

MARIA ANDRÉIA CORRÊA MENDONÇA

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS DE REGENERAÇÃO, VIA
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ORGANOGÊNESE, E DE
ACLIMATIZAÇÃO DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill)**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

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

T

M539p
2010

Mendonça, Maria Andréia Corrêa, 1982-
Padronização de metodologias de regeneração, via
embriogênese somática e organogênese, e de aclimatização
de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) / Maria Andréia Corrêa
Mendonça. – Viçosa, MG, 2010.
xi, 101f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Maurilio Alves Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Soja - Propagação - In vitro. 2. Soja - Genética.
 3. Marcadores genéticos. 4. Plantas - Variação.
 5. Embriogênese somática. 6. Ácido diclorofenoxiacético.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

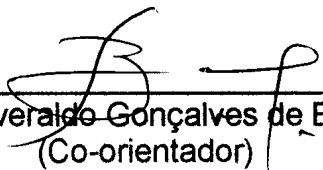
CDD 22. ed. 633.343

MARIA ANDRÉIA CORRÊA MENDONÇA

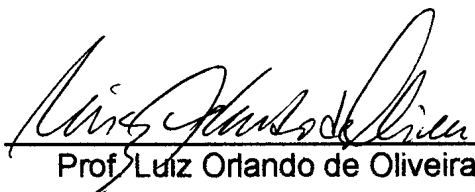
**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS DE REGENERAÇÃO, VIA
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ORGANOGÊNESE, E DE
ACLIAMATIZAÇÃO DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill)**

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

APROVADA: 27 de agosto de 2010.



Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Co-orientador)




Prof. Luiz Orlando de Oliveira



Prof.ª Andreia Barcelos Passos Lima



Prof.ª Valéria Montezze Guimarães



Prof. Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

Aos meus pais, Antônio Marcos e Rosânia.

Aos meus irmãos, Adriana e Marcos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização do curso.

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

Ao meu orientador, Professor Maurilio Alves Moreira, pelos ensinamentos transmitidos e pela confiança.

Aos meus co-orientadores, Professores Wagner Campos Otoni e Everaldo Gonçalves de Barros, pela amizade e pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Luiz Orlando de Oliveira, pelas sugestões e pela atenção durante o curso.

Às Professoras Andreia Barcelos Passos Lima e Valéria Monteze Guimarães, pelas valiosas sugestões, pela amizade e presteza.

Ao Newton Deniz Piovesan, pelo auxílio nas análises no *FT-NIR* e pela atenção durante o curso.

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

Aos funcionários da cozinha, do almoxarifado e da casa de apoio, pelo auxílio profissional, pela atenção e pela amizade.

Aos meus colegas de trabalho dos laboratórios SEQDNA, BIOMOL e PROTEÍNA, pelo auxílio técnico, pela amizade e pelo agradável convívio no ambiente de trabalho. Um agradecimento especial à Beatriz e à Cassiana, companheiras de projeto, pelos valiosos ensinamentos; e à Denise e ao Leonardo, pelo auxílio na condução dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos II, pela amizade, pela paciência e pelos ensinamentos.

Ao Pedro, ao Lucas, à Francielle, à Roberta, à Beatriz e à Vanessa, pela amizade, pelo carinho, pelo companheirismo e pelo alegre convívio.

Aos meus amigos Janaina, Jaqueline, Juliana, Milene, Wellington e Gustavo, pelos momentos de agradável convívio e descontração.

Aos meus familiares, pelo carinho, pelo incentivo e pelas orações.

Ao Mário Henrique, pelo amor, pela dedicação, pela compreensão e pelo apoio; e à sua família, pelo carinho e incentivo.

Àqueles que são a base desta conquista: meus pais Rosânia e Antônio Marcos, pelo amor incondicional, pelo incentivo, pela dedicação, pelo exemplo e pelos sábios conselhos, e meus irmãos Adriana e Marcos, pelo carinho, pelo apoio e pela presença.

A Deus, pelo dom da vida, por conceder-me força, perseverança e possibilitar-me alcançar mais este objetivo.

BIOGRAFIA

MARIA ANDRÉIA CORRÊA MENDONÇA, filha de Antônio Marcos de Mendonça e Rosânia Corrêa Mendonça, nasceu em Manhumirim, Minas Gerais, no dia 19 de abril de 1982.

Em 2000, iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, bacharelando-se em 30 de janeiro de 2004.

Durante o período de graduação, foi monitora do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e bolsista do PIBIC/CNPq no Departamento de Biologia Geral.

Em março de 2004, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV, em nível de Mestrado, submetendo-se à defesa de tese em 03 de fevereiro de 2006.

Em março de 2006, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV, em nível de Doutorado, submetendo-se à defesa de tese em 27 de agosto de 2010.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Aspectos gerais da cultura de tecidos vegetais	3
2.1.1. Embriogênese somática	3
2.1.2. Organogênese	5
2.2. Transformação genética de soja	6
2.2.1. Principais metodologias utilizadas para transformação genética em soja	6
2.2.2. Eventos de importância agrônômica e nutricional mais utilizados na transformação de soja	8
2.3. Variação somaclonal	12
2.4. Marcadores moleculares	15
2.4.1. Marcadores ISSR	16
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo geral	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
Capítulo 1	32
RESPOSTA DE QUATRO CULTIVARES DE SOJA (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill) À INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	
RESUMO	32
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1. Material vegetal e indução de embriogênese somática	37
2.2. Conversão e maturação dos embriões somáticos	39
2.3. Aclimatização das plantas	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4. CONCLUSÕES	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

Capítulo 2	56
ESTABELECIMENTO DE METODOLOGIAS PARA ORGANOGÊNESE A PARTIR DE NÓS COTILEDONARES DE SOJA (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill)	
RESUMO	56
1. INTRODUÇÃO	58
2. MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1. Material vegetal e indução de organogênese em nós cotiledonares... 61	
2.2. Etapas de aclimatização das plantas	62
2.3. Curva de sobrevivência para o herbicida Finale®	63
2.4. Determinação dos teores de óleo e de proteína de grãos de plantas regeneradas por meio de espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS)	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1. Indução de organogênese a partir de nós cotiledonares e aclimatização das plantas.....	65
3.2. Curva de sobrevivência para o herbicida Finale®	71
3.3. Composição de óleo e proteína do grão	73
4. CONCLUSÕES	77
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
Capítulo 3	83
GENETIC STABILITY OF SOYBEAN (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill) REGENERATED PLANTS THROUGH ORGANOGENESIS	
ABSTRACT	83
1. INTRODUCTION.....	85
2. MATERIALS AND METHODS	88
2.1. <i>In vitro</i> procedure	88
2.2. DNA isolation	89
2.3. ISSR fingerprinting	90
3. RESULTS AND DISCUSSION	92
4. REFERENCES.....	96

RESUMO

MENDONÇA, Maria Andréia Corrêa, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2010. **Padronização de metodologias de regeneração, via embriogênese somática e organogênese, e de aclimatização de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Orientador: Maurílio Alves Moreira. Co-orientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Wagner Campos Otoni.

Diferentes metodologias de regeneração *in vitro* já foram desenvolvidas para diversas cultivares de soja. No entanto, essa espécie tem se mostrado recalcitrante, e suas respostas morfogênicas *in vitro* tem sido consideradas genótipo-específicas. Considerando-se a necessidade de desenvolvimento de protocolos confiáveis de regeneração e de aclimatização em soja, os objetivos do presente trabalho foram induzir a embriogênese somática e a organogênese visando à padronização de metodologias. Para os experimentos de embriogênese somática foram utilizados cotilédones imaturos de quatro cultivares comerciais de soja: CAC-1, CD 219 RR, CS 303 TNKCA e FMT Tucunaré. As metodologias adotadas para a obtenção de embriões somáticos a partir de explantes cotiledonares mostraram-se eficientes. Verificou-se que o potencial embriogênico foi genótipo-específico, sendo que as cultivares CAC-1 e CD 219 RR apresentaram as melhores respostas, com médias de produções de embriões por cotilédones de 10,83 e 13,36, respectivamente. Apenas embriões derivados da cultivar CAC-1 germinaram, sendo possível aclimatizar oito plantas dessa cultivar. Para os experimentos de organogênese, foram utilizadas sementes de soja das variedades CAC-1, sendo possível recuperar 156 plantas regeneradas. Essas foram submetidas à análise de fidelidade clonal por meio da utilização de marcadores ISSR, tendo sido identificadas oito plantas com variações no padrão de amplificação em relação a cultivar CAC-1. Além disso, as mesmas plantas foram submetidas a análises da porcentagem de óleo e de proteína por meio da metodologia NIRS. Plantas com elevados

conteúdos de óleo e de proteína, quando comparadas com as testemunhas, foram identificadas, indicando presença de possíveis variantes somaclonais. Em conjunto, os resultados do presente trabalho indicam protocolos que podem ser utilizados, posteriormente, em experimentos de transformação genética de soja, aplicáveis no Programa de Melhoramento Genético da Qualidade do Óleo e Proteína da Soja em desenvolvimento no BIOAGRO/UFV.

ABSTRACT

MENDONÇA, Maria Andréia Corrêa, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2010. **Methodology standardization for regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis and for acclimatization of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Adviser: Maurílio Alves Moreira. Co-Advisers: Everaldo Gonçalves de Barros and Wagner Campos Otoni.

Different methodologies for *in vitro* regeneration have already been developed for several soybean cultivars. However, this species has proven to be recalcitrant to tissue culture and its *in vitro* morphogenetic response has been considered genotype dependent. Taking into account the need to develop reliable protocols for regeneration and acclimatization in soybean, the objectives of this study were to induce somatic embryogenesis and organogenesis in order to standardize protocols. Somatic embryos were obtained from immature cotyledons of four commercial soybean cultivars: CAC-1, CD 219 RR, CS 303 TNKCA and FMT Tucunaré. The methodologies for somatic embryogenesis adopted were effective. It was found that the embryogenic potential was genotype-specific, and the cultivars CAC-1 and CD 219 RR showed the higher responses, with an average of 10.83 and 13.36 somatic embryos per responding cotyledon respectively. Only somatic embryos derived from CAC-1 were able to regenerate plants, leading to eight acclimatized plants. Direct organogenesis was achieved from cotyledonary nodes of CAC-1 soybean and 156 regenerated plants were recovered. Clonal fidelity was evaluated through the use of the ISSR marker assay and eight recovered plants showed variations in the amplification profile. In addition, the same plants were analyzed for oil and protein content using the NIRS methodology. Plants with higher oil and protein contents in comparison with CAC-1 control plants were identified, indicating the presence of somaclonal variation. Taken together, the results of this study indicate specific

protocols that can be used for soybean genetic transformation in the Soybean Quality Breeding Program that is under development at BIOAGRO/UFV.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Originária da China, a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é um dos produtos agrícolas que sofreu maior expansão do seu cultivo no Brasil e no mundo. A excelente combinação entre produtividade e características de interesse para a indústria de alimentos contribuiu para a formação de um vasto complexo agro-industrial destinado ao processamento dos produtos derivados da soja, utilizados na constituição de ração animal e na alimentação humana por ser uma fonte protéica de boa qualidade.

Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo. A produção para a safra 2009/2010 está estimada em 67,86 milhões de toneladas, sendo 18,7% ou 10,7 milhões de toneladas superior à produção atingida na safra 2008/2009, que foi de 57,17 milhões de toneladas. Além disso, houve um crescimento de 6,9% na área cultivada com essa oleaginosa, correspondendo a um ganho de 1,5 milhões de hectares sobre a safra anterior, passando para 23,24 milhões de hectares cultivados. O referido aumento é atribuído às boas condições climáticas aliadas ao alto nível tecnológico (CONAB, 2010).

Dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC, 2010) mostram que a soja e seus derivados têm uma importante participação nas exportações brasileiras. Em 2009, o faturamento das exportações do complexo soja foi de cerca de US\$ 17 bilhões, o que representou, aproximadamente, 11,3% do total das exportações nacionais. Desse modo, a cultura da soja constitui um dos principais produtos da pauta de exportações do Brasil.

A utilização de métodos convencionais de melhoramento aliada às técnicas moleculares de transferência de genes *in vitro* tem permitido um rápido desenvolvimento de novas variedades para a agroindústria (Joshi e Dhawan, 2007), levando a obtenção de cultivares mais produtivas e com maior valor

nutricional, além de oferecer alternativas importantes para vários problemas de caráter econômico ou relacionados à melhoria na qualidade de vida humana.

O Programa de Melhoramento Genético da Qualidade da Soja em desenvolvimento no BIOAGRO/UFV tem feito esforços para a obtenção de plantas geneticamente modificadas, por meio da utilização de ferramentas biotecnológicas. Visando a alcançar esse objetivo, trabalhos foram desenvolvidos envolvendo desde a construção de cassetes de expressão para o silenciamento gênico até a transformação genética. Entretanto, ainda não foi possível recuperar plantas transgênicas agronomicamente viáveis a partir de metodologias de embriogênese somática (Lima, 2005) ou de organogênese a partir de nós cotiledonares (Martins, 2007).

Para que a transformação genética seja realizada, protocolos confiáveis e eficientes de regeneração e de seleção devem ser desenvolvidos, permitindo a conversão dos explantes transformados em plantas transgênicas. Nesse sentido, o desenvolvimento de metodologias que aumentem a taxa de regeneração ainda continua sendo um importante objetivo a ser alcançado dentro do Programa de Melhoramento Genético da Qualidade do Óleo e Proteína da Soja em desenvolvimento no BIOAGRO/UFV.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais da cultura de tecidos vegetais

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.

2.1.1. Embriogênese somática

Embriogênese somática é definida como um processo pelo qual embriões bipolares se desenvolvem a partir de células somáticas sem que ocorra a fusão de gametas, compreendendo uma sequência de etapas que se inicia com a indução e multiplicação de culturas pró-embriogênicas, seguido pela formação e desenvolvimento dos embriões somáticos e sua conversão em plântulas (Von Arnold et al., 2002).

Uma característica peculiar dos embriões somáticos é a presença de um sistema vascular fechado, sem conexão com os tecidos do explante inicial. Essa característica, aliada a sua bipolaridade, diferem os embriões somáticos dos propágulos resultantes dos processos de micropropagação e de organogênese (Guerra et al., 1998).

A transição das células do estado somático para o embriogênico é mediada por mecanismos de adaptação ao estresse imposto pelas condições de cultivo *in vitro* (Fehér et al., 2003; Fehér, 2005). Fatores como a fonte de

explante, o genótipo do material doador e o tipo e nível de reguladores de crescimento utilizados afetam a indução e o controle da embriogênese somática (Guerra et al., 1998; Fuentes et al., 2000).

Os principais reguladores de crescimento envolvidos no controle da divisão celular e da diferenciação dos tecidos vegetais são as auxinas e as citocininas (Fehér et al., 2003). As auxinas, além de serem importantes na indução da aquisição de competência embriogênica *in vitro*, também desempenham função essencial no desenvolvimento do embrião zigótico. Entre as auxinas sintéticas, o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) tem-se apresentado mais eficiente para a indução de embriogênese somática e, por essa razão, tem sido utilizado para o estabelecimento da maioria dos sistemas embriogênicos (Zimmerman, 1993; Fehér et al., 2003; Raghavan, 2004; Fehér, 2005).

A embriogênese somática tem recebido destaque entre as técnicas de cultura de tecidos por ser um processo eficiente de regeneração de plantas *in vitro* e propagação em larga escala, além de contribuir para o entendimento dos aspectos fisiológicos e moleculares da diferenciação celular (Dudits et al., 1995; Dunstan et al., 1995; Guerra et al., 2001; Fehér et al., 2003; Von Arnold et al., 2002; Zimmerman, 1993). Essa metodologia já foi descrita para várias espécies de interesse agrônômico, tais como soja (Lazzeri et al., 1985; Ranch et al., 1985; Ghazi et al., 1986; Hammatt e Davey, 1987; Santos, 1997; Meurer et al., 2001; Ko et al., 2004), milho (Lu et al., 1982), arroz (Rueb et al., 1994; Ramaswamy e Rajesh, 2003) e, provavelmente, pode ser demonstrada para todas as espécies de plantas, desde que condições apropriadas sejam empregadas (Von Arnold et al., 2002).

Em soja, a regeneração via embriogênese somática tem sido bastante estudada (Finer e Nagasawa, 1988; Ko et al., 2003; Ko e Korban, 2004), com reconhecido potencial para produção de grande quantidade de embriões de plantas independentemente transformadas (Finer e McMullen, 1991). No entanto, um número limitado de cultivares de soja tem mostrado respostas embriogênicas satisfatórias (Simmonds e Donaldson, 2000; Meurer et al.,

2001). Diversos trabalhos de otimização do sistema embriogênico têm demonstrado que entre os fatores que influenciam a embriogênese somática em soja estão o tipo de explante, o pH do meio e o genótipo da planta (Ko et al., 2003; Hoffman et al., 2004; Ko e Korban, 2004).

2.1.2. Organogênese

A organogênese *in vitro* é uma via de regeneração em que célula e tecidos são induzidos a sofrer mudanças originando uma estrutura unipolar conhecida como primórdio caulinar (caulogênese) ou de raiz (rizogênese), no qual o sistema vascular está freqüentemente conectado ao tecido parental (Thorpe, 1994). Por meio desse processo, os tecidos vegetais produzem órgãos adventícios *in vitro*, podendo ocorrer direta (sem formação de calo) ou indiretamente (com formação de calo). O calo é uma massa compacta de células desorganizadas, em diferentes estágios de desdiferenciação (Alves, 1999).

Segundo Christianson e Warnick (1988), o processo de organogênese *in vitro* pode ser dividido em etapas: desdiferenciação, aquisição de competência, indução, determinação, diferenciação e formação do órgão. Nesse processo, a competência é entendida como a capacidade de responder ao estímulo hormonal necessário para indução da formação do órgão. Outro fator ligado à competência organogenética é o próprio metabolismo hormonal do explante, pois ele determina o balanço hormonal endógeno para a indução da organogênese (Peres e Kerbauy, 1999).

Protocolos de regeneração por organogênese têm sido estabelecidos para diferentes tipos de explantes em soja, dentre os quais podem ser citados os nós cotiledonares, os nós primários e o meristema apical do eixo embrionário (Widholm et al., 2010)

Nós cotiledonares provenientes de sementes maduras de soja têm se mostrado muito responsivos à indução de múltiplos brotos via organogênese, sendo utilizados em diferentes laboratórios para obtenção de soja transgênica

(Olhoft et al., 2001, 2003, 2006; Zeng et al., 2004; Paz et al., 2006; Xue et al., 2006; Yi et al., 2006). No entanto, o número de brotos recuperados a partir desses explantes tem sido relativamente baixo. Dessa forma, estudos realizados no sentido de aumentar a eficiência da organogênese por meio do aumento do número de brotos induzidos, ainda se fazem necessários.

2.2. Transformação genética de soja

Os primeiros trabalhos visando à transformação genética em soja envolveram a utilização de *Agrobacterium tumefaciens* para obter plantas regeneradas a partir de nós cotiledonares (Hinchee et al., 1988) e o sistema de biobalística para a transformação de meristemas apicais do eixo embrionário (McCabe et al., 1988). Abaixo são descritas as principais metodologias para a transformação genética em soja e os eventos de transformação de importância agrônômica, segundo revisão feita por Widholm et al.(2010).

2.2.1. Principais metodologias utilizadas para transformação genética em soja

a) Sistema de transformação utilizando organogênese

Três tipos de explantes têm sido utilizados nas metodologias de transformação genética utilizando a via organogenética. São eles:

(i) Nós cotiledonares. Por este método, sementes são germinadas em meio de cultura, os nós cotiledonares são precisamente preparados e feridos, para permitir o acesso da *A. tumefaciens* ao tecido, e cultivados em meio apropriado, dando origem a múltiplos brotos. A produção de uma massa proliferativa de brotos é desejável e as células iniciais que dão origem a esses brotos são o real alvo de transformação. Os brotos formados são submetidos a um agente seletivo, por meio do qual apenas os transformados são selecionados. Os subsequentes processos de alongamento e enraizamento dos brotos constituem a fase final de regeneração das plantas transgênicas. Vários

trabalhos utilizando esse sistema já foram relatados (Olhoft et al. 2001, 2003, 2006; Zeng et al., 2004; Paz et al., 2006; Xue et al., 2006; Yi et al., 2006).

(ii) Nós primários ou caulinares. Utilizando uma metodologia similar à anteriormente descrita, Olhoft et al. (2007) desenvolveram um sistema utilizando nós axilares do caule como explantes para transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes*.

(iii) Bombardeamento de meristema apical (*shoot tip*). Essa metodologia combina a técnica de biobalística com a indução de brotos a partir dos eixos embrionários retirados de sementes maduras. Por meio dessa estratégia foi possível produzir o evento que originou a primeira geração da soja RoundupReady (RR), que proporcionou um profundo impacto na prática agrícola. Essa tecnologia, combinada à utilização da resistência a herbicidas do grupo das imidazolinonas como marcador seletivo, tem sido recentemente utilizada com sucesso, destacando-se o protocolo desenvolvido por Rech et al. (2008).

b) Sistema de transformação de culturas embriogênicas

A transformação genética de culturas embriogênicas de soja é uma das metodologias mais difundidas para obtenção de plantas transgênicas nessa espécie. Em virtude disso, a regeneração via embriogênese somática em soja tem sido bastante estudada (Lazzeri et al., 1985; Finer e Nagasawa, 1988; Parrot et al., 1994; Santarém et al., 1997; Ko et al., 2003). Essas culturas são obtidas por meio de cultivo de cotilédones imaturos na presença de altas concentrações de 2,4 – D. Os níveis apropriados de auxina induzem a formação de embriões, mas inibem seu desenvolvimento. Quando os níveis de auxina são reduzidos, os embriões continuam seu desenvolvimento, desde que se disponibilizem nutrientes e condições de crescimento apropriado.

c) VIGS (Virus-induced gene silencing)

Embora seja uma técnica de expressão transiente, o silenciamento gênico induzido por vírus pode ser muito útil para caracterização funcional de genes e promotores. Com esse objetivo, Nagamatsu et al. (2007) utilizaram o

vetor viral CMV (*Cucumber Mosaic Virus*), de ampla faixa de hospedeiros, como carreador de uma sequência *antisense* para um mRNA da chalcona sintase. A infecção de plantas de soja não provocou sintomas característicos da presença viral, mas as sementes, que eram marrons, ficaram amarelas, indicando o silenciamento gênico.

2.2.2. Eventos de importância agrônômica e nutricional mais utilizados na transformação de soja

a) Resistência a herbicida

Inquestionavelmente a característica introduzida na soja de maior importância econômica foi a resistência ao herbicida glifosato (Roundup®). Segundo James (2007) cultivares tolerantes a esse herbicida (popularmente conhecidas como cultivares de soja RR) estão sendo plantadas em mais de 50 milhões de hectares em todo o mundo. O glifosato é um herbicida que interfere na via de biossíntese de aminoácidos aromáticos, inibindo a atividade da enzima glifosato 5-enolpiruvilshiquimato-3-fostato sintase (EPSPS, E.C. 2.5.1.19), que catalisa a síntese de 5-enolpiruvilshiquimato-3-fostato (EPSP) a partir de fosfoenol-piruvato (PEP) e shiquimato 3-fostato (Reade e Cobb, 2002; Tan et al., 2006). Para a obtenção do evento de transformação que originou muitas linhagens de soja resistentes ao glifosato comercializadas desde 1996, uma sequência de *A. tumefaciens*, que codifica uma EPSPS insensível ao glifosato, foi isolada e inserida em soja utilizando bombardeamento de meristema apical (McCabe et al., 1988). A expressão do gene repórter *gusA* foi utilizado para seleção visual de linhagem de soja resistente ao glifosato.

Além da resistência ao glifosato, variedades resistentes a glufosinato de amônio (ingrediente ativo dos herbicidas Basta®, Ignite®, Rely®, Liberty®, Harvest® e Finale®, dentre outros) já foram produzidas. O glufosinato de amônio é um composto natural isolado de duas espécies de fungos do gênero *Streptomyces*. Ele inibe a atividade da enzima glutamina sintetase (GS, E.C.

6.2.1.2), provocando deficiência de glutamina e acúmulo de amônia nas plantas (Reade e Cobb, 2002; Tan et al., 2006).

No Brasil, a EMBRAPA em parceria com a BASF, recentemente, desenvolveram uma soja resistente a herbicidas do grupo das imidazolinonas, por meio da inserção do gene *ahas* mutante, isolado de *Arabidopsis thaliana*, que codifica uma proteína que contém uma modificação no resíduo de aminoácido da posição 653, em que um resíduo de serina é substituído por um de asparagina. Esta alteração faz com que a enzima se torne especificamente tolerante aos herbicidas da classe das imidazolinonas (Tan et al., 2006). O procedimento de transformação genética foi realizado por meio do bombardeamento de micropartículas em explantes oriundos do meristema apical de embriões.

b) Resistência a insetos

A expressão do gene *cry1AC*, proveniente da bactéria *Bacillus thuringiensis*, em soja, tem contribuído para o controle da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*). Segundo Zhu et al. (2008), uma resistência eficiente tem sido alcançada quando cruzamentos são utilizados para piramidar eventos transgênicos com genes de resistência já encontrados em soja.

c) Resistência a doenças

O mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, é uma das doenças que tem causado grandes prejuízos para a cultura da soja. Esse fungo secreta ácido oxálico, que atua como um fator de patogenicidade, danificando o tecido vegetal. Dessa forma, existe grande interesse na inserção de um gene que codifica oxalato oxidase, capaz de degradar ácido oxálico a dióxido de carbono e peróxido de hidrogênio. Plantas transformadas carregando um gene de trigo que codifica uma oxalato oxidase, sob o controle do promotor 35S, mostram um nível de resistência a *S. sclerotiorum* semelhante àquele apresentado por cultivares naturalmente resistentes. Também já foram obtidas variedades de soja resistentes ao vírus do Mosaico Amarelo do Feijoeiro (*Bean*

Pod Mottle Virus - BPMV) (Di et al., 1996) e ao vírus do Mosaico Comum da Soja (*Soybean Mosaic Virus - SMV*) (Wang et al., 2001; Tougou et al., 2006).

d) Resistência a nematóides

Ibrahim et al. (2010) construíram cassetes visando ao silenciamento de dois genes de *Meloidogyne incognita* – *TP* (*tyrosine phosphatase*) e *MSP* (*mitochondrial stress-70 protein precursor*) – para transformar raízes de soja, via *A. rhizogenes*. Os genes alvo apresentam alta similaridade com genes do nematóide do cisto da soja (*Heterodera glycines*) e o silenciamento desses genes reduziu a formação de galhas em mais de 90% durante a infecção por *M. incognita*. Dessa forma, a metodologia descrita pode representar uma solução promissora para o desenvolvimento de variedades de soja com ampla resistência a nematóides.

e) Composição da semente

Os alvos da transformação genética visando a alterações na composição das sementes são:

(i) Alteração da fração óleo. O alto teor de ácidos graxos poli-insaturados tem sido correlacionado com a redução da estabilidade oxidativa e da qualidade (sabor e odor) do óleo de soja, gerando compostos de baixo peso molecular, voláteis, que produzem *off-flavor* e rancidez (Yadav, 1996). Com o aumento no teor de ácido oléico e a conseqüente redução nos teores de ácido linoléico e linolênico, aumenta-se a estabilidade do óleo, reduzindo ou eliminando a necessidade de hidrogenação, que é responsável pela produção indesejável dos ácidos graxos trans (Lima, 2005), frequentemente associados às doenças cardiovasculares (Widholm et al., 2010). Dessa forma, vários ensaios de transformação genética foram realizados buscando aumento do acúmulo de ácido oléico nas sementes (Kinney, 1996; Buhr et al., 2002). Para tanto, culturas embriogênicas foram utilizadas, uma vez que esse sistema permite a quantificação das modificações em embriões maduros, ou seja, antes que planta seja regenerada. Kinney (1996), utilizando construções para cossupressão, obteve linhagens com reduzido conteúdo de ácido palmítico,

com níveis de ácido oléico superiores a 80% e com conteúdo de ácido esteárico superior a 30%. Buhr et al. (2002) obtiveram linhagens com expressão reduzida do gene *fad2-1* que produziam aproximadamente 57% de ácido oléico, enquanto sementes de soja não transformadas apresentavam aproximadamente 18% deste ácido graxo. Além disso, quando os mesmos autores combinaram o silenciamento dos genes *fad2-1* e *fatB*, foi possível obter níveis de ácido oléico superiores a 85% e de ácidos graxos poli-insaturados inferiores a 6%.

(ii) Composição protéica. As sementes de soja contêm em torno de 40% de proteínas, compostas por uma mistura de α , β e γ -conglucininas, glicinina e outras globulinas como a P34. As sementes também contêm proteínas com outras funções incluindo β -amilase, citocromo c, lectinas, lipoxigenases, urease, KTI (inibidor de tripsina de Kunitz) e os inibidores tipo BBI (Bowman-Birk) de tripsina e quimiotripsina. Proteínas de soja são consideradas deficientes em metionina, que é um aminoácido essencial; e, apesar de possuírem um maior teor de lisina que o trigo, a quantidade deste nutriente ainda é menor que o teor encontrado na caseína presente no leite. Além disso, adversidades nutricionais e outros efeitos que se seguem ao consumo de soja crua são atribuídos à presença de inibidores endógenos de enzimas digestivas e lectinas que dificultam a digestão, além de fatores alergênicos (Friedman e Brandon, 2001). Dentre estes fatores alergênicos se destaca a proteína Gly mBd 30K (P34) (Kalinski et al., 1992). Herman et al. (2003) relataram o silenciamento da P34. Kinney et al. (2001) realizaram trabalho envolvendo a supressão dos genes que codificam para as subunidades α e α' da β -conglucinina. O conteúdo protéico total não foi alterado, uma vez que mais proteína glicinina foi produzida nessas sementes. Schimidt e Herman (2008) expressaram a proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein - GFP*) dirigida pelo promotor da glicinina em soja e essa linhagem transformada foi cruzada com uma deficiente em β -conglucinina, gerando plantas que acumulavam *GFP* em quantidades superiores a 7% do proteoma total da semente. Esses dados indicaram um

rebalanceamento do proteoma da semente, que poderá ser explorado para produção de proteínas heterólogas em sementes de soja.

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

(iv) Ácido fítico ou fitato. O fitato é um composto de reserva de fósforo, utilizado durante a germinação de sementes. Nesse processo, fósforo é disponibilizado ao embrião por meio da atividade de uma fitase. Quando a soja é fornecida como alimento para animais não ruminantes, grande parte do fitato não é digerida, sendo excretada no ambiente, podendo provocar a aceleração do processo de eutrofização, resultando em deterioração da qualidade da água (Fireman e Fireman, 1998). Genes que codificam fitases de fungo (Denbow et al., 1998), de bactéria (Bilyeu et al., 2008) e de soja (Chiera et al., 2004) têm sido expressos em sementes soja com a finalidade de reduzir os níveis de ácido fítico. Reduções nos níveis de fitato e maior disponibilização de fósforo para absorção foram observadas em todos os casos. No entanto, houve redução no potencial germinativo das sementes transgênicas (Bilyeu et al., 2008).

2.3. Variação somaclonal

A variação somaclonal pode ser definida como a variação encontrada entre células, embriões, órgãos ou plantas derivadas de cultura *in vitro*. Pode envolver alterações cromossômicas numéricas e estruturais, mutações gênicas, ativações de elementos transponíveis, permutas entre cromátides-irmãs, inserções e deleções no DNA, mudanças no padrão de metilação e alterações no DNA mitocondrial e cloroplastidial (Bennici et al., 2004).

Diversos fatores têm sido apontados como possíveis causas da variação somaclonal, dentre os quais se destacam a resposta à composição física e/ou

química do meio de cultura e a expressão de genes essenciais no controle do número cromossômico, que pode ser afetada durante os processos de cultura de tecidos (Jain, 2001).

Segundo Jain (2001), o sistema de cultivo *in vitro*, por si só, atua como um sistema mutagênico, uma vez que as células são submetidas a situações de estresse durante o isolamento de explantes e à reprogramação celular. Tais eventos não ocorrem em condições normais de desenvolvimento e podem desencadear variações somaclonais.

Dois aspectos da variação somaclonal devem ser considerados: (i) o fato de esse fenômeno ser utilizado, com algum sucesso, como fonte de variabilidade por melhoristas de plantas e (ii) o fato de esse fenômeno ser um processo aleatório e não controlável, resultando em plantas com características indesejáveis. Nesse sentido, a variação somaclonal tende a reduzir o potencial organogênico (Wyman et al., 1992), embriogênico (Bennici et al., 2004) e regenerativo das culturas *in vitro*, prejudicando etapas fundamentais à manipulação genética e ao melhoramento de plantas, diminuindo a eficiência dos processos de micropropagação, o que pode resultar em plantas com reduzido valor comercial (Bennici et al., 2004). Entretanto, espécimes derivados de cultivo *in vitro* que apresentem variações somaclonais podem exibir fenótipos normais (Wyman et al., 1992). Devido a esses fatos, a determinação da estabilidade genética de células, embriões, órgãos ou plantas derivadas desse tipo de cultivo é um processo necessário para assegurar o sucesso dos programas de melhoramento que utilizam a cultura de tecidos em uma de suas etapas (Wyman et al., 1992).

A ocorrência de variação somaclonal pode ser detectada por meio de diversas técnicas, dentre as quais podem ser citadas: contagem e análise de aberrações numéricas e estruturais em cromossomos mitóticos e meióticos, citometrias de fluxo e imagem, tamanho dos estômatos, número de cloroplastos nas células-guarda e utilização de marcadores moleculares (Bennici et al., 2004).

O uso de marcadores moleculares ainda é, potencialmente, a melhor metodologia para o acesso à variação somaclonal (Jin et al., 2008). Diversos trabalhos têm demonstrado a importância desses marcadores para estudos de estabilidade genética em diferentes espécies de plantas regeneradas via cultura de tecidos, dentre as quais podem ser citadas *Actinidia* sp. (Palombi e Damiano, 2002); *Anthurium andreanum* (Gantait et al., 2008); *Anoectochilus formosanus* (Zhang et al., 2010); *Arabidopsis thaliana* (Polanco e Ruiz, 2002); *Capparis decidua* (Tyagi et al., 2010); *Dendranthema grandiflora* (Kengkarj et al., 2008); *Foeniculum vulgare* (Bennici et al., 2004); *Musa spp.* (Ray et al., 2006; Venkatachalam, 2007; Rout et al., 2009); *Oryza sativa* (Kim et al., 2003; Ngezahayo et al., 2007); *Quercus robur* (Valladares et al., 2006); *Solanum melongena* (Xing et al., 2010); *Swertia chirayita* (Joshi e Dhawan, 2007); e *Tigridia pavonia* (Piña-Escutia et al., 2010).

Em soja, a variação somaclonal tem sido avaliada por meio da análise de características fenotípicas, em plantas regeneradas via organogênese ou embriogênese somática (Barwale e Widholm, 1987; Freytag et al., 1987; Graybosh et al., 1987; Amberger et al., 1992; Widholm, 1996; Radhakrishnam e Kumari, 2008, 2009). Radhakrishnam e Kumari (2008) avaliaram características fenotípicas relacionadas à produtividade em plantas regeneradas por organogênese, não tendo reportado efeitos prejudiciais nem benéficos que poderiam ser associados à existência de variações somaclonais. No entanto, Radhakrishnam e Kumari (2009) e Nguyen et al. (2001), analisando o perfil protéico de sementes de soja oriundas de processos de micropropagação, descreveram modificações no conteúdo de proteína de algumas plantas, associando isso à ocorrência de variações somaclonais.

Relativamente poucos trabalhos têm relatado a utilização de marcadores moleculares para identificação de variação somaclonal causada por sistemas de cultivo *in vitro* em soja. Roth et al. (1989), trabalhando com culturas de raízes, folhas e cotilédones mantidas por mais de mil subcultivos, identificaram variações genéticas nas culturas de raízes por meio da utilização de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Hoffman et al. (2004)

utilizaram EMS (metano sulfonato de etila) para induzir mutagênese em culturas embriogênicas de soja e, por meio da utilização de marcadores RAPD, identificaram fragmentos polimórficos entre as culturas embriogênicas, demonstrando a aplicação desse tipo de marcador na identificação de polimorfismos em culturas embriogênicas.

Marcadores RAPD também foram utilizados com sucesso por Gesteira et al. (2002) na avaliação da estabilidade genética de plantas de soja regeneradas via embriogênese somática. Os autores identificaram uma freqüência de variação somaclonal de 4,5% e 3,57% para as cultivares Spring e CAC-1, respectivamente, demonstrando a utilidade desses marcadores como ferramentas para o monitoramento de estabilidade genética durante processos de regeneração.

2.4. Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares constituem regiões do genoma possíveis de serem detectadas, cuja presença ou ausência pode caracterizar um organismo e cuja sequência e função, na maioria das vezes, são desconhecidas (Gostimsky et al., 1999). Esses marcadores mostram-se muito sensíveis à detecção do polimorfismo, visto que as diferenças entre as sequências nucleotídicas de cada indivíduo revelam uma impressão digital genética, que pode ser útil na identidade de cada organismo.

As técnicas moleculares, que estão praticamente substituindo os marcadores morfológicos, apresentam várias vantagens: (i) possibilidade de detecção de um número praticamente ilimitado de marcas moleculares; (ii) ausência de variações por causa do ciclo de vida da planta e (iii) não influência das condições ambientais (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

O primeiro marcador molecular baseado no DNA, o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), foi desenvolvido na década de 70, com a descoberta das enzimas de restrição. Em meados de 80, com o advento das técnicas de biologia molecular, principalmente a técnica de PCR (*Polymerase*

Chain Reaction), novas classes de marcadores foram desenvolvidas, destacando-se: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*); STS (*Sequence Tagged Sites*); SSR (*Single Sequence Repeats*) e ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Cada marcador apresenta sua particularidade, diferenciando-se entre si pela repetibilidade e complexidade da técnica, custo, tempo consumido, nível de polimorfismo detectado entre os indivíduos, quantidade exigida de material biológico, tipo de segregação (dominante ou co-dominante), entre outros. A escolha de um marcador molecular depende do objetivo do trabalho, das considerações das técnicas, da disponibilidade de recursos e das facilidades do laboratório (O'Hanlon et al., 1999).

2.4.1. Marcadores ISSR

ISSR é um marcador molecular associado ao uso de sequências microssatélites, que são sequências simples repetidas, organizadas em *tandem*, abundantemente distribuídas ao longo de todo o genoma de eucariotos (Wang et al., 1994; Ratnaparkhe et al., 1998; Liu e Wendel, 2001).

A análise de ISSR consiste na amplificação, via PCR, de regiões do DNA genômico que compreendem dois microssatélites idênticos, adjacentes e inversamente orientados, apresentando distância suficientemente amplificáveis (Reddy et al., 2002; Assefa et al., 2003). Na técnica de ISSR utiliza-se um único *primer* complementar às sequências microssatélites, podendo ser não ancorado (Gupta et al., 1994; Wu et al., 1994) ou, mais usualmente, ancorado na extremidade 5' ou 3', com 1 a 4 bases degeneradas (Zietkiewicz et al., 1994).

A detecção do polimorfismo via ISSR é realizada a partir da visualização de bandas de diferentes tamanhos em gel de poliacrilamida ou agarose, sendo que cada banda corresponde a uma sequência de DNA delimitada por dois microssatélites invertidos. A interpretação dos dados é realizada de forma simples: bandas em comum entre genótipos representam similaridades

genéticas, enquanto bandas incomuns representam diferenças genéticas (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os marcadores ISSR apresentam melhor reprodutibilidade das bandas quando comparado com o RAPD, devido ao uso de *primers* longos, de 16 - 25 pb de comprimento, os quais permitem a utilização de temperaturas de pareamento mais altas, resultando em condições de elevada estringência (Reddy et al., 2002). Outras vantagens são a dispensa de prévia informação da sequência genômica, como requerido pelo SSR, e o baixo custo da técnica, quando comparado ao AFLP (Reddy et al., 2002). Estudos também demonstram que os ISSR detectam níveis de polimorfismo similares ou superiores aos RFLP e RAPD (Godwin et al., 1997; Nagaoka e Ogihara, 1997).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho foi realizado com objetivo de induzir embriogênese somática, a partir de cotilédones imaturos de soja, e organogênese, a partir de nós cotiledonares de sementes maduras de soja, visando à padronização de metodologias para regeneração e aclimatização de plantas.

3.2. Objetivos específicos

- Induzir e isolar embriões somáticos a partir de cotilédones imaturos de quatro cultivares comerciais de soja: CAC-1, CD 219 RR, CS 303 TNKCA e FMT Tucunaré;
- Induzir organogênese a partir de nós cotiledonares da cultivar CAC-1;
- Padronizar protocolo de regeneração e aclimatização de plântulas obtidas a partir de cultivo *in vitro* por organogênese e embriogênese;
- Avaliar a fidelidade clonal de plantas de soja regeneradas via organogênese em relação à planta matriz, por meio da determinação dos teores de óleo e de proteína em sementes de soja e por meio da utilização de marcadores moleculares do tipo ISSR.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, A. C. Estudos anatômicos da organogênese *in vitro* de soja e otimização do processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. Dissertação mestrado. 107p. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP 1999.

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

Assefa, K., Merker, A., Tefera, H.: Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic diversity in tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. - *Hered.* 139: 174-183, 2003.

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

Bennici, A., Andizei, M., Vendramin, G. G.: Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. - *Plant Sci.* 166: 221-227, 2004.

Bilyeu, K. D., Zheng, P., Coello, P., Zhang, Z. J., Krishnan, H. B., Bailey, A., Beuselinck, P. R., Polacco, J. C.: Quantitative conversion of phytate to inorganic phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase. - *Plant Physiol.* 146: 468-477, 2008.

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

Chiera, J. M., Finer, J. J., Grabau, E. A.: Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability. - Plant Mol. Biol. 56: 895-904, 2004.

Christianson, M. L., Warnick, D. A.: Organogenesis *in vitro* as a development process. Hort. Sci. 23: 515-519, 1988.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: www.conab.gov.br . Acessado em 26/05/2010.

Denbow, D. M., Grabau, E. A., Lacy, G. H., Kornegay, E. T., Russell, D. R., Umbeck, P. F.: Soybean transformed with a fungal phytase gene improve phosphorous availability for broilers. - Poult. Sci. 77:878–881, 1998.

Di, R., Purcell, V., Collins, G. B., Ghabril, S. A.: Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. - Plant Cell Rep. 15: 746-750, 1996.

Dudits, D., Györgyey, J., Bögre, L., Bakó, L.: Molecular biology of somatic embryogenesis. - In: Thorpe, T. A. (ed.): *In vitro* embryogenesis in plants. Pp. 267-308. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1995.

Dunstan, D. I., Tautorus, T. E., Thorpe, T. A.: Somatic embryogenesis in woody plants. - In: Thorpe, T. A. (ed.): *In vitro* embryogenesis in plants. Pp. 471-538. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1995.

Fehér, A., Pasternak, T. P., Dudits, D.: Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. - Plant Cell Tiss. Org. 74: 201-228, 2003.

Fehér, A.: Why somatic plant cells start to form embryos? - In: Mujib, A., Samaj, J. (ed.): Somatic embryogenesis. Pp. 85-101. Springer-Verlag - Berlin 2005.

Ferreira, M. E., Grattapaglia, D.: Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. - Embrapa - Brasília 1998.

Finer, J. J., McMullen, M. D.: Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension tissue culture. -*In vitro* Cell. Dev-Pl. 27: 175-182, 1991.

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

Fireman, A. K. B. A. T., Fireman, F. A. T.: Fitase na alimentação de poedeiras. - Cienc. Rural - 28(3): 529-534, 1998.

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

Friedman, M., Brandon, D. L.: Nutritional and health benefits of soy proteins. - J. Agric. Food Chem. 49: 1069-1084, 2001.

Fuentes, S. R. L., Calheiro, M. B. P., Manetti-Filho, J., Vieira, L. G. E.: The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. - Plant Cell Tiss. Org. 60: 5-13, 2000.

Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., Das, P. K.: *In vitro* mass multiplication with pure genetic identity in *Anthurium andreanum* Lind. - Plant Tiss. Cult. Biotechnol. 18(2): 113-122, 2008.

Gesteira, A. S., Otoni, W. C., Barros, E. G., Moreira, M. A.: RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. - Plant Breed. 121: 269-271, 2002.

Ghazi, T. D., Cheema, H. V., Nabors, M. W.: Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus of soybean, *Glycine max* L. - Plant Cell Rep. 5: 452-456, 1986.

Godwin, I. D., Aitken, E. A. B., Smith, L. M.: Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. - Electroph. 18: 1524-1528, 1997.

Gostimsky, S. A., Kokaeva, Z. G., Bobrova, V. K.: Use of molecular markers for the analysis of plant genome. - Rus. J. Genet. 11(35): 1538-1549, 1999.

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

Guerra, M. P., Dal Vesco, L., Ducroquet, J. P. H. J., Nodari, R. O., Reis, M. S.: Somatic embryogenesis in Goiabeira Serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. - Braz. J. Plant Physiol. 13: 117-128, 2001.

Guerra, M. P., Torres, A. C., Teixeira, J. B.: Embriogênese somática e sementes sintéticas. - In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. (ed.): Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas (2). Pp. 533-568. Embrapa - Brasília 1998.

Gupta, M., Chyi, Y. S., Romero-Severson, J., Owen, J. L.: Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. - Theor. Appl. Genet. 89: 998-1006, 1994.

Hammatt, N., Davey, M. R.: Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured zygotic embryos of soybean (*Glycine max* L. Merr.). - J. Plant Physiol. 128: 219-226, 1987.

Herman, E. M., Helm, R. M., Jung, R., Kinney, A. J.: Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. - Plant Physiol. 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 gene transfer. - Bio. Technol. 6: 916-922, 1988.

Hofmann, N. E., Raja, R., Nelson, R. L., Korban, S. S.: Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers. - Biol. Plant. 48: 173-177, 2004.

Ibrahim, H. M. M., Alkharouf, N. W., Meyer, S. L. F., Aly, M. A. M., El-Din, A. E. K. Y. G., Hussein, E. H. A., Matthews, B. F.: Post-transcriptional gene silencing of root-knot nematode in transformed soybean roots. - Exp. Parasitol. doi: 10.1016/j.exppara.2010.06.037, 2010.

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

James, C.: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007. ISAAA Briefs N° 37. – Ithaca, New York 2007.

Jin, S., Mushke, R., Zhu, H., Tu, L., Lin, Z., Zhang, Y., Zhang, X.: Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. - Plant Cell Rep. 27(8): 1303-1316, 2008.

Joshi, P., Dhawan, V.: Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay. – Biol. Plant. 51: 22-26, 2007.

Kalinski, A. J., Melroy, D. L., Dwivedi, R. S., Herman, E. M.: A soybean vacuolar protein (P34) related to thiolproteases which is synthesized as a glycoprotein precursor during seed maturation. - H. Biol. Chem. 265: 12068-12076, 1992.

Kengkarj, P., Smitamana, P., Fujime, Y.: Assessment of somaclonal variation in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Kitam.) using RAPD and morphological analysis. - Plant Tiss. Cult. Biotechnol. 18(2): 139-149, 2008.

Kim, D. S., Lee, I. S., Hyun, D. Y., Jang, C. S., Song, H. S., Seo, Y. W., Lee, Y. E.: Detection of DNA instability induced from tissue culture and irradiation in *Oryza sativa* L. by RAPD analysis. - J. Plant Biotechnol. 5: 25-31, 2003.

Kinney, A. J., Jung, R., Herman, E. M.: Cosuppression of the α subunits of β -conglycinin in transgenic soybean seeds induces the formation of endoplasmic reticulum-derived protein bodies. - *Plant Cell* 13: 1165-1178, 2001.

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

Ko, T. S., Korban, S. S.: Enhancing the frequency of somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. - *In vitro Cell. Dev-Pl.* 40: 552–558, 2004.

Ko, T. S., 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 explants. - *Appl. Genet.* 107: 439-447, 2003.

Ko, T. S., Nelson, R. L., Korban, S. S.: Screening multiple soybean cultivars (MG 00 to MG VIII) for somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons. – *Crop Sci.* 44: 1825-1831, 2004.

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

Lima, A. B. P. Construção de cassete para co-supressão do gene da oleoil desaturase e transformação genética de embriões somáticos de soja. Tese Doutorado. 117p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG 2005.

Liu, B., Wendel, J. F.: Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as genetic marker system in cotton. - *Mol. Ecol. Not.* 1: 205-208, 2001.

Lu, C., Vasil, I. K., Ozias-Akins, P.: Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. - *Theor. Appl. Genet.* 62: 109-112, 1982.

Martins, P. K. Transformação de nós cotiledonares de soja visando à co-supressão do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase. Tese doutorado. 94p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG 2007.

McCabe, D. E., Swain, W. F., Martinell, B. J., Christou, P.: Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. - *Bio Technol.* 6: 923–926, 1988.

MDIC. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em www.mdic.gov.br. Acessado em 26/05/2010.

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

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

Nagaoka, T., Ogihara, Y.: Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. - *Theor. Appl. Genet.* 94: 597-602, 1997.

Ngezahayo, F., Dong, Y., Liu, B.: Somaclonal variation at the nucleotide sequence level in rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by RAPD and ISSR markers, and by pairwise sequence analysis. - *J Appl. Genet.* 48:329-336, 2007.

Nguyen, M. V., Nickell, C. D., Widholm, J. M.: Selection for high seed oil content in soybean families derived from plants regenerated from protoplasts and tissue cultures. - *Theor. Appl. Genet.* 102: 1072-1075, 2001.

O'hanlon, P. C., Peakall, R., Briese D. T.: Amplified fragment length polymorphism (AFLP) reveals introgression in weedy *Onopordum thistles*: hybridization and invasion. - Mol. Ecol. 8: 1239-1246, 1999.

Olhoft, P. M., Bernal, L. M., Grist, L. B., Hill, D. S., Mankin, S. 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 Cell. Dev-Pl.* 43: 536-549, 2007.

Olhoft, P. M., Donovan, C. M., Somers, D. A.: Soybean (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary mature node explants. – *Method. Mol. Biol.* 343: 385-396, 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. - *Plant* 216: 723–735, 2003.

Olhoft, P., Lin, K., Galbraith, J., Nielsen, N., Somers, D.: The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. - *Plant Cell Rep.* 20: 731-737, 2001.

Palombi, M. A., Damiano, C.: Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). - *Plant Cell Rep.* 20: 1061-1066, 2002.

Parrot, W. A., All, J. N, Adang, M. J., Bailey, M. A., Boerma, H. R., Stewart, C. N.: Recovery and evaluation of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal gene. - *In vitro Cell. Dev-Pl.* 30:144-149, 1994.

Paz, M. M., Martinez, J. C., Kalvig, A. B., Fonger, T. M., Wang, K.: Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature

seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. - Plant Cell Rep. 25: 206-213, 2006.

Peres, L. E. P., Kerbauy, G. B.: High cytokinin accumulation following root tip excision change the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lind. (Orchidaceae). - Plant Cell Rep. 18: 1002-1006, 1999.

Piña-Escutia, J. L., Vázquez-García, L. M., Arzate-Fernández, A. M.: *In vitro* regeneration and genetic fidelity of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. – Electron. J. Biotechnol. 13(1). doi: 10.2225/vol13-issue1-fulltext-1, 2010.

Polanco, C., Ruiz, M. L.: AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. - Plant Sci. 162: 817-824, 2002.

Radhakrishnan, R., Kumari, B. D. R.: Changes in protein content in micropropagated and conventional soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr.) - World J. Agri. Sci. 5(2): 186-189, 2009.

Radhakrishnan, R., Kumari, B. D. R.: Morphological and agronomic evaluation of tissue culture derived Indian soybean plants. - Acta Agri. Slovenica 91: 391-396, 2008.

Raghavan, V.: Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell assessed by RAPD and ISSR markers. - Plant Cell Rep. 23: 492-496, 2004.

Ramaswamy, N. M., Rajesh, M. K.: Induction and use of somatic embryogenesis in rice improvement. - Int. Rice Res. Inst. 514-517, 2003.

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

Ratnaparkhe, M. B., Tekeoglu, M., Muehlbauer, F. J.: Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. - *Theor. Appl. Gen.* 97: 515-519, 1998.

Ray, T., Dutta, I., Saha, P., Das, S., Roy, S. C.: Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. - *Plant Cell Tiss. Org.* 85:11-21, 2006.

Reade, J. P. H., Cobb, A. H.: Herbicides: modes of action and metabolism. - In Naylor, R. E. L. (ed): *Weed management handbook*. Pp 134-170. Blackwell Science, Oxford 2002.

Rech, E. L., Vianna, G. R., Aragão, F. J. L.: High efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. - *Nat. Protoc.* 3: 410-418, 2008.

Reddy, M. P., Sarla, N., Siddiq, E. A.: Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its applications plant breeding. - *Euphytica* 128: 9-17, 2002.

Roth, E. J., Frazier, B. L., Apuya, N. R., Lark, K. G.: Genetic variation in an inbred plant: variation in tissue cultures of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Genet.* 121:359-368, 1989.

Rout, G. R., Senapati, S. K., Aparajita, S., Palai, S. K.: Studies on genetic identification and genetic fidelity of cultivated banana using ISSR markers. - *Plant Omics J.* 2(6): 250-258, 2009.

Rueb, S., Leneman, M., Schilperoort, R. A., Hensgens, L. A. M.: Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). - *Plant Cell Tiss. Org.* 36: 259-264, 1994.

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

Santos, K. G. B., Mundstock, E., Bodanese-Zanettini, M. H.: Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. - *Plant Cell Rep.* 16: 859-864, 1997.

Schimidt, M. A., Herman, E. M.: Proteome rebalancing in soybean seeds can be exploited to enhance foreign protein accumulation. - *Plant Biotechnol. J.* 6: 832-842, 2008.

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

Tan, S., Evans, R., Singh, B.: Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. - *Amino Acids* 30: 195-204, 2006.

Thorpe, T. A.: Morphogenesis and regeneration. - In: Vasil, K. I., Thorpe, T. A., (ed.): *Plant cell and tissue culture*. Pp.17-36. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1994.

Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A.: *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa, Brasília 1998.

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

Tyagi, P., Khanduja, S., Kothari, S. L.: *In vitro* culture of *Capparis decidua* and assessment of clonal fidelity of the regenerated plants. - *Biol. Plant.* 54(1): 126-130, 2010.

Valladares, S., Sanchez, C., Martinez, M. T., Ballester, A., Vieitez, A. M.: Plant regeneration through somatic embryogenesis from tissues of mature oak trees: true-to-type conformity of plantlets by RAPD analysis. - *Plant Cell Rep.* 25: 879-886, 2006.

Venkatachalam, L., Sreedhar, R. V., Bhagyalakshmi, N.: Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers. - *Plant Growth Reg.* 51: 193-205, 2007.

Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filonova, L.: Developmental pathways of somatic embryogenesis. - *Plant Cell Tiss. Org.* 69: 233-249, 2002.

Wang, X., Eggenberger, A. L., Nutter, F. W., Hill, J. H.: Pathogen-derived transgenic resistance to soybean mosaic virus in soybean. - *Mol. Breed.* 8: 119-127, 2001

Wang, Z., Weber, J. L., Zong, G., Tanksley, S. D.: Survey of plant short tandem DNA repeats. - *Theor. Appl. Genet.* 88: 1-6, 1994.

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 N° 64*. Pp. 473-498 - Springer-Verlag, Berlin 2010.

Widholm, J. M.: *In vitro* selection and culture-induced variation in soybean. - In: Verma, D. P. S., Shoemaker, R. (ed.): *Soybean: genetics, molecular biology and biotechnology*. Pp. 107-126. - CAB Int, Wallingford 1996.

Wu, K., Jones, R., Dannaeburger, L., Scolnik, P.A.: Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. - *Nucl. Acids Res.* 22: 3257-3258, 1994.

Wyman, J., Brasard, N., Flipo, D., Lalibert, S.: Ploidy level stability of callus tissue, axillary and adventitious shoots of *Larix eurolepis* Henry regenerated *in vitro*. - *Plant Sci.* 85: 189-196, 1992.

Xing, Y., Yu, Y., Luo, X., Zhang, J. N., Zhao, B., Guo, Y. D.: High efficiency organogenesis and analysis of genetic stability of the regenerants in *Solanum melongena*. - *Biol. Plant.* 54(2): 231-236, 2010.

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

Yadav, N. S.: Genetic modification of soybean oil quality. - In: Verma, D. P. S., Shoemaker, R. C. (ed.): *Soybean genetics, molecular biology and biotechnology*. Pp. 127-188. CAB Int., Wallingford 1996.

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

Yu, O., Shi, J., Hession, A. O., Maxwell, C. A., McGonigle, B., Odell, J. T.: Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. - *Phytochem.* 63: 753-763, 2003.

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

Zhang, F., Lv, Y., Dong, H., Guo, S.: Analysis of genetic stability through inter simple sequence repeats molecular markers in micropropagated plantlets of *Anoectochilus formosanus* HAYATA, a medicinal plant. - *Biol. Pharm. Bull.* 33(3): 384-388, 2010.

Zhu, S., Walker, D. R., Boerma, H. R., All, J. N., Parrott, W. A.: Effects of defoliating insect resistance QTLs and a *cry1Ac* transgene in soybean near-isogenic lines. - *Theor. Appl. Genet.* 116: 455-463, 2008.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D.: Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. - *Genomics* 20: 176-183, 1994.

Zimmermann, J. L.: Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. - *Plant Cell* 5: 1141-1423, 1993.

CAPÍTULO 1

RESPOSTA DE QUATRO CULTIVARES DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) À INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

RESUMO

Diversas metodologias de transformação genética e regeneração já foram desenvolvidas para diferentes cultivares de soja. No entanto, essa espécie tem sido considerada recalcitrante tanto para a transformação genética, quanto para a regeneração *in vitro*, com número limitado de cultivares apresentando respostas embriogênicas satisfatórias. Tem sido demonstrado que essa resposta é genótipo-específica, o que denota a dificuldade de identificação de condições ótimas para transformação e regeneração de plantas de soja a partir de embriões somáticos. Visando à padronização de um protocolo para recuperação de plantas a partir de embriões somáticos no Programa de Melhoramento Genético da Qualidade do Óleo e Proteína da Soja em desenvolvimento no BIOAGRO/UFV, o presente trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos: (i) induzir embriogênese somática a partir de cotilédones imaturos de quatro cultivares de soja, (ii) avaliar o potencial embriogênico de cada cultivar e (iii) realizar aclimatização das plantas regeneradas. As metodologias para indução de embriões somáticos mostraram-se eficientes, sendo que as cultivares CAC-1 e CD 219 RR apresentaram as melhores respostas, com médias de produções de embriões por cotilédones de 10,83 e 13,86, respectivamente. Longos períodos de exposição ao 2,4-D e problemas ligados à dessecação parecem ter afetado o potencial embriogênico nas diferentes cultivares. Apenas embriões derivados da cultivar CAC-1 germinaram, sendo possível aclimatizar oito plantas. Os resultados do presente

trabalho indicam que o protocolo de indução de embriogênese somática foi efetivo para as cultivares analisadas e que pode ser utilizado, posteriormente, em experimentos de transformação genética de soja no programa de melhoramento. Além disso, evidenciou-se a necessidade de estudos mais específicos visando a aumentar as taxas de histodiferenciação e de conversão dos embriões em plântulas para a cultivar CD 219 RR. Essa última apresentou um potencial embriogênico satisfatório, embora não tenha sido possível recuperar embriões viáveis para germinação.

Palavras-chave: embriogênese somática, soja, 2,4-D, genótipo-dependência.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma oleaginosa importante para a dieta humana, constituindo uma importante fonte de proteínas e de óleos vegetais. Os produtos derivados da soja podem ser consumidos diretamente, usados na alimentação de animais ou utilizados em diversos segmentos da indústria. Portanto, existe grande interesse no melhoramento de características agronômicas da soja, bem como na modificação da composição do grão.

A combinação de métodos convencionais de melhoramento com a utilização de técnicas moleculares de transferência de genes *in vitro* permite um rápido desenvolvimento de novas variedades (Joshi e Dhawan, 2007). Para que todo o potencial dessas técnicas seja explorado, metodologias de cultivo *in vitro* e de transformação genética, bem como protocolos de regeneração de plantas, necessitam ser estabelecidos.

Diferentes metodologias de transformação genética e de regeneração de plantas já foram desenvolvidas para diferentes cultivares de soja. No entanto, essa espécie ainda tem sido considerada recalcitrante para manipulação via cultura de tecidos (Meurer et al., 2001; Ko et al., 2004; Widholm et al., 2010).

A transformação genética de culturas embriogênicas de soja é uma das metodologias mais difundidas para obtenção de plantas transgênicas nessa espécie. Em virtude disso, a regeneração via embriogênese somática em soja tem sido bastante estudada (Lazzeri et al., 1985; Finer e Nagasawa, 1988; Parrot et al., 1994; Santarém et al., 1997; Ko et al., 2003), com reconhecido potencial para produção de grande quantidade de embriões (Finer e McMullen, 1991; Ko et al., 2003).

As culturas embriogênicas de soja são obtidas por meio do cultivo de cotilédones oriundos de embriões zigóticos imaturos em meio contendo níveis muito elevados de auxinas sintéticas (2,4-D) (Widholm et al., 2010). As auxinas, além de serem indispensáveis para a viabilidade das plantas, são importantes

na indução da aquisição de competência embriogênica *in vitro* (Fehér et al., 2003; Raghavan, 2004; Fehér, 2005; Benjamins e Scheres, 2008).

Agregados de embriões somáticos de soja têm sido considerados adequados para a transformação genética, uma vez que novos embriões estão sempre sendo formados a partir de células da superfície apical de embriões antigos (Widholm et al., 2010). A escolha da embriogênese somática como método de regeneração de plantas apresenta algumas vantagens em relação à organogênese, tais como a grande quantidade de embriões que pode ser formada com um mínimo de manipulação e espaço físico de laboratório (Torres et al., 1998).

Ao longo dos anos, diferentes trabalhos têm sido realizados no sentido de otimizar o processo de indução e proliferação de embriões somáticos em soja (Widholm et al., 2010). Nesse sentido, diferentes autores têm demonstrado a influência de fatores, tais como o tipo de explante, o pH do meio e o genótipo da planta nas respostas *in vitro* (Komatsuda et al., 1992; Santarém e Finner, 1999; Meurer et al., 2001; Hofman et al., 2004).

Existem muitas variações quanto ao sistema embriogênico utilizado para transformação entre os diferentes laboratórios, o que denota a dificuldade de identificação de condições ótimas para transformação e regeneração de plantas de soja (Meurer et al., 2001). Além disso, um número limitado de cultivares de soja tem mostrado respostas embriogênicas satisfatórias (Parrott et al., 1989; Simmonds e Donaldson, 2000; Meurer et al., 2001). Assim, a otimização do sistema embriogênico pode aumentar o potencial para produção de um grande número de linhagens transgênicas independentes.

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. Visando a alcançar esse objetivo, trabalhos prévios foram desenvolvidos no sentido de estabelecer metodologias para a transformação genética nessa espécie. Em um desses trabalhos, Gesteira (2002) avaliou o potencial genético de nove cultivares de soja em relação a

respostas à embriogênese somática utilizando 2,4-D como agente indutor. No entanto, segundo o referido autor, não foi possível recuperar nenhuma plântula, em virtude de um processo necrótico que ocorria logo após a emissão dos primeiros folíolos. Em trabalho posterior, realizado por Lima (2005), também foram relatadas dificuldades para recuperação de plântulas a partir de embriões somáticos. Portanto, o estabelecimento de protocolos eficientes de regeneração e aclimatização de plantas de soja oriundas de embriões somáticos ainda se faz necessário dentro do Programa de Melhoramento Genético da Qualidade do Óleo e Proteína da Soja em desenvolvimento no BIOAGRO/UFV.

Visando à padronização de um protocolo para recuperação de plantas a partir de embriões somáticos no Programa de Melhoramento Genético da Qualidade do Óleo e Proteína da Soja em desenvolvimento no BIOAGRO/UFV e buscando fornecer respostas quanto à influência dos diferentes genótipos na indução da embriogênese somática em soja, o presente trabalho foi realizado com os seguintes objetivos específicos: (i) induzir embriogênese somática a partir de cotilédones imaturos de quatro cultivares de soja: CAC-1, CD 219 RR, CS 303 TNKCA e FMT Tucunaré, (ii) avaliar o potencial embriogênico de cada cultivar e (iii) realizar aclimatização das plantas regeneradas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e indução de embriogênese somática

Quatro cultivares comerciais de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) foram utilizadas para a realização do presente trabalho: CAC-1 (COOPADAP - Cooperativa Agropecuária do Alto Paranaíba), CD 219 RR (COODETEC - Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola), CS 303 TNKCA (isolinha de Monarca, COOPADAP) e FMT Tucunaré (FMT - Fundação Mato Grosso).

CAC-1 é uma cultivar semitardia (ciclo de 126-145 dias) que apresenta hábito de crescimento determinado e possui resistência ao cancro da haste e à mancha olho-de-rã. CD 219 RR apresenta resistência ao herbicida Roundup[®], é semiprecoce (ciclo de 101-110 dias), possui hábito de crescimento determinado, resistência ao cancro da haste, à mancha olho-de-rã, à necrose da haste da soja, à podridão radicular de fitóftora e resistência moderada ao oídio da soja. CS 303 TNKCA foi desenvolvida pela UFV, com ausência das lipoxigenases 1, 2 e 3 e do inibidor de tripsina Kunitz. Essa cultivar é tardia (ciclo superior a 145 dias), apresenta hábito de crescimento determinado e resistência ao cancro da haste e à mancha olho-de-rã. FMT Tucunaré pertence ao grupo de maturação médio (ciclo de 111-125 dias), possui hábito de crescimento determinado e resistência ao cancro da haste, à mancha olho-de-rã, à podridão radicular de fitóftora e às raças 1 e 3 do nematóide do cisto.

Todas as plantas foram cultivadas em casa vegetação com fotoperíodo de 14 horas de luz e temperatura de 27 ± 2 °C. Aproximadamente 15 a 20 dias após o florescimento, foram coletadas vagens imaturas contendo sementes entre 4 a 6 mm de comprimento.

As vagens foram desinfestadas por imersão em etanol 70% (v/v) por 1 min, seguido de imersão em água sanitária comercial (2,5% de hipoclorito de sódio) acrescida de Tween 20 0,01% por 20 min. Após três lavagens em água

deionizada estéril, as vagens foram dissecadas com auxílio de pinças e bisturi para a remoção do eixo embrionário e separação dos pares cotilédones. Os cotilédones foram, então, transferidos para o meio de indução com a face abaxial em contato com o meio (Santarém et al., 1997). Todos os procedimentos relatados foram realizados sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar.

No processo de indução de embriogênese somática, uma média de 25 cotilédones imaturos foram cultivados em placa de Petri estéril (90 x 15 mm; J. Prolab) contendo meio MSD40 (Finer e Nagasawa, 1988), composto por sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), sacarose 3%, Gelrite[®] 0,2% e 2,4-D 40 mg.L⁻¹, pH 7,0. As culturas foram incubadas à temperatura de 26 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de 36-50 μmol m⁻².s⁻¹. Os explantes permaneceram nesse meio até o aparecimento de embriões globulares primários.

O isolamento de agregados de embriões globulares foi feito a partir de regiões bem próximas do explante original, sendo posteriormente transferidos para o meio de proliferação para permitir a multiplicação dos agregados embriogênicos (*clusters*). Nessa fase utilizou-se o meio MSD20 (Wright et al., 1991) contendo sais MS, vitaminas B5, sacarose 3%, Gelrite[®] 0,2% e 2,4-D 20 mg.L⁻¹, pH 5,8. As culturas foram mantidas nesse meio por dois subcultivos quinzenais, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Para a avaliação do potencial embriogênico das cultivares foram considerados os seguintes parâmetros: frequência de embriogênese (número de cotilédones embriogênicos por número total de cotilédones utilizados), média de embriões somáticos produzidos por cotilédone (número total de embriões produzidos por número de cotilédones) e número total de embriões por explante (Meurer et al., 2001; Gesteira, 2002; Ko et al., 2004). A contagem dos embriões somáticos foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópico, em fluxo laminar. Os experimentos de indução foram repetidos uma vez.

2.2. Conversão e maturação dos embriões somáticos

Após 30 dias no meio MSD20, os agregados embriogênicos foram transferidos para o meio de histodiferenciação MSM6AC, contendo sais MS, vitamina B5, maltose 6%, carvão ativado 0,5%, Gelrite® 0,2%, pH 5,8 (Bailey et al., 1993), no qual permaneceram por cerca de 10 dias ou até atingirem o estágio cotiledonar. Posteriormente, os embriões cotiledonares foram transferidos para o meio MSM6 (meio MSMAC sem carvão ativado) para sua maturação (Finer e McMullen, 1991).

Quando os embriões cotiledonares atingiram a maturidade fisiológica, foram submetidos a um período de 48 horas de dessecação em placa de Petri estéril (60 x 15 mm; J. Prolab) sem meio de cultura, contendo os embriões cotiledonares individualizados, conforme descrito por Ko et al. (2003).

Após a dessecação, os embriões cotiledonares foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm; J. Prolab) contendo o meio MS0 (sem regulador de crescimento) (Parrott et al., 1989) para germinação. Quando iniciou a emissão de raízes, os embriões foram transferidos para tubos de vidro (25 x 150 mm) contendo o mesmo meio de cultivo, até que fosse observado o alongamento e a conversão em plântulas.

2.3. Aclimatização das plantas

Quando as plântulas apresentavam sistema radicular bem desenvolvido, foram retiradas do meio de cultura e mantidas em água por 3 dias, cobertas com plástico e sob condições da sala de cultivo. Em seguida, foram transferidas para copos plásticos de 100 mL, contendo a mistura de substrato agrícola Plant Max® (Eucatex) estéril e fibra de coco, na proporção de 1:1. As plantas foram mantidas por 10 dias completamente cobertas com plástico, em um sistema de prateleiras com fotoperíodo de 12 h de luz e irradiância de 60-86 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 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.

Posteriormente, essas plantas foram transferidas para casa de vegetação, sendo mantidas sob sistema de irrigação artificial tipo nevoeiro, coberto com sombrite, com intervalos de pulverização de água de 1 min a cada 1 h. Quando o primeiro par de folhas novas abria, as plantas foram retiradas do sombrite e transplantadas para vasos contendo solo adubado, permanecendo ainda sob o sistema de nevoeiro por aproximadamente uma semana. Finalmente, os vasos foram mantidos nas condições normais de cultivo da casa de vegetação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os meios MSD40 e MSD20 possibilitaram a indução e multiplicação de embriões globulares nas cultivares estudadas. Esses resultados estão em concordância com os relatados por Gesteira (2002) e Lima (2005). As metodologias utilizadas para a realização deste experimento englobaram informações disponíveis na literatura que buscam otimizar o processo de embriogênese somática em soja. A implantação do experimento levou em consideração, principalmente, o estado fisiológico da planta doadora do explante, orientação do explante, pH do meio, concentração de 2,4-D e agente solidificante a fim de selecionar genótipos para serem utilizados em protocolos de transformação genética.

A formação de embriões somáticos na face adaxial dos cotilédones imaturos foi observada a partir da quarta semana no MSD40 (Figura 1). Os parâmetros relativos à resposta embriogênica para as cultivares estudadas estão listados na Tabela 1.

A média de embriões isolados por cotilédone variou de 4,35, para a cultivar CS 303 TNKCA, até 13,85, para a cultivar CD 219 RR. A cultivar mais responsiva à indução embriogênica foi CD 219 RR, como pode ser observado na Tabela 1. A frequência de embriogênese entre as diferentes cultivares variou de 42,40% para a cultivar CS 303 TNKCA a 92,00% para CAC-1. Portanto, a cultivar CS303 apresentou a menor frequência na indução de embriões somáticos (42,40%) e a menor média por cotilédone (4,35).

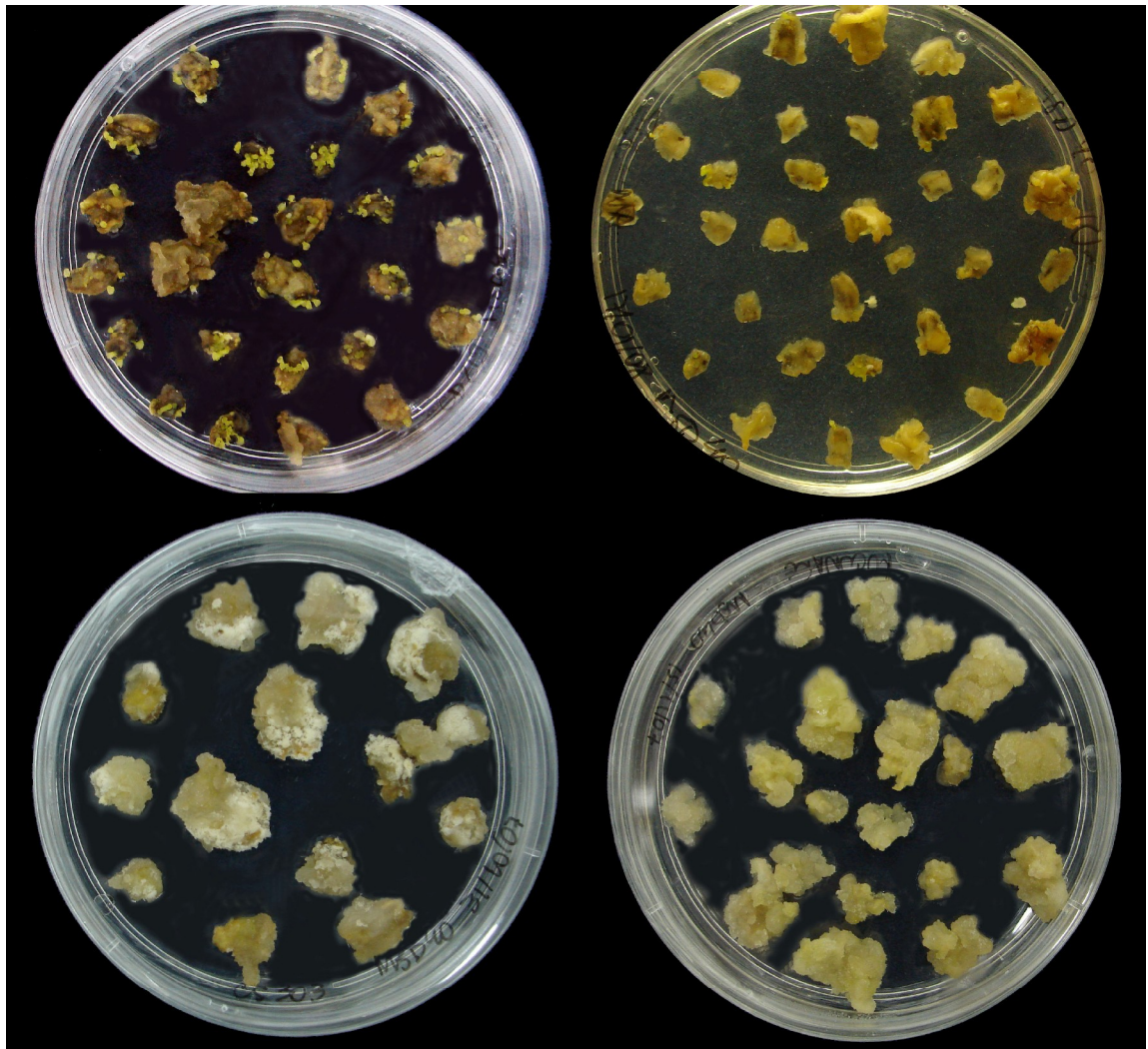


Figura 1- Resposta embriogênica das cultivares CD 219 RR (A), CAC-1 (B), CS 303 TNKCA (C) e FMT Tucunaré (D) em meio de indução (MSD 40), após 30 dias de cultivo. Barra = 10 mm.

Tabela1- Resposta embriogênica das quatro cultivares de soja estudadas.

Cultivar	Nº de total de explantes	Explantes com ES	Frequência de indução (%)	Nº total de ES	Nº médio de ES por explante
CAC-1	150	138	92,00	1495	10,83
CD 219 RR	175	146	83,42	2025	13,86
CS 303 TNKCA	125	53	42,40	231	4,35
FMT Tucunaré	125	86	68,80	791	9,19

ES = embriões somáticos.

Embora a cultivar CAC-1 tenha apresentado maior frequência de indução de embriogênese, sua média de embriões por cotilédone (10,83) revelou-se inferior quando comparada a CD 219 RR (13,85). Além disso, quando considerada a razão entre o número total de embriões pelo número de explantes utilizados, verificou-se que a cultivar CD 219 RR apresentou maior média de produção de embriões por explante. Portanto, a cultivar CD 219 RR, que ainda não havia sido avaliada quanto ao seu potencial embriogênico, demonstrou ser muito responsiva. O potencial embriogênico dessa variedade aliado à sua precocidade tornam a cultivar CD 219 RR um bom alvo para trabalhos de transformação genética envolvendo a embriogênese somática.

No presente estudo, foi possível observar que a cultivar CS 303 TNKCA apresentou o menor potencial para a indução de embriões somáticos. Esses dados estão em concordância com os obtidos por Gesteira (2002), que relatou para a cultivar CS 303 uma frequência de indução de embriogênese de 76,25% e uma eficiência (frequência de embriogênese vezes a média de embriões produzidos) igual a 3,51%. O autor atribuiu a fraca resposta embriogênica à baixa qualidade das sementes imaturas por ele utilizadas. No entanto, no presente trabalho, apenas cotilédones vigorosos, oriundos de plantas sadias e de comprimento inferior a 6 mm foram utilizados, não sendo possível atribuir a baixa produção de embriões somáticos em CS 303 TNKCA a esse fator.

As diferenças encontradas entre as frequências de indução de embriogênese podem estar relacionadas às diferenças genotípicas entre as

variedades. O genótipo do material é um dos fatores mais importantes que afetam as respostas morfogênicas *in vitro*, e a diferença de resposta pode ser encontrada entre espécies, cultivares e até mesmo indivíduos (Brown et al., 1995; Meurer et al., 2001). No presente estudo, foi possível observar o efeito marcante do genótipo na indução da embriogênese, considerando os quatro materiais analisados. Ko et al. (2004) avaliaram o potencial embriogênico de 15 cultivares de soja e verificaram um marcante efeito dos genótipos na indução de embriões somáticos. Outros autores também têm documentado esse efeito (Ranch et al., 1985; Calvo, 1989; Komatsuda e Ohyama; 1988, Shoemaker et al., 1991; Bailey et al., 1993; Santarém et al., 1997; Simmonds e Donaldson, 2000; Meurer et al., 2001).

O forte efeito do genótipo da planta doadora do explante também pode ser consequência do estado fisiológico da mesma, levando-se em consideração que cada genótipo apresenta maior ou menor adaptação a uma determinada condição ambiental (Calvo, 1989; Bailey et al., 1993; Gesteira, 2002).

A base genética para resposta à embriogênese somática não está bem definida, sendo necessários estudos para a sua elucidação (Ko et al., 2004). Parrot et al. (1989) e Ko et al. (2004) relataram que cultivares com alto potencial para embriogênese somática possuem ao menos um progenitor com essa característica. No entanto, em outros estudos realizados com cultivares geneticamente relacionados (Bailey et al., 1993; Tian et al., 1994; Simmonds e Donaldson, 2000; Meurer et al., 2001), um padrão de resposta embriogênica semelhante entre cultivares relacionadas não foi observado. Meurer et al. (2001) relataram que a cultivar Williams, que é uma linha isogênica muito próxima a cultivar Kunitz, apresentou-se recalcitrante à embriogênese somática, diferentemente de Kunitz, que foi muito responsiva. No presente estudo, a cultivar CS 303 TNKCA, que é uma isolinha de CS 303, que por sua vez constitui uma seleção na cultivar CAC-1, não apresentou uma resposta satisfatória à indução quando comparada a CAC-1. Resultados semelhantes foram obtidos por Gesteira (2002), avaliando as cultivares CS 303 e CAC-1.

Aliado ao efeito do genótipo, outro fator que dificulta o estabelecimento de culturas embriogênicas em soja é o estado fisiológico da planta doadora como um todo, sendo o processo mal sucedido quando estabelecido a partir de plantas que sofreram algum tipo de estresse (Gesteira, 2002). Benson (2000) relatou que o estado fisiológico da planta doadora dos explantes é um dos principais fatores que afetam a capacidade de respostas *in vitro*, sendo possível correlacionar diretamente a recalcitrância *in vitro* a fatores ligados à fisiologia da planta doadora. No entanto, poucos relatos sobre isso foram encontrados na literatura consultada.

Quatro semanas após a transferência dos embriões para o meio MSD20, agregados embriogênicos vigorosos foram obtidos (Figura 2). Após esse período, esses agregados foram submetidos a histodiferenciação e maturação.

O uso de 2,4-D tem se tornado frequente durante a indução de embriogênese somática em diferentes espécies. Tem sido demonstrado que a exposição a compostos com alta atividade de auxina, está diretamente relacionada ao surgimento de anormalidades desenvolvimentais e morfológicas. Buchheim et al. (1989) relataram que o uso de carvão ativado diminuiu o efeito residual de 2,4-D, adsorvendo esse composto e também outros tipos de compostos produzidos pelos tecidos cultivados, que são inibitórios para o crescimento e desenvolvimento.

A presença de carvão ativado no meio de cultura pode promover um efeito benéfico ou adverso no crescimento e desenvolvimento *in vitro*, podendo ser causa de sucesso ou falha na regeneração de diferentes espécies (Pan e Van Staden, 1998). Esses efeitos benéficos do carvão ativo ainda não são bem entendidos, entretanto, acredita-se que grande parte dos benefícios está relacionada à adsorção de substâncias inibitórias ou tóxicas, tais como metabólitos, reguladores de crescimento e gases tóxicos (Pan e Van Staden, 1998).

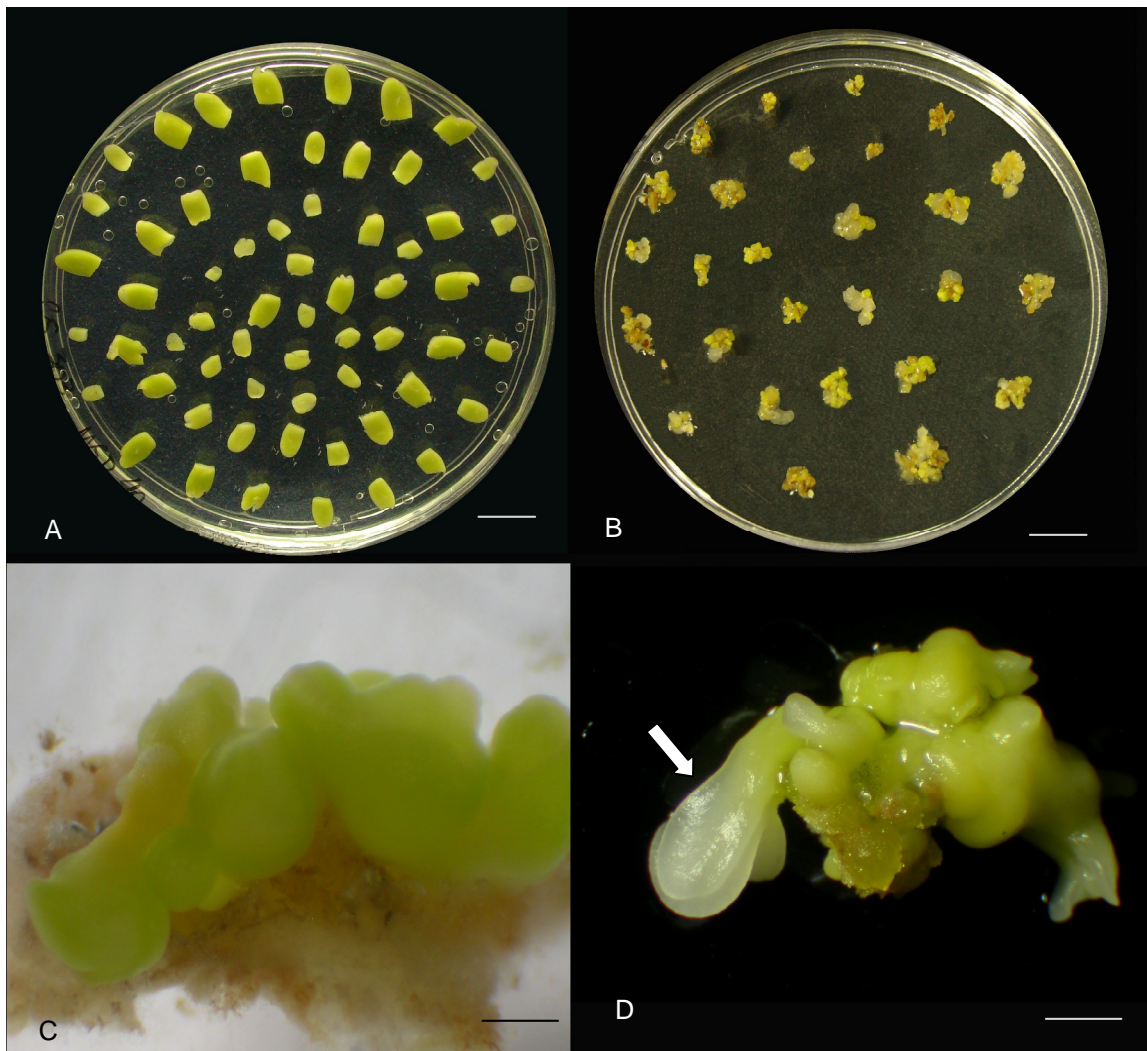


Figura 2- Embriogênese somática em soja a partir de cotilédones imaturos da cultivar CAC-1. (A) Cotilédones imaturos com a face abaxial em contato com o meio MSD40; (B) Agregados de embriões globulares isolados em meio MSD 20; (C) Detalhe de embriões globulares; (D) Embriões submetidos à histodiferenciação, com detalhe para um embrião no estágio cotiledonar. Barras: A, B = 10 mm, C = 0,5 mm e D = 2,5 mm.

A diferenciação de embriões somáticos de soja ocorreu quando as culturas foram transferidas para meio MS básico destituído de reguladores de crescimento e suplementado com maltose, após serem submetidas à dessecação.

Embora embriões somáticos de soja sejam morfológicamente similares ao embrião zigótico, a frequência de germinação daqueles é geralmente bem menor do que a destes (Liu et al., 1994). Dessa forma, a dessecação constitui uma estratégia para aumentar a frequência de germinação daqueles embriões em soja (Bunchhein et al., 1989).

Após a diferenciação dos embriões somáticos, verificou-se a presença de embriões mal formados e com eixos ou cotilédones fundidos em maior quantidade do que embriões normais. Tais anomalias podem aparecer quando as divisões das células em áreas meristemáticas acontecem antes da diferenciação da gema apical e dos cotilédones e não são inerentes aos embriões somáticos, ocorrendo também em embriões zigóticos imaturos cultivados *in vitro* (Barros, 1999). Em geral, esses embriões não continuam seu desenvolvimento, entrando em processo necrótico.

Boa parte dos embriões derivados das cultivares CS 303 TNKCA, CD 219 RR e FMT Tucunaré não conseguiram recuperar-se do processo de dessecação, não germinando em meio apropriado. Ao contrário, esses embriões adquiriam aspecto escuro e necrosado. Portanto, apenas 80 embriões de CAC-1 foram submetidos às etapas de alongamento e conversão em plantas. Essa incapacidade de germinação também foi relatada por Lima (2005) em relação a embriões derivados da cultivar CAC-1. De acordo com a referida autora, a exposição a 2,4-D por longos períodos afeta a germinação dos embriões somáticos, culminando em uma taxa de regeneração baixa.



Figura 3- Germinação e aclimatização. (A) Embrião somático da cultivar CAC-1 germinado em meio MS0; (B) Exemplos de plantas regeneradas e aclimatizadas em casa de vegetação. Barra = 10 mm.

A maioria dos embriões derivados da cultivar CAC-1 que não apresentavam anormalidades desenvolveu-se corretamente, podendo ser observada a emissão de raízes e, posteriormente, o desenvolvimento da parte aérea (Figura 3 A). No entanto, alguns embriões germinados apresentavam apenas desenvolvimento radicular ou apical, sendo descartados, uma vez que não seriam capazes de originar plantas. Nessa etapa também houve muitas perdas, tendo sido possível recuperar apenas 18 plântulas a partir de embriões somáticos de CAC-1.

A morte de grande quantidade de plantas regeneradas também foi observada durante o período de aclimatização. Esse fato pode ser atribuído à escassez de nutrientes e à proliferação de fungos fitopatogênicos na água ou no substrato vegetal utilizado.

Desse modo, foi possível obter apenas oito plantas da variedade CAC-1 completamente estabelecidas em casa de vegetação. No entanto, observou-se que essas plantas apresentaram-se frágeis, com florescimento precoce, e com porte e produção de grãos inferiores aos de plantas não submetidas ao cultivo *in vitro* (Figura 3 B).

As mudanças no microclima causadas pela aclimatização também podem ser responsáveis pelas mortes das plantas regeneradas, sendo um dos maiores obstáculos a ser contornado. A passagem das condições *in vitro*, em que vários parâmetros estão otimizados e controlados, para condições de menor umidade, intensidade de luz superior e autotrofia deve ser um processo gradual, permitindo que a planta adapte o sistema radicular e os estômatos às novas condições.

4. CONCLUSÕES

As metodologias utilizadas na obtenção de embriões somáticos a partir de explantes cotiledonares mostraram-se eficientes para as cultivares CAC-1 e CD 219 RR, que apresentaram freqüências de indução de embriões satisfatórias.

Os resultados do presente trabalho indicam o estabelecimento de um protocolo de indução de embriogênese somática efetivo que pode ser utilizado, posteriormente, em experimentos de transformação genética de soja no Programa de Melhoramento Genético da Qualidade do Óleo e Proteína da Soja em desenvolvimento no BIOAGRO/UFV. Embora não tenha sido possível obter nenhum embrião germinado de CD 219 RR, essa cultivar mostrou-se promissora. Além disso, ficou evidente a necessidade de estudos mais específicos visando a aumentar as taxas de histodiferenciação e de conversão dos embriões em plântulas para cultivares como CD 219 RR, que são muito responsivas à indução de embriões somáticos, mas que apresentam limitações quanto à germinação e à aclimatização.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bailey, M. A., Boerma, H. R., Parrott, W. A.: Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. - *In vitro* Cell. Dev-Pl. 29: 102-108, 1993.

Barros, L. M.: Embriogênese somática: pré-requisito para o emprego de algumas técnicas de biotecnologia no melhoramento genético de plantas perenes. - *Biotechnol. Cien. Desenvol.* 27: 36-39, 1999.

Benjamins, R., Scheres, B.: Auxin: the looping star in plant development. - *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 443-465, 2008.

Benson, E. E.: *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. - *In vitro* Cell. Dev-Pl. 36: 141-148, 2000.

Brown, D. C. W., Finstad, K. I., Watson, E. M.: Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. - In: Thorpe, A. T. (ed.): - *In vitro* embryogenesis in plants. Pp. 345-415. -Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1995.

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

Calvo, E. B. Embriogênese somática em soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. Tese Mestrado. 146p. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP 1989.

Fehér, A., Pasternak, T. P., Dudits, D.: Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. - *Plant Cell Tiss. Org.* 74: 201-228, 2003.

Fehér, A.: Why somatic plant cells start to form embryos? - In: Mujib, A., Samaj, J. (ed.): Somatic embryogenesis. Pp. 85-101. - Springer-Verlag, Berlin 2005.

Finer, J. J., McMullen, M. D.: Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension tissue culture. - *In vitro Cell. Dev-Pl.* 27: 175-182, 1991.

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

Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. - *Exp. Cell. Res.* 50: 151-158, 1968.

Gesteira, A. S. Avaliação do potencial embriogênico de cultivares de soja e transformação com o gene da citrato sintase. Tese Doutorado. 55p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG 2002.

Hofmann, N. E., Raja, R., Nelson, R. L., Korban, S. S.: Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers. - *Biol. Plant.* 48: 173-177, 2004.

Joshi, P., Dhawan, V.: Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay. – *Biol. Plant.* 51: 22-26, 2007.

Ko, T. S., 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 explants. - *Theor. Appl. Genet.* 107: 439-447, 2003.

Ko, T. S., Nelson, R. L., Korban, S. S.: Screening multiple soybean cultivars (MG 00 to MG VIII) for somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons. – *Crop Sci.* 44: 1825-1831, 2004.

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

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

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

Lima, A. B. P. Construção de cassete para co-supressão do gene da oleoil desaturase e transformação genética de embriões somáticos de soja. Tese Doutorado. 117p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG 2005.

Liu, W., Hildebrand, D. F., Moore, P. J., Collins, G. B.: Expression of desiccation-induced and lipoxygenase genes during the transition from the maturation to the germination phases in soybean somatic embryos. - Planta 194: 69-76, 1994.

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

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

Pan, M. J., Van Staden, J.: The use of charcoal in *in vitro* culture – a review. *Plant Growth Regul.* 26: 155-163, 1998.

Parrot, W. A., All, J. N., Adang, M. J., Bailley, M. A., Boerma, H. R., Stewart, C. N.: Recovery and evaluation of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal gene. - *In vitro* Cell. Dev- Pl. 30:144-149, 1994.

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

Raghavan, V.: Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. - *Plant Cell Rep.* 23: 492-496, 2004.

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

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

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

Shoemaker, R. C., Amberger, L. A., Palmer, L. O., Ranch, J. P.: Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation on soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. - *In vitro Cell. Dev-Pl.* 27: 84-88, 1991.

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

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

Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A.: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa - Brasília 1998.

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 N° 64. Pp. 473-498 - Springer-Verlag, Berlin 2010.

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

CAPÍTULO 2

ESTABELECIMENTO DE METODOLOGIAS PARA ORGANOGÊNESE A PARTIR DE NÓS COTILEDONARES DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill)

RESUMO

Para que a transformação genética seja realizada, protocolos eficientes de regeneração e de seleção devem ser desenvolvidos, permitindo a conversão dos explantes transformados em plantas transgênicas. Considerando-se que as respostas morfogênicas em soja são genótipo-dependentes, a padronização de protocolos para cada cultivar é necessária. O presente trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos: (i) induzir a organogênese direta a partir de nós cotiledonares de soja da cultivar CAC-1, (ii) aclimatizar as plantas obtidas, (iii) estabelecer a concentração do herbicida Finale[®] capaz de inibir a organogênese em nós cotiledonares e (iv) verificar a presença de possíveis variantes somaclonais. Após a germinação *in vitro*, os nós cotiledonares foram preparados e colocados com a face adaxial embebida no meio de indução de brotos, no qual permaneceram por 28 dias, ou até que fosse observada a formação de brotos. Esses brotos foram transferidos para o meio de alongação, sendo subcultivados a cada 15 dias. Quando os explantes alcançavam tamanho de aproximadamente 4 cm, cada broto foi excisado e colocado em meio de enraizamento, onde permaneceram até que apresentassem um sistema radicular bem desenvolvido. As plantas enraizadas foram submetidas ao processo de aclimatização. Do total de 600 explantes, foi possível recuperar 156 plantas (eficiência de regeneração de 26%), indicando a adequação das metodologias de organogênese e de aclimatização para a recuperação de plantas a partir de nós cotiledonares da cultivar CAC-1. A partir do ensaio de

curva de sobrevivência foi possível observar que o herbicida Finale[®], na menor concentração utilizada (3 mg.L⁻¹), mostrou-se efetivo na seleção de brotos não transformados e impediu a formação de novos brotos. Para a verificação da presença de variantes somaclonais, as sementes das plantas regeneradas foram submetidas a análises dos teores de óleo e proteína por meio da metodologia NIRS, sendo possível identificar plantas com conteúdo de óleo e de proteína superiores aos das testemunhas, indicando presença de possíveis variantes somaclonais.

Palavras-chave: organogênese, nós cotiledonares, soja, variação somaclonal.

1. INTRODUÇÃO

A introdução de características agronomicamente importantes em soja tem sido realizada por meio da transformação genética de plantas como um método alternativo ao melhoramento convencional (Torres et al., 1998; Lima, 2005).

De forma geral, três tipos principais de explantes têm sido utilizados em trabalhos de transformação genética de soja: nós cotiledonares, eixo embrionário e cotilédones imaturos. Nos dois primeiros tipos de explantes, a regeneração ocorre por meio da via organogenética, e no último, por meio da embriogênese somática (Widholm et al., 2010).

Embora o protocolo de transformação de nós cotiledonares originalmente publicado por Hinchey et al. (1988) venha sendo repetido, modificado, aplicado a outros genótipos e adaptado para utilização com diferentes agentes seletivos, a obtenção de plantas transgênicas a partir dessa metodologia ainda não é rotineira, estando limitada a poucos laboratórios e a alguns cultivares de soja (Hong et al., 2007). Somado a isso, existe o fato de as respostas morfogênicas nessa espécie serem marcadamente influenciadas pelo genótipo (Sairam et al., 2003).

Diferentes autores têm relatado que a transformação genética de nós cotiledonares mediada por *Agrobacterium* e a regeneração de plantas por meio da organogênese proporcionam a obtenção de plantas transgênicas com uma baixa eficiência. Segundo Olhoft et al. (2003, 2007), uma das causas dessa baixa eficiência é a dificuldade em regenerar plantas após os procedimentos de transformação. Assim, para que as técnicas de transformação tenham sucesso, também é necessária uma metodologia eficiente para a regeneração *de novo* de plantas.

Qualquer processo que tenha por objetivo a obtenção de plantas geneticamente modificadas depende da utilização de um sistema gene

marcador/agente seletivo que permita a seleção de células transformadas (Souza-Júnior et al., 2001). Dessa forma, uso de um gene marcador no processo de transformação de plantas fornece uma vantagem seletiva para as células transformadas, permitindo o seu crescimento, desenvolvimento e, geralmente, a morte das células não transformadas. Em alguns casos, o próprio gene marcador é o gene de interesse que poderia expressar uma característica agrônômica, como resistência a herbicida (Aragão e Brasileiro, 2002). O marcador de seleção confere caráter dominante às células transformadas, resultantes da incorporação da nova característica, que não está presente nas células não transformadas (Brasileiro e Aragão, 2001). Portanto, a otimização de metodologias de seleção de eventos transgênicos é crucial para o aumento da eficiência de transformação (Sommers et al., 2003).

O gene marcador de seleção *bar* (isolado de *Streptomyces hygroscopicus*) tem sido amplamente utilizado para selecionar transformantes (Zhang et al., 1999; Olhoft e Sommers 2001; Paz et al., 2004; Zeng et al., 2004, Paz et al., 2006). Esse gene codifica para a enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase, a qual confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio. Este herbicida é um tripeptídeo composto por dois resíduos de L-alanina e um resíduo de fosfinotricina (PPT), um análogo do glutamato. O PPT é um inibidor da glutamina sintetase (GS), uma enzima que converte glutamato em glutamina e remove a amônia tóxica da célula. A inibição da enzima GS causa a morte da planta devido ao efeito fitotóxico do acúmulo de amônia e ruptura dos cloroplastos, inibindo a fotossíntese. A enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase realiza uma detoxificação, permitindo que as células sobrevivam mesmo em presença do herbicida (Lindsey, 1992).

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. Com esse objetivo, Martins (2007) realizou transformação de explantes de nós cotiledonares de soja, via *A. tumefaciens*, visando à obtenção de linhagens que apresentassem a cossupressão da

enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT). No entanto, não houve sucesso nos procedimentos de aclimatização das plantas transformadas. Desse modo, o estabelecimento de um protocolo eficiente de regeneração e aclimatização de plantas de soja, obtidas por meio da organogênese direta de nós cotiledonares, ainda se faz necessário.

Visando à padronização de um protocolo para organogênese que possa ser utilizado em experimentos de transformação genética no âmbito do Programa de Melhoramento Genético da Qualidade do Óleo e Proteína da Soja em desenvolvimento no BIOAGRO/UFV, o presente trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos específicos: (i) induzir a organogênese direta a partir de nós cotiledonares de soja da cultivar CAC-1, (ii) aclimatizar as plantas obtidas, (iii) estabelecer a concentração do herbicida Finale[®] capaz de inibir a organogênese em nós cotiledonares e (iv) verificar a presença de possíveis variantes somaclonais por meio da determinação da porcentagem de óleo e proteína em sementes produzidas por plantas aclimatizadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e indução de organogênese em nós cotiledonares

Para a realização do presente trabalho foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) da cultivar CAC-1. Essa cultivar é semi-tardia (ciclo de 126-145 dias), possui hábito de crescimento determinado, produtividade em torno de 3360 kg/ha e apresenta resistência ao cancro da haste e à mancha olho-de-rã.

As plantas foram cultivadas em casa vegetação com fotoperíodo de 14 horas de luz e temperatura de 27 ± 2 °C. Após o amadurecimento fisiológico das sementes, as vagens foram coletadas e desinfestadas por imersão em etanol 70% (v/v) por 1 min, seguido de água sanitária comercial (2,5% de hipoclorito de sódio) acrescida de Tween 20 0,01% por 20 min. Após três lavagens em água deionizada estéril, as vagens foram secas em temperatura ambiente e abertas para a retirada das sementes, as quais foram armazenadas em dessecador a 4 °C até o momento da utilização.

No momento de sua utilização, as sementes foram desinfestadas por 24 h em câmara de gás cloro, conforme a metodologia proposta por Di et al. (1996) e colocadas para germinar em meio contendo sais e vitaminas B5 (Gamborg et al. 1968), FeEDTA (Murashige e Skoog, 1962), MES 3 mM, sacarose 3% (p/v), Gelrite[®] 0,2% (p/v), com pH ajustado para 5,4. As placas de Petri (90 x 15 mm; J. Prolab) foram vedadas com filme plástico PVC (Goodyear[®]) e mantidas à temperatura de 26 ± 1 °C, irradiância de $50-90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h de luz. As placas foram mantidas nessa condição até que as sementes germinassem e os cotilédones adquirissem coloração verde e as primeiras folhas verdadeiras medissem de 4 a 10 mm de comprimento, conforme descrito por Olhoft et al. (2006).

Para a obtenção dos explantes, a raiz e parte do hipocótilo foram excisados com auxílio de um bisturi, os cotilédones foram separados por meio de um corte vertical ao longo do hipocótilo. O epicótilo foi removido para que houvesse a quebra da dominância apical e indução da proliferação de meristemas axilares (Olhoft et al. 2006). Esse explante foi denominado nó cotiledonar (Figura 1 B).

Os nós cotiledonares foram colocados perpendicularmente no meio de indução de brotos (SIM), com a região do meristema embebida no meio. O meio SIM é constituído por sais e vitaminas B5, suplementado com Fe-EDTA, MES 3 mM, sacarose 3% (p/v), Gelrite[®] 0,2% (p/v), 1,67 mg.L⁻¹ BAP com pH ajustado para 5,6. As placas de Petri foram vedadas com Micropore (Nexcare[®], 3M), e os explantes permaneceram nesse meio por dois subcultivos quinzenais, ou até que pudessem ser visualizados os brotos.

Depois de aproximadamente 30 dias, os explantes foram transferidos para frascos do tipo Magenta[®] (Sigma) vedadas com Micropore, contendo meio de alongação (SEM), constituído por sais MS, vitaminas B5, MES 3 mM, sacarose 3% (p/v), Gelrite[®] 0,2% (p/v), BAP 1,67 mg.L⁻¹, GA₃ 0,5 mg.L⁻¹, AIA 0,1 mg.L⁻¹, Zeatina 1 mg.L⁻¹, com pH ajustado para 5,6. Os cotilédones foram transferidos a cada 15 dias e para um meio SEM fresco, excisando-se do explante o tecido morto.

Quando os brotos alcançaram um tamanho de aproximadamente 4 cm, cada broto foi excisado e colocado em meio de enraizamento, contendo sais B5 (1/2 X), vitaminas B5, MS Fe-EDTA, MES 3 mM, sacarose 3% (p/v), Gelrite[®] 0,2% (p/v), AIB 1 mg.L⁻¹, pH 5,6, em tubos de vidro (25 x 150 mm). As plântulas foram mantidas nesse meio por aproximadamente dez dias.

2.2. Etapas de aclimatização das plantas

Quando as plântulas apresentavam sistema radicular bem desenvolvido, foram retiradas do meio de cultura e mantidas em água por 3 dias, cobertas com plástico e sob condições da sala de cultivo. Em seguida, foram transferidas

para copos plásticos de 100 mL, contendo a mistura de substrato agrícola Plant Max[®] (Eucatex) estéril e fibra de coco, na proporção de 1:1. As plantas foram mantidas por 10 dias completamente cobertas com plástico, em um sistema de prateleiras com fotoperíodo de 12 h de luz e irradiância de 60-86 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilizando lâmpadas fluorescentes de 40 W (Osram). Nas duas semanas subsequentes, o plástico foi retirado gradativamente, até que as plantas estivessem bem adaptadas às condições ambientais.

Posteriormente, essas plantas foram transferidas para casa de vegetação, sendo mantidas sob sistema de irrigação artificial tipo nevoeiro, coberto com sombrite, com intervalos de pulverização de água de 1 min a cada 1 h. Quando o primeiro par de folhas novas abria, as plantas foram retiradas do sombrite e transplantadas para vasos contendo solo adubado, permanecendo ainda sob o sistema de nevoeiro por aproximadamente uma semana. Finalmente, os vasos foram mantidos nas condições normais de cultivo da casa de vegetação.

2.3. Curva de sobrevivência para o herbicida Finale[®]

Tendo em vista que o objetivo em longo prazo do presente trabalho é a padronização de metodologia para a transformação genética de soja, nós cotiledonares da cultivar CAC-1 foram submetidas ao ensaio de curva de sobrevivência. Esse ensaio foi realizado para determinar a concentração adequada do herbicida Finale[®], que contém glufosinato de amônio como componente ativo, capaz de inibir a organogênese em explantes não transformados. Para tanto, nós cotiledonares mantidos por 14 dias no meio SIM foram colocados em meio SIM acrescido do herbicida nas seguintes concentrações: 0, 3, 6, 9, 12 mg.L^{-1} . Cada tratamento continha 3 repetições, cada uma constituída por uma placa contendo 5 nós cotiledonares.

2.4. Determinação dos teores de óleo e de proteína de grãos de plantas regeneradas por meio de espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS)

A técnica de espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (do inglês Near Infrared Reflectance Spectroscopy, NIRS) será aqui chamada de metodologia NIRS. Esse método tem sido empregado na identificação de substâncias orgânicas (como proteínas, aminoácidos, lipídios e carboidratos) que são detectadas na região do infravermelho próximo.

No presente estudo, a determinação dos teores de óleo e de proteína foi realizada em espectrômetro de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR), modelo Antaris II (Thermo Scientific) utilizando-se semente de soja moída das plantas regeneradas por organogênese. Para tanto, farelo de cerca de 10 sementes de soja foi colocado no acessório *sample cup spinner* e o espectro da amostra foi medido.

Das 156 plantas regeneradas, 150 produziram número maior que 10 sementes, sendo selecionadas para a análise pela metodologia NIRS. Como testemunhas, foram utilizadas 10 plantas da cultivar CAC-1 crescidas nas mesmas condições ambientais e durante o mesmo período em que as plantas regeneradas por organogênese foram aclimatizadas em casa de vegetação. Cada espectro gerado foi avaliado utilizando-se equações de regressão previamente estabelecidas.

Para a quantificação de proteína, a equação de regressão foi ajustada utilizando o método de mínimos quadrados parciais (PLS - *partial least square*) e com correção multiplicativa do sinal (MSC - *multiplicative signal correction*) utilizando-se comprimento de onda variando de 4026-9950 cm^{-1} .

Na determinação das porcentagens de óleo também foi utilizado o método de mínimos quadrados parciais (PLS - *partial least square*), com correção multiplicativa do sinal (MSC - *multiplicative signal correction*), cujo modelo que mais se ajustou foi quando se realizou a primeira derivação. O comprimento de onda variou de 4000-9780 cm^{-1} .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Indução de organogênese a partir de nós cotiledonares e aclimatização das plantas

O mecanismo de coleta e desinfestação juntamente com o meio de germinação adotado proporcionaram reduzido grau de contaminação e germinação das sementes (Figura 1 A). Dois métodos para desinfestação de sementes maduras de soja têm sido bastante utilizados: o método denominado desinfestação a seco ou com gás cloro (Di et al., 1996) e o método da desinfestação por imersão em hipoclorito de sódio (Lu et al., 1994). O primeiro, utilizado nesse trabalho, mostrou-se eficiente, sem reduzir a taxa de germinação das sementes. Além disso, o processo de desinfestação por gás cloro permite que as sementes sejam utilizadas posteriormente, desde que mantidas em condições assépticas. No entanto, há demonstrações de que prolongados períodos de exposição das sementes de soja ao gás cloro podem causar efeitos adversos na qualidade da semente comprometendo a germinação e regeneração (Paz et al., 2004).

Os explantes cultivados no meio SIM que desenvolveram brotos característicos foram selecionados e transferidos para o meio SEM (Figura 1 C e D). Durante esse cultivo, quando o caule atingia aproximadamente 70 mm e apresentava um ou mais trifolíolos, as plântulas foram consideradas aptas para o enraizamento. No meio RM, em aproximadamente 10 dias, as plântulas já apresentavam raízes bem desenvolvidas, indicando a possibilidade de início do processo de aclimatização (Figura 1 E e F). Portanto, os meios SIM, SEM e RM, descritos por Olhoft et al. (2006), mostraram-se eficientes para os processos de indução, alongação e enraizamento dos brotos na cultivar CAC-1.



Figura 1- Indução de organogênese a partir de nós cotiledonares de soja cultivar CAC-1. (A) Germinação; (B) Explante; (C) Indução de brotos; (D) Alongamento dos brotos; (E) Enraizamento; (F) Plântula submetida às etapas de aclimatização. Barras: A, C, D, E = 10 mm, B = 5 mm e F = 50 mm.

A padronização de protocolos para a organogênese a partir de nós cotiledonares para a cultivar CAC-1 ainda não havia sido realizada. Considerando-se que a regeneração em soja é marcadamente genótipo-dependente (Sairam et al., 2003), a verificação do potencial organogênico dessa variedade permitirá a sua subsequente utilização em estudos de transformação genética em soja .

Além dos meios de cultivo, outras condições adotadas, como luz (intensidade, qualidade e fotoperíodo), temperatura e vidrarias de cultivo (tipo, tamanho e sistema para permeabilidade a trocas gasosas) constituem elementos importantes para as respostas *in vitro* (Ribeiro, 2006). Nesse sentido, a utilização de frascos do tipo Magenta[®] na fase de alongação dos brotos e a utilização da fita hipoalergênica Micropore representaram uma modificação importante do protocolo descrito por Olhoft et al. (2006) implementada no presente trabalho.

A utilização de frascos tipo Magenta[®] proporcionou maior espaço para o desenvolvimento dos brotos no meio de alongação, permitindo que eles fossem mantidos nesse meio até atingirem tamanho adequado. A fita Micropore é um tipo de vedação que permite uma maior troca gasosa entre o ambiente interno e o externo ao frasco de cultivo, sendo visível a perda de água do meio de cultura durante a condução dos experimentos.

Segundo Ribeiro (2006), a elevada umidade relativa do ambiente interno dos frascos de cultura pode influenciar características anatômicas, fisiológicas e morfológicas, resultando em alta mortalidade *ex vitro*. No presente experimento, um ambiente com maior troca gasosa pode ter influenciado o alongamento dos ápices caulinares, permitindo maior recuperação de brotos para enraizamento. Além disso, condições de menor umidade dentro dos frascos de cultura podem ter efeito benéfico para o processo de aclimatização, aumentando a taxa de sobrevivência das plantas, uma vez que a atmosfera interna dos frascos de cultura fica menos contrastante com aquela encontrada no ambiente externo.

Ao todo, foram realizados 6 experimentos de indução de organogênese, cada um com 100 explantes de nós cotiledonares. De um total de 600

explantes, foi possível obter 156 plantas regeneradas, o que resultou em uma eficiência de regeneração de 26%. Foi observado que, embora uma massa de brotos tenha sido originada no nó cotiledonar em presença de BAP, no máximo quatro brotos por explante chegavam a crescer o suficiente para que pudessem ser colocados no meio de enraizamento (dados não mostrados). Brotos muito pequenos não foram utilizados, uma vez que originavam plântulas muito pequenas, que freqüentemente morriam logo após serem transplantadas para a mistura de substrato vegetal com fibra de coco.

A aclimatização de plantas regeneradas tem sido considerada uma fase crítica em qualquer processo de obtenção de plantas transgênicas (Olhoft et al., 2003, 2007). Martins (2007) relatou em seu trabalho que plântulas regeneradas a partir de nós cotiledonares de soja da variedade CAC-1 não sobreviveram mais que três dias em condições de laboratório, sendo observada uma severa clorose nas folhas das plantas transferidas para substrato vegetal. Segundo a autora, a regeneração *in vitro* as torna mais frágeis e sensíveis a qualquer alteração ambiental.

Todas as etapas de aclimatização propostas por Lima (2005) foram seguidas com pequenas modificações, o que tornou possível conduzir plântulas de soja derivadas da cultivar CAC-1 regeneradas a partir de nós cotiledonares até a fase produção de sementes.

Vale salientar que, quando as plantas foram transplantadas para os vasos contendo solo adubado, foram adicionados os fungicidas Monceren[®]WP (Bayer) e Ridomil Gold[®]MS (Syngenta) em doses recomendadas pelos fabricantes, uma vez que, nos primeiros testes realizados, houve perda de algumas plantas por podridão do sistema radicular. Essa podridão possivelmente foi causada por fungos, e a adição desses compostos permitiu o controle desses microrganismos. Outro fator que pode ter colaborado para a podridão das raízes foi o excesso de água no solo devido à alta umidade proporcionada pelo nevoeiro e também à dificuldade de escoamento da água no solo em virtude de sua compactação no preparo dos vasos. Dessa forma, o

solo do vaso passou a ser periodicamente revolvido, durante o tempo em que os vasos encontravam-se sob o nevoeiro.

Durante a etapa de aclimatização, verificou-se que as plantas floresciam precocemente, o que resultou na diminuição do potencial agrônômico do material vegetal. Com isso, foi possível observar, em casa de vegetação, plantas que mediam aproximadamente 20 cm e já produziam uma ou duas vagens, e, logo após, entravam em senescência (Figura 2). Para contornar esse problema, as plantas foram submetidas à iluminação artificial, como recomendado por Olhoft (2006), por mais 6 horas. Uma vez que a soja é uma espécie de dias curtos e requer noites longas para o florescimento, tal procedimento contribuiu para a redução do florescimento precoce.

Outro procedimento adotado foi o corte do broto apical depois de aproximadamente 20 dias de transplante para o vaso. Esse procedimento promovia a perda da dominância apical e a quebra da dormência das gemas axilares, permitindo maior formação de ramos laterais, e, por consequência, proporcionando maior produção de vagens.



Figura 2- Etapas da aclimatização de plantas. (A) Água; (B) Mistura de substrato vegetal e casca de coco; (C) Detalhe da floração precoce; (D) e (E) Plantas aclimatizadas.

3.2. Curva de sobrevivência para o herbicida Finale®

Em trabalho realizado por Barros (2006) foram construídos cassetes de expressão para silenciamento gênico da proteína P34 e dos inibidores de protease do tipo BBI em sementes de soja. Essas construções contêm as sequências invertidas dos genes a serem silenciados sob o controle do promotor 35S (constitutivo). Sousa (2007) trabalhou com a construção de cassetes de expressão para silenciamento do gene da oleoil dessaturase, sob controle do promotor 35S e do promotor do gene da subunidade alfa da beta-conglicina (semente-específico). Além disso, foram construídos cassetes de expressão para o silenciamento dos genes da 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferase e da lisofosfatidilcolina aciltransferase, sob o controle do promotor 35S. Nas construções acima descritas, está presente o gene *bar* para a seleção das plantas transformadas. Esse gene codifica para a enzima fosfinotricina acetiltransferase, que confere resistência a herbicidas que contenham glufosinato de amônio como composto ativo.

Considerando que o objetivo em longo prazo deste trabalho é a padronização de metodologia para regeneração de plantas após serem submetidas à transformação genética, foi realizado o ensaio de curva de sobrevivência para Finale®, cujo componente ativo é o glufosinato de amônio.

Com base no experimento realizado, foi possível observar que, após os 14 dias no meio SIM acrescido de Finale®, os explantes apresentavam considerável amarelamento e um reduzido número de brotos, indicando que o glufosinato de amônio impediu a formação de novos brotos, além de provocar a clorose, e, ocasionalmente, a morte dos mesmos (Figura 3). Portanto, mesmo a menor concentração utilizada (3 mg.L^{-1}) mostrou-se efetiva na seleção de brotos não transformados.



Figura 3- Brotos regenerados a partir de nós cotilédonares da cultivar CAC-1 submetidos a diferentes concentrações do Herbicida Finale[®]. Barra = 5 mm.

Uma estratégia de seleção efetiva é muito importante para o desenvolvimento de um sistema de transformação. A efetividade do sistema de seleção depende de muitos fatores, incluindo o tipo de tecido, o tamanho do explante, propriedades químicas, concentração do agente seletivo e o tempo de seleção (Bowen, 1993). O gene *bar* tem sido um dos principais marcadores de seleção utilizados em trabalhos envolvendo a transformação de nós cotilédonares em soja.

O glufosinato de amônio é considerado um agente seletivo de contato, ou seja, tem a capacidade de selecionar apenas os tecidos que estão em contato direto com o meio (Monteiro, 2005). Portanto, apenas os brotos induzidos a partir de nós cotilédonares de soja que estivessem em contato direto com o meio contendo herbicida estavam sujeitos a sua ação. Por esse motivo, os nós cotilédonares contendo brotos foram dispostos perpendicularmente no meio SIM acrescido de Finale[®] para permitir que toda a região do nó cotilédonar estivesse em contato com o agente seletivo.

Trabalhos têm sido realizados com o intuito de estabelecer as concentrações de glufosinato de amônio capazes de inibir a morfogênese *in vitro* em diversos explantes. Em trabalho de transformação de nós cotilédonares de soja via *Agrobacterium* realizado por Zhang et al. (1999), foi utilizado 5 mg.L⁻¹

¹ de glufosinato de amônio em meio de indução e 2 mg.L⁻¹ na fase de alongação dos brotos transformados. Zeng et al. (2004) utilizaram glufosinato de amônio para seleção durante a iniciação e alongamento dos brotos após a transformação de nós cotiledonares de soja. Esses autores utilizaram níveis variados de glufosinato (de 3 a 10 mg.L⁻¹) durante os estágios de indução e alongação dos brotos. Segundo os referidos autores, o melhor sistema de seleção foi alcançado quando se utilizou 8 mg.L⁻¹ durante as etapas de indução dos brotos e 3 - 4 mg.L⁻¹ nas etapas de alongação. Paz et al. (2004) utilizaram com sucesso 6 mg.L⁻¹ de glufosinato de amônio tanto para a indução quanto para a alongação dos brotos, tendo relatado que esse sistema de seleção contribuiu para o aumento da eficiência de transformação.

3.3. Composição de óleo e proteína do grão

A metodologia NIRS tem sido reconhecida como uma ferramenta rápida, muito poderosa e útil para análises bioquímicas de alimentos e análises de sementes e produtos derivados para características de importância nutricional e industrial (Sato et al., 2002; Alishahi et al., 2010).

Plantas regeneradas *in vitro* podem apresentar variações morfológicas e bioquímicas em relação a cultivar que as deu origem (Radhakrishnam e Kumari, 2009) que podem ser consequências de variação somaclonal. Assim, no presente estudo, a metodologia NIRS foi utilizada para determinar as porcentagens de óleo e de proteína nas sementes de plantas regeneradas por organogênese. Buscou-se identificar plantas que apresentavam porcentagens de óleo e de proteína superiores às testemunhas.

Das 156 plantas regeneradas, 150 produziram número maior que 10 sementes, sendo essas selecionadas para a análise pela metodologia NIRS. Os conteúdos médios de óleo e de proteína, determinados a partir de sementes de soja moída, foram respectivamente, 22,10 ± 1,66% e 41,16 ± 2,27% para as plantas regeneradas e 23,44 ± 1,46% e 37,89 ± 2,78% para as testemunhas (cultivar CAC-1). De todas as plantas regeneradas, três apresentaram teores de

óleo e seis apresentaram teores de proteína acima dos valores apresentados pela testemunhas (Figura 4), indicando presença de possíveis variantes somaclonais.

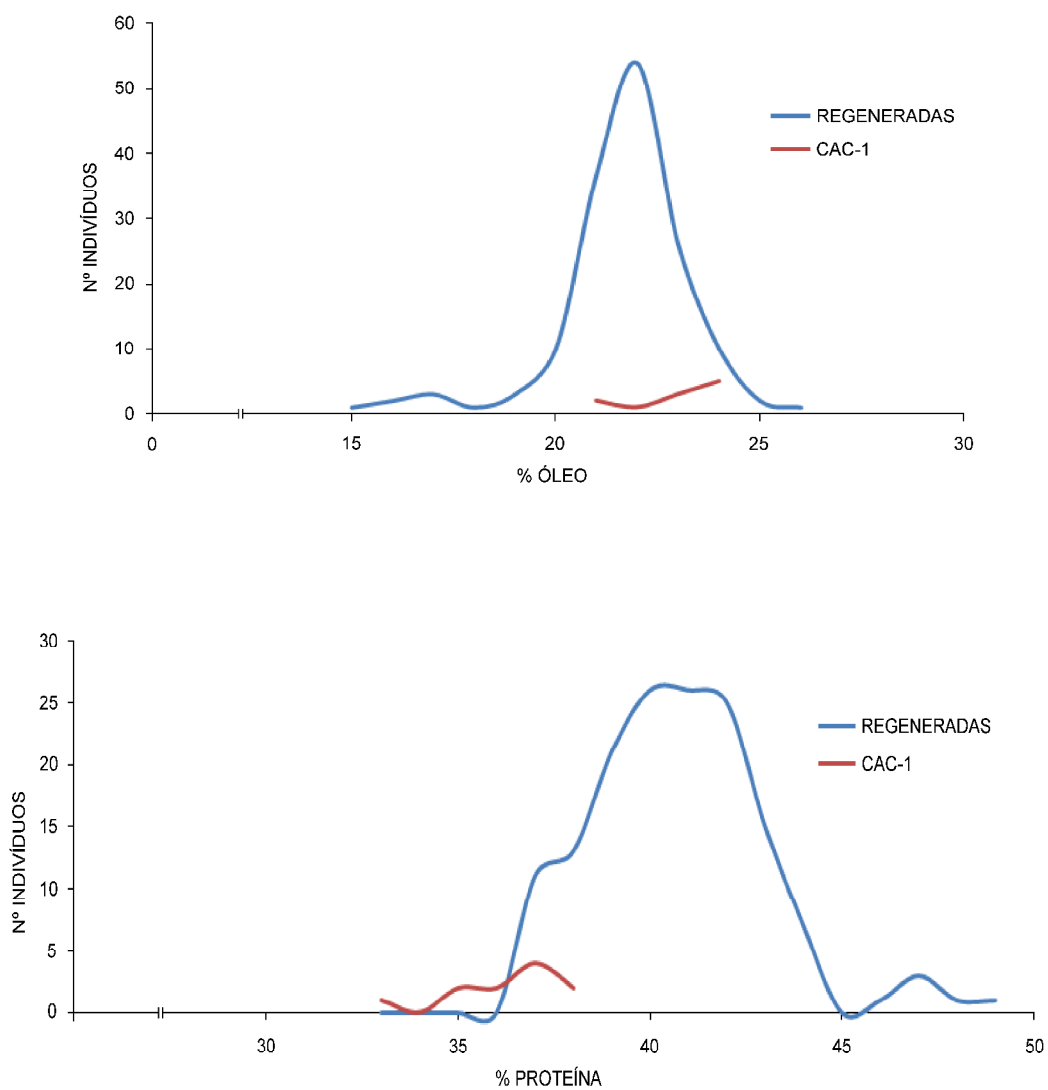


Figura 4- Percentuais de óleo e proteína, medidos em sementes de soja moída, para plantas regeneradas por organogênese e em testemunhas da cultivar CAC-1.

Recentemente, alguns autores têm demonstrado a utilidade da metodologia NIRS para avaliação de plantas transformadas. Munck et al. (2001) avaliaram farelo de cevada transgênica, sendo possível distinguir amostras com maior concentração do aminoácido lisina daquelas de conteúdo normal. Rao e Hildebrand (2009) utilizaram NIRS para a avaliação do conteúdo de óleo em sementes de soja transformadas com o gene *SLC1* de leveduras, que codifica para uma lisofosfatidil acil transferase, verificando aumento na fração óleo das sementes analisadas. Jiao et al. (2010) realizaram estudo comparativo entre cultivares transgênicas e não transgênicas de arroz, verificando alterações nos conteúdos de proteína, ácidos graxos e vitaminas, dentre outros componentes entre as cultivares transgênicas e não transgênicas.

Estudos envolvendo a utilização de características morfológicas na identificação de variantes somaclonais em soja foram desenvolvidos por diferentes autores (Barwale e Widholm, 1987; Freytag et al. 1987; Graybosh et al., 1987; Amberger et al., 1992; Widholm, 1996; Radhakrishnam e Kumari, 2008), tendo sido relatada baixa frequência de variação somaclonal, quando comparada a outras espécies de plantas.

Nguyen et al. (2001) analisaram pela metodologia NIRS 2.008 plantas oriundas de 28 plantas regeneradas via embriogênese somática, 95 via organogênese e 25 recuperadas a partir de protoplastos, de cinco cultivares diferentes de soja. Após três ciclos de seleção os referidos autores encontraram duas linhas regeneradas derivadas da cultivar Jack com alto conteúdo de óleo na semente, demonstrando presença de variação somaclonal.

Radhakrishnam e Kumari (2009) estudaram o conteúdo de proteínas em raízes, caules, folhas e sementes de plantas de soja micropropagadas, comparando-os com plantas crescidas em casa de vegetação. Os autores observaram aumento nos conteúdos protéicos de raízes e folhas e diminuição em caules. Em relação ao grão, as plantas micropropagadas apresentaram um pequeno aumento em relação às plantas não micropropagadas, não sendo possível concluir sobre efeitos deletérios causados pelo processo de micropropagação.

No presente estudo, foi possível recuperar plantas com elevados conteúdos de óleo e de proteína, quando comparadas com as testemunhas, indicando presença de possíveis variantes somaclonais.

4. CONCLUSÕES

As metodologias utilizadas para a indução de organogênese e aclimatização de plantas regeneradas a partir de nós cotiledonares de soja mostraram-se adequadas para estudos envolvendo a cultivar CAC-1. Além disso, foi possível observar que o Finale[®], em concentração de 3 mg.L⁻¹ mostrou-se efetivo na seleção de brotos não transformados e impediu a formação de novos brotos. Considerando-se que as respostas morfogênicas em soja são genótipo-dependentes e que ainda não havia sido realizado nenhum trabalho de padronização de protocolos confiáveis para a regeneração e aclimatização para a cultivar CAC-1, os resultados obtidos no presente trabalho poderão ser utilizados em trabalhos posteriores que envolvam a transformação genética dessa cultivar.

A partir das análises dos teores de óleo e de proteína em sementes de soja, por meio da metodologia NIRS, foi possível identificar plantas regeneradas com elevados conteúdos de óleo e de proteína, quando comparadas com as testemunhas. Esses resultados indicam presença de possíveis variantes somaclonais com características agrônômicas interessantes, que podem ser exploradas dentro do programa de melhoramento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alishahi, A., Farahmand, H., Prieto, N., Cozzolino, D.: Identification of transgenic foods using NIR spectroscopy: a review. – Spectrochim. Acta A 75: 1-7, 2010.

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

Aragão, F. J. L., Brasileiro, A. C. M.: Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. - Braz. J. Plant Physiol. 14(1): 1-10, 2002.

Barros, B. A. Construção de cassetes de expressão para silenciamento gênico de fatores antinutricionais da soja, via interferência por RNA. Tese Mestrado. 58 p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG 2006.

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

Bowen, B. A.: Markers for plant gene transfer. - In: Kung, S. D., Wu, R. (ed.): Transgenic Plants. v. 1. Pp. 89-146 - Academic Press, San Diego 1993.

Brasileiro, A. C. M., Araújo, F. J. L.: Marker genes for *in vitro* selection of transgenic plants. - J. Plant Biotechnol. 3(1): 113-121, 2001.

Di, R., Purcell, V., Collins, G. B., Ghabril, S. A.: Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. - Plant Cell Rep. 15: 746-750, 1996.

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

Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. - *Exp. Cell Res.* 50: 151-158, 1968.

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

Hinchee, M. A. W., Connor-Ward, D. V., Newell, C. A., McDonnell, R. E., Sato, S. J., Gasser, C. S., Fischhoff, D. A., Re, D. B., Fraley, R. T., Horsch, R. B.: Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. - *Bio. Technol.* 6: 916-922, 1988.

Hong, H. P., Zhang, H., Olhoft, P. M., Hill, S., Wiley, H., Toren, E., Hillebrand, H., Jones, T., Cheng, M.: Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. - *In vitro Cell. Dev-Pl.* 43: 558-568, 2007.

Jiao, Z., Si, X. X., Li, G. K., Zhang, Z. M., Xu, X. P.: Unintended compositional changes in transgenic rice seeds (*Oryza sativa* L.) studied by spectral and chromatographic analysis coupled with chemometrics methods. - *J. Agric. Food Chem.* 58(3): 1746-1754, 2010.

Lima, A. B. P. Construção de cassete para co-supressão do gene da oleoil desaturase e transformação genética de embriões somáticos de soja. Tese Doutorado. 117p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG 2005.

Lindsey, K.: Genetic transformation of crop plants. - *J. Biotechnol.* 26: 1-28, 1992.

Lu, G., Hepburn, A., Widholm, J.: A simple procedure for the expression of genes in transgenic soybean callus tissue. - *Plant Cell Rep.* 13: 632-636, 1994.

Martins, P. K. Transformação de nós cotiledonares de soja visando à co-supressão do gene da lisofosfatidilcolina aciltransferase. Tese Doutorado. 94p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG 2007.

Monteiro, M. Transformação genética de maracujá amarelo visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Tese Doutorado. 134p. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP 2005.

Munck, L., Nielsen, J. P., Møller, B., Jacobsen, S., Søndergaard, I., Engelsen, S. B., Nørgaard, L., Bro, L.: Exploring the phenotypic expression of a regulatory proteome-altering gene by spectroscopy and chemometrics – *Anal. Chim. Acta* 446: 171–186, 2001.

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

Nguyen, M. V., Nickell, C. D., Widholm, J. M.: Selection for high seed oil content in soybean families derived from plants regenerated from protoplasts and tissue cultures. - *Theor. Appl. Genet.* 102: 1072-1075, 2001.

Olhoft, P. M., Bernal, L. M., Grist, L. B., Hill, D. S., Mankin, S. 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 Cell. Dev-Pl.* 43: 536-549, 2007.

Olhoft, P. M., Donovan, C. M., Somers, D. A.: Soybean (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary node explants. - *Method. Mol. Biol.* 343: 385-396, 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. - *Plant* 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 Rep.* 20: 706-711, 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 Rep. 25: 206-213, 2006.

Paz, M. M., Shou H. G. 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.

Radhakrishnan, R., Kumari, B. D. R.: Changes in protein content in micropropagated and conventional soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr.) - World J. Agri. Sci. 5(2): 186-189, 2009.

Radhakrishnan, R., Kumari, B. D. R.: Morphological and agronomic evaluation of tissue culture derived Indian soybean plants. - Acta Agri. Slovenica 91: 391-396, 2008.

Rao, S. S., Hildebrand, D.: Changes in oil content of transgenic soybeans expressing the yeast SLC1 gene. - Lipids 44: 945-951, 2009.

Ribeiro A. P. O. Influência de genótipo, agentes gelificantes, precursor (ACC) e inibidores (AVG e ATS) do etileno e tipo de vedação na morfogênese *in vitro* de berinjela (*Solanum melongena* L.). Tese Doutorado. 113p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG 2006.

Sairam, R. V., Franklin, G., Hassel, R., Smith, B., Meeker, K., Kashikar, N., Parani, M., Abed, D. Al., Ismail, S., Berry, K., Goldman, S. L.: A study on the effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary nodal callus. - Plant Cell Tiss. Org. 75: 79-85, 2003.

Sato, T., Takahashi, M., Matsunaga, R.: Use of NIR spectroscopy for estimation of FA composition of soy flour. - JAOCS 79(6): 535-537, 2002.

Somers, D. A., Samac, D. A., Olhoft, P. M.: Recent advances in legume transformation. - *Plant Physiol.* 131: 892-899, 2003.

Sousa, C. S. Construção de cassetes de expressão para silenciamento de genes da biossíntese de ácidos graxos em soja via RNA de interferência. Dissertação Mestrado. 60 p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG 2007.

Souza Júnior, M. T., Venturoli, M. F., Coelho, M. C. F., Rech Filho, E. L.: Análise de sistemas gene marcador/agente seletivo alternativos para seleção positiva de embriões somáticos transgênicos de mamoeiro. - *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 13(3): 365-372, 2001.

Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A.: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa - Brasília 1998.

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* N° 64. Pp. 473-498 - Springer-Verlag, Berlin 2010.

Widholm, J. M.: *In vitro* selection and culture-induced variation in soybean. - In: Verma, D. P. S., Shoemaker, R. (ed.): *Soybean: genetics, molecular biology and biotechnology*. Pp. 107-126. - CAB Int, Wallingford 1996.

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

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

CAPÍTULO 3

GENETIC STABILITY OF SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merrill) REGENERATED PLANTS THROUGH ORGANOGENESIS

ABSTRACT

The Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) marker assay was employed to evaluate the genetic stability of regenerated soybean plants obtained through organogenesis from cotyledonary nodes of soybean cultivar 'CAC-1'. Twelve ISSR primers generated a total of 170 amplicons among the tissue-cultured plants. A homogeneous amplification profile was observed for 148 micropropagated plants and eight different profiles were detected. These results indicate the usefulness of ISSR markers for monitoring genetic stability in soybean plants recovered through organogenesis. In addition, the cotyledonary node organogenesis, as described here, was found to be an adequate method for obtaining genetically stable regenerated soybean plants.

Additional key words: axillary multiplication, molecular markers, somaclonal variation, clonal fidelity.

Abbreviations:

AFLP – amplified fragment length polymorphism

BAP – 6-Benzylaminopurine

bp – base pairs

B5 – Gamborg's B5 (1968) basal salt mixture

IAA – indole-3-acetic acid

IBA – indole-3-butyric acid

GA₃ – gibberellic acid

ISSR – inter-simple sequence repeats

kb – kilobase pairs

MS – Murashige and Skoog's (1962) basal salt mixture

PCR – polymerase chain reaction

RAPD – random amplified polymorphic DNA

RFLP – restriction fragment length polymorphism

SSR – simple sequence repeats

Acknowledgments:

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Belo Horizonte, MG, Brazil) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), for financial support.

1. INTRODUCTION

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is one of the most important sources of edible protein and oil for humans and animals. As an important feed and food source, there is great interest in the genetic improvement of different traits of soybean crops.

Tissue culture and genetic transformation techniques have proven to be effective tools in the breeding programs of several plant species (Pinto et al. 2010), producing novel and genetically diverse plant materials.

As cells in culture divide mitotically during dedifferentiation and growth clonal fidelity of regenerated plants should be expected (Bennici et al. 2004, Xing et al. 2010). However, some observations indicate that plantlets derived from *in vitro* culture and their progenies may develop altered phenotypic traits and reveal a wide array of culture induced genetic variants (Phillips et al. 1994, Jain and De Klerk 1998, Yang et al. 1999, Siragusa et al. 2007) leading to a phenomenon called somaclonal variation (Larkin and Scowcroft 1981).

Most somaclonal variation occurs as a consequence of the stress imposed on the plant in culture conditions and is manifested in the form of DNA methylations, chromosome rearrangements and point mutations (Phillips et al. 1994). Although somaclonal variations may be used as a source of variation to generate superior plants, it could be a serious problem in plant tissue culture where the aim is to develop identical somaclones of a desired variety, resulting in the production of undesirable traits or plant off-types (Karp 1995, Cassells et al. 2001, Bennici et al. 2004, Venkatachalam et al. 2007).

The development of strategies to assess the genetic stability of *in vitro* plants is highly valuable and, techniques such as chromosomal analysis, flow cytometry, and fingerprinting by molecular markers have been used (Jain and De Klerk 1998, Jain 2001, Joshi and Dhawan 2007, Pinto et al. 2010, Xing et al. 2010). During the last few years, molecular techniques including various DNA

markers such as restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), simple sequence repeats (SSR) and inter-simple sequence repeats (ISSR), have been developed and successfully utilized for analyzing genetic fidelity of *in vitro* propagated plantlets. Moreover, tissue- and environment-independence in expression of these DNA-based markers have made them more reliable over morphological and isozyme markers (Venkatachalam et al. 2007). ISSR markers have been successfully applied to detect the genetic similarities or dissimilarities in micropropagated material in various plant species (Ngezahayo et al. 2007, Joshi and Dhawan 2007, Venkatachalam et al. 2007, Gantait et al. 2008, Kengkarj et al. 2008, Rout et al. 2009, Piña-Escutia et al. 2010, Tyagi et al. 2010, Xing et al. 2010, Zhang et al. 2010). ISSR requires only a small amount of DNA and allows a quick and economical analysis of many samples. Furthermore, it detects genetic mutations at hypervariable sites, such as DNA repetitive regions, using highly specific 16-25-bp long primers (Rout et al. 2009). For this reason, this technique is highly discriminative, with reliability and repeatability (Reddy et al. 2002).

As for other legume plants, tissue culture-induced variation has also been known to occur in soybean. To date, very little is known regarding the genetic stability in soybean tissue culture and especially in regenerated plants. For instance, there are studies using morphological traits analysis to assess somaclonal variation in different soybean cultivars (Barwale and Widholm 1987, Freytag et al. 1987, Graybosh et al. 1987, Amberger et al. 1992, Widholm 1996, Radhakrishnam and Kumari 2008). While the frequency of somaclonal variation is relatively low in soybean in comparison to some other crop species, the above mentioned researchers have described a number of variants, including maternally inherited wrinkled leaf, chlorophyll-deficiency, dwarfism, sterility, maturity, height, leaf shape and variegation. Nguyen et al. (2001) recovered soybean somaclones showing high seed oil content from plants regenerated via embryogenesis, organogenesis and protoplasts. Gesteira et al. (2002) were the first to evaluate genetic stability in soybean plants obtained through somatic

embryogenesis using RAPD markers assay, and they described a relatively low somaclonal variation rate (< 5%). Regarding somaclonal variation in organogenesis-derived soybean plants, no reports of the use of molecular markers were found in the surveyed literature. Thus, it is necessary to evaluate the potential for genetic variation induced by organogenesis to ensure that the parental genotype remains true-to-type during regeneration.

Therefore, in the present investigation we report the results of molecular analysis of nuclear DNA, based on the ISSR technique, aimed at assessing the effects of the *in vitro* culture on the genetic homogeneity of soybean plants regenerated through organogenesis from mature seeds. In the surveyed literature, there are no reports on studying genetic variation in regenerated soybean plants through organogenesis by ISSR markers, and retaining genetic integrity would be useful for transformation and breeding programs.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *In vitro* procedure

Soybean plants from the cultivar 'CAC-1' were grown in a greenhouse under standard conditions. Seeds were sterilized using chlorine gas, as described by Di et al. (1996).

The cotyledonary-node method described here was modified from Olhoft et al. (2006). Briefly, sterilized seeds were germinated on germination medium (GM) containing B5 basal salts and vitamins (Gamborg et al. 1968), 3 mM MES, 3% (w/v) sucrose, 0.2% (w/v) Gelrite[®], with pH adjusted to 5.4, in sterile crystal Petri dishes (90 x 15 mm; J. Prolab, Brazil). The dishes were sealed with strips of 9 μ M polyvinylchloride film (Goodyear[®], São Paulo, Brazil) and kept under culture room conditions for 5-7 days, or until the cotyledons turned green, at temperatures of 26 ± 1 °C under a 16 h photoperiod with $50-90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ irradiance from two fluorescent tubes (20 W; Osram, São Paulo, Brazil). Cotyledonary node explants were prepared from a single seedling and the two explants obtained were then transferred into solidified shoot induction medium (SIM, B5 basal salts and vitamins, 3mM MES, 3% (w/v) sucrose, 0.2% (w/v) Gelrite[®], 1.67 mg.L^{-1} BAP, pH 5.6) with the hypocotyl and cotyledonary node placed within the medium. The Petri dishes were sealed with adhesive hypoallergenic tape (Nexcare[®]; Micropore, 3M, São Paulo, Brazil) and kept in this medium for two subcultures of 14 days under the same culture room conditions. Cotyledons were excised and the explant containing the newly developed shoots (callus/shoot pad) was sub-cultured onto shoot elongation medium (SEM, MS basal salts (Murashige and Skoog 1962) and B5 vitamins, 3 mM MES, 3% (w/v) sucrose, 0.2% (w/v) Gelrite[®], 1.67 mg.L^{-1} BAP, 0.5 mg.L^{-1} GA₃, 0.1 mg.L^{-1} IAA, 1 mg.L^{-1} zeatin-riboside, pH 5.6) in Magenta[®] (Sigma, St,

Louis, USA) vessels sealed with adhesive hypoallergenic tape. The explants were transferred to new SEM medium every 14 days. Elongated shoots, over 4 cm in length, were placed into rooting medium (RM, half-strength B5 basal salts, full-strength B5 vitamins, 3 mM MES, 3% (w/v) sucrose, 0.2% (w/v) Gelrite[®], 1 mg.L⁻¹ IBA, pH 5.6). Once a small root was formed on the shoot, the plantlets were transferred to pots containing water for 2 days, then transferred directly to pots filled with a mixture (1:1) of autoclaved Plant Max[®] (Eucatex, Curitiba, Brazil) and defibered coconut. To reduce moisture loss and to protect the shoot from the surrounding environment, the plantlets were covered with a clear plastic container for approximately 10 days. The plants were then transferred to larger pots containing soil. The greenhouse conditions were set to 28°C with a 16/8-h (light/dark) photoperiod under natural lights supplemented with lamps.

2.2. DNA isolation

DNA extractions of soybean seeds from regenerated plants were performed as described by McDonald et al. (1994), with slight modifications. One soybean seed was ground and 50 mg of the crushed seed tissue placed in a centrifuge tube and 1 mL of extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 288 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) added. This mixture was vortexed for 30 s and centrifuged for 4 min at 10,144 x g. After centrifugation, the supernatant was retained, centrifuged again and transferred to another centrifuge tube. Proteinase K (Sigma, St, Louis, USA) and CaCl₂ at final concentration 100 µg.mL⁻¹ and 10 µg.mL⁻¹ respectively were added. The tube was incubated at 37 °C in a water bath for 1 h 30 min. Absolute isopropanol (900 µL) was added and allowed to precipitate the DNA for 2 min. The DNA was pelleted by centrifugation for 7 min at 10,144 x g and the pellet air-dried for 15 min at room temperature. The pellet was resuspended in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) containing RNase A (Sigma, St, Louis, USA) at a final concentration of 40mg.µL⁻¹ and was incubated at 37 °C in a water bath for 1 h 30 min. The DNA was precipitated again with isopropanol (900 µL) and the

pellet obtained was resuspended in 300 μL TE buffer and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for subsequent use.

2.3. ISSR fingerprinting

For ISSR amplification, a total of 100 ISSR primers (UBC primer set #9, Biotechnology Laboratory, University of British Columbia, Canada) were evaluated using three randomly chosen individuals. Twenty primers produced strong bands and were further evaluated for ISSR polymorphism. Different concentrations of several reaction components (primer: 0.15, 0.20, 0.25 or 0.30 mM; DNA template: 30, 60 or 120 ng; MgCl_2 : 2.0, 2.5, 3.0 or 3.5 mM; formamide: 1.0 or 2.0%) and a range of annealing temperatures ($45\text{-}55\text{ }^{\circ}\text{C}$) were tested. The banding pattern produced by each primer and factor combination was inspected visually for reproducibility, intensity and presence of polymorphism. Among the twenty primers, twelve that showed strong and reproducible bands were selected for subsequent experiments (Table 1).

Final PCR amplifications of 15 μL total volume consisted of 30 ng of template DNA, 1.5 μL of 10x PCR buffer (Phoneutria, Minas Gerais, Brazil), 0.2 mM of each dNTP (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), 1% formamide (Sigma, St. Louis, USA), 0.2 μM of primer, 0.75 U of Taq DNA polymerase (Phoneutria, Minas Gerais, Brazil), ultrapure water and different concentrations of MgCl_2 (Phoneutria, Minas Gerais, Brazil, Table 1). PCR amplification was programmed on a MasterCycler Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) using the following conditions: a denaturation step at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min, then 35 cycles of 45 s denaturation at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 45 s annealing at 46 to $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Table 1) and 90 s extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by a 7 min extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. 5 μL of the amplification product was separated by electrophoresis on 5% polyacrilamide gels with 1x TAE buffer at constant voltage (50 V) for approximately 12 h. Negative controls, in which template DNA was omitted, were used throughout the amplification. A 100 bp DNA ladder (Invitrogen, Gran Island, New York) was used to verify the length of fragments. Gels were silver stained according to the

procedure described by Benbouza et al. 2006. Gels were dried at room temperature and DNA bands were viewed directly with aid of a white light box, and then photographed under UV light using the gel documentation system L-PIX EX (Locus Biotecnologia, São Paulo, Brazil). To ensure consistency during scoring of band size, the images were grouped according to ISSR primer and analyzed side-by-side on a computer screen.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In the present study ISSR technique was used to evaluate soybean plants regenerated through organogenesis to detect somaclonal variation. A total of one hundred primers were initially screened and finally twelve were chosen for the present study, based on their amplification products which were revealed to be very clear and easy to interpret. Also PCR amplification conditions such as magnesium chloride, template DNA, Taq DNA polymerase concentrations and annealing temperature were optimized to produce sharp ISSR bands with high intensity and without smearing effects. Moreover, the pattern of amplification was highly reproducible when this process was repeated (at least once) for each primer.

The twelve ISSR primers used in this analysis gave rise to 170 well-resolved band classes, ranging from approximately 300 bp to 4 kb in size. The number of bands for each primer varied from 11 to 18. Thus, 14 bands, on average, were amplified per primer. Primer UBC 890 amplified 18 bands and primer UBC 873 amplified 11 bands (Table 1). The amplification pattern of tissue cultured-raised soybean plants is shown by representative gel profiles of primers UBC 808 e UBC 812 (Figure 1).

Of the 1,872 total band profiles (total number of plants analyzed x total number of primers used) obtained only eight appeared different. Therefore, from the 156 recovered plants, only eight showed variation in the amplification patterns in relation to the cultivar CAC-1. This corresponds to a somaclonal variation frequency of 5.13%. This relatively low frequency of polymorphism in the ISSR profile of recovered plants indicates the genetic stability of organogenesis-derived soybean plants through the described protocol.

Since somaclonal variation is expected under tissue culture conditions (Larkin and Scowcroft 1981), especially in the presence of growth regulators, the genetic fidelity of the recovered soybean plants needed to be checked.

According to Vasil (1987), organogenic differentiation is more prone to somatic variations. Hence it becomes imperative to regularly check the genetic integrity of the regenerated plants in order to produce clonally uniform progeny. Variations induced by genetic and epigenetic mechanisms are very likely to be reflected in the banding profiles developed by employing different marker systems.

Since simple sequence repeat based primers target the fast evolving, hypervariable sequences (Reddy et al. 2002), they are considered suitable to detect variations among tissue culture regenerated plants (Chowdary et al. 1998, Leroy et al. 2001, Rahman and Rajora 2001). ISSR methods have been successfully applied together with other molecular markers (AFLP, RFLP and RAPD) to detect the genetic stability of *in vitro* regenerated plants, such as *Actinidia* sp. (Palombi and Damiano 2002); *Oryza sativa* (Ngezahayo et al. 2007); *Swertia chirayita* (Joshi and Dhawan 2007); *Musa* sp. (Venkatachalam et al. 2007, Rout et al. 2009); *Anthurium andreanum* (Gantait et al. 2008); *Dendranthema grandiflora* (Kengkarj et al. 2008); *Anoectochilus formosanus* (Zhang et al. 2010); *Capparis decidua* (Tyagi et al. 2010); *Solanum melongena* (Xing et al. 2010); *Tigridia pavonia* (Piña-Escutia et al. 2010).

In soybean, tissue culture-induced somaclonal variation has been assessed through the analysis of phenotypic traits in plants recovered by both pathways: embryogenesis and organogenesis (Barwale and Widholm 1987, Freytag et al. 1987, Graybosh et al. 1987, Amberger et al. 1992, Widholm, 1996, Radhakrishnam and Kumari, 2008). In particular, Radhakrishnam and Kumari (2008) evaluated morphological (length of roots, shoots, petioles, internodal region and pods; fresh and dry weight from seed and root) and yield characteristics (flowers/nodal region, pods/nodal region, seeds/pod) of soybean plants cultured through an organogenic regeneration procedure and they did not find detrimental or beneficial effects of somaclonal variation. However, Radhakrishnam and Kumari (2009) and Nguyen et al. (2001), reported changes in oil and protein contents from regenerated soybean plants.

Concerning the use of molecular markers for assessing clonal fidelity in soybean, Gesteira et al. (2002) reported a relatively low (<5%) somaclonal variation rate with the use of RAPD markers, and concluded that the somatic embryogenesis methodology employed was suitable for obtaining genetically modified plants. The current results demonstrated a relatively low somaclonal variation in frequency (5.13%), which are in accordance with values reported by Gesteira et al. (2002) for the same soybean cultivar. A proposed explanation for this low somaclonal variation rate is that the plants regenerated from organized callus vary less than those from unorganized callus, whereas no, or very little variation, occurs when plants are regenerated directly without an intermediate callus phase (Leroy et al. 2001, Sliwiska and Thiem 2007, Xing et al. 2010). For this reason an efficient organogenesis might be the method of choice for soybean plants recovery after transformation assays.

It is well known that high levels of growth regulators induce somaclonal variation (Gesteira et al. 2002, Martins et al. 2004, Martin et al. 2006, Venkatachalan et al. 2007). Tun et al. (2001) demonstrated that high dosages of BAP are responsible for nitric oxide (NO) synthesis. This compound has been shown to generate mutations and DNA damage (Lin et al. 2000, Siragusa et al. 2007). These changes can be considered responsible for genetic and epigenetic somaclonal variation found in cell, tissue and organ culture derived plants (Cassels and Cury 2001, Siragusa et al. 2007).

In the present study, analysis was carried out to evaluate the genetic stability of regenerated and acclimatized organogenesis-derived soybean plants. Our results demonstrated that most of the recovered plants were found to remain stable, as assessed by ISSR markers, indicating the usefulness of this regeneration protocol for soybean regeneration in diverse biotechnological approaches.

Table 1- List of UBC primers used for detecting clonal stability in recovered plants.

UBC primer	Primer sequence* (5' – 3')	Annealing temperature (°C)	MgCl ₂ (mM)	Number of bands amplified	Fragment Size (bp)	Number of polymorphic profiles
807	(AG) ₈ T	51	3.5	14	500-2,500	2
808	(AG) ₈ C	50	3.0	17	300-3,000	2
809	(AG) ₈ G	50	3.5	13	500-4,000	-
812	(GA) ₈ A	55	2.0	14	500-2,000	1
834	(AG) ₈ YT	50	3.5	12	350-3,500	-
835	(AG) ₈ YC	51	3.5	15	300-3,000	2
836	A(AG) ₈ YA	50	3.5	12	300-4,000	-
844	(CT) ₈ RA	51	3.0	15	700-4,000	-
873	(GA) ₈ CA	46	3.0	11	700-4,000	-
884	HBH(AG) ₇	50	3.5	14	300-2,000	-
886	VDV (CT) ₇	50	3.5	15	500-3,000	1
890	VHV(GT) ₇	52	3.0	18	350-3,500	-

*R = (A,G); Y = (C,T); B = (C,G,T); D = (A,G,T); H = (A,C,T); V = (A,C,G).

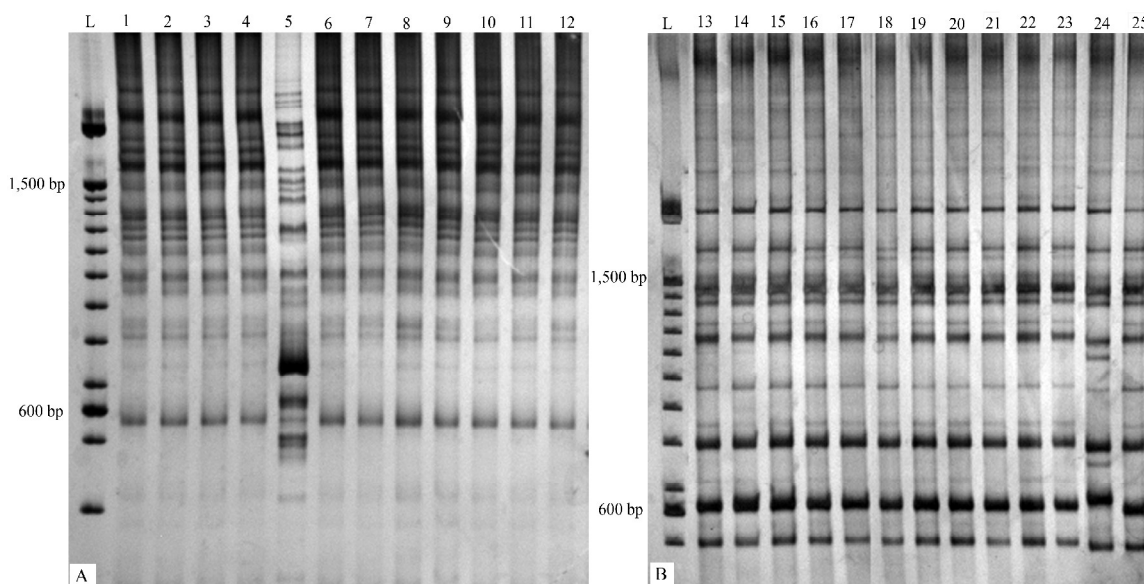


Figure 1- Examples of DNA profiles amplified from soybean organogenesis-derived plants with the ISSR primers UBC 808 (A) and UBC 812 (B). Lane L represents the 100 bp DNA ladder from Invitrogen. Lanes 1 and 13 represents ISSR profiles for cultivar 'CAC-1'. Lanes 2-12 and 14-25 represents tissue culture recovered plants. Lanes 5 and 24 corresponds to variant regenerants R-5 and R-125 respectively.

4. REFERENCES

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

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

Benbouza, H., Jacquemin, J. M., Baudoin, J. P., Mergeai, G.: Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. - Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10(2): 77-81, 2006.

Bennici, A., Andizei, M., Vendramin, G. G.: Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. - Plant Sci. 166: 221-227, 2004.

Cassells, A. C., Curry, R. F.: Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. - Plant Cell Tiss. Org. 64: 145-157, 2001.

Cassells, A. C., Kowalski, B., Fitzgerald, D. M., Murphy, G. A.: The use of image analysis to study developmental variation in micropropagated potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. - Potato Res. 42 (3-4): 541-548, 1999.

Chowdary, K. V., Ramakrishna, W., Tamhankar, S. A., Hendre, R. R., Gupta, V. S., Sahasrabudhe, N. A., Ranjekar.: Identification of minor DNA variations in rice somaclonal variants. - Plant Cell Rep. 18: 55-58, 1998.

Di, R., Purcell, V., Collins, G. B., Ghabril, S. A.: Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. - Plant Cell Rep. 15: 746-750, 1996.

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

Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.: Nutrient requirements of suspensions cultures of soybean root cells. - *Exp. Cell Res.* 50:151-158, 1968.

Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., Das, P. K. *In vitro* mass multiplication with pure genetic identity in *Anthurium andreaeanum* Lind. - *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* 18(2): 113-122, 2008.

Gesteira, A. S., Otoni, W. C., Barros, E. G., Moreira, M. A. RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. - *Plant Breed.* 121: 269-271, 2002.

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

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

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

Joshi, P., Dhawan, V.: Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay. - *Biol. Plant.* 51: 22-26, 2007.

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

Kengkarj, P., Smitamana, P., Fujime, Y.: Assessment of somaclonal variation in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Kitam.) using RAPD and morphological analysis. - *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* 18(2): 139-149, 2008.

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

Leroy, X. J., Leon, K., Hily, J. M., Chaumeil, P., Branchard, M.: Detection of *in vitro* culture-induced instability through inter-simple sequence repeat analysis. - *Theor. Appl. Genet.* 102: 885-891, 2001.

Lin, W., Wei, X., Xue, H., Kelimu, M., Tao, R., Song, Y., Zhou, Z.: Study on DNA strand breaks induced by sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, *in vivo* and *in vitro*. - *Mutat. Res.* 466: 187-195, 2000.

Martin, K. P., Pachathundikandi, S., Zhang, C. L., Slater, A., Madassery, J.: RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. Grande Naine and its propagation via shoot tip culture. - *In vitro Cell. Dev-Pl.* 42:188-192, 2006.

Martins, M., Sarmiento, D., Oliveira, M. M.: Genetic stability of micropropagated almond plantlets as assessed by RAPD and ISSR markers. - *Plant Cell Rep.* 23: 492-496, 2004.

McDonald, M. D., Elliot, L. J., Sweeney, P. A.: DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies. - *Seed Sci. Technol.* 22: 171-176, 1994.

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

Ngezahayo, F., Dong, Y., Liu, B.: Somaclonal variation at the nucleotide sequence level in rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by RAPD and ISSR markers, and by pairwise sequence analysis. – *J. Appl. Genet.* 48: 329-336, 2007.

Nguyen, M. V., Nickell, C. D., Widholm, J. M.: Selection for high seed oil content in soybean families derived from plants regenerated from protoplasts and tissue cultures. - *Theor. Appl. Genet.* 102: 1072-1075, 2001.

Olhoft, P. M., Donovan, C. M., Somers, D. A.: Soybean (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary mature node explants. – Method. Mol. Biol. 343: 385-396, 2006.

Palombi, M. A., Damiano, C.: Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). - Plant Cell Rep. 20:1061-1066, 2002.

Philips, R. L., Kaeppler, S. M., Olhoft, P.: Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal control. - Proc. Nat. Sci. USA, 91: 5222–5226, 1994.

Piña-Escutia, J. L., Vázquez-García, L. M., Arzate-Fernández, A. M.: *In vitro* regeneration and genetic fidelity of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. - Electron. J. Biotechnol. 13(1). doi: 10.2225/vol13-issue1-fulltext-1, 2010.

Pinto, D. L. P., Barros, B. A., Viccini, L. F., Campos, J. M. S., Silva, M. L., Otoni, W. C.: Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. - Plant Cell Tiss. Org. doi: 10.1007/s11240-010-9756-y, 2010.

Radhakrishnam, R., Kumari, B. D. R.: Changes in protein content in micropropagated and conventional soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr.) - World J. Agri. Sci. 5(2): 186-189, 2009.

Radhakrishnam, R., Kumari, B. D. R.: Morphological and agronomic evaluation of tissue culture derived Indian soybean plants. - Acta Agri. Slovenica 91:391-396, 2008.

Rahman, M., Rajora, O.: Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). - Plant Cell Rep. 20: 531-536, 2001.

Reddy, M. P., Sarla, N., Siddiq, E. A.: Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its applications plant breeding. - Euphytica 128: 9-17, 2002.

Rout, G. R., Senapati, S. K., Aparajita, S., Palai, S. K.: Studies on genetic identification and genetic fidelity of cultivated banana using ISSR markers. - Plant Omics J. 2(6): 250-258, 2009.

Siragusa, M., Carra, A., Salvia, L., Puglia, A. M., De Pasquale, F., Carimi, F.: Genetic instability in calamondin (*Citrus madurensis* Lour.) plants derived from somatic embryogenesis induced by diphenylurea derivatives. - Plant Cell Rep. 26: 1289-1296, 2007.

Sliwinska, E., Thiem, B.: Genome size stability in six medicinal plant species propagated *in vitro*. - Biol. Plant. 51: 556-558, 2007.

Tun, N. N., Holk, A., Scherer, G. F. E.: Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. - FEBS Lett. 509: 174-176, 2001.

Tyagi, P., Khanduja, S., Kothari, S. L.: *In vitro* culture of *Capparis decidua* and assessment of clonal fidelity of the regenerated plants. - Biol. Plant. 54(1): 126-130, 2010.

Vasil, I. K.: Developing cell and tissue culture systems for improvement of cereal and grass crops. - J. Plant Physiol. 128: 193-218, 1987.

Venkatachalam, L., Sreedhar, R. V., Bhagyalakshmi, N.: Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers. - Plant Growth Regul. 51: 193-205, 2007.

Widholm, J. M.: *In vitro* selection and culture-induced variation in soybean. - In: Verma, D. P. S., Shoemaker, R. (ed.): Soybean: genetics, molecular biology and biotechnology. Pp. 107-126. - CAB Int, Wallingford 1996.

Xing, Y., Yu, Y., Luo, X., Zhang, J. N., Zhao, B. Guo, Y. D.: High efficiency organogenesis and analysis of genetic stability of the regenerants in *Solanum melongena*. - Biol. Plant. 54 (2): 231-236, 2010.

Yang, H., Tabei, Y., Kamada, H., Kayano, T.: Detection of somaclonal variations in cultured rice cells using digoxigenin-based random amplified polymorphic DNA. - Plant Cell Rep. 18: 520-526, 1999.

Zhang, F., Lv, Y., Dong, H., Guo, S.: Analysis of genetic stability through inter simple sequence repeats molecular markers in micropropagated plantlets of *Anoectochilus formosanus* HAYATA, a medicinal plant. - Biol. Pharm. Bull. 33(3): 384-388, 2010.