

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular**

**Plantas transgênicas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] resistentes à  
lagarta *Anticarsia gemmatalis***

**Tese de Doutorado**

**Milena Schenkel Homrich**

**Porto Alegre**

**2008**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular**

**Plantas transgênicas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] resistentes à  
lagarta *Anticarsia gemmatalis***

**Milena Schenkel Homrich**

**Tese submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Genética e Biologia  
Molecular da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, como requisito parcial para  
a obtenção do Título de Doutor em  
Ciências.**

**Orientadora: Prof. Dra. Maria Helena Bodanese Zanettini**

**Co-orientadora: Prof. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia**

**Porto Alegre, março de 2008.**

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética desta Universidade e nas casas de vegetação do Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, EMBRAPA TRIGO, Passo Fundo, RS. O projeto foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Centro do Agronegócio-Casa Rural.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”.

Fernando Pessoa

À minha família e ao Marcio, agradeço.

À Isadora, luz da minha vida, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Às minhas duas orientadoras...

à **MARIA HELENA**, praticamente minha mãe, agradeço pela orientação preciosa, pela dedicação e extrema competência, pelo caráter firme e seguro dos seus ensinamentos. Um exemplo a ser seguido de pessoa e profissional;

à **LUCIANE**, minha “amiga-orientadora” querida, agradeço pelo apoio intelectual, pela acolhida e por todos os seus ensinamentos;

Aos Pesquisadores da EMBRAPA-TRIGO, em especial, ao **JORGE, PAULO** e **SALVADORI**, por me auxiliarem de forma muito competente na etapa mais importante deste trabalho;

À **ANNETTE DROSTE**, por ter desbravado, de forma pioneira, o difícil caminho da cultura *in vitro* e da transformação genética de soja;

Ao **GIANCARLO PASQUALI**, pela colaboração ao longo de todo o trabalho;

À **MÁRCIA MARGIS**, sempre disponível e interessada, agradeço pelas sugestões enriquecedoras em cada um de nossos encontros. Esta é a oportunidade para manifestar minha imensa admiração e expressar os meus mais sinceros agradecimentos;

À **ELIANE KALTCHUK-SANTOS** e à **LAURA BIANCHESSI ALVES**, pela ajuda com as análises de cito;

Ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**, especialmente, aos professores, pelos ensinamentos e atenção sempre dispensados;

Ao **ELMO** e à **ELLEN**, pela eficiência e presteza, pela disponibilidade em ajudar sempre que solicitados;

À **SILVIA**, pela amizade, apoio técnico e constante ajuda;

A todos os colegas e amigos do laboratório de Genética Vegetal, em especial, aos que moram no meu coração (não preciso citar nomes, eles sabem quem são);

À minha fiel amiga “lôra”, agora comadre, **ADRIANA**, e ao “dindo” **ANDRÉS**, que sempre fizeram com que os momentos de incerteza e dificuldade se tornassem menos significantes e os momentos felizes, mais intensos;

À minha mãe, **JANE**, pelo exemplo de vida, o qual tento seguir a cada dia;

Ao amor da minha vida, **MARCIO**, que tanto me ajudou e que sempre esteve ao meu lado;

À minha família, meu porto seguro, que eu amo demais.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
A soja.....	12
Transformação genética vegetal .....	13
Embriogênese somática e transformação genética de soja.....	15
Co-transformação.....	18
<i>Bacillus thuringiensis</i> e <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	19
Vantagens do uso de plantas modificadas com genes de <i>Bt</i> .....	22
Estabilidade cromossômica das plantas geneticamente transformadas .....	25
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	26
<b>OBJETIVOS</b> .....	28
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	30
“IAS5” transgenic soybean [ <i>Glycine max</i> (L.) Merrill] plants expressing a modified CRY1AC endotoxin show resistance to <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	30
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	67
Agronomic performance of transgenic soybean expressing a <i>cry1Ac</i> gene for control of velvetbean caterpillar .....	67
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	88
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	96



## RESUMO

O objetivo deste estudo foi produzir plantas transgênicas de soja resistentes à *Anticarsia gemmatalis*. Embriões somáticos da cultivar comercial IAS 5 [*Glycine max* (L.)] foram co-transformados, por bombardeamento de partículas, com o gene modificado *cryIAc* de *Bacillus thuringiensis*, e com os genes *gusA* e *hpt*. A expressão do gene *cryIAc* em soja foi controlada pelo promotor da ubiquitina-1 de milho. O co-bombardeamento resultou em uma eficiência de co-transformação de 44%. A integração e expressão dos transgenes *gusA/hpt* e *cryIAc* nos genomas de uma amostra de embriões transformados e de todas as plantas T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> foram confirmadas por atividade de GUS, PCR, *Southern blot*, *Western blot* e/ou ELISA. Duas das sete plantas T<sub>0</sub> co-transformadas produziram sementes e foram analisadas quanto ao padrão de integração e herança até a geração T<sub>4</sub>. As progênes T<sub>1</sub> de ambas as plantas T<sub>0</sub> segregaram para menos plantas *cryIAc/gusA*-positivas do que o predito pelos princípios Mendelianos para um único loco dominante (3:1). As famílias T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> continuaram a segregar de maneira excepcional, com uma vasta deficiência de plantas transgênicas. Além disso, a taxa de segregação indicou que as plantas T<sub>2</sub> eram uniformemente heterozigotas para os traços transformados. No entanto, a condição homozigota foi obtida na geração T<sub>3</sub> e 11 isolinhas transgênicas foram estabelecidas. As isolinhas transgênicas homozigotas foram avaliadas em relação aos possíveis efeitos do transgene na performance agrônômica. Não foi detectada redução significativa de produtividade nas plantas transgênicas. A análise citogenética mostrou que as plantas transformadas apresentam cariótipo normal (2n=40). As plantas transgênicas também foram avaliadas em ensaios *in vitro* e *in vivo* para resistência à *Anticarsia gemmatalis* (lagarta-da-soja). Dois controles negativos (IAS 5 não transgênica e isolinha

homozigota *gusA*) foram utilizados. Em um bioensaio com folhas destacadas, as plantas *cryIAc* exibiram completa eficácia contra *A. gemmatalis*, enquanto os controles negativos sofreram significativo dano. Dados do ensaio com plantas inteiras demonstraram uma elevada proteção das plantas *cryIAc* contra a lagarta-da-soja, enquanto as plantas não transgênicas e a isolinha homozigota *gusA* exibiram 56,5 e 71,5% de desfolhação, respectivamente. Os bioensaios indicaram que as plantas transgênicas foram altamente tóxicas à *A. gemmatalis*, oferecendo um efetivo potencial para resistência a insetos em soja.

## ABSTRACT

The objective of this study was to produce soybean transgenic plants resistant to *Anticarsia gemmatalis*. Somatic embryos of IAS 5, a *Glycine max* (L.) commercial cultivar, were co-transformed using particle bombardment with the modified *Bacillus thuringiensis cryIAc*, *gusA* and *hpt* genes. The expression of *cryIAc* gene in the soybean was controlled by the ubiquitin-1 promoter from maize. The co-bombardment resulted in a co-transformation efficiency of 44%. The integration and expression of the *gusA/hpt* and *cryIAc* transgenes into the genomes of a sample of transformed embryos and all T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> plants were confirmed by GUS activity, PCR, *Southern blot*, *Western blot* and/or ELISA. Two T<sub>0</sub> plants out of the seven co-transformed produced seeds and were analyzed for patterns of integration and inheritance until the T<sub>4</sub> generation. The T<sub>1</sub> progenies of both T<sub>0</sub> plants segregated for fewer *cryIAc/gusA*-positive plants than predicted by Mendelian principles for a single dominant locus (3:1). The T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> families continued to segregate in an exceptional manner, with a vast deficiency of transgenic plants. Moreover, the segregation

ratios indicated that T<sub>2</sub> plants were uniformly heterozygous for the transformed traits. However, the homozygous condition was obtained in the T<sub>3</sub> generation and 11 transgenic isolines were established. The homozygous transgenic isolines were evaluated to test for possible effects the transgene might have on agronomic performance. No significant yield reduction was observed in transgenic plants. The cytogenetical analysis showed that transgenic plants present normal karyotype (2n=40). The transgenic plants were also evaluated by *in vitro* and *in vivo* assays for resistance to *Anticarsia gemmatalis* (velvetbean caterpillar). Two negative controls (non-transgenic IAS 5 and homozygous *gusA* isolate) were used. In a detached-leaf bioassay, *cryIAc* plants exhibited complete efficacy against *A. gemmatalis*, whereas negative controls suffered significant damage. Whole plant-feeding assay data confirmed very high protection of *cryIAc* plants against velvetbean caterpillar while non-transgenic IAS 5 and homozygous *gusA* isolate exhibited 56.5 and 71.5% defoliation, respectively. The bioassays indicated that the transgenic plants were highly toxic to *A. gemmatalis*, offering a potential for effective insect resistance in soybean.

## INTRODUÇÃO GERAL

### A soja

A soja cultivada [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma espécie de planta anual, diplóide ( $2n = 40$ ), de autofecundação, nativa da China e explorada no Oriente há mais de cinco mil anos. No Brasil, esta cultura foi estabelecida a partir da década de 1960 e, hoje, é uma das espécies vegetais de maior interesse econômico do país. Atualmente, a produção de soja nos países da América do Sul ultrapassa a dos Estados Unidos da América (EUA). Em conjunto, os países produtores do Cone Sul produzem 47% de toda a soja no mundo. Os três maiores produtores são o Brasil, que participa com 57% da produção sul-americana, seguido pela Argentina, com 40% e pelo Paraguai, com 3% (ERS-USDA, 2008). Nos últimos anos, a área plantada de soja cresceu 106% no Brasil, 170% na Argentina e, aproximadamente, 125% no Paraguai e na Bolívia.

Como a maioria das espécies de plantas cultivadas que fazem parte do sistema agrícola atual, a soja possui uma baixa variabilidade genética, o que tem dificultado o seu melhoramento através de técnicas clássicas de cruzamento. A fonte dos recursos genéticos representada por espécies afins é inacessível para a soja, devido à incompatibilidade sexual dos cruzamentos interespecíficos e intergenéricos (Hu e Bodanese-Zanettini, 1995). Desta forma, a manipulação genética *in vitro* abriu a perspectiva de que genes derivados de plantas relacionadas ou não, e mesmo de outros organismos, possam ser utilizados em programas de melhoramento, através da utilização de técnicas moleculares de transferência de genes.

## **Transformação genética vegetal**

A transformação genética vegetal é caracterizada pela introdução de DNA exógeno em células de plantas, utilizando-se os métodos de engenharia genética. Este procedimento de manipulação genética visa à expressão de genes heterólogos ou também a superexpressão ou supressão de genes endógenos nas plantas. As plantas que têm seus genomas modificados por transformação genética são denominadas de transgênicas ou geneticamente modificadas (GM).

Os principais objetivos na geração de Plantas Geneticamente Modificadas (PGM) consistem em aumentar a resistência vegetal a herbicidas e patógenos, aumentar a tolerância a estresses abióticos, melhorar a qualidade nutricional do produto vegetal e produzir proteínas e biopolímeros de interesse técnico e farmacêutico (Yuan e Knauf, 1997; Herbers e Sonnewald, 1999; Grover *et al.*, 1999).

Os avanços na utilização da transgênese vegetal têm sido relatados em um grande número de espécies de plantas, utilizando-se diferentes métodos de transformação genética. Estes métodos incluem a transformação genética mediada por polietilenoglicol (PEG) e lipossomos (métodos químicos), a microinjeção, a eletroporação e o bombardeamento de partículas (métodos físicos), o uso de vetores virais e/ou bacterianos, como a agroinfecção e o sistema *Agrobacterium* (métodos biológicos).

O método de transformação genética por bombardeamento de partículas (Sanford, 1988), também denominado de aceleração de partículas ou projéteis, biolística ou biobalística, é caracterizado pela introdução de moléculas de DNA em células e tecidos intactos, por meio de microprojéteis acelerados em alta velocidade, capazes de atravessarem a parede e as membranas celular e nuclear, liberando no núcleo os fragmentos de DNA. Nesta organela, por processos de recombinação ilegítima ou

homóloga, e dependentes exclusivamente de componentes celulares, o DNA exógeno eventualmente pode integrar-se ao DNA cromossômico (Sanford, 1990).

A principal vantagem do método de bombardeamento de partículas é a possibilidade de transferência de genes, independentemente do genótipo, para qualquer tipo de tecido ou célula, sem a necessidade da compatibilidade bactéria/hospedeiro, exigida pelo sistema *Agrobacterium*.

O bombardeamento de partículas permite a introdução de DNA nas células vegetais utilizando-se usualmente plasmídeos. Estes são aderidos às partículas de metais, como ouro ou tungstênio (microcarreadoras). Os metais devem ser quimicamente inertes para evitar reações com o DNA ou com componentes celulares. O complexo DNA-partículas é acelerado em direção às células-alvo, utilizando-se vários aparatos e propelentes baseados em diversos mecanismos de aceleração. Finer *et al.* (1992) desenvolveram um acelerador de partículas denominado “*Particle Inflow Gun*” (PIG). Este aparelho tem sido utilizado com sucesso pelo fato de empregar baixas pressões de gás hélio, resultando em menores danos aos tecidos bombardeados (Droste *et al.*, 2002).

Nos trabalhos de transformação genética vegetal são utilizados, usualmente, além do gene de interesse, genes denominados de marcadores de seleção e genes repórteres. Os genes marcadores de seleção são aqueles capazes de conferir resistência ou tolerância a antibióticos e a herbicidas, permitindo a seleção do material transgênico. Os genes repórteres, por sua vez, codificam proteínas cuja presença ou atividade enzimática são facilmente percebidas e mensuráveis, denotando a condição transgênica de células, tecidos e organismos (Walden e Wingender, 1995).

O gene repórter mais utilizado na avaliação da condição transgênica de células e tecidos é o *uidA* ou *gusA*, isolado da bactéria *Escherichia coli* e que codifica a enzima  $\beta$ -

glucuronidase (GUS). As células transformadas com este gene podem ser visualizadas por meio da coloração azul decorrente da conversão do substrato ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glicurônico em um precipitado indólico azul, na presença de oxigênio.

Entre os genes capazes de conferir resistência a antibióticos e frequentemente utilizados em plantas, estão o gene da neomicina-fosfotransferase (*nptII*) ou aminoglicosídeo-fosfotransferase 3'II (*atp3'*) e o gene da higromicina-fosfotransferase (*hpt*). O gene *nptII* foi originalmente isolado do transposon Tn5 de *E. coli* e é capaz de conferir resistência à neomicina e aos seus análogos estruturais como kanamicina, geneticina (G418) e paromomicina. O gene *hpt*, isolado de *E. coli*, codifica a enzima higromicina-fosfotransferase (HPT) e confere resistência ao antibiótico higromicina (Van Den Elzen *et al.*, 1985).

### **Embriogênese somática e transformação genética de soja**

A embriogênese somática consiste no desenvolvimento de embriões a partir de micrósoros ou tecidos somáticos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (Williams e Maheswaran, 1986). Este processo envolve uma série de mudanças morfológicas que são semelhantes, em vários aspectos, àquelas associadas com o desenvolvimento dos embriões zigóticos.

Embora para outras espécies vegetais como, por exemplo, *Daucus carota* (Steward, 1958), a embriogênese somática tenha sido descrita há bastante tempo e possa ser considerada rotineira, em soja, o primeiro registro foi de Beversdorf e Bingham (1977), mas apenas poucos embriões foram induzidos. Christianson *et al.* (1983) regeneraram, pela primeira vez, plantas de soja *in vitro* via embriogênese somática.

Vários trabalhos posteriores relataram a obtenção de embriões somáticos, por via direta ou indireta, a partir de cotilédones de embriões imaturos (Lippmann e Lippmann, 1984; Lazzeri *et al.*, 1985; Barwale *et al.*, 1986; entre outros). Contudo, a maioria dos protocolos se mostrava pouco eficiente para a transformação. Em parte, essa limitação provinha da incapacidade de produzir um grande número de embriões, obstáculo superado com a descoberta do uso de altas concentrações do regulador de crescimento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nas etapas de indução e proliferação dos embriões somáticos. Por outro lado, a transformação dos embriões somáticos originava plantas quiméricas (Parrott *et al.*, 1989) devido à origem multicelular dos embriões somáticos primários, a partir de células superficiais da epiderme dos explantes (Finer, 1988). Entretanto, este último autor mostrou que a proliferação dos embriões somáticos secundários ocorria a partir de células únicas da superfície dos embriões primários, e que a embriogênese secundária poderia ser obtida com a manutenção do tecido em meio com alta concentração de 2,4-D. A origem unicelular dos embriões secundários faz deste tecido o principal alvo para a transformação genética, afastando o problema do quimerismo.

Dois métodos de transferência de genes têm sido utilizados na transformação de diferentes tecidos de soja. Estes incluem: (1) bombardeamento de partículas, utilizando como alvo meristemas de brotos (McCabe *et al.*, 1988; Christou *et al.*, 1989) e culturas embriogênicas em suspensão (Finer e McMullen, 1991; Stewart *et al.*, 1996); (2) sistema *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando como alvo nós cotiledonares derivados de plântulas de 5 a 7 dias (Hinchee *et al.*, 1988; Donaldson e Simmonds, 2000; Olhoft *et al.*, 2003), sementes maduras (Paz *et al.*, 2006), embriões somáticos provindos de cotilédones imaturos (Parrott *et al.*, 1989; Yan *et al.*, 2000) e culturas embriogênicas em suspensão (Trick e Finer, 1998).



Um procedimento simples para o estabelecimento e proliferação de embriões somáticos de cotilédones imaturos, mais rápido e menos laborioso do que as culturas embriogênicas em suspensão, foi desenvolvido por Santarém *et al.* (1997), utilizando um meio semi-sólido descrito por Wright *et al.* (1991). Seguindo este procedimento, Santarém e Finer (1999) e Droste *et al.* (2002) produziram plantas transgênicas de soja das cultivares “Jack” e “IAS 5”, respectivamente, expressando o gene repórter *gusA*. As plantas transgênicas obtidas em ambos os trabalhos eram férteis, indicando que esta estratégia é bastante promissora para a recuperação de plantas transgênicas de soja.

Inúmeros trabalhos têm indicado que a regeneração de soja é genótipo-específica e que a grande maioria das cultivares permanece recalcitrante à cultura *in vitro* e à transformação. Não existe um sistema de transformação eficiente para a maior parte das cultivares de soja (Trick *et al.*, 1997; Hofmann *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2004). Isto explica, em parte, a escassez de publicações relacionadas à transformação genética de cultivares comerciais desta cultura.

De acordo com Meurer *et al.* (2001), existem dois caminhos para otimizar a regeneração das culturas embriogênicas e os protocolos de transformação de soja: 1) testar um grande número de novas cultivares, para identificar aquelas com potencial embriogênico; 2) utilizar protocolos estabelecidos para cultivares como “Jack”, que tem sido a mais empregada em trabalhos de transformação de soja nos EUA. Neste caso, a obtenção das plantas geneticamente modificadas deve estar associada a programas de melhoramento tradicional, com o objetivo de introgridir os traços transgênicos em outros genótipos. Esta segunda opção foi seguida por Stewart *et al.* (1996) e Yan *et al.* (2000) para a transformação de soja visando resistência a insetos e a modificação de proteínas, respectivamente.

A cultivar brasileira de soja IAS 5 ainda tem sido, freqüentemente, utilizada em programas de melhoramento genético e é recomendada para o cultivo nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Goiás (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007). Esta cultivar tem mostrado uma boa resposta em sistemas embriogênicos (Santos *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2001; Droste *et al.*, 2002).

### **Co-transformação**

A co-transformação caracteriza-se pela utilização de dois cassetes de transformação (ou plasmídeos) independentes, um dos quais portando os genes repórter/marcador de seleção e o outro, o gene de interesse. O sistema de co-transformação permite a segregação do gene de interesse e dos genes repórter/marcador de seleção na progênie das plantas transformadas, desde que tais genes tenham sido inseridos em *loci* não ligados (Ebinuma *et al.*, 2001). Desta maneira, a co-transformação pode ser vista como uma estratégia promissora para a obtenção de plantas transgênicas livres de genes marcadores de seleção.

A maioria dos trabalhos de co-transformação foi realizada com a utilização do sistema *Agrobacterium*. Na revisão publicada por Ebinuma *et al.* (2001), está registrado o sucesso de co-transformação via *Agrobacterium* em diferentes espécies e diferentes tecidos-alvo: protoplastos de tabaco, discos de folhas de tabaco, segmentos de hipocótilo de canola, discos de folhas de *Arabidopsis* e em arroz. Segundo os autores, embora a freqüência de co-transformação tenha apresentado uma ampla variação (de 10 a 90%), na maioria dos trabalhos, foi verificado que esta freqüência foi superior à prevista para eventos de transformação independentes.

Utilizando técnicas de transferência direta, especialmente transformação de protoplastos mediada por polietilenoglicol e bombardeamento de partículas, vários grupos de pesquisa registraram frequências de co-transformação variando de 18 a 88% (Bettany *et al.*, 2002). Em soja, uma frequência de co-transformação de aproximadamente 25% foi encontrada em experimentos envolvendo aceleração de partículas ou eletroporação de protoplastos, bem como aceleração de partículas utilizando meristemas como alvo (Christou *et al.*, 1990). Não existem, até o momento, relatos de trabalhos, em soja, utilizando embriões somáticos como alvo para estudos de co-transformação.

### ***Bacillus thuringiensis e Anticarsia gemmatilis***

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria Gram-positiva, entomopatogênica, aeróbica (ou facultativamente anaeróbica) e amplamente utilizada como biopesticida para o controle de insetos-praga de culturas agronomicamente importantes. À semelhança de outras bactérias, esta espécie pode manter-se em latência na forma de endósporos, sob condições adversas. Durante a fase de esporulação, as bactérias sintetizam proteínas que se acumulam na periferia dos esporos sob a forma de cristais (Peferöen, 1997). Estes cristais são compostos de várias proteínas Cry, também chamadas de  $\delta$ -endotoxinas ou *Insecticidal Crystal Proteins* (ICPs). Estas proteínas têm uma atividade tóxica específica, principalmente, contra larvas de lepidópteros, dípteros e coleópteros (Hongyu *et al.*, 2000).

Alguns modelos têm sido propostos na tentativa de elucidar o mecanismo de ação das proteínas Cry. Atualmente, o modelo “guarda-chuva” é o mais aceito na comunidade científica. De acordo com este modelo, as  $\delta$ -endotoxinas constituintes dos cristais são protoxinas solubilizadas e proteoliticamente convertidas em pequenos polipeptídios no trato digestivo dos insetos suscetíveis. Nesse processo, ocorre a remoção de um peptídeo

amino-terminal, composto de 25 a 30 aminoácidos e de, aproximadamente, metade da proteína restante, correspondente à porção C-terminal. Estes pequenos polipeptídios associam-se a sítios específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células do intestino dos insetos, causando lise osmótica por meio da formação de poros na membrana celular (Schnepf *et al.*, 1998; Bravo *et al.*, 2004).

Um segundo modelo de ação das proteínas Cry foi descrito por Broderick *et al.* (2006). Segundo estes autores, as lesões causadas no intestino do inseto, por ação das  $\delta$ -endotoxinas, possibilitariam a colonização de sua hemolinfa pela microbiota enterobacteriana residente, e o inseto morreria devido a uma “infecção generalizada”.

Desta maneira, modelos anteriores sugerem que a causa da morte do inseto ocorre por inanição devido à paralisia da digestão, causada pelas lesões. No entanto, Broderick *et al.* (2006) mostraram que os insetos, cujo trato digestivo havia sido esterilizado com antibióticos, não morriam ao ingerir a toxina e, ainda, eram capazes de regenerar seu epitélio intestinal, retomando a alimentação normal.

A lagarta *Anticarsia gemmatilis* Hübner é a principal praga da soja e ocorre, principalmente, nas Américas do Norte e Sul (Panizzi e Corrêa-Ferreira, 1997; Macrae *et al.*, 2005). Esta lagarta causa danos ao reduzir substancialmente a área foliar, promovendo uma significativa redução na produção de grãos. Uma única larva pode consumir mais de 110 cm<sup>2</sup> da folhagem da soja (Walker *et al.*, 2000). Para o controle deste inseto têm sido utilizados, predominantemente, inseticidas químicos, com até três aplicações por safra, ocasionando enormes prejuízos ambientais e custos elevados aos produtores. Além disso, os inseticidas químicos provocam a mortalidade de outros insetos, até mesmo de inimigos naturais, que contribuem para o controle de pragas. A busca por métodos alternativos de controle de insetos-praga tem sido realizada por vários laboratórios ao redor do mundo

devido, principalmente, à necessidade de preservação do meio ambiente. Os inseticidas biológicos têm sido a alternativa encontrada para a chamada “agricultura orgânica” e para o controle mais seletivo de insetos. Bioinseticidas contra *A. gemmatilis* baseados em formulações de esporos de *B. thuringensis* demonstraram várias vantagens sobre o uso de agentes químicos de controle, no que diz respeito à alta especificidade e toxicidade desta bactéria a determinados insetos-praga, enquanto é atóxica a outros insetos, plantas e vertebrados (Hongyu *et al.*, 2000). Estes bioinseticidas, mesmo utilizados há mais de 50 anos e com claras indicações de serem menos impactantes ao meio ambiente do que os agroquímicos, nunca ocuparam um lugar de destaque no mercado de inseticidas, principalmente, por problemas relacionados à perda de estabilidade, à ausência de translocação nas plantas, ao espectro limitado de ação e à rápida degradação pela ação da luz ultravioleta (Navon, 2000).

Recentemente, a possibilidade de gerar plantas transgênicas resistentes a insetos, através da introdução nestas de genes codificadores de  $\delta$ -endotoxinas, tem sido explorada em diferentes culturas. Em 1981, o primeiro gene *cry* foi clonado e expresso em *Escherichia coli* (Schnepf e Whiteley, 1981). Poucos anos depois, foi produzida a primeira planta de tomate com genes de *Bt* (Fischhoff *et al.*, 1987). O milho Maximizer™ da Novartis, o algodão Bollgard™ e a batata Newleaf™ da Monsanto foram introduzidos no mercado norte-americano em 1995, sendo genericamente conhecidos como plantas-*Bt* (Jouanin *et al.*, 1998). Em 2006, 19% e 13% da área global de transgênicos (102 milhões de hectares) foi ocupada por culturas *Bt* e por culturas *Bt*/tolerantes a herbicida, respectivamente (James, 2006). Além do milho, do algodão e da canola, que já se encontram em comercialização, outras plantas cultivadas expressando uma ou várias

proteínas Cry para o controle de lepidópteros e coleópteros estão em fase de desenvolvimento em laboratórios ou em testes a campo.

Apesar de plantas de soja-*Bt* ainda não terem sido liberadas para cultivo, várias linhagens transgênicas já foram obtidas. A atividade inseticida de  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* no controle de larvas de *A. gemmatilis* foi demonstrada através de bioensaios com plantas de soja-*Bt* por Stewart *et al.* (1996), Walker *et al.* (2000), Macrae *et al.* (2005) e, mais recentemente, por Miklos *et al.* (2007) e Homrich *et al.* (no prelo).

### **Vantagens do uso de plantas modificadas com genes de *Bt***

Levando em conta os dados relativos à segurança, aos riscos ambientais e à eficiência no controle de pragas, avaliados durante os 50 anos de utilização do *Bacillus thuringiensis* como biopesticida, pode-se considerar que as plantas-*Bt* oferecem segurança e controle efetivo dos insetos (De Maagd *et al.*, 1999). Em nível mundial, os produtores perdem bilhões de dólares com a redução da produtividade ocasionada pelo ataque de insetos e pelo alto custo de defensivos agrícolas. Assim, a necessidade de diminuir os custos, minimizar os danos ambientais e reduzir os riscos à saúde dos produtores, tem tornado as plantas-*Bt* uma alternativa promissora para o controle de insetos.

Desde a liberação comercial das plantas-*Bt* nos EUA, os agricultores têm adotado esta tecnologia visando um aumento efetivo de produção na agricultura sustentável (Dunwell, 1999). Neste contexto, além da alta efetividade no controle de insetos-praga, podem-se mencionar como benefícios do uso desta tecnologia:

**1. Diminuição dos efeitos ambientais sobre as toxinas:** As plantas-*Bt* têm demonstrado vantagens sobre os biopesticidas, pois a eficiência da produção de proteínas

Cry por estas plantas não é afetada por fatores ambientais, como: chuva após a aplicação, radiação solar e altas temperaturas (Betz *et al.*, 2000). Adicionalmente, as proteínas Cry recombinantes se acumulam nos tecidos vegetais de forma homogênea, tornando mais eficiente o efeito tóxico aos insetos do que a aplicação (pulverização) de esporos de *Bt*.

**2. Maior segurança na utilização:** Várias características inerentes às plantas-*Bt* proporcionam a estes produtos um grau de segurança que, dificilmente, pode ser obtido por meio de inseticidas químicos como, por exemplo, o fato destas proteínas não serem tóxicas para humanos e animais domésticos, nem se acumularem nos tecidos adiposos ou persistirem no ambiente (Siegel, 2001). Outra característica importante é que as proteínas Cry exibem um alto grau de especificidade aos insetos-alvo, e devem ser ingeridas para exercerem seus efeitos, já que não possuem atividade por contato (Betz *et al.*, 2000). Ainda, a exposição de humanos e outros animais a estas proteínas é muito menor do que aos inseticidas normalmente utilizados. Isto porque os inseticidas químicos e biológicos são, normalmente, aplicados em grandes quantidades, enquanto que as proteínas Cry, em plantas-*Bt*, são produzidas em pequenas quantidades no interior da planta (mesmo com o uso de seqüências promotoras fortes) (Bishop *et al.*, 1999).

**3. Redução do uso de inseticidas químicos:** Nos últimos anos, o impacto negativo dos produtos químicos sobre o meio ambiente tem se agravado com a poluição das terras e dos mananciais de água doce, com seus acúmulos na cadeia alimentar, e com os conseqüentes problemas de saúde pública. O percentual de redução nas aplicações de inseticidas químicos com o emprego de plantas-*Bt* foi variável, dependendo da cultura. Na China, por exemplo, o algodão-*Bt* proporcionou grande redução no uso de químicos, que variou entre 60 e 80% (Xia *et al.*, 1999).

**4. Aumento da produção agrícola pela redução dos danos:** A proteção inerente das plantas-*Bt* foi traduzida em aumento de produtividade agrícola. As perdas anuais de milho nos EUA, devido aos danos causados pelo besouro *L. decemlineata*, variavam em torno de 33 e 300 milhões de toneladas/ano, e a redução destas perdas com o emprego do milho-*Bt* levou ao aumento significativo da produção final desta cultura (Betz *et al.*, 2000). Em 1997, um aumento de produção de aproximadamente 5% em 1/3 dos 30 milhões de hectares de milho híbrido cultivado nos EUA representou um lucro em torno de US\$ 350.000.000 aos produtores (Peferöen, 1997).

**5. Conservação de inimigos naturais dos insetos-praga:** Os efeitos das toxinas de *Bt* sobre os inimigos naturais dos insetos-praga (parasitóides ou predadores) têm sido estudados em laboratórios e a campo, indicando pouco ou nenhum efeito sobre estes organismos (Wraight *et al.*, 2000). Os inimigos naturais são extremamente importantes, pois as pragas secundárias podem tornar-se um problema caso a população de insetos benéficos seja reduzida pelo uso de inseticidas químicos de amplo espectro. Xia *et al.* (1999) relataram que, na China, o uso de algodão-*Bt* determinou a redução do uso de inseticidas químicos, resultando em um aumento de 24% na população de inimigos naturais dos insetos-praga.

**6. Diminuição do surgimento de doenças fúngicas como consequência da redução dos danos:** As lesões causadas por insetos em vários órgãos das plantas promovem redução na produção de grãos e oportunizam a infecção por fungos, principalmente, dos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus* (Munkvold e Hellmich, 1999a). A germinação dos esporos e a proliferação de fungos do gênero *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. proliferatum* ou *F. subglutinans*), normalmente estão associadas a lesões causadas pela larva *Ostrinia nubilalis* (Sobek e Munkvold, 1999). A importância primária destas doenças



está associada às micotoxinas, particularmente fumosinas e aflatoxinas, produzidas por fungos destes gêneros (Munkvold e Hellmich, 1999b). As fumosinas podem ser fatais para cavalos e suínos, porém sua relevância para a saúde humana ainda está em debate. A aflatoxina é, reconhecidamente, uma micotoxina extremamente tóxica a animais e humanos. As plantas-*Bt*, por permitirem considerável controle do ataque de insetos, levaram à redução da possibilidade de infecção por *Fusarium e Aspergillus* (Betz *et al.*, 2000).

### **Estabilidade cromossômica das plantas geneticamente transformadas**

É bem conhecido que células vegetais propagadas *in vitro* podem sofrer várias alterações genéticas e cromossômicas. Segundo Finer e McMullen (1991), algumas plantas transgênicas produzidas pelo bombardeamento de suspensões embriogênicas eram estéreis e apresentavam várias alterações morfológicas. As análises citológicas de células de cultura em suspensão, de raízes de embriões germinados e de plantas T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub>, realizadas na tentativa de determinar a causa da variação morfológica, revelaram várias aberrações cromossômicas, tais como deleções, duplicações, trissomias e tetraploidia. Foi mostrado, também, que os genótipos de soja diferem em sua suscetibilidade à instabilidade cromossômica induzida pela cultura de tecidos (Singh *et al.*, 1998). Portanto, a análise cromossômica de plantas regeneradas *in vitro* pode ajudar a eliminar material genético e cromossomicamente anormal obtido em experimentos de transferência de genes.

## JUSTIFICATIVA

Embora existam no mercado produtos transgênicos de soja utilizados em larga escala, a transformação genética desta espécie está longe de ser uma rotina. Inúmeros trabalhos têm indicado que a regeneração de soja é genótipo-específica e que a grande maioria das cultivares permanece recalcitrante à cultura *in vitro* e à transformação.

Uma vez que em nossos laboratórios o tecido embriogênico tem sido utilizado como alvo para a transferência de genes, a otimização do sistema de regeneração *in vitro* é pré-requisito para o sucesso na transformação genética. Desde 1991, temos testado a regeneração via embriogênese somática de várias cultivares de soja recomendadas para o cultivo no Brasil. A cultivar IAS 5, utilizada no presente trabalho, destacou-se por apresentar alto potencial embriogênico e alta capacidade de regeneração *in vitro* (Santos *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2001). Droste *et al.* (2002) produziram plantas férteis e totalmente transgênicas desta mesma cultivar expressando o gene repórter *gusA*. No entanto, até então, a experiência de nossa equipe havia sido demonstrada apenas na transformação de plantas com genes repórteres/marcadores de seleção.

O estudo apresentado nesta Tese, que demonstra a eficiência de um gene sintético de *Bacillus thuringiensis* (*cryIAc*) em soja, é o primeiro trabalho da equipe na obtenção de plantas transformadas com um gene de interesse agrônômico. Além disso, é pioneiro na transformação de uma cultivar recomendada para uso comercial no Brasil, utilizando embriões somáticos como alvo para a transformação via biolística. A importância econômica da cultivar comercial IAS 5, aliada aos enormes prejuízos causados por larvas de *Anticarsia gemmatilis* (lagarta-da-soja) que afetam a cultura da soja, motivaram o desenvolvimento de uma linha resistente a tal praga. O sucesso na obtenção de plantas

geneticamente transformadas com o gene *cryIAc*, que mostraram alta resistência à lagarta-da-soja, abre a perspectiva da utilização deste mesmo protocolo para a obtenção de outros produtos transgênicos de soja, resultantes da integração do próprio gene sintético *cryIAc*, bem como de outros genes de interesse agrônômico.

## OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi introduzir, na cultivar IAS 5 de soja, o gene sintético *cryIAc* de *Bacillus thuringiensis*, por meio da estratégia de co-transformação via bombardeamento, visando à obtenção de plantas resistentes à lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*).

Para atingir o objetivo proposto, as seguintes metas foram priorizadas:

- a) Introduzir em soja os genes *cryIAc* e *hpt/gusA* por co-transformação via bombardeamento, utilizando o tecido embriogênico como alvo;
- b) Realizar a avaliação molecular de embriões/plantas obtidos (transformantes primários) quanto à presença e à expressão dos transgenes *hpt/gusA* e *cryIAc*, a fim de se obter a eficiência da estratégia de co-transformação;
- c) Realizar a avaliação molecular de todas as plantas obtidas nas gerações subsequentes (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>);
- d) Realizar testes de progênes e estudos de segregação dos transgenes *cryIAc* e *hpt/gusA*;
- e) Avaliar a estabilidade cromossômica das plantas transgênicas;

f) Realizar bioensaios *in vitro* (com folhas destacadas) e *in vivo* (com plantas inteiras) para avaliar as plantas transgênicas quanto à resistência efetiva contra a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*);

j) Avaliar a performance agronômica das plantas transgênicas homozigotas.

## Capítulo 1

“IAS5” transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants  
expressing a modified CRY1AC endotoxin show resistance to

*Anticarsia gemmatalis*

*Artigo aceito para publicação no periódico Genetics and Molecular Biology*

**“IAS5” transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants expressing a modified  
CRY1AC endotoxin show resistance to *Anticarsia gemmatalis***

Milena Schenkel Homrich<sup>1</sup>, Luciane Maria Pereira Passaglia<sup>1</sup>, Jorge Fernando Pereira<sup>2</sup>,  
Paulo Fernando Bertagnolli<sup>2</sup>, Giancarlo Pasquali<sup>3</sup>, Mohsin Abbas Zaidi<sup>4</sup>, Illimar Altosaar<sup>4</sup>  
and Maria Helena Bodanese-Zanettini<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P.O. Box 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, EMBRAPA, P.O. Box 451, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P.O. Box 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Biochemistry, Microbiology and Immunology Department, University of Ottawa, Ottawa Ont. K1H 8M5, Canada.

\*Correspondence [phone: (5551) 3308 6725; fax: (5551) 3308 9823; e-mail: maria.zanettini@ufrgs.br]

## Abstract

Somatic embryos of IAS5, a *Glycine max* (L.) commercial cultivar, were co-transformed using particle bombardment with a modified *Bacillus thuringiensis cryIAc*, *gusA* and *hpt* genes. The expression of *cryIAc* gene in the soybean was driven by the ubiquitin-1 promoter from maize. Hygromycin-resistant tissues were proliferated individually to give rise to nine sets of clones corresponding to independent transformation events. The co-bombardment resulted in a co-transformation efficiency of 44%. Many histodifferentiated embryos and thirty well-developed plants were obtained. Twenty of these plants flowered and fourteen set seeds. The integration and expression of the *gusA/hpt* and *cryIAc* transgenes into the genomes of a sample of transformed embryos and all T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> plants were confirmed by GUS activity, PCR, Southern, Western blot and ELISA. Two T<sub>0</sub> plants out of the seven co-transformed plants produced seeds and were analyzed for patterns of integration and inheritance until the T<sub>3</sub> generation. Bioassays indicated that the transgenic plants were highly toxic to *A. gemmatilis*, thus offering a potential for effective insect resistance in soybean.

**Keywords:** *cryIAc* gene, transgenic soybean, insect resistance, *Anticarsia gemmatilis*, IAS5 cultivar.



## Introduction

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] is one of the most important sources of edible oil and protein in the world raising a special interest in the genetic improvement of this crop. *Anticarsia gemmatalis* Hübner, velvetbean caterpillar is a major pest of soybean, occurring mainly in soybean growing regions of North and South Americas (Panizzi and Corrêa-Ferreira, 1997; Macrae *et al.*, 2005). *A. gemmatalis* causes extremely high levels of defoliation when infestation is heavy, and can severely damage axillary meristems. A single larva can consume up to 110 cm<sup>2</sup> of soybean foliage (Walker *et al.*, 2000). The activity of  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* in controlling the larvae of *A. gemmatalis* has been described (Stewart *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 2000; Macrae *et al.*, 2005).

Various DNA delivery methods and plant tissues were used in developing transgenic soybean plants. These included particle bombardment of shoot meristems (McCabe *et al.*, 1988; Christou *et al.*, 1989), or embryogenic suspension cultures (Finer and McMullen, 1991; Stewart *et al.*, 1996); and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated T-DNA delivery into cotyledonary explants derived from 5-7-day-old seedlings (Donaldson and Simmonds, 2000; Olhoft *et al.*, 2003) or mature seeds (Paz *et al.*, 2006), immature cotyledons (Parrott *et al.*, 1989; Yan *et al.*, 2000), and embryogenic suspension cultures (Trick and Finer, 1998).

A simple procedure for the establishment and proliferation of somatic embryos from immature cotyledons, more rapid and less labor-intensive than embryogenic suspension cultures, was developed by Santarém *et al.* (1997), using a semi-solid medium described by Wright *et al.* (1991). Using this procedure, Santarém and Finer (1999) and Droste *et al.*

(2002) have generated transgenic soybean plants of “Jack” and “IAS5” cultivars, respectively, expressing the *gusA* reporter gene. Transgenic plants obtained in both works were fertile indicating that this strategy is a promising tool for the recovery of soybean transgenic plants.

Earlier studies have indicated that soybean regeneration is genotype-specific with differences in their responses to the *in vitro* culture and transformation. There is no efficient transformation system for a wide range of soybean cultivars (Hofmann *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2004). This explains why very few reports on genetic transformation of commercial soybean cultivars are available. According to Meurer *et al.* (2001) there are two major routes to improve embryogenic culture-based soybean regeneration and transformation protocols with the goal of increase the recovery of transgenic fertile lines: either to screen large numbers of new soybean cultivars and genotypes for embryogenic potential, or existing protocols using cultivars as “Jack” will be need to be coupled with traditional breeding programs for introgressing transgenic traits into other genotypes. The second option was followed by Stewart *et al.* (1996) and Yan *et al.* (2000) for engineering traits for insect resistance and protein modification, respectively, into soybean.

The IAS5 is a Brazilian soybean cultivar that has been commonly used in genetic breeding programs and recommended for commercial growing in Brazilian States of Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais and Goiás (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007). This cultivar has shown good reliable response in embryogenic systems (Santos *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2002).

The present study was aimed at developing transgenic soybean with resistance to *A. gemmatalis* larvae. Somatic embryos of IAS5 cultivar proliferated on semi-solid medium were transformed with a synthetic *cryIAc* gene via particle bombardment. Insertion pattern

of the *cryIAc* transgene in the transgenic plants were analyzed in primary transformants. Moreover, transmission and expression of the transgenes were characterized in T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> generations. Insect feeding assays indicated that transgenic plants were highly toxic to *A. gemmatalis* larvae.

## **Materials and methods**

### **Plant material**

Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean cultivar IAS5 was induced, proliferated and maintained as described by Droste *et al.* (2002).

### **Plasmids used for soybean transformation**

Plant transformation vectors used in this study were: 1) pGusHyg, a pUC18 derivative plasmid carrying the *gusA* reporter gene and a hygromycin resistance gene (*hpt*), both controlled by the *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter and nopaline synthase (*nos*) terminator and 2) pGEM4Z*cryIAc*, a pGEM4Z derivative plasmid containing the truncated synthetic *cryIAc* gene from *Bacillus thuringiensis* under control of the maize ubiquitin promoter (Ubi-1) and nopaline synthase terminator. The *cryIAc* used in this study was synthesized at University of Ottawa using the recursive PCR approach (Prodromou and Pearl, 1992). In terms of codon usage, the gene *cryIAc* was designed for expression in dicots and has a G+C content of 47.7% (the original bacterial gene has a G+C content of 37%). The overall modifications have resulted in higher expression levels of CRY1AC in transgenic plants (Sardana *et al.*, 1996). Both plasmids

were used at a final concentration of  $1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ . A 4:1 molar ratio of pGEM4ZcryIAc and pGusHyg plasmid DNA was precipitated onto tungsten particles (M10, Dupont, Wilmington, DE).

### **Transformation procedure**

Particle bombardment, using a Particle Inflow Gun – PIG (Finer *et al.*, 1992), selection of transformed tissues and plant regeneration were followed as previously described by Droste *et al.* (2002). Twenty embryogenic clusters (about 70 mg tissue) were placed in each dish containing D20 medium. Fifteen dishes were prepared. Each dish was bombarded once. The selection of transformed tissues was done on D20 medium with  $12.5 \text{ mg L}^{-1}$  hygromycin-B for 14 days, followed by three months culture on the same medium containing  $25 \text{ mg L}^{-1}$  hygromycin-B. After selection, pieces of green tissue were subcultured for the establishment and proliferation of embryogenic tissues in dishes containing fresh D20 medium without antibiotic during two additional months. Subcultures were performed every 14 days.

To stimulate histodifferentiation, clusters of hygromycin-resistant embryos were transferred to MSM6 maturation medium (Finer and McMullen, 1991). Histodifferentiated embryos were subsequently placed on MSO conversion medium, containing MS salts, B5 vitamins, 3% of sucrose, 0.3% of Phytigel<sup>TM</sup> and pH 6.4. The germinated embryos were individually transferred from the Petri plates into 100 ml flasks (with the same medium) to further support the regeneration of plantlets. Regenerated plantlets were transferred to plastic cups containing vermiculite and covered with PVC plastic film. They were gradually exposed to ambient humidity and then transferred to 1 kg pots with organic soil

and maintained in a growth chamber with a 14h photoperiod, light intensity of 13,500 lux and temperature of  $26\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

### **Progeny analysis**

Primary regenerants ( $T_0$ ) refer to the transgenic plants recovered from the explant originally subjected to particle bombardment.  $T_1$ ,  $T_2$  and  $T_3$  are seed-derived plants obtained from self-pollination of  $T_0$ ,  $T_1$  and  $T_2$  plants, respectively, and were grown in greenhouses with natural light at  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . The Chi-square ( $\chi^2$ ) test was used to confirm the probability that ratios conformed to the expected Mendelian segregation patterns of 3:1 or 2:1, where significance was determined for those values with a *P*-value greater than 0.01. At flowering, some  $T_3$  transgenic plants were reciprocally crossed to untransformed plants. Ten plants of 18a1 family were used as the pollen donor and 10 as the female parent. Twenty-five plants of 18a4 family were crossed as female parent. Ten flowers were pollinated per plant.

### **GUS histochemical assay**

Detached leaves or seedlings were assayed for GUS activity using the improved histochemical staining protocol (Jefferson, 1987).

### **PCR analysis**

Polymerase chain reactions (PCR) were performed using genomic DNA extracted from samples of histodifferentiated embryos and leaf tissues of all the regenerated plants according to the CTAB procedure described by Doyle and Doyle (1987) with some modifications. The PCR primers used to detect *cryIAC* gene were *cryFOR* 5'

GGGGATCCATGGATAACAATCCGAAC 3' and *cryREV* 5' CAGTCGACATTCAGCCTCGAGTGTTG 3'. These primers amplify a 1845 bp region of the *cryIAc* gene. The reaction mixture (25 µl) consisted of 200 µM dNTPs, 1 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, 5 U ml<sup>-1</sup>), 1X Reaction buffer with 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 nM of each primer and 100 ng of each DNA sample. Amplification reactions were carried out as follow: pre-cycling at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 1 min; 52°C for 1 min; and 72°C for 2 min, with a final extension step of 5 min at 72°C. The PCR primers used to detect *gusA* gene were *gusAFOR* 5' GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG 3' and *gusARev* 5' GGATTCCGGCATAGTTAAAGG 3', and to detect *hpt* gene were *hptFor* 5' GCGATTGCTGATCCCCATGTGTAT 3' and *hptRev* 5' GGTTTCCACTATCGGCGAGTACTT 3'. These primers amplify fragments of 622 bp and 512 bp, respectively. The reaction mixtures for both genes were prepared as described above. Amplifications conditions were as follow: pre-cycling at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 45 s; 52°C for 45 s; and 72°C for 45 s, with a final extension step of 2 min at 72°C. All amplification reactions were carried out in a Thermo Hybaid termocycler.

To confirm the PCR results, the amplified product was electrophoresed on 1% agarose gel and transferred overnight onto Hybond N+ membranes (GE Healthcare) for Southern blot following standard protocols as described by Sambrook and Russel (2001). Probe labeling, hybridization, stringency washes and detection were carried out as specified by the ECL<sup>TM</sup> kit (GE Healthcare). The DNA blotting was probed with a 1.8 kb PCR fragment containing the *cryIAc* gene coding sequence purified from agarose gel using the GFX kit (GE Healthcare). Hybridizing bands were detected by exposing to Kodak X-OMAT autoradiography films for 2 hours.

### **Southern blot hybridization of genomic DNA**

Total genomic DNA (20 µg) from putative transformed and untransformed control plants were digested overnight with the restriction enzymes *Bam*HI, *Kpn*I and *Sal*I at 37°C. Digested genomic DNA of each plant was separated through a 0.8% agarose gel electrophoresis and transferred from the gel to a nylon membrane Hybond N+. Probe labeling, hybridization, stringency, washes and detection were carried out as specified above.

### **Protein expression analysis**

Fresh leaf tissue (0.2 g) from T<sub>0</sub> plants was homogenized in 500 µl of extraction buffer [50 mM of 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 1% β-mercaptoethanol, 0.2% PVP-40]. Samples were stirred for 30 min at 4°C and then clarified by centrifugation at 10,000 g. Protein concentration was determined using the Bradford method (Bradford, 1976) with bovine serum albumin as standard protein. Fifty micrograms of crude protein extract from each plant were separated on a 10% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Presence of CRY1AC protein was detected using a polyclonal antibody specific for CRY1AC δ-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* (kindly supplied by Dr. Lidia Mariana Fiuza, UNISINOS, RS, Brazil). The protein bands were visualized using the ECL Western Blot Detection and Analysis System (GE Healthcare). Detection of CRY1AC protein produced by T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> plants was monitored by a double-sandwich antibody procedure (ELISA), using Trait Check Bt 1Ac Cotton Leaf/Seed kits from Strategic Diagnostics Inc. (Newark, DE, USA).

## **Insect bioassays**

Insecticidal activity of T<sub>2</sub> transgenic plants toward *A. gemmatalis* larvae was evaluated by using a detached leaf-feeding assay. The plants were heterozygous for *cryIAC* gene as determined by segregation analysis and were CRY1AC-positive as ascertained by the double-sandwich antibody procedure. Leaflets from large trifoliolate leaves were placed in 100 mm x 20 mm Petri dishes containing a 90mm Whatman N° 1 filter paper (Whatman International, Maidstone, UK) saturated with distilled water to maintain a high ambient humidity. The amount of leaf tissue was kept as uniform as possible from one dish to another. Leaf samples were infested with 20 neonate *A. gemmatalis* larvae per plate. Ten and 30 transgenic plants of 18a1 and 18a4 families, respectively, with four replicates per plant, were included in the bioassay. Three untransformed IAS5 plants of the same age as the transgenic ones, with four replicates per plant, were used as controls. After 24 h, the percent foliage consumption was estimated; the leaf remainders (if remaining) were removed and replaced by a 1 cm<sup>3</sup> piece of a solid artificial diet (Greene *et al.*, 1976). Leaf consumption percentages were converted to scores as follow: Zero (no consumption), 1 (less than 50%), 2 (more than 50%) and 3 (100% consumption). The number of alive and dead larvae was determined 24, 48, 72 and 96 h after infestation.

## **Results and Discussion**

### **Transformation and regeneration of transgenic plants**

Three months after bombardment, hygromycin-resistant embryogenic soybean tissues were visually selected, counted and separately cultured for the establishment and proliferation of lines, corresponding to putative independent transformation events. Nine



proliferative lines out of 60 independent pieces of hygromycin-resistant tissues were established. A total of 613 histodifferentiated somatic embryos were obtained. The histodifferentiated embryos were transferred to conversion medium. Thirty well-developed plantlets were transplanted *ex vitro*. Twenty of these plants reached maturity and flowered. Fourteen plants set seeds. All embryos/plants derived from an independent piece of hygromycin-resistant tissue were noted as being clonal embryos/plants.

### **Transgene integration and expression**

Seventy-two histodifferentiated embryos and the 20 recovered plants were screened for the presence of the *gusA*, *hpt* and *cryIAc* genes by PCR. Two (2/9=22%) lines, which did not show PCR products for any tested genes, were considered “escapes” and discarded. The molecular analysis showed also that one piece of hygromycin-resistant tissue could contain two independent transformation events. Therefore, the lines numbered as 18 and 43 were subdivided (a and b).

Molecular characterization of transformed lines is presented in Table 1. All 64 embryos and 11 plants of the nine independent lines presented the expected 622 and 512 bp fragments for *gusA* and *hpt* genes, respectively. The presence of the expected 1845 bp *cryIAc* fragment was observed in 23 embryos and seven plants derived from four lines (18a, 26, 41 and 43a). Simultaneous occurrence of *gusA/hpt* and *cryIAc* genes in these four lines allowed the co-transformation efficiency (4/9=44%) to be calculated. The efficiency recorded in the present work is in agreement with previous reports for soybean. In situations in which two genes on independent plasmids are introduced by particle bombardment, co-transformation rates have been shown to vary from 18 to 50% (Christou and Swain, 1990; Li *et al.*, 2004).

Western blot hybridization was used to evaluate the expression of *cryIAC* gene at the protein level. When the proteins were separated electrophoretically on SDS gel, a band of ~70 kDa corresponding to the *Bt* toxin was detected in *cryIAC/gusA*-positive plants (Figure 1). No antibody reactive protein was found either in *cryIAC*-negative/*gusA*-positive plants or in untransformed plants.

### **Transgene segregation**

Only two (18a1 and 18a4) out of the seven co-transformed T<sub>0</sub> plants produced seeds and were analyzed for patterns of integration and inheritance until the T<sub>3</sub> generation. The 18a1 and 18a4 plants derived from the same (18a line) transformation event (Table 1). Expression of the *cryIAC* gene in T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> plants was first determined using the double-sandwich antibody procedure. GUS expression was ascertained, histochemically, by assaying young leaf discs. To validate the results of the preliminary tests, the presence of transgenes were confirmed by PCR analysis in all T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> CRY1AC/GUSA-positive plants (Figure 2). PCR was also performed on CRY1AC/GUSA-negative plants and the absence of band signals suggested that no transgenes could be detected from these plants. The correlation between presence of transgene DNA and its expression was perfect.

On the base of 48 T<sub>1</sub> plants evaluated, it appeared that *gusA/hpt* and *cryIAC* were linked at one integration site in the initial T<sub>0</sub> plants (Table 2). The T<sub>1</sub> progenies of both T<sub>0</sub> plants segregated for fewer *cryIAC/gusA*-positive plants than predicted by Mendelian principles for a single dominant locus (3:1). The T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> families continued to segregate in an exceptional manner, with a vast deficiency of transgenic plants (Tables 3). Moreover, the segregation ratios indicated that T<sub>2</sub> plants were uniformly heterozygous for the transformed traits.

Transgenes are generally expected to behave as dominant genes and segregate in a 3:1 ratio for transgenic to non-transgenic progeny when the plant is self-pollinated, because the transgene locus is considered to be hemizygous in the primary ( $T_0$ ) transformant (Campbell *et al.*, 2000). However, transgenic loci introduced into higher plant species frequently display unpredictable patterns of inheritance and expression, which has occurred at a frequency between 10% and 50% of some transgenic lines (Yin *et al.*, 2004).

Exceptional segregation ratios could result from a number of factors, including inactivation of transgene expression, insertion leading to a lethal mutation and poor transgene transmission to the progeny. The inactivation of expression is frequently observed when transgenes are present in multiple copies and is responsible for causing abnormal segregation (Yin *et al.*, 2004). However, PCR amplifications performed on  $T_1$  and  $T_2$  CRY1AC/GUSA-negative plants confirmed the absence of transgene-DNA in these plants. Therefore, the inactivation of transgene expression cannot be considered to explain the non-Mendelian segregation observed in this study.

The integration of foreign DNA into the plant genome can produce an insertion mutation in an essential gene. A lethal mutation reflected by the lack of homozygotes can lead to a 2:1 segregation for transgenic and non-transgenic traits in the progeny of a transgenic plant. The 2:1 segregation observed in a  $T_2$  progeny of a transformed line of *Asparagus officinalis* was explained by the absence of homozygotes (Limanton-Grevet and Jullien, 2001). However, the results obtained in the present work did not fit even to this 2:1 segregation (Tables 2 and 3) suggesting that other factors could be acting.

In addition, non-Mendelian segregation of transgenes could be accounted for the lack of transmittance via one of the gametes. Christou *et al.* (1989) credited a 1:1 segregation ratio observed in progeny derived from selfing of a transgenic soybean plant to the failure

of passing a transgene to the next generation through pollen. Reciprocal backcrosses to untransformed *Arabidopsis* plants showed unequal transmission of the kanamycin-resistance trait through the gametes in seven exceptional lines for up to six successive generations (Feldmann *et al.*, 1997). Two of these lines failed to transmit the kanamycin-resistance trait through the female, while the extreme deficiency of Kan<sup>R</sup> seedlings in the other five lines was primarily due to the pollen.

To investigate the transgene transmission through the gametes, several of our transgenic plants were crossed with untransformed plants. The segregation of the *gusA* and *cryIAC* genes in the BCF<sub>1</sub> plants was determined by GUS histochemical assays and the double-sandwich antibody procedure, respectively. Results showed transgene transmission through male and female gametes, but at a substantially reduced rate (Table 4). In 18a1 family, transmission of the transgenes through the pollen and the egg was reduced to 60-75% and 33-49%, respectively, of that expected for a heterozygote. Family 18a4 displayed a similar transmission rate (30-47%) through the female side; no crosses were made in which the transformant served as the pollen donor. The low number of crosses in which the transformant served as the pollen donor did not allow us to conclude unequivocally that the transmission through the male was affected less severely than transmission through the female.

### **Homozygous CRY1AC/GUSA-positive plants**

A T<sub>3</sub> transformant plant from 18a4 family that served as the female parent in the backcross set four seeds, which gave rise to four CRY1AC/GUSA-positive plants. This result indicated that the T<sub>3</sub> transformant plant would be homozygous. To check our assumption, we tested 20 selfed seeds obtained from that T<sub>3</sub> transformant plant. Seeds were

germinated on wet filter paper and the seedlings were analyzed for GUS activity and *cryIAC* expression. The results confirmed the homozygous condition. Based on this fact, we decided to investigate the possible homozygous state of other T<sub>3</sub> transgenic plants. Twenty selfed seeds from each 253 out of the 309 T<sub>3</sub> CRY1AC/GUSA-positive plants were germinated and the seedlings analyzed as described above. Besides the plant already mentioned, the analysis detected 12 T<sub>3</sub> homozygous CRY1AC/GUSA-positive plants. Therefore, the possibility of a lethal insertional mutation that would be reflected by the lack of homozygotes was also excluded to explain the observed non-Mendelian segregation. On the other hand, we assumed that the difficulty to obtain homozygous plants in the T<sub>2</sub> generation could be accounted for the poor transmission of transgenes through the male and especially through the female gametes.

### **Southern analysis of transformed plants**

Genomic DNA of T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> CRY1AC/GUSA-positive plants was digested with *KpnI*, an enzyme that cuts plasmid pGEM4Z only once, *SalI* that does not cleave the transformation plasmid, and with *BamHI* which release the 2.1 kb *cryIAC* cassette (gene coding region and *nos* terminator). Figure 3 shows a representative Southern blot of seven T<sub>1</sub> CRY1AC/GUSA-positive plants derived from 18a1 and 18a4 T<sub>0</sub> plants. The detection of a 2.1 kb band in DNA digested with *BamHI* in all plants indicated the presence of at least one intact gene copy. The presence of bands larger than 2.1 kb is evidence for rearrangements of the transgene DNA. Analysis of digests with *KpnI* revealed three *cryIAC* fragments in all plants. Analysis with *SalI* confirmed the presence of three copies for that gene (data not shown). Southern blot was also performed on CRY1AC/GUSA-negative plants in order to determine if transgenes were present. The absence of any hybridization

signal indicated that those plants probably had no transgene inserted. All the transgenic plants of the T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> progenies analyzed showed the same hybridization pattern as the two T<sub>0</sub> parental plants (data not shown) and consequently the same copy number. These results indicate that all copies of the gene are inherited as a unit and that the original transgene integration pattern observed in the primary regenerated plants was stably passed on to all progeny plants.

### **Insecticidal activity**

To confirm that the CRY1AC protein produced in the transgenic plants was functional, isolated leaves from transgenic plants and untransformed control plants were infested with neonate larvae of *A. gemmatalis*. After 24 h, all control leaves were completely defoliated (Figure 4a). In contrast, consumption was significantly reduced in transgenic leaves (Table 5; Figure 4b). Larvae fed on transgenic leaves showed browning and severe growth retardation in comparison to larvae fed on control leaves (Figure 4c). After the 24 h period in which the larvae were allowed to feed on detached leaves, leaf remainders were removed and replaced by an artificial diet. The fate of the larvae was monitored for more three days. For insect survival 96 h after infestation, more than 19 of 20 larvae reared on control leaves survived, compared with less than two surviving larvae fed on leaves from the transgenic plants. Larvae on transgenic leaves stopped feeding and most of them were dead within 48 h. The mortality of *A. gemmatalis* affected by expression of *cryIAC* in transgenic leaves of 18a1 and 18a4 families was similar. This data could be accounted for the fact that both families were derived from the same transformation event.

*Bt* soybean cultivars have not yet been commercialized, although experimental lines have been developed. Parrott *et al.* (1994) reported that the expression of a native *cryIAb* gene prevented *A. gemmatalis* larval feeding and growth. A transgenic line of the soybean “Jack” cultivar expressing high levels of a synthetic *cryIAc* gene caused complete *A. gemmatalis* larval mortality and significantly reduced *Pseudoplusia includens* and *Helicoverpa zea* larval survival and feeding in laboratory bioassays (Stewart *et al.*, 1996) and in artificially infested field cages (Walker *et al.*, 2000). More recently, transgenic lines of soybean (‘A5547’) expressing a synthetic *cryIA* gene were evaluated for the resistance against several lepidopteran pests in screenhouse and conventional field trials, carried out in the United States and Argentina. *Bt* lines exhibited virtually complete efficacy against all the pests tested (Macrae *et al.*, 2005).

### **Intralocus recombination**

Co-transformation is one of the best strategies to obtain marker-free transgenic plants since it is based on the principle that a proportion of transformed plants carrying the selectable marker gene will also have integrated the transgene of interest at a second, unlinked insertion site and the genes can subsequently be removed from such plants by genetic segregation (Bettany *et al.*, 2002; Ebinuma *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2004). The co-transformation strategy was elected for *cryIAc* gene introduction in soybean with the expectation to obtain marker-free transgenic plants. However, as the co-transformed *cryIAc* and *gusA/hpt* genes integrated at a single locus they segregated together. A high incidence of linkage has been demonstrated when using biolistic-mediated co-transformation (Miki and McHugh, 2004). Nevertheless, three transgenic CRY1AC-negative/GUSA-positive plants were obtained (Table 3; Figure 5). A likely explanation for

this result could be that interchromosomal recombination split up the transgenes. It is possible that the transgenic locus contains interspersed genomic DNA within it (Kohli *et al.*, 2003). Intriguingly, up to now, no plants containing only the *cryIAc* gene alone were obtained.

## **Conclusions**

This work reports the success in developing soybean *A. gemmatalis*-resistant IAS5 transgenic plants with a synthetic *cryIAc* gene under the control of maize ubiquitin-1 promoter. Although the segregation was non-Mendelian in the first generations, this study clearly demonstrates that the transgenes were stably transmitted and expressed in the progenies. Homozygous transgenic plants were obtained in T<sub>3</sub> generation. The agronomic performance and the response of these plants toward field populations of *A. gemmatalis* are still under analysis. Further studies involving combined molecular and cytogenetic analysis will be performed to determine the transgenic locus organization.

## **Acknowledgements**

We would like to thank the following people for their important contributions to this study: Dr. Flávio Moscardi (EMBRAPA Soja, Londrina, PR), Dr. José Roberto Salvadori (EMBRAPA Trigo, RS), Dr. Luiz Carlos Federizzi (Departamento de Plantas de Lavoura, UFRGS), Dr. Márcia Pinheiro Margis (Departamento de Genética, UFRGS) and Silvia N. Cordeiro Richter (technical assistance). This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de



Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil), Centro do Agronegócio-Casa Rural (Brazil), The Rockefeller Foundation (USA) and Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC, Canada). Milena S. Homrich acknowledges CNPq for her PhD fellowship.

## References

- Bettany AJE, Dalton SJ, Timms E, Dhanoa MS and Morri P (2002) Effect of selectable gene to reporter gene ratio on the frequency of co- transformation and co-expression of *uidA* and *hpt* transgenes in protoplast-derived plants of tall fescue. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 68:177-186.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Campbell BT, Baenziger PS, Mitra A, Sato S and Clemente T (2000) Inheritance of multiple transgenes in wheat. *Crop Sci* 40:1133-1141.
- Christou P, Swain WF, Yang NS and McCabe DE (1989) Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Genetics* 88:7500-7504.
- Christou P and Swain WF (1990) Co-transformation frequencies of foreign genes in soybean cell cultures. *Theor Appl Genet* 79:337-341.
- Donaldson PA and Simmonds DH (2000) Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. *Plant Cell Rep* 19:478-484.

- Doyle JJ and Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull* 19:11-15.
- Droste A, Pasquali G and Bodanese-Zanettini MH (2002) Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. *Euphytica* 127:367-376.
- Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Endo S, Yamada K and Komamine A (2001) Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker. *Plant Cell Rep* 20:383-392.
- Feldmann KA, Coury DA and Christianson ML (1997) Exceptional segregation of a selectable marker (Kan<sup>R</sup>) in *Arabidopsis* identifies genes important for gametophytic growth and development. *Genetics* 147:1411-22.
- Finer JJ and McMullen MD (1991) Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 27: 175-182.
- Finer JJ, Vain P, Jones MW and McMullen MD (1992) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep* 11:323-328.
- Greene GL, Leppla NC and Dickerson WA (1976) Velvet bean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J Econ Entomol* 69:487-488.
- Hofmann N, Nelson RL and Korban SS (2004) Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 77:157-163.
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5:387-405.

- Ko TS, Nelson RL and Korban SS (2004) Screening multiple soybean cultivars (MG 00 to MG VIII) for somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons. *Crop Sci* 44:1825-1831.
- Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E and Christou P (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol Biol* 52:247-258.
- Li HY, Zhu YM, Chen Q, Conner RL, Ding XD, Li J and Zhang BB (2004) Production of transgenic soybean plants with two anti-fungal protein genes via *Agrobacterium* and particle bombardment. *Biol Plant* 48:367-374.
- Limanton-Grevet A and Jullien M (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Asparagus officinalis* L.: molecular and genetic analysis of transgenic plants. *Mol Breed* 7:141-150.
- Macrae TC, Baur ME, Boethel DJ, Fitzpatrick BJ, Gao AG, Gamundi JC, Harrison LA, Kabuye VT, Mcpherson RM, Miklos JA, Paradise MS, Toedebusch AS and Viegas A (2005) Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA* gene for control of Lepidoptera. *J Econ Entomol* 98:577-587.
- McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ and Christou P (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technol* 6:923-926.
- Meurer CA, Dinkins RD, Redmond CT, McAllister KP, Tucker DT, Walker DR, Parrott WA, Trick HN, Essic JS, Frantz HM, Finer JJ and Collins GB (2001) Embryogenic response of multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars across three locations. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37:62-67.
- Miki B and McHugh S (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol* 107:193-232.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento,

<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/37AA904436961F63E040A8C07502416D> (October 15, 2007).

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

Panizzi AR and Corrêa-Ferreira BS (1997) Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. *Trends Entomol* 1:71-88.

Park J, Lee YK, Kang BK and Chung WI (2004) Co-transformation using a negative selectable marker gene for the production of selectable marker gene-free transgenic plants. *Theor Appl Genet* 109:1562-1567.

Parrott WA, Hoffman LM, Hildebrand DF, Williams EG and Collins GB (1989) Recovery of primary transformants of soybean. *Plant Cell Rep* 7:615-617.

Parrott WA, All JN, Adang MJ, Bailey MA, Boerma HR and Stewart CN (1994) Recovery and evaluation of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki insecticidal gene. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 30:144-149.

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

Prodromou C and Pearl LH (1992) Recursive PCR - a novel technique for total gene synthesis. *Protein Eng* 5:827-829.

- Sambrook J and Russel DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor, New York.
- Santarém ER, Pelissier B and Finer JJ (1997) Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 33:13-19.
- Santarém ER and Finer JJ (1999) Transformation of soybean [*Glycine Max* (L.)Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 35: 451-455.
- Santos KGB, Mundstock E and Bodanese-Zanettini MH (1997) Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. *Plant Cell Rep* 16:859-864.
- Sardana R, Dukijandjiev S, Giband M, Cheng X, Cowan K, Sauder C and Altosaar I (1996) Construction and rapid testing of synthetic and modified toxin gene sequences CryIA (b & c) by expression in maize endosperm culture. *Plant Cell Rep* 15:677-681.
- Stewart CN, Adang MJ, All JN, Boerma HR, Cardineau G, Tucker D and Parrott WA (1996) Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. *Plant Physiol* 112:121-129.
- Trick HN and Finer JJ (1998) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Rep* 17:482-488.
- Walker DR, All JN, McPherson RM, Boerma HR and Parrott WA (2000) Field evaluation of soybean engineered with a synthetic *cryIAc* transgene for resistance to corn

earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). J Econ Entomol 93:613-622.

Wright MS, Launis KL, Novitzky R, Duesiing JH and Harms CT (1991) A simple method for the recovery of multiple fertile plants from individual somatic embryos of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. In Vitro Cell Dev Biol Plant 27:153-157.

Yan B, Reddy MSS, Collins GB and Dinkins RD (2000) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants. Plant Cell Rep 19:1090-1097.

Yin Z, Plader W and Malepszy S (2004) Transgene inheritance in plants. J Appl Genet 45:127-144.

**Table 1.** Molecular characterization of soybean histodifferentiated embryos and recovered plants derived from independent transformation events (lines) determined by PCR analysis.

Lines	Number of analyzed		PCR analysis	
	embryos	plants	<i>cryIAc</i>	<i>gusA/hpt</i>
4	11	0	-	+
5	10	0	-	+
18a	2	4	+	+
18b	6	1	-	+
19	11	3	-	+
26	9	1	+	+
41	4	2	+	+
43a	8	0	+	+
43b	3	0	-	+
9	64	11	4	9

**Table 2.** Segregation of the T<sub>1</sub> generation obtained from *cryIAc/gusA*-positive T<sub>0</sub> plants.

T <sub>0</sub> plant	<i>cry</i> <sup>+</sup> <i>gus</i> <sup>+</sup>	<i>cry</i> <sup>-</sup> <i>gus</i> <sup>-</sup>	<i>cry</i> <sup>+</sup> <i>gus</i> <sup>+</sup> / <i>cry</i> <sup>-</sup> <i>gus</i> <sup>-</sup>	Ratio Tested	$\chi^{2(1)}$
18a1	2	8	0.25	3:1	16.13
				2:1	10.00
18a4	5	33	0.15	3:1	77.51
				2:1	48.94

$\chi^{2(1)}$ : Chi-square



**Table 3.** Segregation of the T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> generation obtained from *cryIAc/gusA*-positive T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> families, respectively.

T <sub>1</sub> families	<i>cry</i> <sup>+</sup> <i>gus</i> <sup>+</sup>	<i>cry</i> <sup>-</sup> <i>gus</i> <sup>-</sup>	<i>cry</i> <sup>-</sup> <i>gus</i> <sup>+</sup>	<i>cry</i> <sup>+</sup> <i>gus</i> <sup>+</sup> / <i>cry</i> <sup>-</sup> <i>gus</i> <sup>-</sup>	Ratio Tested	$\chi^{2(1)}$
18a1	20	90	1	0.22	3:1	189.40
					2:1	116.34
18a4	81	207	1	0.39	3:1	337.51
					2:1	192.51
<b>T<sub>2</sub> families</b>						
18a1	80	248	0	0.32	3:1	448.07
					2:1	263.82
18a4	229	760	1	0.30	3:1	1390.80
					2:1	842.60

$\chi^{2(1)}$ : Chi-square

**Table 4.** Segregation in BCF<sub>1</sub> from crosses of *cryIAc/gusA*-positive plants with untransformed (wild-type) plants.

Families	Observed segregation					
	To WT <sup>(1)</sup>		By WT <sup>(2)</sup>		Percent of that expected through	
	<i>cry</i> <sup>+</sup> <i>gus</i> <sup>+</sup>	<i>cry</i> <sup>-</sup> <i>gus</i> <sup>-</sup>	<i>cry</i> <sup>+</sup> <i>gus</i> <sup>+</sup>	<i>cry</i> <sup>-</sup> <i>gus</i> <sup>-</sup>	pollen (%) <sup>(3)</sup>	egg (%) <sup>(4)</sup>
18a1	9	15	15	46	60-75	33-49
18a4			41	135		30-47

WT: wild-type. <sup>(1)</sup>Progeny are those resulting from a cross in which the transformant served as the pollen donor. <sup>(2)</sup>Progeny are those resulting from a cross in which the transformant served as the female parent. <sup>(3)</sup>*cryIAc/gusA*-positive plants expected when a *cryIAc/gusA* heterozygote is used as a pollen parent onto a wild-type plant, as percent. In family 18a4, 41 *cryIAc/gusA*-positive plants were observed but 88 (41+135/2) to 135 were expected (41/135 - 41/88 = 30.37-46.59). <sup>(4)</sup>*cryIAc/gusA*-positive plants expected when a *cryIAc/gusA* heterozygote is used as a the female in a cross a wild-type plant, as percent. Percent of that expected calculated according to Feldmann *et al.* (1997).

**Table 5.** Feeding assay of neonate larvae of *Anticarsia gemmatalis* on detached leaves of T<sub>2</sub> transgenic plants.

Families	Leaf consumption (mean)	Live larvae (mean)	
	24 h	48 h	96 h
18a1	1.25	3.68	1.75
18a4	1.40	4.02	1.95
Control	3.00	19.92	19.33

Twenty larvae were applied to a detached leaf. Leaf consumption was estimated 24 h after infestation. Leaf remainders (if lasted) were removed and replaced by a piece of a solid artificial diet. Larval survivorship was recorded 48 and 96 h after infestation.

## Figure Legends:

**Figure 1.** Detection of recombinant CRY1AC protein in soybean plants by western blot hybridization. Samples from T<sub>0</sub> *cryIAC/gusA*-positive plants are shown in lanes 3, 4, 6, 7, 8, 9 of the blot, along with a CRY1AC protoxin from *Bt* as positive control (lane 1), and untransformed plant (lane 2). Lane 5 was loaded with protein extract from a *cryIAC*-negative/*gusA*-positive plant. Arrows indicate the position of the CRY1AC toxin at ~70 kDa and the CRY1AC protoxin at ~130 kDa.

**Figure 2.** PCR amplification of *cryIAC* (A) and *gusA* (B) genes from a sample of 18a4 T<sub>2</sub> progeny. Lanes: 1, positive control (pGEM4Z/pGusHyg plasmids); 2, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15, 18, 19, CRY1AC/GUSA-positive plants; 3, 4, 5, 8, 9, 13, 16, 17, CRY1AC/GUSA-negative plants; 20, negative control (untransformed plant).

**Figure 3.** Southern blot hybridization analysis of the T<sub>1</sub> progeny of 18a1 and 18a4 T<sub>0</sub> plants. Ten µg of genomic DNA was digested with *Bam*HI, separated by electrophoresis in a 0.8% agarose gel, blotted onto nitrocellulose and hybridized to a 1.8 kb *cryIAC* probe. Lanes: 1, positive control (pGEM4Z); 2, 3, CRY1AC/GUSA-positive plants of 18a1 family; 4, 5, 6, 7, 8, CRY1AC/GUSA-positive plants of 18a4 family; 9, 10, CRY1AC/GUSA-negative plants; 11, negative control (untransformed plant).

**Figure 4.** Insect bioassay. Defoliation of control (A) and transgenic (B) leaves 24 hours after infestation with *Anticarsia gemmatalis* larvae. (C) Larva fed on a transgenic leaf

showing browning and severe growth retardation (t) in comparison to larva fed on a control leaf (c).

**Figure 5.** PCR amplification of *cryIAC* and *gusA* genes from a sample of 18a1 T<sub>2</sub> progeny. Lanes: 1, 1 Kb ladder; 2, positive control (pGEM4Z/pGusHyg plasmids); 3, 4, 6, 7, 8, 10, CRY1AC/GUSA-positive plants; 5, 9, CRY1AC-negative/GUSA-positive plants; 11, negative control (untransformed plant).

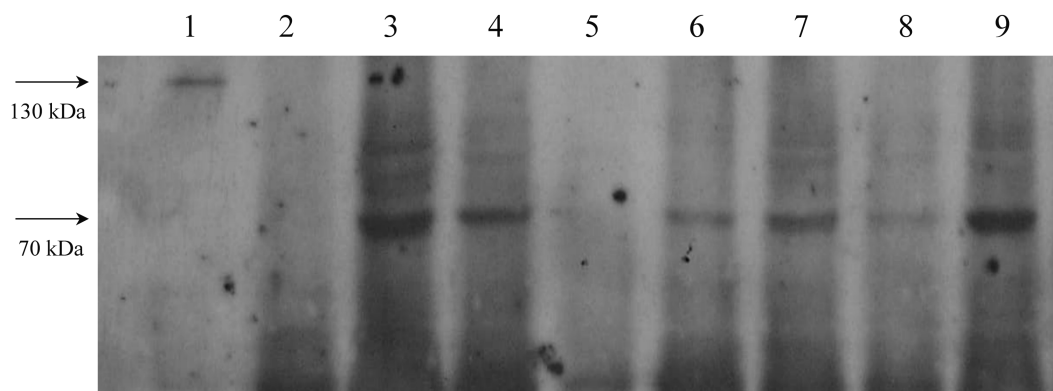


Figure 1

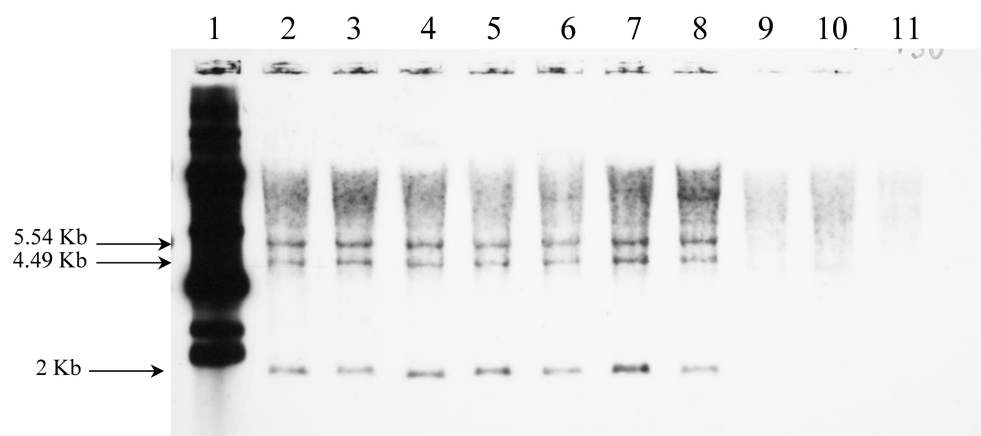


Figure 3

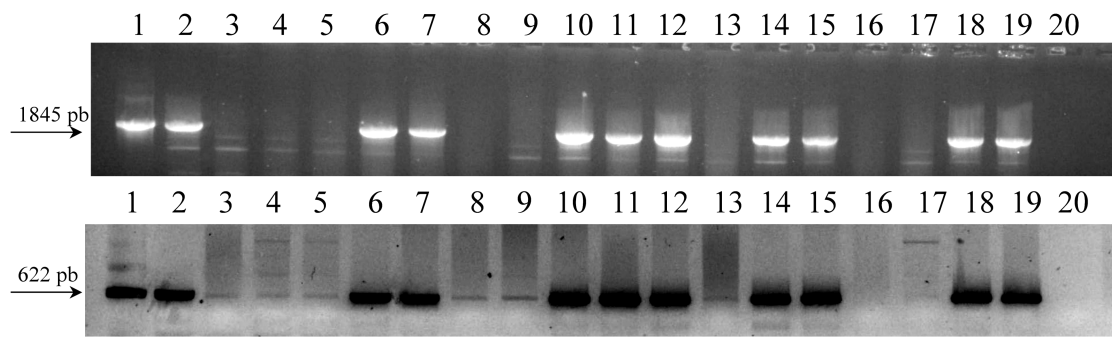


Figure 2



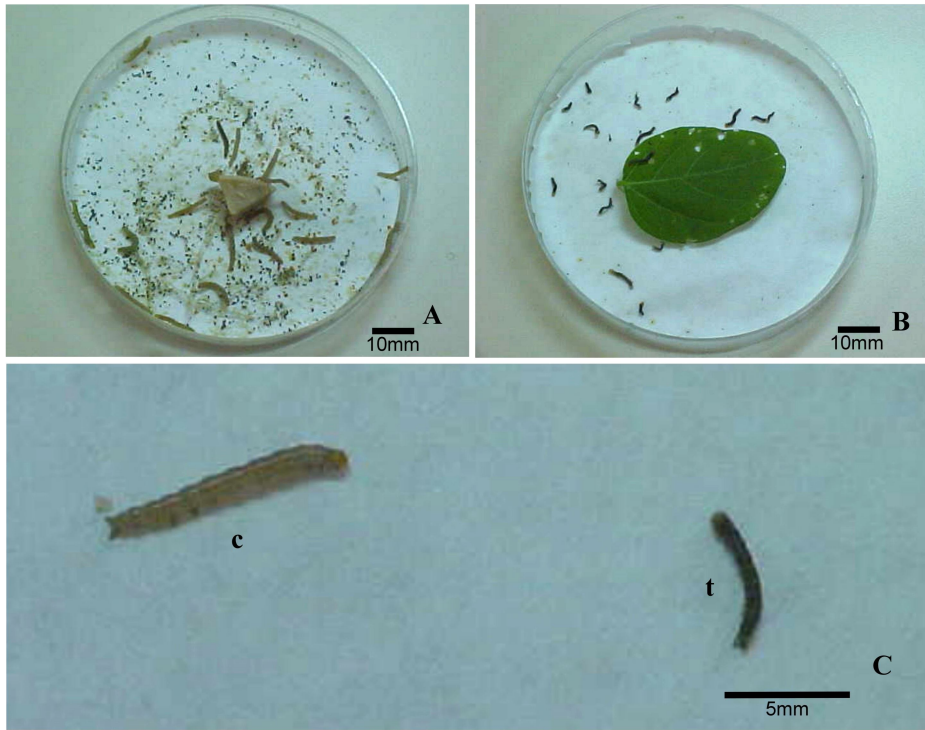


Figure 4

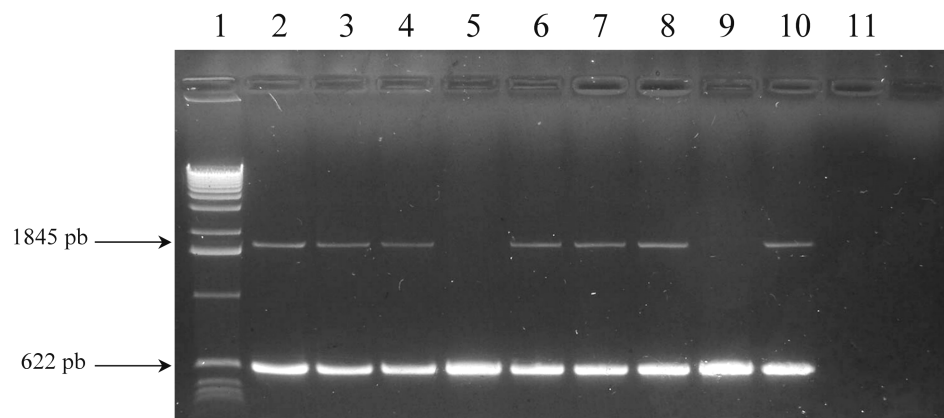


Figure 5

## Capítulo 2

Agronomic performance of transgenic soybean expressing a *cry1Ac* gene for control of velvetbean caterpillar

*Artigo submetido à publicação no periódico*

*Pesquisa Agropecuária Brasileira*

**Agronomic performance of transgenic soybean expressing a *cryIAc* gene for control  
of velvetbean caterpillar**

Milena Schenkel Homrich<sup>(1)</sup>, Luciane M. P. Passaglia<sup>(1)</sup>, Jorge Fernando Pereira<sup>(2)</sup>, Paulo Fernando Bertagnolli<sup>(2)</sup>, José Roberto Salvadori<sup>(2)</sup>, Marcio Nicolau<sup>(2)</sup>, Eliane Kaltchuk-Santos<sup>(1)</sup>, Laura Bianchessi Alves<sup>(1)</sup> and Maria Helena Bodanese-Zanettini<sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P.O.Box 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: milenash@terra.com.br, lpassaglia@terra.com.br, eliane.kaltchuk@ufrgs.br, laura.alves@ufrgs.br, maria.zanettini@ufrgs.br.

<sup>(2)</sup>Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, EMBRAPA, P.O.Box 569, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS, Brazil. E-mail: jorge@cnpt.embrapa.br, bertag@cnpt.embrapa.br, jrsalva@cnpt.embrapa.br, nicolau@cnpt.embrapa.br.

**Abstract**

Homozygous transgenic isolines of IAS 5, a *Glycine max* (L.) commercial cultivar, expressing a truncated synthetic *cryIAc* gene were evaluated to test for possible effects the transgene might have on agronomic performance. Taking in account all analyzed agronomic traits the presence of the *cryIAc* transgene did not affect the development and yield of transgenic plants. Cytogenetical analysis showed that transgenic plants presented normal karyotype (2n=40). Transgenic plants were also evaluated by *in vitro* and *in vivo* assays for resistance to *Anticarsia gemmatalis* (velvetbean caterpillar). Two negative

controls (non-transgenic IAS 5 and homozygous *gusA* isoline) were used. In a detached-leaf bioassay, *cryIAc* plants exhibited complete efficacy against *A. gemmatalis*, whereas negative controls suffered significant damage. Whole plant-feeding assay data confirmed a very high protection of *cryIAc* plants against velvetbean caterpillar while non-transgenic IAS 5 and homozygous *gusA* isoline exhibited 56.5 and 71.5% defoliation, respectively. The results of *in vitro* and *in vivo* bioassays confirm the resistance of plants to *Anticarsia gemmatalis*.

Index terms: *Glycine max*, *Anticarsia gemmatalis*, insect resistance.

## **Performance agronômica de soja transgênica expressando um gene *cryIAc* para controle da lagarta-da-soja**

### **Resumo**

Isolinhas transgênicas homozigotas da cultivar comercial IAS 5 [*Glycine max* (L.)] expressando um gene sintético truncado *cryIAc* foram avaliadas em relação aos possíveis efeitos do transgene na performance agronômica. Levando em conta todos os caracteres agronômicos analisados, a presença do transgene *cryIAc* não afetou o desenvolvimento e a produtividade das plantas transgênicas. A análise citogenética mostrou que as plantas transgênicas apresentaram cariótipo normal ( $2n=40$ ). Tais plantas também foram avaliadas em ensaios *in vitro* e *in vivo* para resistência à *Anticarsia gemmatalis* (lagarta-da-soja). Dois controles negativos (IAS 5 não transgênica e isolinha homozigota *gusA*) foram utilizados. Em um bioensaio com folhas destacadas, as plantas *cryIAc* exibiram completa

eficácia contra *A. gemmatalis*, enquanto os controles negativos sofreram dano significativo. Dados do ensaio com plantas inteiras confirmaram uma elevada proteção das plantas *cryIAc* contra a lagarta-da-soja, enquanto a planta não transgênica e a isolinha homozigota *gusA* exibiram 56,5 e 71,5% de desfolhação, respectivamente. Os resultados dos bioensaios *in vitro* e *in vivo* confirmam a resistência das plantas à *Anticarsia gemmatalis*.

Termos para indexação: *Glycine max*, *Anticarsia gemmatalis*, resistência a insetos.

## Introduction

*Anticarsia gemmatalis* Hübner, the velvetbean caterpillar is a major pest of soybean, occurring mainly in soybean growing regions of North and South Americas (Panizzi & Corrêa-Ferreira, 1997; Macrae et al., 2005). *A. gemmatalis* causes extremely high levels of defoliation when infestation is heavy, and can severely damage axillary meristems. A single larva can consume up to 110 cm<sup>2</sup> of soybean foliage (Walker et al., 2000). The activity of  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* in controlling the larvae of *A. gemmatalis* has been described (Stewart et al., 1996; Walker et al., 2000; Macrae et al., 2005; Miklos et al., 2007).

In a previous study (Homrich et al., *in press*) we developed an IAS 5 transgenic line from somatic embryos proliferated on the semi-solid medium, which were co-transformed using microprojectile bombardment. Transgenic line contains at least an intact copy of a truncated synthetic *cryIAc* gene from *Bacillus thuringiensis*. Transgene transmission and expression were characterized in T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> generations. Eleven homozygous Cry1Ac-positive plants were obtained in the T<sub>3</sub> generation. A preliminary *in vitro* insect feeding assay indicated that transgenic plants were highly toxic to *A. gemmatalis* larvae.

Genetic and chromosomal abnormalities have been reported in plants arising from tissue culture. The change in chromosome number in a variant plant is commonly associated with reduced fertility and with altered genetic ratios in the progeny of self-fertilized plants. Singh et al. (1998) showed that soybean genotypes differ in their susceptibility to chromosomal instability induced by tissue culture. Thus is important to ascertain if the obtained transgenic plants present normal karyotype ( $2n=40$ ). Moreover is important to investigate if the transgenic plants maintain the productivity of the IAS 5 non-transgenic cultivar.

The objectives of this work were to analyze the agronomic performance of the transgenic homozygous lines, and to confirm the resistance of these plants against *A. gemmatalis* larvae by detached-leaf and whole plant-feeding bioassays.

## **Materials and Methods**

The transgenic isolines of the cultivar IAS 5 used in this study were developed by Homrich et al. (*in press*), and carry at least one intact gene copy of a synthetic *cryIAc* construct in which the 1.8-kb coding sequence is driven by the maize ubiquitin promoter (Ubi-1) and nopaline synthase terminator. In terms of codon usage, the gene *cryIAc* was designed for expression in dicots and has a G+C content of 47.7%. The overall modifications have resulted in higher expression levels of Cry1Ac in transgenic plants (Sardana et al., 1996).

## **Agronomic performance**

Progenies (=isolines) were obtained from self-pollination of 11 T<sub>3</sub> homozygous transgenic plants (44, 46, 162, 169, 438, 497, 507, 520, 551, 937, 1274). Seeds of non-transgenic IAS 5 were used as a control. Seeds were individually planted in 30-cm plastic pots containing organic soil, which were maintained in a greenhouse with natural light at 25 ± 1°C. Pots were arranged in randomized complete block design with six repetitions per line.

The following traits were analyzed: date of emergence, initial development, seedling hypocotyl color, flower color, pubescence color, growth habit, plant height, number of nodes, flowering date, maturity date, seed tegument color, seed hilum color, 100-seed weight, number of seeds and total grain weight. Initial development was scored 15 days after planting using a scale of 1 (poorly developed first trifoliolate leaf) to 5 (completely developed first trifoliolate leaf).

Analyses of variance were performed on the data, using the GLM procedure of SAS (SAS Institute, Cary, NC). When the assumptions for this test were not met variable transformations were selected according to Box & Cox (1964). Transformations were performed on flowering date, plant height, number of nodes, and total grain weight data. Multiple comparisons were made using Tukey's HSD test.



## Cytogenetical analysis

Chromosome numbers were determined in five transgenic isolines (44, 169, 438, 937 and 1274) and non-transgenic control plants, with three repetitions (plants) per genotype. Ten cells were analyzed per plant.

Root tips *c.* 1 cm in length were removed from seedlings, pretreated with a saturated solution of paradichlorobenzene for 18-20 h at 4°C, fixed in 3:1 ethanol-acetic acid for 12-24 h and stored in 70% ethanol at -18°C until required. Slides were prepared with only one root tip per slide, each seedling being considered as one plant. Root tips were hydrolysed in 1N HCl at 60°C for 8 min and stained with Feulgen. Chromosome counts were made on well-spread metaphases from intact cells, directly on the microscope.

## Insect bioassays

Two homozygous *cryIAc* transgenic isolines (162; 438) were evaluated by *in vitro* and *in vivo* assays for resistance to *Anticarsia gemmatalis*. A homozygous *gusA* isoline (732) and non-transgenic IAS 5 plants were used as negative controls. The transgenic and controls seeds were planted in 30-cm diameter plastic pots filled with organic soil and maintained in a greenhouse with natural light at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . A randomized complete block design was used with six repetitions (plants) per genotype. About 2,000 eggs of *A. gemmatalis* were provided by Embrapa Soja, Londrina, PR, and the experiments were conducted at Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, Brazil.

*In vitro* insecticidal activity of transgenic and control plants toward *A. gemmatalis* larvae was evaluated by using a detached leaf-feeding assay. Leaflets from large

trifoliolate leaves were placed in 100 mm x 20 mm Petri dishes containing a piece of moistened filter paper and were incubated for 72 h at 25 °C (with 12 h photoperiod). The amount of leaf tissue was kept as uniform as possible from one dish to another, with leaves being replaced as necessary. Leaf samples were infested with 20 neonate *A. gemmatalis* larvae per plate. After 24 h, the percent foliage consumption was estimated. Leaf consumption percentages were converted to scores as follow: 1 (very low consumption), 2 (less than 50%), 3 (around 50%) and 4 (~100% consumption). The number of alive and dead larvae was determined 24, 48 and 72 h after infestation. At the end of the experiment, the surviving larvae had their development and weight evaluated.

The whole plant-feeding assay was carried out in a greenhouse. Each plant was infested with 50 velvetbean caterpillar larvae when plants were in the V3 to V4 stages of development. Resistance was evaluated through visual estimates of percent defoliation and the insect survivorship seven and fourteen days after the infestation. The percent defoliation refers to the percentage of leaves with consumed area higher than 50%.

## **Results and discussion**

### **Agronomic performance**

For the following agronomic traits no variation was observed within and among transgenic isolines and the non-transgenic IAS 5 control: date of emergence (6-7 days), seedling hypocotyl color (light green), flower color (white), pubescence color (grey), growth habit (determinate), maturity (155 days), seed tegument color (yellow), seed hilum color (light brown). These traits are in accordance with the IAS 5 description.

Significant differences were observed for initial development, flowering date, plant height, number of nodes, number of seeds, 100-seed weight, and total grain weight (Table 1). Ten days after planting the non-transgenic IAS 5 control was at a more advanced developmental stage (score = 4.67) than those of the transgenic isolines (scores ranging from 2.33 to 3.83; Table 2). Interestingly, only two transgenic isolines (937, 520) showed a late flowering, while the other isolines did not differ from non-transgenic IAS 5 control. Likewise the number of nodes and plant height at maturity of most of the transgenic isolines did not differ from the control. Concerning the yield evaluation, five transgenic isolines (169, 438, 497, 520, 1274) had a significant lower 100-seed weight, while the other isolines did not differ from the control. However for the number of seeds and total grain weight no significant differences were detected among the transgenic isolines and the control. Taking in account all analyzed traits the presence of the *cryIAc* transgene did not affect the development and yield of plants. The agronomic performance of the transgenic isolines was similar to the control. Likewise, Miklos et al. (2007) showed no significant differences in agronomic performance (emergence, flowering, plant height, lodging, maturity and yield) of transgenic soybean plants containing a highly expressed *cryIA* gene.

### **Cytogenetical analysis**

A total of 180 cells of root tips from five transgenic isolines and non-transgenic control plants were analyzed. Cytological examination (mitotic pro-metaphase to metaphase chromosomes) of cells showed that transgenic plants and controls present normal karyotype ( $2n=40$ ) with no apparent chromosomal abnormalities.

## **Insect bioassays**

*Bt* soybean cultivars have not yet been commercialized, although experimental lines have been developed. A transgenic line of the soybean “Jack” cultivar expressing high levels of a synthetic *cryIAc* gene caused complete *A. gemmatalis* larval mortality in laboratory bioassays (Stewart et al., 1996) and in artificially infested field cages (Walker et al., 2000). More recently, transgenic lines of soybean (‘A5547’) expressing a synthetic *cryIA* gene were evaluated for the resistance against several lepidopteran pests in screenhouse and conventional field trials. *Bt* lines exhibited virtually complete efficacy against all pests tested (Macrae et al., 2005). Moreover, Miklos et al. (2007) reported the generation of three transgenic soybean lines via *Agrobacterium*-mediated gene transfer of a *cryIA* gene (*tic107*) which exhibited a high degree of resistance against lepidopteran pests (*Pseudoplusia includens*, *Helicoverpa zea*, and *A. gemmatalis*) in leaf disc and whole leaf bioassays. In the leaf disc bioassay all three transgenic *Bt* lines caused 100% mortality in the 4-d test period, while mortality on the isogenic isolines ranged from 25 to 42%. In the whole leaf assay, both third- and fourth-instar larvae on the transgenic *Bt* lines caused 100% mortality after 4d test, compared with 6.7 and 0% mortality, respectively, on the control.

In the present study two homozygous *cryIAc* transgenic isolines (162, 438), a homozygous *gusA* isoline (732) and non-transgenic IAS 5 plants were evaluated by *in vitro* and *in vivo* assays for resistance to *A. gemmatalis*. For the *in vitro* detached leaf-feeding assay isolated leaves were infested with neonate larvae of *A. gemmatalis*. After 24 h, leaves from the homozygous *gusA* isoline and from the non-transgenic plants were completely defoliated (Fig. 1a and b). In contrast, consumption was significantly reduced

in homozygous *cryIAc* transgenic leaves (Table 3; Fig. 1c and d). Larvae fed on *cryIAc* transgenic leaves showed browning and severe growth retardation in comparison to larvae fed on control leaves. Considering the larval weight on non-transgenic leaves as 100%, the larvae reared on *cryIAc* leaves had greatly reduced weight (64 and 66% for 162 e 438 isolines, respectively). The fate of the larvae was monitored for two more days. Seventy-two hours after infestation, larvae reared on *cryIAc* leaves exhibited 100% mortality compared with 1.65% of larvae fed on leaves from both the non-transgenic and *gusA* plants.

Insect damage in whole plant-feeding assay was similar to the detached leaf-feeding experiments, as control plants suffered a much greater amount of leaf damage than transgenic plants (Table 4; Fig. 2). The percent defoliation of the homozygous *gusA* isolate (732) and non-transgenic IAS 5 plants fourteen days after the infestation was in average 56.5 and 71.5%, respectively. On the other hand almost no damage was observed on *cryIAc* transgenic isolines (162, 438).

The results obtained in the present study showed that the high level of resistance against velvetbean caterpillar is similar or even higher than that reported by Miklos et al. (2007).

## **Conclusion**

1. This work reports the agronomic performance of the IAS 5 soybean transgenic isolines. Taking in account all analyzed agronomic traits the presence of the *cryIAc* transgene not affect the development and yield of plants.

2. Cytogenetical analysis show that transgenic plants present normal karyotype (2n=40) with no apparent chromosomal abnormalities.

3. The results of *in vitro* and *in vivo* bioassays confirm the resistance of transgenic plants to *Anticarsia gemmatalis*.

### Acknowledgements

To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil) and Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, for technical and financial support.

### References

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations (with discussion). **Journal of the Royal Statistical Society B**, v.26, p.211–252, 1964.

HOMRICH, M.S.; PASSAGLIA, L.M.P.; PEREIRA, J.F.; BERTAGNOLLI, P.F.; PASQUALI, G.; ZAIDI, M.A.; ALTOSAAR, I.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. “IAS5” transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants expressing a modified CRY1AC endotoxin show resistance to *Anticarsia gemmatalis*. **Genetics and Molecular Biology**, in press.

MACRAE, T.C.; BAUR, M.E.; BOETHEL, D.J.; FITZPATRICK, B.J.; GAO, A.G.; GAMUNDI, J.C.; HARRISON, L.A.; KABUYE, V.T.; MCPHERSON, R.M.; MIKLOS, J.A.; PARADISE, M.S.; TOEDEBUSCH, A.S.; VIEGAS, A. Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA* gene for control of Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, v.98, p.577-587, 2005.

MIKLOS, J.A.; ALIBHAI, M.F.; BLEDIG, S.A.; CONNOR-WARD, D.C.; GAO, A.G.; HOLMES, B.A.; KOLACZ, K.H.; KABUYE, V.T.; MACRAE, T.C.; PARADISE, M.S.; TOEDEBUSCH, A.S.; HARRISON, L.A. Characterization of soybean exhibiting high expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA* transgene that confers a high degree of resistance to Lepidopteran pests. **Crop Science**, v.47, p.148-157, 2007.

PANIZZI, A.R.; CORRÊA-FERREIRA, B.S. Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. **Trends Entomology**, v.1, p.71-88, 1997.

SARDANA, R.; DUKIANDJIEV, S.; GIBAND, M.; CHENG, X.; COWAN, K.; SAUDER, C.; ALTOSAAR, I. Construction and rapid testing of synthetic and modified toxin gene sequences CryIA (b & c) by expression in maize endosperm culture. **Plant Cell Reports**, v.15, p.677-681, 1996.

SINGH, R.J.; KLEIN, T.M.; MAUVAIS, C.J.; KNOWLTON, S.; HYMOWITZ, T.; KOSTOW, C.M. Cytological characterization of transgenic soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.319-324, 1998.

STEWART, C.N.; ADANG, M.J.; ALL, J.N.; BOERMA, H.R.; CARDINEAU, G.; TUCKER, D.; PARROTT, W.A. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. **Plant Physiology**, v.112, p.121-129, 1996.

WALKER, D.R.; ALL, J.N.; MCPHERSON, R.M.; BOERMA, H.R.; PARROTT, W.A. Field evaluation of soybean engineered with a synthetic *cryIAc* transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera : Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera : Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, v.93, p.613-622, 2000.



**Table 1.** Mean square, variation coefficient and P-value of the analysis of variance for initial development (ID), flowering date (FD), plant height (PH), number of nodes (NN), number of seeds (NS), 100-seed weight (100-SW) and total grain weight (TGW).

Source of variation	Degrees of freedom	ID	FD	PH	NN	NS	100-SW	TGW
Lines	11	24.8396465	7.63E-16	0.42174426	0.00036146	3205.22601	5.29331768	104.747391
Blocks	5	2.1888889	1.07E-16	0.05462058	0.00005651	1275.38056	1.43348556	26.09431
Error	55	3.0358586	1.24E-16	0.05899971	0.00005894	1475.6109	1.0902522	36.906352
C.V.	-	34.37007	4.45136E-6	5.616527	0.829181	26.30824	6.564811	26.62165
P <sup>(1)</sup>	-	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0296	0.0001	0.0052

<sup>(1)</sup>P-value related to the comparison among lines.

**Table 2.** Agronomic performance of the T<sub>4</sub> transgenic plants for initial development (ID), flowering date (FD), plant height (PH), number of nodes (NN), number of seeds (NS), 100-seed weight (100-SW) and total grain weight (TGW).

line	ID	line	FD	line	PH	line	NN	line	NS	line	100-SW	line	TGW
NT <sup>(1)</sup>	<b>4.67 a</b>	937	59.33 a	551	107.00 a	551	15.83 a	162	204.33 a	NT <sup>(1)</sup>	<b>17.66 a</b>	162	32.00 a
1274	3.83 b	520	58.50 a	520	105.50 a	520	15.33 ab	507	164.33 ab	44	16.67 ab	NT <sup>(1)</sup>	<b>29.05 ab</b>
551	3.50 bc	551	57.00 ab	937	103.67a	NT <sup>(1)</sup>	<b>15.33 ab</b>	NT <sup>(1)</sup>	<b>162.33 ab</b>	507	16.65 ab	507	26.69 ab
937	3.33 bc	438	56.17 abc	507	97.67 a	507	15.33 abc	937	153.17 ab	162	16.22 ab	937	22.96 ab
438	3.17 bc	507	53.00 abc	NT <sup>(1)</sup>	<b>96.00 a</b>	937	15.00 abc	169	145.00 ab	937	16.21 ab	551	21.74 ab
169	3.17 bc	44	51.17 abc	162	74.33 ab	162	13.33 abcd	438	141.83 ab	551	16.20 ab	438	21.44 ab
162	3.17 bc	1274	50.83 abc	438	71.83 ab	438	12.83 abcd	520	140.50 ab	46	15.93 abc	169	21.23 ab
507	3.17 bc	NT <sup>(1)</sup>	<b>49.17 bc</b>	1274	68.00 ab	1274	12.83 bcd	551	137.33 ab	497	15.59 bc	497	20.28 ab
497	3.00 bc	497	49.00 bc	497	67.67 ab	497	12.67 bcd	497	132.33 ab	1274	15.56 bc	44	20.10 ab
520	3.00 bc	162	47.17 c	44	56.83 b	46	12.33 cd	46	125.50 b	438	15.24 bc	46	20.01 b
46	2.67 c	46	47.17 c	169	56.33 b	44	12.33 cd	1274	124.67 b	169	14.92 bc	520	19.29 b
44	2.33 c	169	47.00 c	46	53.67 b	169	11.83 d	44	120.83 b	520	14.01 c	1274	19.05 b

Means followed by the same letter are not statistically significant at the 0.05 level. <sup>(1)</sup>NT-non-transgenic IAS 5 control

**Table 3.** Feeding assay of neonate larvae of *A. gemmatalis* on detached leaves.

Genotype	Leaf cons. (mean)	Larval Weight (mean) (mg)	% Mortality (mean)		
	24 h	24 h	24 h	48 h	72 h
162	1	0.40	90.8	98.3	100
438	1	0.39	85	95	100
732	3.67	1.56	0.85	1.65	1.65
NT <sup>(1)</sup>	3.83	1.12	1.65	1.65	1.65

<sup>(1)</sup>Non-transgenic IAS 5 plants. Twenty larvae were applied to detached leaves. Leaf consumption scores: 1 (very low consumption), 2 (less than 50%), 3 (around 50%) and 4 (~100% consumption).

**Table 4.** Whole plant-feeding assay of neonate larvae of *A. gemmatalis*.

Genotype	% defoliation	
	7 days after infestation (mean)	14 days after infestation (mean)
162	0	0
438	0	0
732	60	71.5
NT <sup>(1)</sup>	37.5	56.5

<sup>(1)</sup>Non-transgenic IAS 5 plants. Each plant was infested with 50 velvetbean caterpillar larvae. The percent defoliation refers to the percentage of leaves with consumed area higher than 50%.

**Figure legends:**

**Figure 1.** Detached leaf-feeding assay. Defoliation of controls (a-non-transgenic IAS 5; b-*gusA* isoline) and *cryIAC* transgenic (c-162 isoline; d-438 isoline) leaves 24 hours after infestation with *Anticarsia gemmatalis* larvae.

**Figure 2.** Whole plant-feeding assay. Defoliation of controls (a-non-transgenic IAS 5; b-*gusA* isoline) and *cryIAC* transgenic (c-162 isoline; d-438 isoline) plants 14 days after infestation with *Anticarsia gemmatalis* larvae.



Figure 1

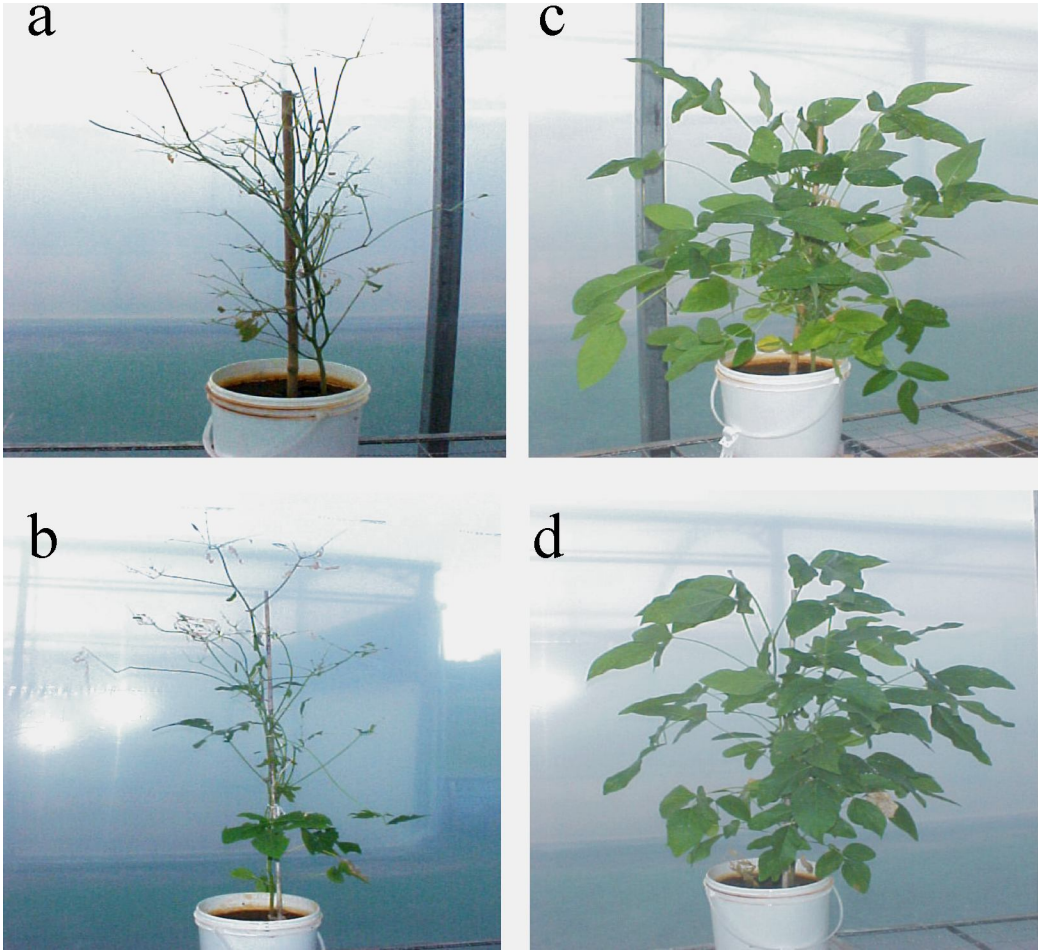


Figure 2

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja e o Estado do Rio Grande do Sul é o terceiro maior produtor de soja do Brasil. Sendo assim, o grande interesse econômico desta espécie torna-a um importante alvo para o melhoramento genético. Como a maioria das espécies de plantas cultivadas que fazem parte do sistema agrícola atual, a soja possui uma baixa variabilidade genética, o que tem dificultado o seu melhoramento através de técnicas clássicas de cruzamento. Neste sentido, técnicas de cultura de tecidos e de transferência de genes apresentam-se como importantes ferramentas auxiliares, permitindo que genes derivados de plantas relacionadas ou não e, até mesmo, de outros organismos possam ser utilizados em programas de melhoramento. Entretanto, o sucesso com estas abordagens tem sido limitado, devido à falta de sistemas eficientes de regeneração e de transformação. A maior vantagem da utilização de técnicas de engenharia genética para a transferência de genes específicos é a redução no tempo necessário para a obtenção de cultivares comercialmente úteis, com um mínimo de rompimento da integridade genética de genomas já selecionados.

Considerando que um sistema eficiente de regeneração *in vitro* é pré-requisito para o sucesso na transformação genética, a partir de 1991, temos testado, em nossos laboratórios, a regeneração via embriogênese somática de mais de vinte cultivares de soja recomendadas para o cultivo no Brasil. A cultivar IAS 5, utilizada no presente trabalho, destacou-se por apresentar alto potencial embriogênico e alta capacidade de regeneração *in vitro* (Santos *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2001). Em relação ao método de transformação, foi estabelecido um protocolo de transferência direta de DNA, via bombardeamento de partículas, utilizando o tecido embriogênico como alvo. Através deste protocolo, foram



geradas plantas férteis e totalmente transgênicas da cultivar IAS 5 expressando o gene repórter *gusA* (Droste *et al.*, 2002).

A importância econômica da cultivar comercial IAS 5, aliada aos enormes prejuízos causados por lagartas de *Anticarsia gemmatalis* que afetam a cultura da soja, motivaram o desenvolvimento de uma linha resistente a tal praga. Desta maneira, o objetivo principal desta Tese foi introduzir, na cultivar comercial IAS 5, o gene sintético *cryIAc* de *Bacillus thuringiensis*, visando à obtenção de plantas resistentes à lagarta-da-soja (*A. gemmatalis*).

O gene sintético *cryIAc* codifica apenas as regiões amino e central da  $\delta$ -endotoxina Cry1Ac, as quais são as regiões importantes para a toxicidade desta proteína à lagarta-da-soja (Bravo *et al.*, 2002). Este gene modificado apresenta uma alteração de códons com o objetivo de otimizar sua expressão em plantas e foi sintetizado a partir da união de oligonucleotídeos com o conteúdo de bases G + C alterado (47,7%) em relação ao gene original (37%) (Sardana *et al.*, 1996). O controle da expressão do gene *cryIAc* é realizado através do promotor da ubiquitina de milho (Ubi-1) e do terminador da nopalina sintase (*nos*).

O promotor da ubiquitina de milho tem sido utilizado em trabalhos de transformação de espécies monocotiledôneas, tais como milho (Christensen *et al.*, 1992; Sardana *et al.*, 1996) e arroz (Toki *et al.*, 1992 ; Cornejo *et al.*, 1993). Segundo Sardana *et al.* (1996), o promotor Ubi-1 se mostrou mais eficiente do que o promotor CaMV 35S, quando testado em milho.

O mesmo gene *cryIAc* sintético, utilizado no presente trabalho, foi primeiramente testado sob controle do promotor CaMV 35S, em algodão (Perlak *et al.*, 1990). Posteriormente, este gene, sob controle do promotor da ubiquitina, foi testado em milho (Sardana *et al.*, 1996). Nossos resultados mostram a eficiência do promotor Ubi-1 de milho

em soja. Tanto quanto é de nosso conhecimento, este é o primeiro registro da utilização deste promotor de monocotiledônea em uma espécie dicotiledônea.

Atualmente, a maioria das culturas transgênicas está alterada em características controladas por um único gene. Entretanto, plantas com características transgênicas múltiplas podem ser obtidas pelo processo de retransformação de uma planta já transformada ou pelo cruzamento sexual de diferentes plantas transgênicas que contenham, cada uma, um gene exógeno. Contudo, se por um lado há um grande número de características e genes desejáveis a serem incorporados nas culturas, há um número limitado de genes marcadores de seleção disponíveis (Miki e McHugh, 2004). Quando uma segunda característica é introduzida em uma planta transgênica por retransformação, a presença de um gene marcador nesta planta receptora impede o uso do mesmo marcador para a seleção da planta duplo-transformada. Por outro lado, se características transgênicas forem reunidas por cruzamento sexual, a redundância do gene de seleção no genoma da progênie pode ser problemática, pois aumentaria a possibilidade de silenciamento gênico dependente de homologia. Por estes motivos, vários sistemas têm sido desenvolvidos para a remoção do gene de seleção das plantas transgênicas, o que permite a utilização de um mesmo gene de seleção para transformações sequenciais (Bodanese-Zanettini e Pasquali, 2004).

Aliada às limitações acima, a preocupação pública com a disseminação de transgenes de resistência a antibióticos tem incentivado o desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de plantas transgênicas livres de genes marcadores. Embora nenhum efeito deletério da liberação destes genes de resistência seja conhecido, a percepção pública de possíveis riscos tem limitado a aceitação de produtos transgênicos. Tal preocupação encontra fundamento na possibilidade da transferência horizontal do transgene marcador

do vegetal para bactérias patogênicas do trato intestinal humano. Embora o risco da transferência de genes de resistência das plantas transgênicas para bactérias patogênicas seja essencialmente hipotético e remoto, este não pode ser totalmente afastado (Bennett *et al.*, 2004).

No presente trabalho, com a expectativa de se obter plantas transgênicas *cryIAc* livres de genes marcadores, a estratégia de co-transformação foi escolhida. Na co-transformação os genes repórteres/marcadores de seleção e o gene de interesse são introduzidos em cassetes de transformação ou plasmídeos diferentes. Esse sistema permite a segregação do gene de interesse e do gene repórter/marcador de seleção na progênie de plantas transformadas, desde que tais genes tenham sido inseridos em *loci* não ligados (Ebinuma *et al.*, 2001, Park *et al.*, 2004). A eficiência de co-transformação obtida neste trabalho (44%) está de acordo com publicações anteriores para soja. Em situações em que dois genes, em plasmídeos separados, são introduzidos por bombardeamento de partículas, a taxa de co-transformação tem variado de 18 a 50% (Christou e Swain, 1990; Li *et al.*, 2004).

A co-transformação pode resultar na ligação dos genes em um único loco, o que freqüentemente ocorre, quando é utilizado o método de bioústica (Miki e McHugh, 2004). Confirmando esta tendência, as análises moleculares das progênies T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> mostraram que os transgenes repórter/marcador de seleção (*gusA/hpt*) co-segregaram com o gene de interesse (*cryIAc*), indicando sua integração em um único loco. Resultados semelhantes foram obtidos em soja por Hadi *et al.* (1996).

A integração dos genes repórter/marcador de seleção (*gusA/hpt*) e do gene de interesse no mesmo loco, teoricamente, impediria a segregação dos mesmos nas progênies e, portanto, a obtenção de plantas livres de marcador de seleção. Entretanto, no presente

trabalho, a identificação de plantas *cryIAC*-negativas/*gusA*-positivas na descendência de plantas *cryIAC*-positivas/*gusA*-positivas indicou a ocorrência de recombinação, o que é possível se os genes não estiverem completamente ligados, ou seja, se houver DNA genômico intercalado entre os transgenes. Se isto for confirmado, pode-se manter a expectativa de buscar plantas livres de genes marcadores. Entretanto, investigações futuras serão necessárias para a melhor caracterização deste loco complexo. A estrutura do loco pode variar de simples cópias intactas até configurações complexas, compreendendo cópias intactas, repetições *in tandem* ou invertidas, concatâmeros, seqüências truncadas e/ou rearranjadas e presença de DNA genômico intercalado entre os genes (Kohli *et al.*, 2003).

A transmissão regular do transgene, bem como a manutenção de sua expressão é um pré-requisito para a produção de linhagens e, posteriormente, de novas cultivares a partir de transformantes primários. Segundo Campbell *et al.* (2000), o loco transgênico é considerado hemizigoto nos transformantes primários. Desta forma, é esperado que os transgenes se comportem como genes dominantes e segreguem em uma proporção de 3:1 (descendentes transgênicos e não-transgênicos, respectivamente) quando a planta é autopolinizada. No entanto, entre 10 e 50% das linhagens transgênicas, em várias espécies de plantas superiores, apresentam padrões excepcionais de expressão e herança (Yin *et al.*, 2004).

No presente trabalho, as progênies T<sub>1</sub> apresentaram um número significativamente menor de plantas transgênicas (*cryIAC*-positivas/*gusA*-positivas) do que o predito pelos princípios Mendelianos de herança para um único loco. As famílias T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> continuaram a segregar de forma excepcional, com uma grande deficiência de plantas transformadas.

A segregação excepcional pode resultar de um grande número de fatores que incluem, principalmente: a inativação da expressão do transgene, a inserção do transgene levando a uma mutação letal, e a baixa transmissão do transgene para a progênie (Yin *et al.*, 2004). A inativação da expressão é frequentemente observada quando o transgene está presente em múltiplas cópias e é responsável pela segregação anormal. No presente estudo, a inativação da expressão não pode ser considerada como alternativa para explicar a segregação não-Mendeliana, uma vez que foi confirmada a ausência do DNA exógeno nas plantas descendentes que não expressavam os transgenes.

Por outro lado, a integração do transgene no genoma da planta poderia ter provocado uma mutação letal em um gene essencial. Esta mutação seria refletida pela ausência de homozigotos na progênie das plantas transformadas. No entanto, a identificação de plantas homozigotas na geração T<sub>3</sub> afastou a possibilidade de ocorrência de mutação letal devida à inserção do transgene.

Desta forma, diante do número reduzido de plantas transgênicas em relação ao esperado, foi levantada, então, a hipótese de bloqueio na transmissão dos transgenes por um ou ambos os gametas. Para testar esta hipótese, foram realizados cruzamentos recíprocos de algumas plantas transgênicas T<sub>3</sub> com plantas não transformadas. Os resultados destes cruzamentos mostraram que os transgenes são transmitidos tanto pelo gameta masculino como pelo feminino, embora em uma frequência reduzida. A redução na taxa de transmissão dos gametas portando os transgenes pode explicar a dificuldade de obtenção de plantas homozigotas nas primeiras gerações segregantes. Entretanto, a homozigose foi atingida na terceira geração e 11 isolinhas transgênicas foram estabelecidas.

Como a transmissão reduzida dos transgenes por ambos os gametas poderia comprometer a produtividade das plantas transgênicas, decidiu-se investigar, de forma detalhada, a performance agrônômica das isolinhas homozigotas T<sub>4</sub>. Apenas cinco das 11 isolinhas testadas apresentaram o peso de 100 sementes mais baixo do que o controle (plantas de IAS 5 não transformadas). No entanto, para as características número total de sementes e peso total de grãos, nenhuma diferença significativa foi detectada entre as isolinhas e o controle. De um modo geral, considerando-se todos os caracteres agrônômicos analisados, a presença do transgene *cryIAc* não afetou o desenvolvimento e a produtividade das plantas transgênicas.

Os bioensaios realizados mostraram que tanto as plantas heterozigotas da geração T<sub>2</sub> (Capítulo 1) como as isolinhas homozigotas T<sub>4</sub> (Capítulo 2) apresentaram uma alta resistência quando desafiadas com larvas de *A. gemmatilis*. O nível de resistência observado neste trabalho é equivalente e, até mesmo, mais elevado do que o descrito por Miklos *et al.* (2007). Estes autores demonstraram a completa proteção das plantas transgênicas de soja quando desafiadas por lagartas de *A. gemmatilis*. Um aspecto relevante a ser considerado é o fato de que a expressão do gene *cryIA* descrita por Miklos *et al.* (2007) é classificada como de “alta dose” e um período de quatro dias de teste foi necessário para causar a total mortalidade das lagartas quando em contato com as folhas transgênicas. No bioensaio com folhas destacadas, realizado no presente estudo, um período de 24 horas foi suficiente para matar a grande maioria das lagartas em contato com as folhas transgênicas, tendo sido registrada 100% de mortalidade três dias após a inoculação das larvas (Capítulo 2). Os resultados obtidos no bioensaio com plantas inteiras confirmaram a alta proteção das mesmas contra a lagarta-da-soja. A quantificação da

expressão da proteína Cry1Ac será uma das próximas etapas na caracterização das plantas transgênicas.

O produto apresentado nesta Tese é o resultado do primeiro trabalho desenvolvido pela equipe na obtenção de plantas transformadas com um gene de interesse agrônômico. Este é, também, o primeiro produto transgênico de soja obtido no Brasil por co-transformação genética via biolística, utilizando embriões somáticos como alvo. Os resultados altamente promissores, que demonstram expressiva resistência das plantas transgênicas à lagarta-da-soja, abrem a perspectiva de uso comercial deste produto. As próximas etapas deverão contemplar a caracterização molecular detalhada do loco gênico, bem como testes a campo para confirmar se as plantas obtidas serão de interesse ao setor produtivo. De qualquer forma, mesmo não alcançando sucesso na obtenção de um produto comercial, o trabalho realizado tem o mérito de mostrar a eficiência do gene sintético *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* em soja. Além disto, o protocolo de transformação utilizado abre a possibilidade de obtenção de outros produtos transgênicos de soja, resultantes da integração do próprio gene sintético *cry1Ac*, bem como de outros genes de interesse agrônômico.

A construção gênica contendo o gene *cry1Ac* modificado foi cedida à nossa equipe pelo Dr. Illimar Altosaar da Universidade de Ottawa, Canadá, por meio de um Termo de Transferência de Material Biológico. Tal termo garante a utilização da construção enquanto pesquisa e determina que, caso exista qualquer possibilidade de uso comercial do produto transgênico obtido, novas tratativas deverão ser realizadas. Em relação à questão de propriedade intelectual, como se trata de um gene sintético, foi iniciada, com a concordância do Dr. Altosaar, a investigação da possibilidade de uso do mesmo diante das patentes já existentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barwale UB, Kerns HR e Widholm JM (1986) Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167:473-481.
- Bennett PM, Livesey CT, Nathwani D, Reeves DS, Saunders JR e Wise R (2004) Na assessment of the risks associated with the use of antibiotic resistance genes in the genetically modified plants: report of the working party of the British Society for Antimicrobial Chemoterapy. *J Antimicrob Chemother* 53:418-431.
- Bettany AJE, Dalton SJ, Timms E, Dhanoa MS e Morri P (2002) Effect of selectable gene to reporter gene ratio on the frequency of co- transformation and co-expression of *uidA* and *hpt* transgenes in protoplast-derived plants of tall fescue. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 68:177-186.
- Betz FS, Hammond BG e Funchs RL (2000) Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests. *Regul Toxicol Pharmacol* 32:156-173.
- Beversdorf WD e Bingham ET (1977) Degrees of differentiation obtained in tissue cultures of *Glycine* species. *Crop Sci* 17:307-311.
- Bishop AH, Johnson C e Perani M (1999) The safety of *Bacillus thuringiensis* to mammals investigated by oral and subcutaneos dosage. *World J Microbiol Biotechnol* 15:375-380.
- Bodanese-Zanettini MH e Pasquali G (2004) Plantas transgênicas. In: Mir L (eds) *Genômica*. 1st edition. Atheneu, São Paulo, pp 721-736.



- Bravo A, Sánchez J, Kouskoura T e Crickmore N (2002) N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *B. thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *J Biol Chem* 277:23985-23987.
- Bravo A, Gomez I, Conde J, Munoz-Garay C, Sánchez J, Zhuang M, Gill SS e Soberón M (2004) Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta* 1667:38-46.
- Broderick NA, Raffa KF e Handelsman J (2006) Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:15196-15199.
- Campbell BT, Baenziger PS, Mitra A, Sato S e Clemente T (2000) Inheritance of multiple transgenes in wheat. *Crop Sci* 40:1133-1141.
- Christensen AH, Sharrock RA e Quail PH (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol* 18:675-689.
- Christianson ML, Warnick DA e Carlson PS (1983) A morphogenetically competent soybean suspension culture. *Science* 222:632-634.
- Christou P, Swain WF, Yang NS e McCabe DE (1989) Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Genetics* 88:7500-7504.
- Christou P e Swain WF (1990) Co-transformation frequencies of foreign genes in soybean cell cultures. *Theor Appl Genet* 79:337-341.
- Christou P, McCabe DE, Martinell BJ e Swain WF (1990) Soybean genetic engineering-commercial products of transgenic plants. *Trends Biotechnol* 18:145-151.
- Cornejo MJ, Luth D, Blankenship KM, Anderson OD e Blechl AE (1993) Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Mol Biol* 23:567-581.

- De Maagd RA, Bosch D e Stiekema W (1999) *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sci* 14:9-13.
- Donaldson PA e Simmonds DH (2000) Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. *Plant Cell Rep* 19:478-484.
- Droste A, Leite PCP, Pasquali G, Mundstock EC e Bodanese-Zanettini MH (2001) Regeneration of soybean via embryogenic suspension culture. *Scientia Agrícola* 58:753-758.
- Droste A, Pasquali G e Bodanese-Zanettini MH (2002) Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. *Euphytica* 127:367-376.
- Dunwell JM (1999) Transgenic crops: The next generation, or an example of 2020 vision. *Ann Bot* 84:269-277.
- Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Endo S, Yamada K e Komamine A (2001) Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker. *Plant Cell Rep* 20:383-392.
- ERS-USDA, Soybeans and Oil Crops, <http://www.ers.usda.gov/Briefing/SoybeansOilCrops> (January 18, 2008).
- Finer JJ (1988) Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Rep* 7:238-241.
- Finer JJ e McMullen MD (1991) Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 27:175-182.
- Finer JJ, Vain P, Jones MW e McMullen MD (1992) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep* 11:323-328.

- Fischhoff DA, Bowdish KS, Perlak FJ, Marrone PG, McCormick SM, Niedermeyer JG, Dean DA, Kusano-Kretzmer K, Mayer EJ, Rochester DE, Rogers SG e Fraley RT (1987) Insect tolerant transgenic tomato plants. *Biotechnology* 5:807-813.
- Gelvin SB (1998) The introduction and expression of transgenes in plants. *Curr Opin Biotechnol* 9:227-232.
- Grover A, Sahi C, Sanan N e Grover A (1999) Taming abiotic stresses in plants through genetic engineering: current strategies and perspective. *Plant Sci* 143:101-111.
- Hadi MZ, McMullen MD e Finer JJ (1996) Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Rep* 15:500-505.
- Herbers K e Sonnewald U (1999) Production of new/modified proteins in transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol* 10:163-168.
- Hinchee MA, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, Fischhoff DA, Re DB, Fraley RT e Horsch RB (1988) Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Biotechnology* 6:915-922.
- Hofmann N, Nelson RL e Korban SS (2004) Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 77:157-163.
- Homrich MS, Passaglia LMP, Pereira JF, Bertagnolli PF, Pasquali G, Zaidi MA, Altosaar I e Bodanese-Zanettini MH. "IAS5" transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants expressing a modified CRY1AC endotoxin show resistance to *Anticarsia gemmatilis*. *Genet Mol Biol*, no prelo.

- Hongyu Z, Ziniu Y e Wangxi D (2000) Composition and ecological distribution of Cry protein and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. *J Invertebr Pathol.* 76:191-197.
- Hu CY e Bodanese-Zanettini MH (1995) Embryo culture and embryo rescue for wide cross hybrids. In: Gamborg OL e Phillips (eds) *Plant Cell, Tissue and Organ Cultures: Fundamental Methods*. Springer, Berlin, pp. 129-141.
- James C (2006) Global status of commercialized biotech/GM crops: 2006. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/35/executivesummary/default.html>
- Jouanin L, Bodané-Botino M, Girard C, Morrot G e Giband M (1998) Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci* 131:1-11.
- Ko TS, Nelson RL e Korban SS (2004) Screening multiple soybean cultivars (MG 00 to MG VIII) for somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons. *Crop Sci* 44:1825-1831.
- Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E e Christou P (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol Biol* 52:247-258.
- Lazzeri PA, Hildebrand DF e Collins GB (1985) A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Mol Biol Rep* 3:160-167.
- Li HY, Zhu YM, Chen Q, Conner RL, Ding XD, Li J e Zhang BB (2004) Production of transgenic soybean plants with two anti-fungal protein genes via *Agrobacterium* and particle bombardment. *Biol Plant* 48:367-374.
- Lippmann B e Lippmann G (1984) Introduction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. Merr. *Plant Cell Rep* 3:215-218.
- Macrae TC, Baur ME, Boethel DJ, Fitzpatrick BJ, Gao AG, Gamundi JC, Harrison LA, Kabuye VT, Mcpherson RM, Miklos JA, Paradise MS, Toedebusch AS e Viegas A

- (2005) Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA* gene for control of Lepidoptera. *J Econ Entomol* 98:577-587.
- McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ e Christou P (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Biotechnology* 6:923-926.
- Meurer CA, Dinkins RD, Redmond CT, McAllister KP, Tucker DT, Walker DR, Parrott WA, Trick HN, Essic JS, Frantz HM, Finer JJ e Collins GB (2001) Embryogenic response of multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars across three locations. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37:62-67.
- Miki B e McHugh S (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol* 107:193-232.
- Miklos JA, Alibhai MF, Bledig SA, Connor-Ward DC, Gao AG, Holmes BA, Kolacz KH, Kabuye VT, MacRae TC, Paradise MS, Toedebusch AS e Harrison LA (2007) Characterization of soybean exhibiting high expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA* transgene that confers a high degree of resistance to Lepidopteran pests. *Crop Sci* 47:148-157
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/37AA904436961F63E040A8C07502416D> (October 15, 2007).
- Munkvold GP e Hellmich RL (1999a) Comparison of fumosin concentrations in kernel of transgenic Bt maize hybrids and non-transgenic hybrids. *Plant Dis* 83:130-138.
- Munkvold GP e Hellmich RL (1999b) Genetically modified insect resistant corn: implications for disease management. <http://www.apsnet.org/online/feature/BtCorn/Top.html>

- Navon A (2000) *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection-reality and prospects. *Crop Prot* 19:669-676.
- Olhofs PM, Flagel LE, Donovan CM e Somers DA (2003) Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 216:723-735.
- Panizzi AR e Corrêa-Ferreira BS (1997) Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. *Trends Entomol* 1:71-88.
- Park J, Lee YK, Kang BK e Chung WI (2004) Co-transformation using a negative selectable marker gene for the production of selectable marker gene-free transgenic plants. *Theor Appl Genet* 109:1562-1567.
- Parrott WA, Hoffman LM, Hildebrand DF, Williams EG e Collins GB (1989) Recovery of primary transformants of soybean. *Plant Cell Rep* 7:615-617.
- Paz MM, Martinez JC, Kalvig AB, Fonger TM e Wang K (2006) Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep* 25:206-213.
- Peferöen M (1997) Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. *Trends Biotechnol* 15:173-177.
- Perlak FJ, Deaton RW, Armstrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT e Fischhoff DA (1990) Insect resistant cotton plants. *Nat Biotechnol* 8:939-943.
- Sanford JC (1988) The biolistic process. *Trends Biotechnol* 6:299-302.
- Sanford JC (1990) Biolistic plant transformation. *Plant Physiol* 79:206-209.
- Santarém ER, Pelissier B e Finer JJ (1997) Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 33:13-19.

- Santarém ER e Finer JJ (1999) Transformation of soybean [*Glycine Max* (L.)Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. In Vitro Cell Dev Biol Plant 35: 451-455.
- Santos KGB, Mundstock E e Bodanese-Zanettini MH (1997) Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. Plant Cell Rep 16:859-864.
- Sardana R, Dukiandjiev S, Giband M, Cheng X, Cowan K, Sauder C e Altosaar I (1996) Construction and rapid testing of synthetic and modified toxin gene sequences CryIA (b & c) by expression in maize endosperm culture. Plant Cell Rep 15:677-681.
- Schnepf E e Whiteley HR (1981) Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 78:2893-2897.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR e Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev 62:775-806.
- Siegel JP (2001) The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. J Invertebr Pathol 77:13-21.
- Singh RJ, Klein TM, Mauvais CJ, Knowlton S, Hymowitz T e Kostow CM (1998) Cytological characterization of transgenic soybean. Theor Appl Genet 96:319-324.
- Sobek EA e Munkvold GP (1999) European corn borer (Lepidoptera:Pyralidae) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. J Econ Entomol 92:503-509.
- Steward FC (1958) Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of growth from free cell to carrot plant. Am J Bot 45:709-713.

- Stewart CN, Adang MJ, All JN, Boerma HR, Cardineau G, Tucker D e Parrott WA (1996) Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. *Plant Physiol* 112:121-129.
- Toki S, Takamatsu S, Nojiri C, Ooba S, Anzai H, Iwata M, Christensen AH, Quail PH e Uchimiya H (1992) Expression of a maize ubiquitin gene promoter-*bar* chimeric gene in transgenic rice plants. *Plant Physiol* 100:1503-1507.
- Trick HN, Dinkings RD, Santarém ER, Samoylov V, Meurer CA, Walker DR, Parrott WA, Finer JJ e Collins GB (1997) Recent advances in soybean transformation. *Plant Tissue Cult Biotechnol* 3:9-24.
- Trick HN e Finer JJ (1998) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Rep* 17:482-488.
- Van Den Elzen PJM, Townsend J, Lee KY e Bedbrook JRA (1985) Chimeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Mol Biol* 5:299-305.
- Walden R e Wingender R (1995) Gene-transfer and plant regeneration techniques. *Trends Biotechnol* 13:324-331.
- Walker DR, All JN, McPherson RM, Boerma HR e Parrott WA (2000) Field evaluation of soybean engineered with a synthetic *cryIAc* transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera : Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera : Pyralidae). *J Econ Entomol* 93:613-622.
- Williams ES e Maheswaran B (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann Bot* 57:443-462.



- Wraight CL, Zangerl AR, Carroll MJ e Berenbaum MR (2000) Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. Proc Natl Acad Sci USA 97:7700-7703.
- Wright MS, Launis KL, Novitzky R, Duesiing JH e Harms CT (1991) A simple method for the recovery of multiple fertile plants from individual somatic embryos of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. In Vitro Cell Dev Biol Plant 27:153-157.
- Xia JY, Cui JJ, Ma LH, Dong SX e Cui XF (1999) The role of transgenic *Bt* cotton in integrated insect pest management. Acta Gossypii Sin 11:57-64.
- Yan B, Reddy MSS, Collins GB e Dinkins RD (2000) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants. Plant Cell Rep 19:1090-1097.
- Yin Z, Plader W e Malepszy S (2004) Transgene inheritance in plants. J Appl Genet 45:127-144.
- Yuan L e Knauf VC (1997) Modification of plants components. Curr Opin Biotechnol 8:227-233.