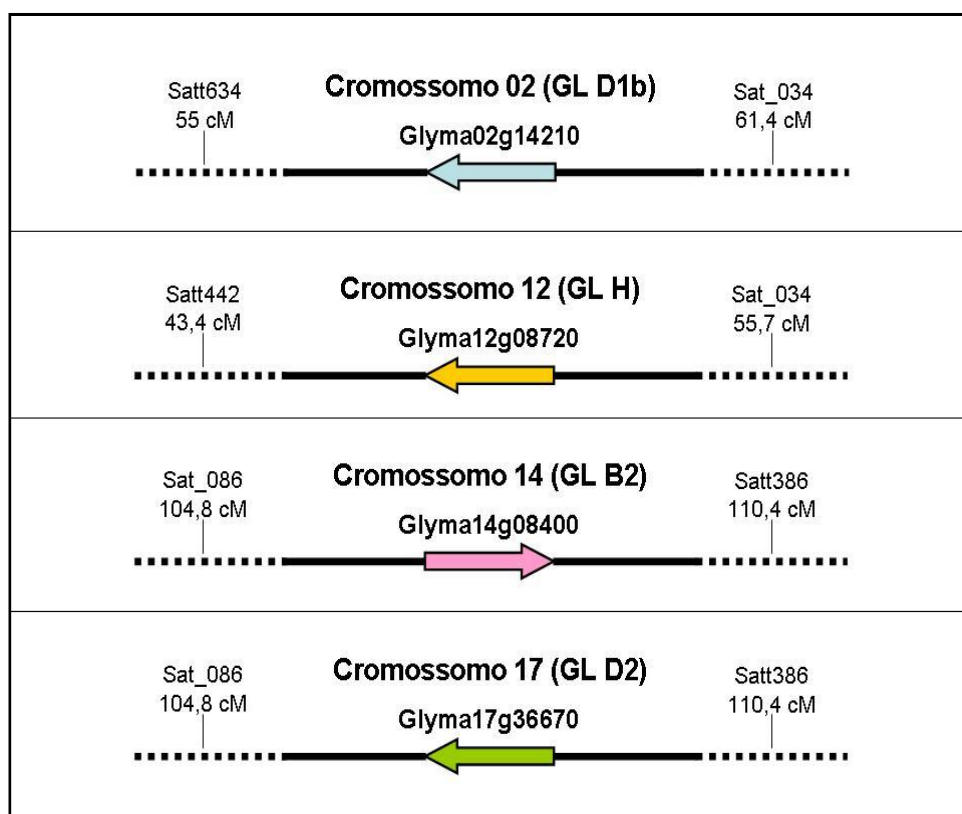


Figura 3: Posicionamento dos genes que codificam as enzimas 1,2-diacilglicerol colinafosotransferase (Glyma02g14210 e Glyma12g08720) e lisofosfatidilcolina aciltransferase (Glyma14g08400 e Glyma17g36670) no mapa físico da soja.

3.2. Análise da expressão dos genes

Para caracterizar a região promotora dos genes identificados foram obtidos do genoma da soja 1500 pb *upstream* ao provável ponto +1 da tradução e submetidos a extensiva análise *in silico* para avaliar a presença de motivos regulatórios conhecidos.

A região promotora dos genes analisados apresentou elementos responsáveis pela expressão semente-específica, expressão de proteínas de reserva e de resposta a estresses biótico e abiótico. Na Tabela 1 estão listados os *cis*-elementos que foram encontrados na região promotora dos quatro genes que codificam para as duas enzimas estudadas.

Tabela 1: *Cis*-elementos comuns encontrados nas regiões promotoras dos genes que codificam 1,2 diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase em soja. 1) Glyma12g08720; 2) Glyma02g14210; 3) Glyma17g36670; 4) Glyma14g08400.1; 5) Glyma14g08400.2.

PLACE ID e Motivo	Posição	Número de vezes	Descrição
ACGTATERD1 (ACGT)	1) 74; 779; 1007	3	Sequência requerida para resposta a estresse hídrico.
	2) 1229; 1285	2	
	3) 1352	1	
	4) 105; 156	2	
	5) 225; 1281; 1410	3	
CAAT BOX1 (CAAT)	1) 126; 136; 245; 335; 687; 750; 785; 896; 1204; 1259; 1435	11	Atividade semente específica.
	2) 41; 219; 228; 267; 304; 408; 474; 597; 701; 705; 957; 1004	12	
	3) 80; 118; 153; 171; 324; 369; 663; 736; 786; 835; 852; 941; 1338; 1438	14	
	4) 174; 255; 400; 605; 1031; 1046; 1109; 1156; 1207; 1217; 1377; 1482	12	
	5) 533; 553; 837; 1116; 1216; 1223; 1406; 1417; 1941; 1618	10	
DOFCOREZM (AAAG)	1) 94; 188; 891	3	Sítio de ligação de fatores de transcrição DOF induzidos por ácido salicílico.
	2) 4; 205; 718; 829; 880; 993; 1076; 1250; 1308; 1363; 1522	11	
	3) 234; 534; 575; 597; 609; 902; 982; 1410; 1487; 1550, 1586	11	
	4) 304; 357; 393; 1052; 1105; 1143; 1512	7	
	5) 282; 521; 667; 746; 1062; 1105; 1296; 1319, 1341; 1395; 1646; 1661; 1668	13	
EBOXBNNAPA (CANNTG)	1) 1; 67; 1414	3	Elemento essencial para a expressão de proteínas de reserva.
	2) 666; 1254; 1265	4	
	3) 80; 258; 443	3	
	4) 277; 521; 731; 911; 1161; 1408	6	
	5) 169	1	

GT1CONSENSUS (GRWAAW)	1) 307; 798; 817; 834; 875; 945	6	Atividade regulada pela luz.
	2) 1028; 1083; 1156	3	
	3) 74; 85; 273; 318; 531; 606; 1382	7	
	4) 572; 682; 771; 779; 835; 1140	6	
	5) 30; 210; 518; 784; 879; 890; 1179; 1292; 1303; 1664	10	
INRNTPSADB (YTCANTTY)	1) 1573; 920; 980; 1465; 1470	5	Atividade regulada pela luz.
	2) 1569	1	
	3) 367; 828; 1436	3	
	4) 253; 398; 1336	3	
	5) 1431; 835; 1611	3	
OSE2ROOTNODUL E (CTCTT)	1) 928	1	Sequência encontrada em promotores ativadas em células infectadas de nódulos de raiz.
	2) 53; 186; 905; 1383; 1402; 1550; 1592	7	
	3) 710; 1043	2	
	4) 430	1	
	5) 814; 987; 1035; 1435; 1605	5	
POLASIG1 (AATAA)	1) 381; 385; 412; 418; 580; 627; 688; 1191	8	Sinal de poliadenilação.
	2) 459; 1169	2	
	3) 119; 276; 328; 700; 896	5	
	4) 785; 988; 1047	3	
	5) 242; 274; 412; 724; 751; 755; 1058; 1457	8	
TATA BOX (TATAAAT)	1) 342; 763	2	Elemento posicionalmente importante para a acurácia do início da transcrição.
	2) 736	1	
	3) 290; 341; 403; 549	4	
	4) 410; 453	2	
	5) 270	1	
WRK4710S (TGAC)	1) 133; 149; 743; 782; 1005; 1119	6	Repressor transcricional da via de sinalização das giberelinas
	2) 1298; 1513	2	
	3) 156; 491; 540; 732; 739; 938; 1535	7	
	4) 339	1	
	5) 811; 1350; 1487; 1494	4	

Barros *et al.* (2012) e Soares (2011) também encontraram tais cis-elementos nas regiões promotoras dos genes avaliados em seus respectivos estudos de análise de expressão *in silico* de genes em soja. Barros *et al.* (2012) analisaram a expressão da família multigênica que codifica inibidores do tipo Bowman-Birk em soja e Soares (2011) analisou a expressão de genes envolvidos na biossíntese de oligossacarídeos de rafinose em soja.

Vandepoele *et al.* (2009) relataram a identificação de elementos regulatórios transcricionais em estudos de análise *in silico* de expressão de genes em *Arabidopsis*. Em tal estudo foram identificados elementos responsáveis pela expressão circadiana de genes, elementos de resposta a estresse biótico, expressão de genes envolvidos em processos como fotossíntese ou biossíntese de proteínas. Análises evolutivas sugeriram que esses módulos regulatórios são conservados entre as espécies pertencentes a diferentes famílias de plantas (VANDEPOELE *et al.*, 2009).

De acordo com Upchurch (2008) as plantas respondem aos estresses biótico e abiótico por meio do remodelamento e da fluidez da membrana plasmática. O ajuste da fluidez ocorre através de modificações nos níveis de ácidos graxos insaturados. E, conseqüentemente, mantém o ambiente adequado para as funções das proteínas integrais de membrana bem como da maquinaria fotossintética, durante o estresse.

Esse padrão de expressão diferencial de genes é devido à regulação da transcrição dos mesmos e, por isso, muitos autores realizam estudos na busca de melhor compreensão da expressão dos genes de soja, sob diferentes condições, tais como excesso de água (KOMATSU *et al.*, 2009), infecção por nematóide do cisto da soja (YECKEL *et al.*, 2007), expressão circadiana e florescimento controlado pelo fotoperíodo (QUECINI *et al.*, 2007), dentre outros.

Ainda pode-se verificar que, com relação à resposta a ácido salicílico, existem sítios de ligação para as proteínas DOF (*DNA binding with one finger*) (Tabela 1). De acordo com KANG & SINGH (2000) as proteínas DOF, induzíveis por ácido salicílico, interagem e estimulam a atividade de ligação ao DNA de proteínas bZIP, também respondentes a estresse.

Também na Tabela 1 está descrita a presença de um *cis*-elemento repressor transcricional da via de sinalização das giberelinas. Tal *cis*-elemento possui um sítio de ligação de WRKY que, segundo Eulgem *et al.* (2000), constitui uma família de fatores de transcrição que são únicas em plantas. Membros dessa família têm sua atividade de ligação ao DNA induzida após ataque por patógenos, sinalização de defesa e ferimentos.

Foi realizada uma análise *in silico* para verificar sob que condições e em que tecido da planta os genes que codificam as enzimas CPT e LPCAT são expressos. Para isso, a sequência predita do transcrito de cada um deles foi utilizada para a busca no banco de EST's de soja (*Expressed Sequence Tags*) e para realizar uma análise de RNA-Seq.

Os resultados das análises de EST's e de RNA-Seq estão em concordância com os *cis*-elementos que estão demonstrados na Tabela 1. Os resultados da busca de EST's sugeriram a expressão dos genes de interesse em condições de estresse hídrico, estresse salino, infecção por patógenos, sob a indução de ácido salicílico, em embriões somáticos em diferenciação, em sementes imaturas de soja, em tecidos de raiz e em calos de soja crescidos no escuro.

A análise dos resultados obtidos por meio de RNA-Seq (Tabela 2), demonstra que os genes que codificam as enzimas CPT e LPCAT são expressos em diferentes tecidos e, considerando-se o mesmo tecido, a expressão dos genes demonstrou ser diferente em diferentes estágios de desenvolvimento. Além disso, a expressão do gene Glyma17g36670 apresentou ser específica de folhas jovens, flores, vagem de 1 cm e raiz, ou seja, não é expresso em sementes ou em vagens mais desenvolvidas. O gene Glyma14g08400 foi expresso nos diferentes tecidos da soja, inclusive em sementes, além de ser mais expresso que o gene Glyma17g36670. Com relação aos genes Glyma02g14210 e Glyma12g08720, estes demonstraram ser expressos nos diferentes tecidos da soja, inclusive nas sementes.

O padrão de expressão diferencial pode ser devido a *cis*-elementos presentes no promotor, responsáveis por induzirem a expressão tecido-específica e estão de acordo com os resultados demonstrados na Tabela 1 e

com os resultados obtidos por meio da análise de EST's. Um exemplo de *cis*-elemento responsável pela indução tecido-específica é a região CAAT BOX1 no promotor dos genes que codificam as enzimas CPT e LPCAT, envolvida na atividade semente-específica (Tabela 1).

Tabela 2: Análise de expressão virtual a partir de dados de RNA-Seq dos genes que codificam para as enzimas CPT (Glyma02g14210 e Glyma12g08720) e LPCAT (Glyma14g08400 e Glyma17g36670) em diferentes tecidos da soja. Os números representam quantos mRNAs foram mapeados para os respectivos genes.

	Glyma02g14210	Glyma12g08720	Glyma14g08400	Glyma17g36670
Folha jovem	4	10	7	1
Flor	4	14	29	3
Vagem 1cm	3	11	1	1
Vagem 10DAF	3	8	1	0
Vagem 14DAF	4	6	1	0
Semente 10 DAF	2	5	2	0
Semente 14 DAF	3	6	1	0
Semente 21 DAF	4	6	1	0
Semente 25 DAF	2	4	1	0
Semente 28 DAF	1	2	0	0
Semente 35 DAF	1	5	2	0
Semente 42 DAF	0	2	2	0
Raiz	5	9	8	1
Nódulo	2	4	2	0

(DAF = Dias após o florescimento)

A fim de identificar se o transcrito primário e o transcrito alternativo do gene Glyma14g08400 eram diferentemente expressos, ou seja, para verificar se a diferença entre eles estava associada à expressão sob diferentes condições foi feito um alinhamento com as regiões que diferenciam Glyma14g08400.1 e Glyma14g08400.2 (região 5'UTR). No primeiro deles, a região 5'UTR constituiu-se de 54 nucleotídeos e indicou a expressão gênica sob condições de estresse hídrico, salino, infecção por pseudomonas, em plântulas estioladas e em calos de soja quando crescidos

no escuro, bem como no meristema apical, flores e sementes verdes. No segundo deles, a sequência gênica exibiu uma região 5'UTR composta por 256 nucleotídeos e, além de sugerir a expressão do gene da LPCAT sob as mesmas condições descritas anteriormente, também demonstrou que esse gene é expresso em raízes de soja infectadas por nematóide do cisto. Isso sugere que a expressão dos transcritos alternativos pode estar relacionada a uma resposta à infecção por nematóides. Dessa forma, com uma adaptação ao ataque de tal patógeno.

3.3. Análise das sequências aminoacídicas, identificação de domínios e localização subcelular

Na busca por domínios conservados desta classe de proteínas, as sequências peptídicas preditas de CPT e LPCAT foram utilizadas para a identificação de regiões conservadas. Como os domínios estão intimamente relacionados com a função de uma proteína/enzima é importante identificar e caracterizar essas regiões, a fim de conhecer a enzima e relacionar estrutura com função. Os resultados obtidos estão descritos no texto e visualizados na Tabela 3 e na Figura 4.

Para a CPT as duas sequências de aminoácidos utilizadas nas análises demonstraram basicamente o mesmo resultado: um domínio CDP-álcool fosfatidiltransferase, um domínio colina/etanolamina fosfotransferase e um domínio com peptídeo sinal e regiões transmembrana. A única diferença é que a sequência peptídica obtida a partir de Glyma12g08720 possui 9 regiões transmembrana enquanto que a sequência peptídica obtida a partir de Glyma02g14210 possui 8 regiões transmembrana (Figura 4). O mesmo resultado foi obtido quando foi utilizado um banco de dados para a predição de hélices transmembrana em proteínas. Como os domínios transmembrana estão distribuídos de forma uniforme ao longo de toda extensão da cadeia polipeptídica, foi possível inferir que tal enzima é uma proteína integral de membrana (Figura 4). De acordo com o banco de dados de predição de localização subcelular, a CPT está localizada na membrana do retículo

endoplasmático, confirmando as inferências realizadas. De acordo com Schmutz *et al.* (2010) a CPT de soja está envolvida na síntese de lipídeos na membrana do retículo endoplasmático, o que corrobora o resultado obtido nas análises de localização subcelular realizadas no presente trabalho.

Para a LPCAT, as sequências utilizadas apresentam um domínio fosfolípido/glicerol aciltransferase e um domínio com regiões aciltransferase, peptídeo sinal, regiões transmembrana e uma região sem descrição (Tabela 2). De acordo com o banco de dados para predição de hélices transmembrana em proteínas, a sequência peptídica obtida a partir de Glyma17g36670 possui 3 hélices transmembrana e a sequência peptídica obtida a partir de Glyma14g08400 possui 2 hélices transmembrana. Em ambas as sequências peptídicas, os domínios transmembrana estão localizados mais externamente na sequência, o que indica que elas são proteínas ancoradas na membrana. Além disso, por meio das análises realizadas, foi observado que a proteína com 3 hélices transmembrana está ancorada na membrana e voltada para dentro do retículo endoplasmático e a proteína com 2 hélices está ancorada na membrana e voltada para fora do retículo endoplasmático (Figura 4). Akermoun *et al.* (2000) em estudos para analisar o envolvimento da LPCAT na importação de precursores de lipídeos extraplasmáticos necessários para a síntese de lipídeos verificaram que é uma enzima associada à membrana, pois foi necessário solubilizá-la por meio da adição de detergente para detectarem a atividade da referida enzima na fração de proteínas solubilizadas.

Tabela 3: Domínios identificados nas enzimas 1,2 - diacilglicerol colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, por meio da análise da cadeia de aminoácidos em banco de dados.

Enzima	Domínios
<p>CPT (Glyma12g08720) (Glyma02g14210)</p>	<p>1) CDP-álcool fosfatidil transferase. 2) Colina/ etanolamina fosfotransferase. 3) Peptídeo sinal e regiões transmembrana (9 regiões transmembranas na proteína codificada por Glyma12g08720 e 8 regiões transmembranas na proteína codificada por Glyma02g14210).</p>
<p>LPCAT (Glyma17g36670) (Glyma14g08400)</p>	<p>1) Fosfolípídeo/glicerol aciltransferase. 2) Regiões aciltransferase, peptídeo sinal, regiões transmembrana (3 regiões transmembranas na proteína codificada por Glyma17g36670 e 2 regiões transmembranas na proteína codificada por Glyma14g08400) e uma região sem descrição.</p>

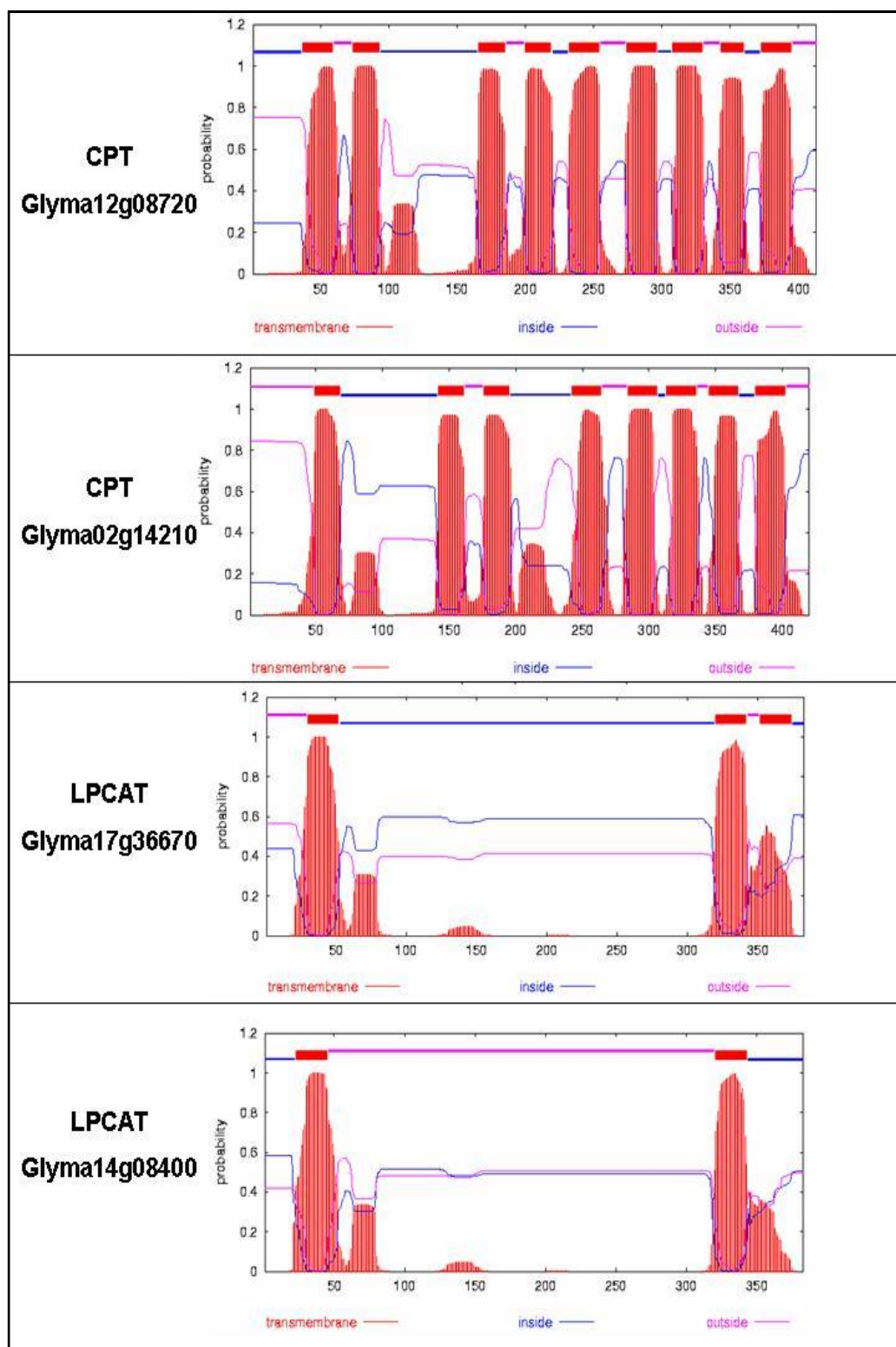


Figura 4: Predição de hélices transmembrana para as enzimas 1,2-diacilglicerol colinafostotransferase (CPT) e lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT). Foi utilizada a sequência peptídica no banco de dados TMHMM.

Os resultados obtidos no presente trabalho com relação às análises *in silico* das regiões promotoras dos genes que codificam as enzimas CPT e LPCAT e da expressão dos genes das mesmas, sugerem que estas enzimas são expressas na soja, em vários tecidos, em diferentes estágios de desenvolvimento, sob diferentes condições de estresses biótico e abiótico, o que indica um papel importante das mesmas no metabolismo de lipídeos na soja. A identificação dos domínios e a localização subcelular das enzimas demonstraram que elas estão diretamente relacionadas com a biossíntese de ácidos graxos e são preponderantes para a síntese de triacilgliceróis, devido à localização na membrana do retículo endoplasmático, local da síntese dos triacilgliceróis, e devido aos domínios de atividade de transferase.

Como esses genes já foram estudados visando à melhoria da qualidade do óleo da soja (LANNA, 2002; LIMA, 2005; MARTINS, 2007 e SOUSA, 2007), era esperado encontrar pelo menos um gene específico de semente. No entanto, isso não foi observado, pois os genes demonstraram ser expressos em diferentes tecidos. Entretanto, é possível utilizar tais genes em manipulações genéticas de interesse, como por exemplo, em silenciamento gênico, desde que promotores específicos de sementes sejam utilizados, para controlar a expressão do transgene.

4. CONCLUSÕES

- Foi possível verificar que o genoma da soja apresenta 2 genes que codificam a enzima 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase (CPT) e 2 *loci* que codificam a enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT).
- As enzimas estudadas, além de serem importantes para a manutenção da estrutura da membrana plasmática e para a composição dos ácidos graxos nas sementes oleaginosas, estão ainda envolvidas na proteção contra estresses biótico e abiótico, visto que foram encontrados na região promotora desses genes, elementos de resposta associados a tais condições.
- Além dos transcritos primários identificados para os genes, um dos genes que codifica a LPCAT apresenta um transcrito alternativo, que é expresso quando a soja é infectada por nematóide de cisto, podendo esta enzima estar relacionada à adaptação contra tal patógeno.
- O posicionamento das enzimas como integrais da membrana do retículo endoplasmático ou ancoradas à mesma, bem como os domínios de atividade de fosfotransferase na CPT e aciltransferase na LPCAT correlacionam as mesmas à biossíntese dos triacilgliceróis.
- Os genes CPT e LPCAT são possíveis alvos para o melhoramento genético da qualidade do óleo da soja, por meio de manipulação genética, desde que sob a regulação de promotores semente-específicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25: 3389-3402, 1997.

BARROS, B. A.; SILVA, W. G.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. *In silico* characterization and expression analysis of the multigene family encoding the Bowman–Birk protease inhibitor in soybean. **Molecular Biology Reports**, 39:327-334, 2012.

EULGEM, T.; RUSHTON, P. J.; ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I. E. The WRKY superfamily of plant transcription. **Trends in Plant Science**, 5: 199-206, 2000.

FUKURAWA-STOFFER, T. L.; BOYLE, R. M.; THOMSON, A.L.; SARNA, M. A.; WESELAKE, R. J. Properties of lysiphsphatidylcholine acyltransferase from *Brassica napus* cultures. **Lipids**, 38: 651-656, 2003.

GRANT, D.; NELSON, R. T.; CANNON, S. B.; SHOEMAKER, R. C. SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. **Nucleic Acids Research**, 38: D843-D846, 2010.

HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. **Nucleic Acids Research**, 27: 297-300, 1999.

KANG, H. G.; SINGH, K. Characterization of salicylic acid responsive, *Arabidopsis* DOF domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. **Plant Journal**, 21:329-339, 2000.

KOMATSU, S.; YAMAMOTO, R.; NANJO, Y.; MIKAMI, Y.; YUNOKAWA, H.; SAKATA, K. A comprehensive analysis of the soybean genes and proteins

expressed under flooding stress using transcriptome and proteome techniques. **Journal of Proteome Research**, 8(10): 4766-4778, 2009.

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

LI, R.; YU, K.; HILDEBRAND, D. F. DGAT1, DGAT2 and PDAT expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. **Lipids**, 45:145–157, 2010.

LIBAULT, M.; FARMER, A.; JOSHI, T.; TAKAHASHI, K.; LANGLEY, R. J.; FRANKLIN, L. D.; HE, J.; XU, D.; MAY, G.; STACEY, G. An integrated transcriptome atlas of the crop model *Glycine max*, and its use in comparative analyses in plants. **Plant Journal**, 63(1):86-99, 2010.

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

MARTINS, P. K. **Transformação genética em nós cotiledonares de soja visando á co-supressão do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase**. Viçosa: UFV, 82p. Tese (Doutorado Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

PESTRIDGE, D.S. SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. **Computer Applications in the Biosciences**, 7: 203-206, 1991.

QUECINI, V.; ZUCCHI, M. I.; BALDIN, J.; VELLO, N. A. Identification of soybean genes involved in circadian clock mechanism and photoperiodic control of flowering time by in silico analyses. **Journal of Integrative Plant Biology**, 49(11): 1640-1653, 2007.

SCHMUTZ, J.; CANNON, S.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, W. NELSON, T.; HYTEN, D.; SONG, Q.; THELEN, J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYYA, M.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X.; SHINOZAKI, S.; NGUYEN, H.; WING, R.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R.; JACKSON, S. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, 463:178-83, 2010.

SEVERIN, A. J.; WOODY, J. L.; BOLON, Y.; JOSEPH, B.; DIERS, B. W.; FARMER, A. D.; MUEHLBAUER, G. J.; NELSON, R. T.; GRANT, D.; SPECHT, J. E.; GRAHAM, M. A.; CANNON, S. B.; MAY, G. D.; VANCE, C.P.; SHOEMAKER, R. C. RNA-Seq atlas of *Glycine max*: A guide to the soybean transcriptome. **BMC Plant Biology**, 10:160, 2010.

SOARES, A. P. G. **Caracterização *in silico* de genes envolvidos na biossíntese de oligossacarídeos de rafinose em soja e construção de cassetes de silenciamento do gene da estaquiose sintase, via interferência por RNA.** Viçosa: UFV, 123p. Tese (Doutorado Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011).

SOUSA, C. S. **Construção de cassetes de expressão para silenciamento de genes da biossíntese de ácidos graxos em soja via RNA de interferência.** Viçosa: UFV, 60p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

STRACKE, R.; WERBER, M.; WEISSHAAR, B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Current Opinion in Plant Biology**, 4:447-456, 2001.

UPCHURCH, R. G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. **Biotechnology Letters**, 30:967-977, 2008.

VANDEPOELE, K.; QUIMBAYA, M.; CASNEUF, T.; DE VEYLDER, L.; VAN DE PEER, Y. Unraveling transcriptional control in *Arabidopsis* using *cis*-regulatory elements and coexpression networks. **Plant Physiology**, 50: 535-546, 2009.

VOGEL, C.; BROWSE, J. Cholinephosphotransferase and diacylglycerol acyl transferase - substrate specificities at a key branch point in seed lipid metabolism. **Plant Physiology**, 110: 923-931, 1996.

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

YECKEL, G.; ITHAL, N.; NETTLETON, D.; RECKNOR, J.; WU, X. R.; NGUYEN, H. T.; MITCHUM, M. G. **Characterization of soybean genes involved in soybean cyst nematode (SCN) resistance**, In: 2007 Undergraduate Research and Creative Achievements Forum (MU) – 163, 2007.

CAPÍTULO 2

UTILIZAÇÃO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS E DE NÓS-COTILEDONARES DE SOJA COMO EXPLANTES EM PROTOCOLOS DE CULTURA DE TECIDOS PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA VIA RNA DE INTERFERÊNCIA

RESUMO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das espécies vegetais de grande interesse comercial e esta pode ter suas características modificadas por meio de ferramentas da Biologia Molecular e da Cultura de Tecidos. Diversas metodologias de transformação genética, regeneração e aclimatação já foram desenvolvidas para diferentes cultivares de soja. Entretanto, essa espécie tem sido considerada recalcitrante quanto à transformação genética e à regeneração *in vitro*, apresentando um número limitado de cultivares que respondem de maneira satisfatória a esses procedimentos. Isso ocorre porque a resposta é genótipo-específica, o que torna necessária a adequação e a otimização das condições para a transformação e regeneração de plantas de soja a partir de diferentes explantes. Das características de qualidade que podem ser modificadas na soja, destaca-se a composição da fração lipídica. Nesse sentido a estratégia é a modificação genética da expressão de enzimas-chave da biossíntese de ácidos graxos polinsaturados, por meio de transformação genética de plantas via silenciamento gênico. Visando a utilização de técnicas de culturas de tecidos para possível obtenção de soja com óleo que apresente maior estabilidade oxidativa para o Programa de Melhoramento Genético da Qualidade do Óleo e Proteína da Soja em desenvolvimento no BIOAGRO/UFV, o presente trabalho teve como objetivo realizar a infecção de eixos embrionários e nós-cotiledonares de soja via *Agrobacterium*

tumefaciens, seguida das etapas de regeneração e aclimação das plantas. As variedades comerciais CAC-1 e CD-201 foram submetidas à infecção via *A. tumefaciens* da linhagem KYRT1. Foram utilizados dois protocolos diferentes. Os experimentos foram realizados 6 vezes para os eixos embrionários e 13 vezes para os nós-cotiledonares. O protocolo utilizado para os eixos embrionários demonstrou ser mais rápido, com meios de cultura menos elaborados com relação à composição e um maior número de plantas foi levado à casa de vegetação, onde permaneceram até a produção de vagens e sementes. Os resultados do presente trabalho demonstram que é possível percorrer todas as etapas, desde a infecção até a regeneração e aclimação das plantas para as variedades comerciais utilizadas e segundo os protocolos descritos. Estes procedimentos estão sendo usados nos experimentos de transformação de soja que estão sendo realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Filogeografia/BIOAGRO – UFV.

Palavras-chave: eixos embrionários, nós-cotiledonares, soja, *Agrobacterium*.

1. INTRODUÇÃO

A obtenção de uma planta transgênica por meio de infecção via *Agrobacterium tumefaciens* envolve a transferência e a integração do T-DNA na célula vegetal e a capacidade dessas células transformadas se diferenciarem em uma planta. A capacidade de diferenciação, ou totipotência, permite a regeneração de plantas por meio de técnicas de cultura de tecidos (BRASILEIRO & LACORTE, 2000).

O avanço nos conhecimentos de Biologia Molecular foi fundamental, tanto para elucidar de forma aprofundada as bases moleculares do processo de interação *Agrobacterium*-hospedeiro como para a construção de vetores de transformação baseados no plasmídeo Ti. Assim, as técnicas de Biologia Molecular em associação com as técnicas de Cultura de Tecidos Vegetais constituem a base para a obtenção de uma planta transgênica (BRASILEIRO & LACORTE, 2000).

A cultura de tecidos vegetais consiste no conjunto de técnicas que possibilitam a manutenção ou o cultivo de plântulas, embriões, órgãos, tecidos e células *in vitro*, em meio de cultura apropriado e asséptico, sob condições controladas de temperatura, umidade, fotoperíodo e intensidade luminosa (TORRES *et al.*, 1998). Essas técnicas têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento e na propagação de cultivares superiores de plantas, principalmente na obtenção de plantas geneticamente modificadas (OLHOFT *et al.*, 2001, 2003, 2006, 2007; ZENG *et al.*, 2004; PAZ *et al.*, 2004, 2006; XUE *et al.*, 2006; YI *et al.*, 2006).

Dentre os diferentes protocolos de regeneração por organogênese que têm sido estabelecidos para os diferentes tipos de explantes de soja, destacam-se os nós cotiledonares, os nós primários e o meristema apical do eixo embrionário (WIDHOLM *et al.*, 2010).

Avanços já foram alcançados na transformação genética da soja, o que permitiu aos setores público e privado produzirem cultivares com características transgênicas (SPECHT *et al.*, 2007). Os avanços nos métodos de transformação da soja resultaram de fatores como: tecidos-alvo,

condição do tecido vegetal, métodos de injúria, sistemas de regeneração, marcadores de seleção, genes repórter e promotores tecido-específicos, que já vem sendo bastante estudados e adequados à obtenção de resultados mais eficientes (SPECHT *et al.*, 2007; MELLO-FARIAS & CHAVES, 2008).

Quando se utiliza a técnica de RNA de interferência (RNAi) para modificar a expressão de um gene-alvo, um sistema eficiente de transformação de soja é necessário. Dessa forma, para estabelecer um bom sistema e uma boa frequência de transformação, é importante que as condições de cultura de tecidos sejam melhoradas e adaptadas para cada tipo de explante utilizado (WANG & XU, 2008).

A soja é de difícil transformação quando comparada com outras plantas (WANG & XU, 2008). Muitos esforços foram realizados para aumentar a eficiência da transformação, incluindo a utilização de diferentes explantes e uma melhora das condições de transformação, como: alterações na concentração de reguladores de crescimento e suplementação dos meios de co-cultura com nitrato de prata e agentes antioxidantes (OLHOFT *et al.*, 2001; OLHOFT & SOMERS, 2001).

Efeitos desconhecidos ou indesejados no metabolismo podem ocorrer, pois os métodos de transformação de plantas não oferecem controle sobre o sítio de inserção, número de cópias transferidas ou da integridade do cassete. Dessa forma, efeitos não desejados podem ocorrer devido à interrupção de um gene funcional pela inserção do transgene, rearranjos do gene carregado pelo cassete, ou co-expressão de genes vizinhos (DUNWELL, 2005).

O Programa de Melhoramento Genético da Qualidade do Óleo e Proteína da Soja em desenvolvimento no BIOAGRO/UFV tem feito esforços para a obtenção de plantas geneticamente modificadas por meio da utilização de ferramentas biotecnológicas. Nesse Programa de Melhoramento, já foram realizados diversos trabalhos, com diferentes cassetes para silenciamento gênico, diferentes explantes, de diferentes variedades de soja, e protocolos, com o objetivo de padronizar um protocolo que pudesse ser utilizado (LIMA, 2005; BARROS, 2006; SOUSA, 2007;

MARTINS, 2007; MENDONÇA, 2010). O presente trabalho faz parte desse Programa de Melhoramento e teve como objetivo realizar a infecção de eixos embrionários e nós-cotiledonares de soja via *Agrobacterium tumefaciens*, seguida das etapas de regeneração e aclimação das plantas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais vegetais

Foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) da variedade comercial CAC-1, desenvolvida pela COOPADAP (Cooperativa Agropecuária do Alto Paranaíba LTDA) e da variedade comercial CD-201 desenvolvida pela COODETEC (Cooperativa Central Agropecuária de Desenvolvimento Tecnológico e Econômico Ltda.). A variedade CAC-1 apresenta as seguintes características: possui ciclo de 126-145 dias (semi-tardia), com teor protéico de aproximadamente 40%, hábito de crescimento determinado, produtividade em torno de 3360 kg/ha e é resistente ao cancro da haste e à mancha olho-de-rã. A variedade CD-201 possui ciclo de 116-125 dias (precoce), hábito de crescimento determinado, produtividade em torno de 2990 kg/ha, é resistente ao cancro da haste, à mancha olho-de-rã e à pústula bacteriana. Estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram que a CAC-1 é bastante responsiva à cultura de tecidos tanto para indução de embriogênese somática (LIMA, 2005) quanto para a regeneração de brotos induzidos a partir de nós cotiledonares (MENDONÇA, 2010).

2.2. Plantio, coleta e desinfestação das vagens

Para o plantio das sementes de soja foram utilizados vasos que continham 3 litros de solo previamente adubado e em cada um deles foram plantadas 3 sementes. As condições de cultivo em casa de vegetação foram aquecimento controlado ($26^{\circ}\text{C} \pm 1$) e fotoperíodo de 14 horas de luz.

Após o amadurecimento fisiológico das sementes, foi realizada a coleta das vagens para desinfestação no laboratório. Esta foi realizada por meio de imersão em etanol 70% (v/v) por 30 segundos, seguida de solução de hipoclorito de sódio 1% acrescida de Tween 20 (0,01%) por 20 minutos. Em seguida, as vagens foram lavadas com água destilada estéril, colocadas

para secar e dissecadas com o auxílio de pinças. As sementes foram individualizadas e mantidas em dessecador a 4°C até a sua utilização.

2.3. Desinfestação das sementes

No momento de sua utilização, as sementes foram desinfestadas por 6 h utilizando gás cloro produzido pela mistura de 3,5 mL de HCl 12N e 100 mL de hipoclorito de sódio em um dessecador selado (DI *et al.*, 1996).

2.4. Preparo das sementes para obtenção dos explantes

2.4.1. Embebição das sementes (eixos embrionários)

Depois de realizada a desinfestação das sementes, estas foram embebidas em meio de co-incubação (meio C, Tabela 1), em béquer de vidro devidamente vedado com papel alumínio e filme plástico PVC. As sementes foram mantidas por 16 h, a 26°C ± 1, até que estivessem entumecidas e fosse possível a excisão dos eixos embrionários (KANAMORI *et al.*, 2011).

2.4.2. Germinação das sementes (nós-cotiledonares)

Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em meio de germinação (GM, Tabela 2), em placas de Petri (90x15 mm). Estas foram vedadas com filme plástico PVC e mantidas a 26°C ± 1, sob fotoperíodo de 16 h de luz, a uma irradiância de 90 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ até que os cotilédones estivessem verdes e as primeiras folhas verdadeiras tivessem de 4 a 10 mm de comprimento (OLHOFT *et al.*, 2006).

Tabela 1: Composição dos meios de cultura utilizados nos experimentos com eixos embrionários.

	C	S1	S2	R1
Sais MS	2,2g	4,4g	4,4g	2,2g
Vitaminas B5	1mL	1mL	1mL	1mL
Fe-EDTA MS	10mL	10mL	10mL	10mL
Ca MS	10mL	10mL	10mL	10mL
MES	0,64g	0,64g	0,64g	0,64g
Sacarose	15g	15g	15g	15g
Ágar	7g	7g	7g	7g
pH	5,4	5,7	5,7	5,7
BAP 5mg/mL ^{*,1}	1mL	-	-	1mL
AIB 1mg/mL ^{*,2}	-	-	-	1mL
Acetossiringona 1M*	200µL	-	-	-
Tiosulfato de Sódio 1M*	1mL	-	-	-
DTT 1M*	1mL	-	-	-
Glufosinato de Amônio 10mg/mL *	-	-	200µL	200µL
Meropenem 12,5mg/mL *	-	2mL	2mL	2mL
*Filtro-estéreis.	C: Meio de Co-incubação			
1. 6-benzil-aminopurina;	S1: Meio de Alongamento de Brotos			
2. Ácido 3-indol butírico;	S2: Meio de Alongamento de Brotos			
	R1: Meio de Enraizamento			
	Sais MS: (MURASHIGE & SKOOG, 1962)			
	Sais B5: (GAMBORG <i>et al.</i> ,1968)			

Tabela 2: Composição dos meios de cultura utilizados nos experimentos com nós-cotiledonares.

	GM	CCM	SIM	SEM	RM
Sais MS	-	-	-	1X	-
Sais B5	1X	1/10X	1X	-	1/2X
Fe-EDTA MS	1X	1X	1X	1X	1X
Vitaminas B5	1X	1X	1X	1X	-
MES	3 mM	20 mM	3 mM	3 mM	3 mM
Sacarose	2%	3%	3%	3%	2%
Gelrite®	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
pH	5,8	5,4	5,6	5,6	5,6
BAP ^{*,1}	-	7,5 µM	7,5 µM	-	-
GA ₃ ^{*,2}	-	0,25 g.L ⁻¹	-	0,5 g.L ⁻¹	-
Acetosseringona*	-	200µM	-	-	-
L-Cisteína*	-	8,8 mM	-	-	-
Tioossulfato de Sódio*	-	1 mM	-	-	-
DTT*	-	1 mM	-	-	-
Glufosinato de amônio*	-	-	0 e 3 mg.L ⁻¹	0 e 3mg.L ⁻¹	-
Ticarcilina*	-	-	50 mg.L ⁻¹	50 mg.L ⁻¹	-
Cefotaxima*	-	-	100 mg.L ⁻¹	100 mg.L ⁻¹	-
Vancomicina*	-	-	50 mg.L ⁻¹	50 mg.L ⁻¹	-
Asparagina*	-	-	-	50 mg.L ⁻¹	-
Ácido Piroglutâmico*	-	-	-	100 mg.L ⁻¹	-
AIA ^{*,3}	-	-	-	0,1 mg.L ⁻¹	-
Zeatina-ribosídeo*	-	-	-	1 mg.L ⁻¹	-
AIB ^{*,4}	-	-	-	-	1 mg.L ⁻¹

* Filtro-estéreis.

GM: Meio de Germinação

1. 6-benzil-aminopurina; **CCM:** Meio de Co-cultivo

2. Ácido Giberélico; **SIM:** Meio de Indução de Brotos

3. Ácido 3-indol acético; **SEM:** Meio de Alongamento de Brotos

4. Ácido 3-indol butírico **RM:** Meio de Enraizamento

Sais MS: (MURASHIGE & SKOOG, 1962)

Sais B5: (GAMBORG *et al.*,1968)

2. 5. Vetores para transformação genética

Para a transformação de *Agrobacterium tumefaciens* e posterior infecção de soja foram utilizados os vetores p35SCBDessaturaseRNAi e p β CBDessaturaseRNAi. Ambos os vetores carregam cassetes construídos para silenciamento gênico via RNA de interferência (SOUSA, 2007). Eles possuem fragmentos do gene que codificam a enzima oleoil dessaturase, clonados em sequências invertidas, espaçadas pelo íntron PDK (íntron do gene que codifica a piruvato desidrogenase quinase), o terminador OCS (terminador do gene que codifica a octopina sintase) e os promotores 35SCaMV (constitutivo) e do gene da subunidade α da β -conglucina (semente-específico), respectivamente (Figura 1).

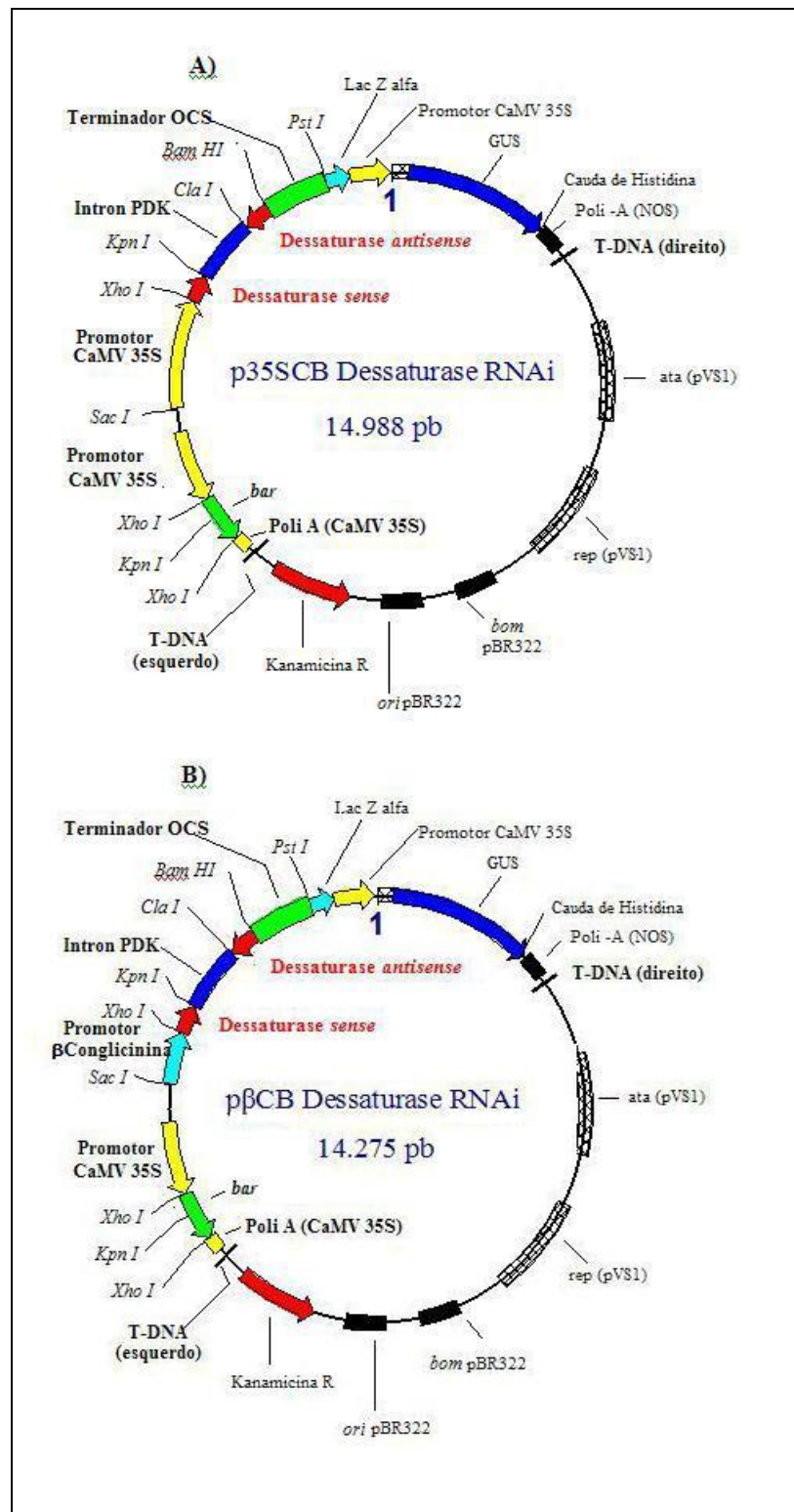


Figura 1: Representação esquemática dos vetores contendo as construções para silenciamento gênico, via RNA de interferência, do gene da oleoil dessaturase em soja. Os cassetes estão sob controle do promotor 35SCaMV (A) e do promotor do gene da subunidade α da β -conglucina (B) (Sousa, 2007).

2.6. Linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*

Os vetores foram inseridos separadamente em *A. tumefaciens*, linhagem KYTR1 (TORISKY *et al.*, 1997) por meio de eletroporação (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Os estoques de *A. tumefaciens*, carregando cada vetor binário, foram estriados em meio YEP [peptona (10 g.L⁻¹), NaCl (5 g.L⁻¹), extrato de levedura (5 g.L⁻¹), ágar 1,5 % (p/v), pH 7,0] contendo canamicina (50 mg.L⁻¹) e rifampicina (100 mg.L⁻¹). A cultura foi incubada a 28°C em BOD até a formação de colônias.

No dia anterior ao preparo dos explantes, uma colônia de cada linhagem foi inoculada em 200 mL de meio YEP líquido acrescido de canamicina (50 mg.L⁻¹) e rifampicina (100 mg.L⁻¹) e mantida sob agitação (175 rpm) a 28°C até que a cultura atingisse uma OD₆₀₀ de 0,8 a 1,0. Então, a cultura foi dividida em alíquotas de 50 mL e as células foram concentradas por centrifugação (3270 g/10 min/20°C). Em seguida, as células foram ressuspensas em 25 mL de meio C (Tabela 1) e meio de co-cultivo (CCM, Tabela 2) para os eixos embrionários e nós-cotiledonares, respectivamente, e incubadas a temperatura ambiente por 30 min antes da infecção (OLHOFT *et al.*, 2006).

2.7. Preparos dos eixos embrionários, nós-cotiledonares e Infecção

Para a obtenção dos eixos embrionários, os cotilédones e as folhas primárias no eixo embrionário foram excisadas para expor o meristema embrionário.

Para obter os nós-cotiledonares, a raiz e parte do hipocótilo (3-5 mm abaixo do nó-cotiledonar) foram excisados e foi feito um corte longitudinal, para que os cotilédones fossem separados. Foram removidos o epicótilo e os brotos axilares pré-formados, para que houvesse quebra da dominância apical e indução *de novo* da proliferação de meristemas axilares. Para

facilitar a infecção por *Agrobacterium*, foram feitos ferimentos na região do nó-cotiledonar por meio de ferimentos.

Em cada um dos experimentos com os eixos embrionários, 380 explantes foram incubados por 30 min em suspensão bacteriana (sendo cerca de 50 explantes para cada 25 mL). Para o controle negativo da infecção, foram utilizados 20 explantes incubados em 25 mL de meio de co-incubação líquido (meio C, Tabela 1).

Em cada um dos experimentos com os nós-cotiledonares, 200 explantes foram incubados por 30 min em suspensão bacteriana (sendo cerca de 50 explantes para cada 25 mL). Para o controle negativo da infecção, foram utilizados 50 explantes incubados em 25 mL de meio de co-cultivo líquido (CCM, Tabela 2).

Os eixos embrionários foram plaqueados de 20 em 20 em meio C (Tabela 1) coberto com papel de filtro estéril e os nós cotiledonares foram plaqueados de 5 em 5 em meio de co-cultivo sólido (Tabela 2) coberto com papel filtro estéril. Os nós-cotiledonares foram dispostos com a face adaxial em contato com o meio. As placas foram vedadas com filme plástico PVC e incubadas por 5 dias no escuro a $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ (OLHOFT *et al.* 2006; MENDONÇA, 2010; KANAMORI *et al.*, 2011).

2.8. Seleção e Regeneração de Plantas

2.8.1. Experimentos com eixos embrionários

Transcorrido o período de 5 dias de co-cultivo, os explantes foram secos em papel filtro estéril para retirar o excesso de *A. tumefaciens*. Em seguida, foram embebidos perpendicularmente em meio de alongamento de brotos (S1, Tabela 1). Foram colocados 12 explantes em cada frasco do tipo Magenta.[®] Estes não tiveram a tampa completamente vedada para evitar a condensação no frasco. As tampas foram fechadas com fita hipoalergênica Micropore[®] 3M. Os explantes permaneceram nos frascos por um período de 10 dias. Após este período, os brotos alongados foram retirados e

transferidos para meio de alongamento de brotos contendo 2 mg.L⁻¹ de glufosinato de amônio (S2, Tabela 1). Os explantes foram recultivados a cada duas semanas e permaneceram até que estivessem bastante alongados. Quando os brotos se apresentaram bem alongados foram cortados e transferidos para frascos do tipo Magenta[®] contendo meio de enraizamento (R1, Tabela 1) e também vedados com Micropore[®] 3M (KANAMORI *et al.* 2011, com modificações). Como os explantes controle não possuíam resistência ao glufosinato de amônio, os mesmos foram recultivados somente em meio S1 e R1 sem glufosinato de amônio.

As etapas de seleção e regeneração foram conduzidas em sala de cultivo a 26±1°C e sob fotoperíodo de 16 h de luz, a uma irradiância de 90 µE/m²/s.

2.8.2. Experimentos com nós-cotiledonares

Transcorrido o período de 5 dias de co-cultivo, os explantes foram secos em papel estéril, para retirar o excesso de *A. Tumefaciens*. Em seguida, os explantes foram embebidos perpendicularmente em meio de indução de brotos (SIM, Tabela 2) de forma que o hipocótilo e o tecido ferido ficassem submersos no meio. Foram colocados 5 explantes por placa e esta foi vedada com fita hipoalergênica Micropore[®] 3M. Os explantes permaneceram por um período de 15 dias. Após este período, os cotilédones com brotos formados foram recultivados em meio SIM recém preparado por igual período. Os brotos que passaram por essa etapa foram recultivados em meio SIM fresco, contendo, então, 3 mg.L⁻¹ de glufosinato de amônio (Finale[®], Bayer SA) por 14 dias (OLHOFT *et al.*, 2006, com modificações). Como os explantes controle não possuíam resistência ao glufosinato de amônio, os mesmos foram recultivados somente em meio SIM fresco.

Depois de dois recultivos de 14 dias em meio SIM contendo glufosinato de amônio, os cotilédones foram excisados dos explantes, foi retirado o tecido morto e os explantes foram transferidos para frascos do tipo

Magenta[®] contendo meio de alongamento de brotos (SEM, Tabela 2) com glufosinato de amônio na concentração de 3 mg.L⁻¹, por 14 dias. Os frascos, da mesma maneira, foram vedados com Micropore[®] 3M. Assim como descrito anteriormente, os explantes controle foram recultivados somente em meio SEM. Após o período de 14 dias, os explantes foram recultivados em meio SEM fresco sem glufosinato de amônio e novos recultivos foram realizados sempre que necessário (OLHOFT *et al.*, 2006; MENDONÇA, 2010).

Os brotos que alongaram e apresentavam-se saudáveis foram excisados e transferidos para tudo de vidro de 25 x 150 mm, contendo meio de enraizamento (RM, Tabela 2) também vedados com Micropore[®] 3M por um período de cerca de 10 dias, até que houvesse a formação de raízes (OLHOFT *et al.*, 2006; MENDONÇA, 2010).

As etapas de seleção e regeneração foram conduzidas em sala de cultivo a 26±1°C e sob fotoperíodo de 16 h de luz, a uma irradiância de 90 μE/m²/s.

2.9. Aclimatização das plantas

As plântulas foram retiradas do meio de cultura quando apresentaram sistema radicular bem desenvolvido e foram inicialmente transferidas para copos plásticos que continham água e permaneceram por um período de 3 dias, cobertas com plástico e sob as condições de cultivo descritas anteriormente. Após esse período, elas foram transferidas para copos plásticos de 100 mL que continham uma mistura de substrato agrícola (Bioplant) e casca de coco na proporção de 1:1, onde foram mantidas por mais 10 dias completamente cobertas com plástico, em um sistema de prateleiras com fotoperíodo de 16 h de luz, utilizando lâmpadas fluorescentes de 40 W (Osram).

Nas duas semanas subseqüentes, o plástico foi retirado gradativamente, até que as plantas estivessem bem adaptadas às condições ambientais.

Decorrido esse período, as plantas foram transferidas para casa de vegetação e mantidas sob um sistema de irrigação artificial tipo nevoeiro, com intervalos de pulverização de água a cada 2 h, com um período de 10 h/dia sem pulverização, e fotoperíodo de 16 h de luz, por cerca de 20 dias.

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os vetores p35SCBDessaturaseRNAi e p β CBDessaturaseRNAi foram inseridos separadamente, com sucesso, na linhagem KYRT1 de *Agrobacterium tumefaciens*. Torisk *et al.* (1997) em estudo comparativo avaliaram a eficiência da infecção por *A. tumefaciens* KYRT1, GV3850 e EHA105 por meio da inoculação em explantes de nós-cotiledonares. O resultado de tal estudo demonstrou que, em um sistema de vetor binário, KYRT1 é igual ou mais eficaz que EHA105 ou GV3850 em entregar o DNA na soja. Em outro estudo, Meurer *et al.* (1998) verificaram a virulência de algumas linhas de *A. tumefaciens* também para explantes de soja e como resultado, eles observaram que a linhagem KYRT1 era mais virulenta do que outras linhagens, tais como, EHA105 e LB4404, bastante utilizadas para transformação de plantas.

O protocolo utilizando eixos embrionários de soja como explantes foi realizado seis vezes. Em cada um dos experimentos foram utilizados 400 explantes, dos quais 380 foram submetidos à infecção por *A. tumefaciens* e 20 foram mantidos como controle. Foi utilizado o protocolo descrito por Kanamori *et al.* (2011), com pequenas modificações, de acordo com o que era observado durante todas as etapas. O tipo de tecido, a idade, o genótipo e a susceptibilidade a *Agrobacterium* desempenham importante papel na efetividade da infecção bacteriana. Desta forma, as etapas de cultura de tecidos devem ser adaptadas e adequadas ao explante utilizado (BRASILEIRO & LACORTE, 2000; MELLO-FARIAS & CHAVES, 2008).

Para os nós-cotiledonares de soja, os experimentos foram realizados 13 vezes. Em cada um deles foram utilizados 250 explantes, dos quais 200 foram submetidos à infecção por *A. tumefaciens* e 50 foram mantidos como controle. Os nós-cotiledonares também são amplamente utilizados em experimentos de cultura de tecidos de soja.

Para a desinfestação eficiente das sementes utilizadas nos experimentos foi utilizada câmara de gás cloro, pois, de acordo com Paz *et al.* (2004) a desinfestação a seco (câmara de gás cloro) é eficiente para

sementes produzidas em casa de vegetação ou em condições de campo. De acordo com o observado, a desinfestação por gás cloro foi realmente efetiva, pois não ocorrem problemas relacionados à contaminação das sementes.

Para os experimentos com os dois tipos de explantes foram utilizadas sementes de soja da variedade CAC-1 e CD-201. Optou-se por utilizar sementes de ciclo semi-tardio (CAC-1) e sementes de ciclo de precoce (CD-201) para observar se o ciclo tem alguma influência nas etapas *in vitro*. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas com relação ao ciclo. Ambas as variedades foram conduzidas por todas as etapas de regeneração e aclimação.

As sementes foram submetidas à infecção por *A. tumefaciens* KYRT35SDessatRNAi ou KYRT β DessatRNAi. Após a etapa de infecção, os explantes percorreram as etapas de indução e seleção de brotos potencialmente transformados geneticamente, alongamento e enraizamento dos mesmos, seguidos pelas etapas de aclimação e transferência para a casa de vegetação.

O protocolo utilizado para os eixos embrionários foi mais rápido, menos elaborado com relação à composição dos meios de cultura e um maior número de plantas foi levado à casa de vegetação, onde permaneceram até a produção de vagens e sementes.

Todas as etapas percorridas estão ilustradas na Figura 2. As imagens à esquerda do traço vermelho são referentes aos eixos embrionários e as imagens à direita estão relacionadas aos nós-cotiledonares.

Após as 16 h a $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ que as sementes ficaram embebidas em meio C líquido estas já se apresentaram entumecidas (Figura 2A) e foi possível retirar os eixos embrionários para serem submetidos à infecção. Com relação aos experimentos com os nós cotiledonares, poucos dias após as sementes terem sido transferidas para o meio de germinação e mantidas a $26^{\circ}\text{C} \pm 1$, sob um fotoperíodo de 16 h de luz, a uma irradiância de $90 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ estas já se apresentavam maiores (Figura 2a) e após cerca de oito dias as mesmas já estavam germinadas, com os cotilédones verdes e as primeiras folhas verdadeiras já podiam ser observadas (Figuras 2b e 2c). Os

explantes foram preparados a partir destas plântulas e foram feitos ferimentos na região do nó-cotiledonar (Figura 2d).

Foi adicionada acetosseringona aos meios C e Co-cultivo líquidos utilizados para ressuspender as células e realizar a posterior infecção dos eixos embrionários e nós-cotiledonares, respectivamente, com o objetivo de aumentar a eficiência da infecção. Como muitos genótipos não produzem acetosseringona (composto fenólico) o suficiente para induzir os genes *vir* (GODWIN *et al.*, 1991); esta deve ser adicionada ao meio de cultura (MELLO-FARIAS & CHAVES, 2008).

Também foram adicionados aos meios utilizados para a infecção os compostos DTT e tiosulfato de sódio, pois de acordo com Olhoft *et al.* (2003) e Kanamori *et al.* (2011) tais compostos aumentam a eficiência da infecção e não interferem no desenvolvimento dos explantes.

Após a infecção com *A. tumefaciens* os eixos embrionários foram plaqueados em meio C sólido (Figura 2B) e foram mantidos no escuro por cinco dias (Figura 2C). Semelhantemente, os nós-cotiledonares foram plaqueados em meio de co-cultivo sólido, onde também permaneceram por cinco dias no escuro (Figura 2e).

A produção *de novo* de brotos foi induzida nos eixos embrionários por 10 dias sem agente seletivo (Figura 2D). Em seguida, os brotos alongados foram transferidos para o meio S2 (que, conforme descrito na Tabela 1, possuía 2mg.L⁻¹ de glufosinato de amônia) (Figura 2E). Quando os brotos se apresentaram bastante alongados, estes foram excisados e transferidos para o meio de enraizamento (Figura 2F).

Para os nós-cotiledonares, a produção *de novo* de brotos foi induzida por 15 dias sem agente seletivo (Figura 2f). Esse intervalo de tempo é necessário para que a indução dos brotos possa ocorrer, antes de se iniciar o processo de seleção dos explantes (OLHOFT *et al.*, 2003). Durante a permanência dos explantes em meio de indução de brotos, foi possível perceber que os explantes controle induziram brotos mais rapidamente que os que foram submetidos à infecção por *A. tumefaciens*. A etapa de seleção foi iniciada transferindo-se os brotos para o mesmo meio de indução, agora

contendo 3 mg.L⁻¹ de glufosinato de amônio. O glufosinato de amônio (PPT) é um herbicida que age como inibidor competitivo da enzima glutamina sintetase, promovendo acúmulo de amônia e a morte de células. O gene introduzido que confere resistência ao PPT é uma versão sintética do gene *pat* que codifica a enzima Fosfinotricina-N-Acetiltransferase (PAT) obtida da bactéria *Streptomyces viridochromogenes* pertencente à família Actinomycetaceae. O gene *pat* confere resistência através da acetilação (introdução de grupo acetyl – CH₃CO em molécula orgânica contendo grupos hidroxila – OH ou amino– NH₂) do PPT, utilizando como co-fator acetil-coenzima A, fazendo com que o PPT perca a ação inibidora (DEKEYSER *et al.*, 1989; WILMINK & DONS, 1993; LILGE *et al.*, 2003). Como descrito por Zeng *et al.* (2004), quando se utiliza uma alta concentração de agente seletivo nos primeiros dias de seleção, a sobrevivência dos explantes parcialmente transformados (quimeras) pode ser diminuída.

Após o período de indução e seleção dos explantes em meio de indução de brotos, todos aqueles que se mostravam verdes e saudáveis tiveram os cotilédones e o tecido morto retirados e foram transferidos para frascos do tipo Magenta ® contendo meio de alongamento com o agente seletivo (glufosinato de amônio) na mesma concentração. Após 14 dias, os brotos foram recultivados em meio de alongamento sem agente seletivo e foram recultivados sempre que necessário até o alongamento dos mesmos (Figura 2g). Os brotos controle se desenvolveram mais rapidamente que os potencialmente transformados, que se demonstraram muito pouco alongados ou não alongaram.

Decorrida a fase de alongamento (cerca de 35 dias), os brotos que se desenvolveram foram transferidos para tubos de vidro devidamente vedados, contendo meio de enraizamento. A maior parte dos brotos que estavam no meio com agente seletivo sofreu necrose e não alongou. Para os que foram transferidos para o meio de enraizamento, cerca de 8 a 10 dias foram suficientes para o desenvolvimento de raízes saudáveis (Figura 2h).

Para os dois protocolos, as plântulas que se apresentaram enraizadas foram aclimatizadas em sala de cultivo. Inicialmente elas foram transferidas

para copos com água (Figuras 2G e 2i), onde permaneceram por 3 dias. Em seguida, foram transferidas para copos plásticos contendo a mistura de substrato agrícola (Bioplant) e casca de coco (Figuras 2H e 2j). Após essa fase, as plantas foram transferidas para vasos e levadas para casa de vegetação (Figuras 2l e 2k). A Figura 2l mostra em detalhe uma planta com indução floral.

As plantas obtidas a partir dos eixos embrionários e levadas para a casa de vegetação foram tanto as plantas controle quanto aquelas obtidas de explantes submetidos à infecção por *A. tumefaciens*.

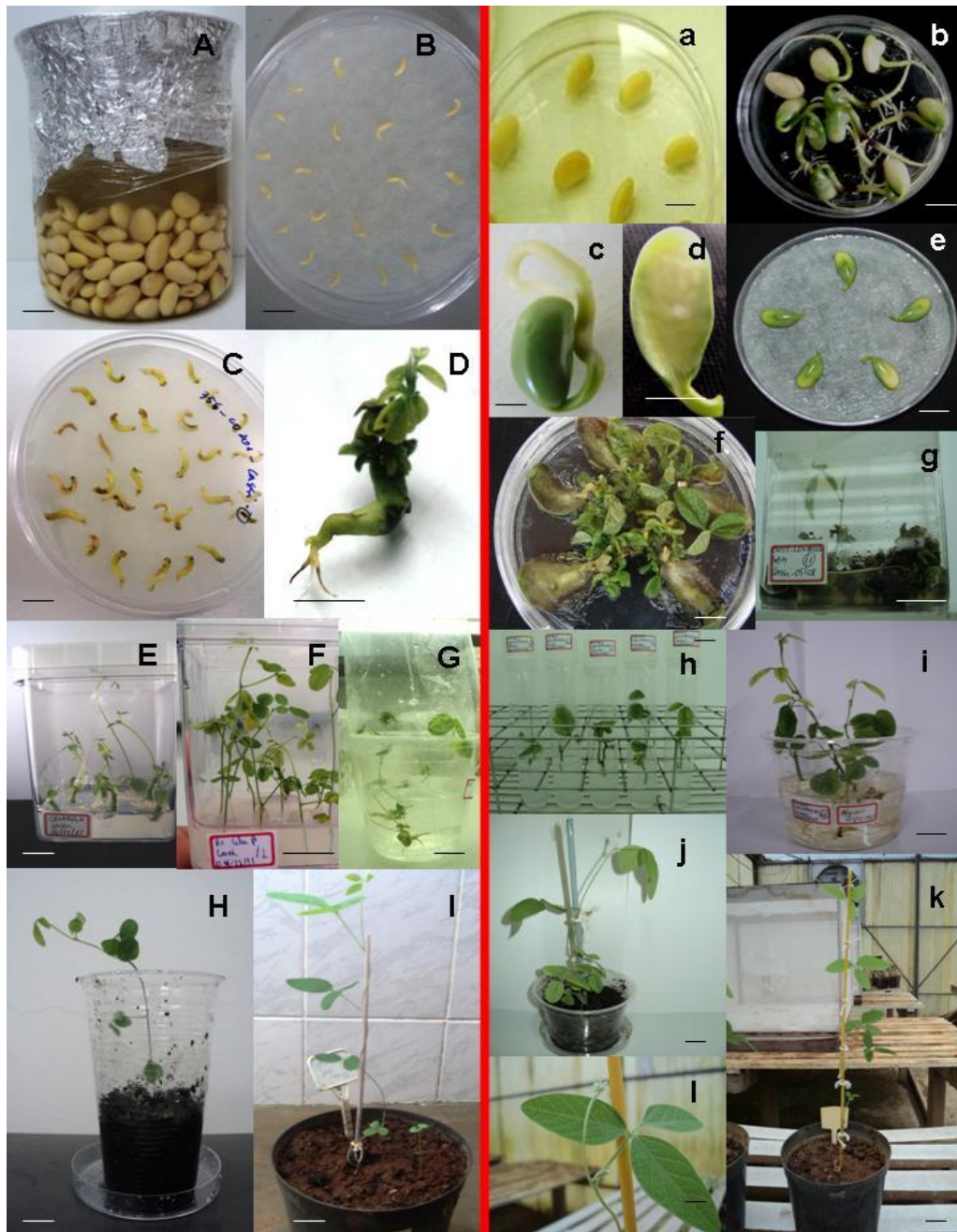


Figura 2: Etapas de cultura de tecidos e aclimação de soja, utilizando dois tipos de explantes. À esquerda do traço vermelho estão as etapas utilizando eixos embrionários como explantes. À direita estão as etapas com nós-cotiledonares. Embebição das sementes (A), eixos embrionários em meio C após infecção (B) e após cinco dias (C), indução de brotos (D), brotos alongados em meio S1 (E), brotos em meio de enraizamento (F), plântulas em água (G), plântula em substrato (H), planta em casa de vegetação (I). Sementes em meio de germinação (a), sementes germinadas (b, c), explante preparado para infecção (d), nós cotiledonares em meio CCM (e), brotos induzidos (f), brotos alongados (g), brotos em meio de enraizamento (h), plântulas em água (i), plântula em substrato (j), planta em casa de vegetação (k), indução floral (l). Barra = 1cm e em (d) Barra = 5mm.

Tais resultados evidenciam que a metodologia utilizada para a regeneração dos explantes e a aclimatização das plântulas foi adequada. Para os nós-cotiledonares, foi utilizado um protocolo anteriormente estabelecido em nosso laboratório por Mendonça (2010). Para os eixos embrionários foi testado o protocolo desenvolvido por Kanamori *et al.* (2011).

4. CONCLUSÕES

- Foi possível percorrer todas as etapas desde a infecção via *A. tumefaciens* até a aclimação de plantas por meio dos dois protocolos. Entretanto foi possível obter um número muito maior de plantas em casa de vegetação quando foram utilizados eixos embrionários como explantes.
- O protocolo utilizado para os eixos embrionários foi mais rápido e os meios de cultura utilizados eram mais simples.
- O período necessário para indução e alongamento dos brotos quando foram utilizados os nós-cotiledonares foi maior que para os eixos embrionários.
- Plantas obtidas de eixos embrionários submetidos à infecção via *A. tumefaciens* foram levadas até a casa de vegetação.
- Para futuros experimentos de transformação, serão necessárias modificações no sistema de seleção e na regeneração dos brotos potencialmente transformados, para melhor adequação do protocolo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, B. A. **Construção de cassetes de expressão para silenciamento gênico de fatores antinutricionais da soja, via interferência por RNA.** Viçosa:UFV, 58p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

BRASILEIRO, A. C. M; LACORTE, C. *Agrobacterium*: Um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 15(3):12-15 , 2000.

DEKEYSER, D.; CLAES, B.; MARICHAL, M.; MONTAGU, M. B.; CAPLAN, A. Evaluation of selectable markers for rice transformation. **Plant Physiology**, 90:217-223, 1989.

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 Reports**, 15: 746-750, 1996.

DUNWELL, J. M. Transgenic crops: the current and next generations. **Methods in Molecular Biology**, 286, 377–398, 2005.

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

GODWIN, I.; TODD, G.; FORD-LOYD, B.; NEWBURY, H. I. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. **Plant Cell Reports**, v.9, p.671-675, 1991.

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

LILGE, C. G.; TILLMANN, M. Â. A.; VILLELA, F. A.; DODE, L. B. Identificação de sementes de arroz transformado geneticamente resistente ao herbicida glufosinato de amônio. **Revista Brasileira de Sementes**, 25(1), 2003.

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

MARTINS, P. K. **Transformação de nós cotiledonares de soja visando à cosupressão do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase**. Viçosa: UFV, 94p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

MELLO-FARIAS, P. C.; CHAVES, A. L. S. Advances in *Agrobacterium*-mediated plant transformation with emphasis on soybean. **Scientia Agricola**, 65(1):95-106, 2008.

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

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

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

OLHOFT, P. M.; BERNAL, L. M.; GRIST, L. B.; HILL, S.; MANKIN, L.; SHEN, Y.; KALOGERAKIS, M.; WILEY, H.; TOREN, E.; SONG, H.S.; HILLEBRAND, H.; JONES, T. A novel *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation method of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using primary-node explants

from seedlings. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 43: 536-549, 2007.

OLHOFT, P. M.; DONOVAN, C. M.; SOMERS, S. A. Soybean (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary node explants. In: Wang K (ed) **Agrobacterium protocol**, 2nd ed. Springer, Dordrecht, pp 473-498, 2006.

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

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

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

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

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

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.

SOUSA, C. S. **Construção de cassetes de expressão para silenciamento de genes da biossíntese de ácidos graxos em soja via RNA de**

interferência. Viçosa: UFV, 60p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

SPECHT, J; SHOEMAKER, R.; JACKSON, S.; STACEY, G.; CREGAN, P. **Soybean genomics research – A strategic plan for 2008-2012.** St. Louis, Missouri, 25p, 2007.

TORISKY, R. S.; KOVACS, L.; AVDIUSHKO, S.; NEWMAN, J.D.; HUNT, A. G.; COLLINS, G.B. Development of a binary vector system for plant transformation based on the supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Cry5. **Plant Cell Reports**, 17: 102-108, 1997.

TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A.: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Embrapa - Brasília 1998.

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

WIDHOLM, J. M., FINER, J. J., VODKIN, L. O., TRICK, H. N., LAFAYETTE, P., LI, J., PARROTT, W.: Soybean. - In: KEMPKEN, F., JUNG, C. (ed.): Genetic Modification of Plants. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, 64: 473-498 - Springer- Verlag, Berlin, 2010.

WILMINK, A.; DONS, J.J.M. Selective agents and marker genes for use in transformation systems of monocotyledonous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, 11(2):165-185, 1993.

XUE R., XIE, H., ZHANG, B.: A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells. **Biotechnology Letters**, 28: 1551-1557, 2006.

YI, X., YU, D. Transformation of multiple soybean cultivars by infecting cotyledonary-node with *Agrobacterium tumefaciens*. **African Journal of Biotechnology**, 5: 1989-1993, 2006.

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