

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE CO-TRANSFORMAÇÃO
DE SOJA [*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL] VIA
BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS UTILIZANDO UM
GENE DE SELEÇÃO E UM GENE DE INTERESSE EM
PLASMÍDEOS DIFERENTES**

RAQUEL SACHET

**Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Mestre**

**Orientadora: Dra. Maria Helena Bodanese Zanettini
Co-orientadora: Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia**

**Porto Alegre
Maio de 2005**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Departamento de Genética
Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Centro do Agronegócio-Casa Rural.

Agradecimentos

A todos vocês, que estiveram ao meu lado nas horas que chorei e nas horas que sorri, nas horas que me lamentei e nas horas que de uma forma ou de outra demonstrei total alegria.

Muitas coisas aprendi, muitos valores guardei e muitas vitórias conquistei.

Mas tudo isso só foi possível, porque pude contar com a sincera ajuda de vocês.

Com vocês aprendi a respeitar e ser respeitada e principalmente aprendi que não podemos ter medo de lutar para ser feliz, que devemos vencer nossos obstáculos, pois Deus sempre está do nosso lado.

Agradeço pelo sorriso diário, sem mágoas nem rancores, agradeço de peito aberto, com a alma explosiva por ter chegado ao fim de mais uma etapa.

Hoje quero parar e agradecer, porque vocês fizeram, fazem e sempre farão parte de minha história!

Obrigada, pela amizade.

Obrigada, pela força que vocês me deram.

Obrigada, pelas inúmeras alegrias que senti em nossas conversas descontraídas.

Obrigada, pela compreensão que vocês tiveram por mim.

Enfim...!

São tantos OBRIGADOS, que aqui não caberia quase nada.

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Capítulo I - Introdução Geral.....	7
I.1 INTRODUÇÃO.....	8
I.2 OBJETIVOS.....	18
Capítulo II - Soybean co-transformation by particle bombardment using a selectable marker gene and a gene of interest on different plasmids	19
Capítulo III - Discussão Geral.....	42
Capítulo IV - Referências Bibliográfica dos Capítulos I e III.....	46

Resumo

Visando aumentar a resistência a moléstias fúngicas, o presente trabalho teve como objetivo introduzir um gene (*chit1*) que codifica uma quitinase do fungo *Metarhizium anisopliae* em cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. A co-transformação foi a estratégia escolhida, visando a obtenção de plantas livres de transgenes marcadores na progênie das plantas transformadas. A co-transformação foi realizada via biolística, tendo como tecido-alvo conjuntos de embriões somáticos globulares das cultivares MG/BR46 Conquista e IAS-5. O plasmídeo pGusHyg, que contém o gene repórter *gusA* e o gene marcador *hpt*, foi bombardeado concomitantemente com o plasmídeo pMOG463*chit1*, que porta o gene *chit1*. Os conjuntos de embriões bombardeados foram transferidos para meio seletivo contendo higromicina, visando a obtenção de material estavelmente transformado. Os conjuntos embriogênicos higromicina-resistentes foram transferidos seqüencialmente para meios de proliferação D-20 (sem higromicina), maturação e regeneração. No total, foram obtidos 387 e 380 embriões histodiferenciados das cultivares MG/BR46 Conquista e IAS-5, respectivamente. Plantas transgênicas adultas e férteis foram regeneradas. Para avaliar a eficiência da estratégia de co-transformação, foram realizadas análises moleculares de embriões histodiferenciados e de plantas regeneradas. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram o cálculo da taxa de co-transformação de 44% para os embriões histodiferenciados da cultivar MG/BR46 Conquista e de 50% para plantas de IAS-5. Não existem, até o momento, relatos de trabalhos em soja utilizando embriões somáticos globulares em proliferação como alvo para estudos de co-transformação.

Abstract

Aiming the increase of plant resistance to fungal disease, the present work was carried out with the objective of introducing a gene (*chit1*) coding a chitinase from *Metarhizium anisopliae* in soybean cultivars [*Glycine max* (L.) Merrill]. Co-transformation was the strategy elected, in order to obtain marker-free transgenic plants in the progeny of transformed plants. Co-transformation was performed via biolistic using somatic globular embryo clusters of MG/BR46 Conquista and IAS-5 cultivars as target tissues. Plasmid pGusHyg, containing the reporter *gusA* gene and the selectable marker *hpt* gene, was co-delivered with the pMOG463*chit1* plasmid containing the *chit1* gene. Bombarded embryo clusters were transferred to selective medium containing hygromycin, aiming to obtain stable transformed material. Hygromycin-resistant embryogenic clusters were sequentially transferred to proliferation D20 (without hygromycin), maturation and regeneration media. A total of 387 and 380 histodifferentiated embryos were respectively obtained from MG/BR46 Conquista and IAS-5 cultivars. Transgenic adult fertile plants were regenerated. To evaluate the co-transformation efficiency, DNA from histodifferentiated embryos and from regenerated fertile plants was submitted to molecular analysis. Data obtained allowed us to calculate co-transformation frequencies of 44% and 50% for MG/BR46 Conquista and IAS-5 cultivars, respectively. As far as we are concerned there is no studies utilizing soybean somatic embryos for co-transformation via biolistic.

Capítulo I

Introdução Geral

I.1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivada é muito diferente das plantas ancestrais, as quais eram rasteiras e se desenvolviam na costa leste da Ásia, principalmente ao longo do Rio Yangtze, na China. Sua evolução começou com o aparecimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagem que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China. Sua importância na dieta alimentar dessa antiga civilização chinesa era tal que a soja, juntamente com trigo, arroz, centeio e milho, era considerada um grão sagrado, com direito a cerimônias ritualísticas na época do plantio e da colheita (EMBRAPA soja, 2005). A soja hoje cultivada é uma espécie anual, diplóide ($2n = 40$), de autofecundação e pertencente à família Fabaceae (Hymowitz, 1979; EMBRAPA Soja, 2005).

Apesar de conhecida e explorada no Oriente há mais de cinco mil anos, sendo uma das mais antigas plantas cultivadas do Planeta, o Ocidente ignorou o cultivo da soja até a segunda década do século vinte, quando os Estados Unidos iniciaram sua exploração comercial, primeiro como forrageira e, posteriormente, como grão (EMBRAPA Soja, 2005). A revolução sócio-econômica e tecnológica protagonizada pela soja no Brasil moderno pode ser comparada ao fenômeno ocorrido com a cana-de-açúcar no Brasil colônia e com o café no Brasil imperial que, em épocas diferentes, comandaram o comércio exterior do país. Em nosso país, a soja foi estabelecida como uma cultura importante primeiramente na Região Sul (décadas de 1960 e 1970) e, em seguida, nos cerrados do Brasil Central (a partir da década de 1980) (EMBRAPA Soja, 2005)

O Complexo Agroindustrial da soja movimenta mundialmente aproximadamente US\$ 215 bilhões/ano. Em 2004, o Brasil figurou como o segundo produtor mundial, com uma produção de 50 milhões de toneladas ou 25% da safra mundial. Em primeiro lugar encontram-se os Estados Unidos, com 65,8 milhões de toneladas. A receita cambial auferida pela soja brasileira foi de aproximadamente 10 bilhões de dólares, e de cinco vezes esse valor, se considerados os benefícios gerados ao longo da sua extensa cadeia produtiva (EMBRAPA Soja, 2005).

Devido à sua posição de destaque em todo o mundo, a soja tem sido alvo de constantes estudos para o melhoramento genético. No entanto, a caracterização das

cultivares brasileiras de soja, usando microssatélites como marcadores, demonstrou uma estreita base genética em seu germoplasma (Priolli *et al.*, 2002). Além disso, a fonte de recursos genéticos, representada por espécies afins, também é inacessível para soja, devido à incompatibilidade sexual dos cruzamentos interespecíficos e intergenéricos (Hu & Bodanese-Zanettini, 1995).

Por esses motivos, a eficiência dos métodos tradicionais de cruzamento tem sido bastante limitada, fazendo com que as pesquisas tenham sido direcionadas à utilização de técnicas moleculares de transferência de genes. Sendo assim, a manipulação genética abriu a perspectiva de que genes derivados de plantas, relacionadas ou não, e mesmo de organismos de outros reinos, possam ser utilizados em programas de melhoramento da soja. Diferentes técnicas para a transformação genética de plantas foram estabelecidas com o desenvolvimento da cultura de tecidos e da engenharia genética (para revisão ver Brasileiro & Lacorte, 1998; Bodanese-Zanettini & Pasquali, 2004).

Os cultivos de plantas transgênicas em geral registraram o segundo maior crescimento em 2004, alcançando 81 milhões de hectares (200 milhões de acres). De acordo com estudo divulgado pelo Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA), a área global cultivada com transgênicos cresceu 20% em 2004, representando um aumento de 13,3 milhões de hectares (James, 2004). No Brasil, por exemplo, dados apontam crescimento de 66% da área com soja transgênica RR (*Round up Ready*; Suzuki S & Yuyama, 2005).

Vários métodos de transferência de genes para tecidos-alvo já foram empregados para a produção de soja transgênica. Os primeiros trabalhos de transformação por bombardeamento de partículas utilizaram meristemas apicais (McCabe *et al.*, 1988) e culturas embriogênicas em suspensão (Finer & McMullen, 1991). Pelo sistema de transferência mediada por *Agrobacterium* foram utilizados como alvo cotilédones imaturos (Parrott *et al.*, 1989; Yan *et al.*, 2000), culturas embriogênicas em suspensão (Trick & Finer, 1998) e tecido meristemático axilar localizado em nodos cotiledonares de plântulas (Hinchee *et al.*, 1988).

O sucesso dos métodos de transformação genética da soja, no entanto, não tem correspondido às expectativas, o que pode ser atribuído à ineficiência das técnicas de transferência de genes e, principalmente, da regeneração de plantas *in vitro*. Uma vez que o gene tenha sido introduzido no tecido-alvo, é necessário que as células ou tecidos

transformados sejam regenerados em plantas, sendo esta uma limitação para a obtenção de soja geneticamente modificada, já que esta espécie é de difícil regeneração *in vitro* (Trick *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2001). Desta forma, pode-se dizer que existem três fatores limitantes principais para a obtenção de soja transgênica, sendo eles: 1) o sistema de cultura de tecido que precisa ser otimizado, 2) a eficiência do método de transformação que ainda é baixa e de difícil reprodutibilidade, e 3) o limitado número de genótipos que têm sido transformados com sucesso.

Um protocolo de transformação de soja ideal deve ser simples, rápido e de baixo custo; proporcionar um método eficiente de seleção, sem a produção de plantas não-transformadas ou quiméricas, e ter sucesso com várias cultivares (Olhoft *et al.*, 2003). Apesar de ainda ineficiente, trabalhos recentes têm demonstrado considerável avanço no sistema de transformação de soja mediada por *Agrobacterium*. Yan *et al.* (2000) obtiveram três plantas férteis e a análise de 48 progênies revelou um padrão de herança mendeliano. Este foi o primeiro trabalho a demonstrar a exequibilidade do método de transformação usando cotilédones zigóticos imaturos como explante. Segundo Ko *et al.* (2003), um fator crítico para o sucesso da transformação de diferentes cultivares de soja é o uso de uma linhagem adequada de *Agrobacterium*.

O método de transformação genética por bombardeamento de partículas, 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 atravessar a parede e as membranas celular e nuclear, liberando no núcleo os fragmentos de DNA. Este método tem sido reconhecido como um dos mais eficientes, pois utiliza como alvo o tecido intacto, além de ser relativamente independente do genótipo (Bodanese-Zanettini & Pasquali, 2004).

Para a transferência de DNA para tecidos vegetais, Finer *et al.* (1992) desenvolveram um aparelho denominado *Particle Inflow Gun* (PIG), o qual é simples e de baixo custo se comparado aos demais aparelhos. O método desenvolvido por Finer & McMullen (1991) utiliza partículas de tungstênio ou ouro cobertas com DNA, que são impulsionadas diretamente por uma descarga de gás hélio sob baixa pressão (em torno de 60 psi), o que resulta em danos menores aos tecidos bombardeados. O tecido-alvo é

mantido em câmara com vácuo para que as partículas não sofram uma rápida desaceleração após o disparo.

A principal vantagem do bombardeamento 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*. Christou *et al.* (1989) demonstraram que a introdução de DNA em soja via biolística pode apresentar um padrão de herança mendeliano. Entretanto, a frequência de integração estável obtida via bombardeamento ainda é baixa e podem ocorrer rearranjos, fragmentação do DNA inserido e/ou inserção de cópias múltiplas (Hadi *et al.*, 1996). A presença de cópias múltiplas pode resultar no silenciamento do transgene (Reddy *et al.*, 2003). Outros fatores limitantes deste método são os relacionados aos aspectos técnicos, incluindo o tipo de aparelho e partícula e o fato de que alguns tecidos podem ser resistentes à penetração das partículas devido a cutículas espessas e compactas, paredes celulares lignificadas e superfícies pilosas (Hunold *et al.*, 1994).

Vários tipos de explantes e células podem ser utilizados para a transformação por biolística tais como folhas, caule e calos. De modo geral, a transformação de meristemas apicais e células embriogênicas tem demonstrado maior eficiência para a obtenção de plantas transgênicas (Lacorte *et al.*, 1999, Bodanese-Zanettini & Pasquali, 2004).

O primeiro registro de transformação de soja via bombardeamento data de 1988 (McCabe *et al.*, 1988), sendo que os autores utilizaram tecido meristemático como alvo. No entanto, as plantas obtidas foram, em geral, quiméricas, devido à constituição multicelular do meristema. Assim, para que a planta regenerada fosse totalmente transgênica seria necessário que ocorresse a transferência do gene para as três camadas de células que compõem o meristema apical. Porém, comprovou-se que as células transformadas encontravam-se basicamente nas duas camadas mais externas dos ápices meristemáticos dos brotos regenerados (Sato *et al.*, 1993).

Posteriormente, vários trabalhos relataram a obtenção de embriões somáticos, por via direta ou indireta, a partir de cotilédones de embriões zigóticos imaturos. Como a origem dos embriões secundários é unicelular (Finer, 1988), o tecido embriogênico passou a ser o principal tecido-alvo para a transformação genética, uma vez que uma única célula epidérmica transformada de um embrião primário é capaz de originar, por embriogênese secundária, um indivíduo totalmente transgênico. Além disto, a embriogênese somática

como sistema de regeneração de soja tem sido reconhecida por seu potencial em produzir um grande número de plantas independentemente transformadas (Finer & McMullen, 1991).

Conceitualmente, a embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas dão origem a estruturas semelhantes a embriões, sem que ocorra a fusão de gametas, sendo esses capazes de se desenvolver em plantas. O padrão de desenvolvimento de um embrião somático em dicotiledôneas apresenta características morfológicas semelhantes àquelas do embrião zigótico (Guerra *et al.*, 1999), passando pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. O embrião somático é uma estrutura bipolar, com meristema apical e radicular e sem conexão física com o tecido de origem (Tisserat, 1991).

Embora a embriogênese somática seja amplamente utilizada para a regeneração de plantas *in vitro*, ainda não se conhecem totalmente os processos que levam à formação dos embriões. A resposta diferenciada das cultivares às condições da cultura ainda é o principal obstáculo à regeneração da soja via embriogênese (Droste, 2001; Silva, 2005). Além disto, uma cultivar que apresenta maior capacidade de indução de embriões não necessariamente é a que tem a maior capacidade de conversão dos mesmos em plantas (Santos *et al.*, 1997; Droste, 1998; Silva, 2005).

Nos primeiros trabalhos desenvolvidos por nossa equipe foram utilizados apenas genes marcadores e genes repórteres, com o objetivo de estabelecer as melhores condições para a transformação genética da soja. Droste *et al.* (2002) utilizaram o plasmídeo pGusHyg, o qual contém o gene repórter *gusA*, isolado da bactéria *Escherichia coli*, que codifica a enzima β -glicuronidase (GUS) e o gene marcador higromicina-fosfotransferase (*hpt*), derivado de um transposon de *E. coli*, sendo este capaz de conferir resistência à higromicina e antibióticos derivados.

Quando se trata da introdução de genes de interesse, após a obtenção das plantas transformadas, a manutenção da presença do gene marcador nestas é geralmente desnecessária e indesejável. É recomendável que qualquer gene de seleção, especialmente aqueles que conferem resistência a antibióticos ou a herbicidas, seja removido antes da planta ser liberada no meio ambiente (Bettany *et al.*, 2002). Isto evitaria um possível escape do gene de resistência a herbicidas, por exemplo, por meio do pólen das linhagens transformadas para espécies selvagens próximas (Scutt *et al.*, 2002).

Em relação aos genes que conferem resistência a antibióticos, há também a preocupação com a possibilidade de que tais genes possam ser transferidos horizontalmente de plantas para bactérias do ambiente ou que os produtos vegetais utilizados na alimentação possam transferir o(s) transgene(s) para microrganismos da flora intestinal ou para as células humanas, o que tem dificultado a utilização comercial de organismos geneticamente modificados (CSA, 2000). No entanto, estudos detalhados demonstraram que a possibilidade de ocorrência de tais eventos é desprezível (Kuiper *et al.*, 2001; Bennett *et al.*, 2004). Endo *et al.* (2002) acrescentaram que a presença de gene de seleção impede o uso do mesmo marcador no momento da re-transformação, gerando um empilhamento de genes na planta, o que poderia causar um efeito negativo desse agente, diminuindo a capacidade de proliferação da célula transformada e a sua conversão em planta adulta. Os genes repórteres/marcadores e o gene de interesse podem ser introduzidos no mesmo cassete de transformação (co-integrado) ou serem introduzidos em cassetes separados (co-transformação; Bettany *et al.*, 2002).

Várias metodologias têm sido descritas para a remoção do gene de seleção das plantas transgênicas (para revisão ver Ebinuma *et al.*, 2001 e Miki & McHugh, 2004). Dentre as várias técnicas descritas, duas têm apresentado maior potencial. A mais simples é o sistema de co-transformação, o qual permite a segregação do gene de interesse e do gene repórter/marcador na progênie de plantas transformadas, desde que tais genes tenham sido inseridos em locus não ligados (Ebinuma *et al.*, 2001). Uma outra estratégia, mais complicada, é o uso de recombinases sítio-específicas sob o controle de promotores induzíveis, para remover o gene marcador das plantas transgênicas após a seleção (Miki & McHugh, 2004).

A co-transformação apresenta, também, a vantagem de permitir a inserção simultânea de um grande número de genes em uma planta, com um número limitado de genes marcadores (François *et al.*, 2002). 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 e discos de folhas de tabaco, segmentos de hipocótilo de canola, discos de folhas de *Arabidopsis* e em arroz. Segundo os autores, embora a eficiência de co-transformação tenha apresentado uma ampla variação (de 10 a

90%), na maioria dos trabalhos foi verificado que esta eficiência foi superior à prevista para eventos independentes.

Utilizando técnicas de transferência direta, especialmente transformação de protoplastos mediada por polietilenoglicol e bombardeamento com partículas, vários grupos de pesquisa registraram eficiência de co-transformação variando de 18 a 88% em diferentes espécies incluindo feijão, milho, aveia, soja, arroz e trigo (Campbell *et al.*, 2000; Bettany *et al.*, 2002).

Em soja, uma eficiência de co-transformação de aproximadamente 25% foi encontrada em experimentos envolvendo a aceleração de partículas ou a eletroporação de protoplastos, bem como a aceleração de partículas utilizando meristemas como alvo (Christou *et al.*, 1990). Hadi *et al.* (1996) realizaram um experimento de co-transformação via biolística tendo como tecido-alvo culturas embriogênicas em suspensão, usando até 12 plasmídeos diferentes. Das 26 plantas regeneradas testadas, todas continham pelo menos oito plasmídeos diferentes, enquanto 73% dos clones continham os 12 plasmídeos. Em outro trabalho, nódulos cotiledonares foram transformados por bombardeamento de partículas ou via *Agrobacterium*. Quando os explantes foram co-cultivados com *Agrobacterium* visando a co-integração de dois genes (mesmo plasmídeo) que expressavam proteínas anti-fúngicas, das 11 plantas obtidas, quatro apresentavam ambos os genes. Já quando cotilédones imaturos de soja foram co-bombardeados com dois plasmídeos (contendo os mesmos genes do experimento anterior), 26 plantas foram regeneradas e, destas, duas foram co-transformadas (Li *et al.*, 2004). Não existem, até o momento, relatos de trabalhos em soja utilizando embriões somáticos globulares em proliferação como alvo para estudos de co-transformação via biolística ou outro método de transformação genética.

Um dos fatores limitantes para a obtenção de altos rendimentos na cultura da soja são as doenças, que demandam conhecimento especializado para sua correta identificação, avaliação de perdas e controle. Já foram identificadas, no Brasil, inúmeras doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides, algumas das quais de grande importância, provocando perdas consideráveis no rendimento e, outras, de aparência secundária, que não têm causado maiores prejuízos.

A aquisição de tolerância a herbicidas e de resistência a microrganismos e insetos é um dos principais objetivos no melhoramento genético de plantas as doenças causadas por

microrganismos, principalmente aquelas de origem fúngica, são consideradas um dos mais sérios problemas que afetam as plantações. Por este motivo, é de grande interesse introduzir no genoma das plantas agrícolas genes que, potencialmente, possam conferir resistência genética a tais moléstias.

De acordo com revisões apresentadas por Bonato (2000) e pela COODETEC (2002), entre os diversos fungos que atacam a soja, destacam-se:

- ✓ Rizoctônia (*Rhizoctonia solani*), que ataca a soja em duas fases. No início do desenvolvimento, causando o denominado “tombamento por rizoctônia”, e em plantas adultas, causando a morte em reboleiras a partir da floração;

- ✓ Murcha por esclerócio (*Sclerotium rolfsii*);

- ✓ Tombamento por pítium/fitófora (*Pythium spp.* e/ou *Phytophthora sojae*).

De acordo com os autores acima citados, existem também fungos que causam doenças de raízes, tais como:

- ✓ Podridão por fitófora (*Phytophthora sojae*);

- ✓ Morte da extremidade da raiz principal (*Pythium*, *Fusarium* e *Rhizoctonia*);

- ✓ Síndrome da morte súbita ou podridão vermelha da raiz (*Fusarium solani f. sp. glycines*).

Uma das principais doenças que tem atingido as plantações de soja, desde sua primeira constatação no Brasil na safra 2000/2001, é a Ferrugem Asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Esta doença tem sido alvo de inúmeros estudos em face de sua agressividade e poder de dano, causando a desfolha prematura e redução drástica no rendimento de grãos (Suzuki & Yuyama, 2005).

Não existem cultivares de soja com resistência a esses fungos, sendo este um grande desafio para os programas de melhoramento. Assim, a obtenção de plantas geneticamente transformadas que apresentam aumento da resistência a moléstias fúngicas surge como uma estratégia promissora e factível.

Segundo Punja (2001), as pesquisas visando o aumento da resistência a doenças fúngicas em plantas transgênicas podem ser agrupadas em cinco categorias:

- ✓ A expressão de genes que são diretamente tóxicos aos patógenos ou que reduz seu crescimento. Estes incluem proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR), tais como as enzimas hidrolíticas (quitinases, glicanases), proteínas antifúngicas (osmotina

e taumatina), peptídeos antimicrobianos (tioninas, defensinas, lectinas), proteínas inativadoras de ribossomo (RIP), e fitoalexinas;

✓ A expressão de genes que destroem ou neutralizam um componente do arsenal patogênico, tais como poligalacturonase, ácido oxálico e lipase;

✓ A expressão de genes que podem potencialmente aumentar a estrutura de defesa da planta. Estes incluem níveis elevados de peroxidase e lignina;

✓ A expressão de genes que liberam sinais que podem regular a defesa da planta, incluindo a produção de elicitores específicos, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido salicílico (SA) e etileno (C₂H₄);

✓ A expressão de genes de resistência (R) envolvidos na resposta hipersensível (HR) e fatores de interação com avirulência (Avr).

As enzimas hidrolíticas quitinases e β -1,3-glicanases estão entre as proteínas antifúngicas mais exploradas para a geração de plantas transgênicas resistentes, por serem capazes de degradar os principais componentes da parede celular de fungos, as quitinas e os glicanos, respectivamente (Fritig *et al.*, 1998; Salmeron & Vernooij, 1998). Além disso, as quitinases fazem parte do sistema de defesa das plantas, não sendo tóxicas para as mesmas e para animais (Lorito *et al.*, 1998).

O principal substrato das quitinases é o polissacarídeo quitina – um polímero não ramificado de *N*-acetil-D-glicosaminas (NacGlcs) unidas por ligações do tipo β -(1,4). A quitina é um dos polímeros mais abundantes da natureza, sendo constituinte do exoesqueleto de artrópodes e de conchas de moluscos, e que também compõe a parede celular de fungos e algumas algas. Investigações recentes indicaram que tanto em plantas como em animais, as quitinas estão envolvidas não apenas no processo relacionado à defesa ou à resposta ao estresse em geral, mas também nos processos de crescimento e desenvolvimento (Kasprzewska, 2003).

Algumas espécies de culturas transgênicas expressando quitinases têm sido avaliadas em casa de vegetação (Kern, 2003) e testes a campo (Melchers & Stuiver, 2000; Punja, 2001) e demonstraram uma redução na incidência de doenças fúngicas.

Genes de plantas que codificam proteínas envolvidas na degradação da parede celular, especialmente quitinases, foram usados visando alterar a resistência a fungos patogênicos. No entanto, a inserção de apenas um gene não conferiu níveis de resistência adequados e poucos trabalhos relatam a resistência a múltiplos patógenos. Os genes de

uma quitinase de pepino e de uma glicanase de *Nicotiana plumbaginifolia* foram introduzidos em batata (*Solanum tuberosum* L.). Os resultados mostraram que não houve diferença significativa na habilidade dos extratos foliares das plantas transformadas em inibir o crescimento de *Rhizoctonia solani*, quando comparadas com plantas controle (Moravčíková *et al.*, 2004).

Genes codificantes de quitinases isolados de fungos utilizados para o biocontrole de outros fungos e de artrópodes como, por exemplo, *Trichoderma harzianum*, representam notadamente um avanço na estratégia de emprego de transgenia, uma vez que apresentam uma alta atividade antifúngica, agindo sobre um amplo espectro de fitopatógenos e por não serem tóxicos às próprias plantas, mesmo quando em altas concentrações (Lorito *et al.*, 1998).

A introdução em soja do gene *chit1*, que codifica a quitinase CHIT42 do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (utilizado como biocontrole) e caracterizado por Bogo *et al.* (1998), apresenta-se como uma perspectiva para introduzir a resistência a fungos em plantas. Este gene foi transferido para plantas de tabaco por Kern (2003). Foram obtidas plantas capazes de expressar o gene *chit1* de forma estável. Plantas expressando altos níveis da proteína CHIT42 mostraram-se consistentemente resistente ao fungo *Rhizoctonia solani*, sugerindo uma relação direta entre a atividade enzimática e a redução da área foliar afetada pelas lesões fúngicas.

I.2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo geral introduzir em cultivares de soja, via co-transformação por biolística, o gene *chit1* isolado do fungo *Metarhizium anisopliae*, com a perspectiva de aumentar a resistência a moléstias fúngicas nestas plantas.

Os objetivos específicos desse trabalho são:

a) Avaliar a eficiência da estratégia de co-transformação, comparando a resposta de duas cultivares de soja por meio de análises moleculares de embriões histodiferenciados e de plantas regeneradas;

b) Obter plantas transformadas, as quais poderão conter apenas o gene marcador (resistência ao antibiótico higromicina) ou, além deste, o gene de interesse (*chit1*).

Capítulo II

Soybean co-transformation by particle bombardment using a selectable marker gene and a gene of interest on different plasmids

Trabalho a ser submetido à revista PAB – Pesquisa Agropecuária Brasileira

Co-transformação de soja via bombardeamento de partículas utilizando um gene marcador e um gene de interesse em plasmídeos diferentes

Raquel Sachet⁽¹⁾; Luciane Maria Pereira Passaglia⁽¹⁾; Milena Schenkel Homrich⁽¹⁾; Giancarlo Pasquali⁽²⁾ and Maria Helena Bodanese-Zanettini^{(1)*}

⁽¹⁾ Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

⁽²⁾ Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

*e-mail: maria.zanettini@ufrgs.br

Resumo

No presente trabalho está descrita a co-transformação de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] via bombardeamento de partículas. Um plasmídeo contendo um gene (*chit1*) que codifica uma quitinase do fungo *Metarhizium anisopliae* foi bombardeado concomitantemente com o plasmídeo pGusHyg, contendo os genes *gusA* e *hpt* de *Escherichia coli*. Conjuntos de embriões somáticos de soja foram utilizados como tecidos-alvo. Após a seleção, tecidos resistentes à higromicina foram individualmente proliferados e deram origem a conjuntos de clones, que correspondem a eventos de transformação independentes. Vinte e nove embriões e uma planta da cultivar MG/BR46 Conquista, e nove plantas adultas e férteis da cultivar IAS-5 foram analisadas para verificar a presença dos transgenes. Os dados obtidos permitiram calcular eficiências de co-transformação de 44% e 50% para as cultivares MG/BR46 Conquista e IAS-5, respectivamente. As sementes obtidas das plantas transgênicas co-transformadas consistem em um valioso material genético para a avaliação da expressão e do padrão de herança dos genes exógenos.

Termos para indexação: bombardeamento de partículas, co-transformação, embriogênese somática, soja, gene de seleção

Soybean co-transformation by particle bombardment using a selectable marker gene and a gene of interest on different plasmids

Abstract

The present work describes the co-transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] via particle bombardment. A plasmid containing a chitinase gene (*chit1*) isolated from *Metarhizium anisopliae* was co-delivered with the plasmid pGusHyg containing the *Escherichia coli gusA* and *hpt* genes. Somatic embryogenic clusters were employed as target tissues. After selection, hygromycin-resistant tissues were proliferated individually to give rise to sets of clones corresponding to independent transformation events. Twenty-nine histodifferentiated embryos and one regenerated plant of cultivar MG/BR46 Conquista, and nine adult fertile plants of cultivar IAS-5 were analyzed for the presence of transgenes. Data obtained allowed us to calculate co-transformation efficiencies of 44% and 50% for MG/BR46 Conquista and IAS-5 cultivars, respectively. Seeds obtained from transgenic co-transformed plants consist in a valuable genetic material to evaluate the expression and the inheritance pattern of the foreign genes.

Index terms: co-transformation, particle bombardment, somatic embryogenesis, soybean, selectable marker gene.

Introduction

During the last decades, the development of *in vitro* tissue culture techniques in concert with advances in gene transfer technologies allowed the application of genetic engineering to improve agronomic traits in crop plants, including soybean. Transgenic soybean plants are produced using various DNA delivery methods and plant tissues, including: 1) particle bombardment of shoot meristems (McCabe et al., 1988), embryogenic suspension cultures (Finer & McMullen, 1991) and proliferative embryogenic clusters (Droste et al., 2002); 2) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated T-DNA delivery into immature cotyledons (Parrott et al., 1989; Yan et al., 2000), embryogenic suspension cultures (Trick & Finer, 1998), and axillary meristematic tissue located in seedling cotyledonary-nodes (Hinchee et al., 1988; Olhoft et al., 2003). Although the first production of fertile transgenic soybean plants has been reported about 15 years ago, current transformation protocols for soybean remain inefficient and limited to a few cultivars. The ability to transform soybean using a straightforward protocol with high efficiency and high quality transgenic events is essential to impart a variety of genes into the genome of this plant species to improve important agronomic traits.

Co-transformation is defined as the simultaneous introduction of multiple genes followed by their integration into the cell genome. The genes are either present on the same plasmid used in transformation ('single-plasmid co-transformation') or on separate plasmids ('multiple-plasmid co-transformation'). The main advantage of co-transformation as a way to introduce multiple transgenes into a plant is that a single transformation event can result in the integration of multiple transgenes as opposed to sequential transformation which requires multiple, time-consuming transformation events (François et al., 2002). In addition, co-transformation has been used as a system to generate marker-free transgenic

plants. This method 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. Marker genes can subsequently be removed from such plants by genetic segregation (Ebinuma et al., 2001; Scutt et al., 2002).

Every year fungal diseases cost millions of dollars due to crop damage despite the extensive use of fungicides. Using transformation technology to strengthen host resistance to these pathogens is not only a desirable but also an achievable objective. The most widely used approach to enhance plant resistance against fungal pathogens has been to overexpress hydrolytic enzymes (chitinases and glucanases), which belong to the group of pathogenesis-related proteins (PR proteins; Punja, 2001). Here we report the efficient soybean co-transformation via particle bombardment using two plasmids: one containing a selectable marker gene and a second one harboring a chitinase (*chit1*) gene isolated from *Metarhizium anisopliae*.

Material and methods

Plasmids used for soybean transformation

Plant transformation vectors used in this study were pGusHyg carrying the *gusA* reporter gene and a hygromycin resistance gene (*hpt*) both driven by the Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter and nopaline synthase (*nos*) terminator, and pMOG463*chit1* harboring a fragment of 1.7 kb which contains the full cDNA for CHIT42 (*chit1* gene) from *Metarhizium anisopliae* (Bogo et al., 1998). Both plasmids were used at a final concentration of $1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$.

Transformation procedure and selection of transformed tissues

Somatic embryogenic cultures of two soybean cultivars, MG/BR46 Conquista and IAS-5, initiated and proliferated on solid 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) containing medium (D20), as described in Droste et al. (2002), were used as target-tissues. For the co-transformation of MG/BR46 Conquista embryogenic clusters (Experiment I), a 1:1 molar ratio of plasmids was used, while for IAS-5 embryogenic clusters (Experiment II), the molar ratio was 4:1 (pMOG463*chit1*:pGusHyg). To precipitate DNA 5 µl of each plasmid (Experiment I) and 4 µl of pMOG463*chit1* and 1 µl of pGusHyg (Experiment II) were added to 25 µl of 100 mg/ml tungsten pellets (M10, Dupont, Wilmington, DE) suspended in sterile distilled water. Next, 25 µl of 2.5 M CaCl₂, followed by 10 µl of 0.2 M spermidine, were added to the suspension. After 5 min on ice, 50 µl of the supernatant were removed. The pellet mixture was resuspended using a bath sonicator (Model FS15, Fisher Scientific Pittsburg, USA) immediately before using 2 µl for each bombardment.

Bombardments were performed using a Particle Inflow Gun – PIG (Finer et al., 1992). Fifteen embryogenic clusters (about 50 mg tissue) were placed in each dish containing D20 medium (Figure 1A). Twelve and 15 dishes were prepared for MG/BR46 Conquista and IAS-5 cultivars, respectively. Each dish was bombarded once. A sample of randomly picked clusters from each dish was histochemically stained for GUS activity 48 hours after bombardment. The selection of transformed tissues was done on D20 medium with 12.5 mg l⁻¹ hygromycin-B for 14 days, followed by three months culture on the same medium containing 25 mg l⁻¹ hygromycin-B. After selection, pieces of green tissue were subcultivated individually in dishes containing fresh D20 medium without antibiotic during two additional months. Subcultures were performed every 14 days.

Embryo histodifferentiation and conversion into plants

To stimulate histodifferentiation, clusters of hygromycin-resistant embryogenic tissues were transferred to modified MSM6 maturation medium (Finer & McMullen, 1991), containing MS salts, B5 vitamins, 6% sucrose, 0.3% PhytigelTM, pH 5.8. After 4 weeks, the embryos were individualized and transferred to fresh MSM6 medium for further 4 weeks. Histodifferentiated embryos were subsequently placed on MSO conversion medium, containing MS salts, B5 vitamins, 3% sucrose, 0.3% PhytigelTM, pH 5.8. Germinated embryos were individually transferred to glass pots containing the same medium, aiming the regeneration of plants. Regenerated plantlets were transferred to plastic cups covered with plastic films and containing vermiculite. Plantlets were gradually exposed to ambient humidity and then transferred to 1 kg pots with organic soil and maintained in a growth chamber.

Molecular analysis

Polymerase chain reactions (PCR) were performed using genomic DNA extracted from samples of histodifferentiated embryos and leaf tissues of regenerated plants according to the CTAB procedure of Doyle & Doyle (1987) with modifications. Each reaction mixture (50 μ l) consisted of 200 μ M dNTPs, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Biotools, 5 U μ l⁻¹), 1X Reaction Buffer with 2 mM MgCl₂, 100 nM of each primer and 100 ng of each DNA sample. Reactions employed specific primers to the *chit1* coding region (MachitFor GGAGGGTGGACGTGGTCAC and MachitRev GCTGCCCCCAATCCCTTG), to the *hpt* gene (HptFor GCGATTGCTGATCCCCATGTGTAT and HptRev GGTTTCCAATATCGGCGAGTACTT) and to the *gusA* gene (GusAFor

GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG and GusARev TGGATTCCGGCATAGTTAAAGG), which amplified fragments of 750, 622 and 412 bp, respectively. Amplification reactions were carried out in a thermocycler (Thermo Hybaid) as follows: 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. After electrophoresis in 1.5% agarose gel, PCR-generated fragments were transferred overnight onto hybond N+ membranes (Amersham Biosciences) using standard solutions and protocols (Sambrook & Russel, 2001). Probe labeling, hybridization, stringency washes and detection were carried out as specified by the ECL™ kit (Amersham Biosciences). DNA blottings were probed with 1.8 kb PCR fragments corresponding to the *E. coli hpt* or *gusA* genes or with 750 bp PCR fragment of pMOG463*chit1* carrying the *chit1* gene, purified from agarose gel by GFX kit (Amersham Biosciences).

Results and Discussion

In order to evaluate the efficiency of co-transformation of soybean embryogenic tissues via bombardment, two independent experiments were performed. In the first experiment, embryogenic clusters of cultivar MG/BR46 Conquista were bombarded with 1:1 molar ration of the plasmids pGusHyg and pMOG463*chit1*. Since it has been postulated that higher transformation frequencies can be obtained by increasing the amount of the gene of interest in relation to the selectable marker gene (Bettany et al., 2002; François et al., 2002), embryogenic tissues of IAS-5 cultivar were bombarded with a 1:4 (pGusHyg:pMOG463*chit1*) molar ratio in the second experiment. A high frequency of GUS expression was observed in both experiments, which was demonstrated by blue stained areas in almost all samples assayed (Figure 1B).

Selection of transgenic clones, maturation and conversion of transformed embryos

Three months after bombardment, hygromycin-resistant embryogenic soybean tissues could be visually selected, counted and separately cultured for the establishment and proliferation of individual clones, corresponding to independent transformation events, in proliferation D20 medium without hygromycin.

Eight and seven proliferative sets of clones out of 52 and 59 independent pieces of hygromycin-resistant tissues were established for MG/BR46 Conquista and IAS-5, respectively (Table 1). Hygromycin-resistant embryo clusters were then transferred to maturation medium. After 30 days on this medium, embryos from histodifferentiated clusters (Figure 1C) were individualized. The individualized embryos were cultured for further 30 days on the same medium. A total of 387 and 380 histodifferentiated somatic embryos were obtained for MG/BR46 Conquista and IAS-5, respectively. Histodifferentiated embryos exhibited diverse morphologies ranging from dicotyledonous embryos to highly abnormal types. The most common morphological classes were embryos with fused or trumpet cotyledons (Figure 1D). These types are known to convert to plants in low frequencies probably due to the absence of apical meristems (Suhasini et al., 1996; Droste et al., 2002).

The histodifferentiated embryos were transferred to conversion medium. For cultivar MG/BR46 Conquista, 12 plantlets were obtained, representing 3.1% of conversion, calculated as the number of embryos converted into plantlets divided by the total number of histodifferentiated embryos. For cultivar IAS-5, 42 plantlets were recovered, corresponding to a conversion frequency of 11.0%. All plantlets were transferred to plastic pots containing vermiculite and covered with plastic film (Figure 1E). They were gradually exposed to ambient humidity. Two and 11 plants of MG/BR46 Conquista and IAS-5,

respectively, were transferred to larger pots with organic soil and maintained in the growth chamber. One and nine plants of the above cultivars flowered and set seeds (Figure 1F). The plants of cultivar IAS-5 were regenerated from four sets of clones, representing at least four independent transformation events.

The plant conversion capacity of soybean tissues is highly dependent on the genotype (Bailey et al., 1993; Santos et al., 1997; Droste et al., 2001). Cultivar IAS-5 is already known to have a higher regeneration rate when compared to other soybean cultivars (Santos et al., 1997; Droste et al., 2002). Although cultivar MG/BR46 Conquista presented an excellent induction capacity, high proliferation potential and maturation of embryos, it expressed a low rate of plant conversion. The results for MG/BR46 Conquista confirm data recently obtained in other experiments performed in our laboratories (data not shown).

Molecular analysis

Data obtained from molecular analysis are summarized in Table 2. We assumed that embryos/plants derived from an independent piece of hygromycin-resistant embryogenic tissue corresponded to an independent transformation event. However, the molecular analysis showed that one piece of hygromycin-resistant tissue could contain at least two independent transformation events. Therefore the events numbered as 2, 3 and 6 of MG/BR46 Conquista and 3 and 6 of IAS-5 were subdivided (2.1 and 2.2; 3.1 and 3.2 and so on). Nine and six independent transformation events were identified for cultivars MG/BR46 Conquista and IAS-5, respectively. Twenty-nine histodifferentiated embryos and one regenerated plant of cultivar MG/BR46 Conquista derived from nine independent transformation events were screened for the presence of the fungal *chit1* gene and for the

gusA gene by PCR. All samples and positive controls presented the expected 412 bp *gusA* fragment (Table 2). This assay confirmed the stable transformation of embryos obtained in the medium with hygromycin and that our selection system is very tight. The presence of the expected 750 bp *chit1* fragment was observed in DNA samples extracted from three embryos.

PCR analyses of the nine adult fertile plants of IAS-5 derived from six independent transformation events showed the presence of the expected 622 bp *hpt* fragment in all plants (Figure 2A), and the presence of the 750 pb fragment corresponding to the *chit1* gene in three of them (Figure 2B). Another fragment of smaller size, which is probably related to an endogenous chitinase gene, was also amplified in all DNA samples.

In order to confirm the specificity of all fragments amplified by PCR, they were transferred to a nylon membrane and hybridized with the specific probe for each gene. Seven histodifferentiated embryos, derived from four independent transformation events of MG/BR46 Conquista, and five adult fertile plants obtained from three transformation events of IAS-5 (Table 2, Figure 2C) presented positive hybridization signals to the *chit1* gene. Differences between PCR and hybridization results could be accounted to the higher sensitivity of detection of the latter procedure.

The hybridization data allowed us to calculate the co-transformation efficiencies of 44% and 50% for cultivars MG/BR46 Conquista and IAS-5, respectively, calculated as the number of co-transformation events divided by the total number of independent transformation events. Co-transformation experiments utilizing genes carried by separate plasmids indicated that those genes are often, but not always, inherited together and act as linked genes (Campbell et al., 2000). The co-transformation via particle bombardment of multiple transgenes present on separated plasmids has been employed successfully in a

number of plant species including French bean, maize, oat, soybean, rice and wheat, with co-transformation efficiencies ranging from 18% to 88% (Campbell et al., 2000; Bettany et al., 2002). The wide range of co-transformation efficiencies currently reported is likely due to protocol differences in transformation, selection, or regeneration for individual experiments.

The efficiencies recorded in the present work for cultivars MG/BR46 Conquista (44%) and IAS-5 (50%) were higher than those reported for soybean by Christou et al. (1990), who found co-transformation efficiencies around 25% for unlinked genes on separate plasmids. These results were obtained for cell lines derived from protoplast transformation experiments involving either electroporation or particle acceleration, as well as to regenerated transgenic plants from experiments involving particle acceleration into soybean meristems. As far as we know there are no studies utilizing soybean somatic embryos for co-transformation via biolistic.

Despite the co-transformation success, the low rate of conversion of embryos into plants for cultivar MG/BR46 Conquista represented a limiting factor to regenerate plants expressing the *chit1* gene. This result confirms that the response to transformation procedure is genotype-specific (Trick et al., 1997).

Conclusion

This work clearly shows that transferring a gene of interest and a selectable marker gene harbored into two separate plasmids can result in the successful co-integration of both genes. In this study, nine plants of cultivar IAS-5 derived from six independent transformation events were obtained. Plants representing three events of transformation were shown to contain both *hpt* and *chit1* genes. Although a similar co-transformation

efficiency was obtained for MG/BR46 Conquista, we were not able to regenerate adult co-transformed plants of this cultivar. Additional analyses are required to further verify transgene inheritance.

Acknowledgements

Research support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil) and Centro do Agronegócio-Casa Rural (RS, Brazil).

References

- BAILEY, M.A.; BOERMA, H.R.; PARROTT, W.A. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.29, p.102-108, 1993.
- BETTANY, A.J.E.; DALTON, S.J., TIMMS, E.; DHANOA, M.S.; MORRI, P. 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 and Organ Culture**, v.68, p.177-186, 2002.
- BOGO, M.R.; ROTA, C.A.; PINTO, H.J.R.; OCAMPO, M.; CORREA, C.T.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the

entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. **Current Microbiology**, v.37, p.221-225, 1998.

CAMPBELL, B.T.; BAENZIGER, P.S.; MITRA, A.; SATO, S.; CLEMENTE, T.
Inheritance of multiple transgenes in wheat. **Crop Science**, v.40, p.1133-1141, 2000.

CHRISTOU, P.; MCCABE, D.E.; MARTINELL, B.J.; SWAIN, W.F. Soybean genetic engineering-commercial products of transgenic plants. **Tibtech**, v.8, p. 145-151.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. **Phytochemistry Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

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

DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. **Euphytica**, v.127, p.367-376, 2002.

EBINUMA, H.; SUGITA, K.; MATSUNAGA, E.; ENDO, S.; YAMADA, K.; KOMAMINE, A. Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker. **Plant Cell Reports**, v.20, p.383-392, 2001.

FINER, J.J.; MCMULLEN, M.D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.27, p.175-182, 1991.

FINER, J.J.; VAIN, P.; JONES, M.W.; MCMULLEN, M.D. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cell. **Plant Cell Reports**, v.11, p.323-328, 1992.

FRANÇOIS, I.E.J.A.; BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B.P.A. Different approaches for multi-transgene-stacking in plants. **Plant Science**, v.163, p.281-295, 2002.

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

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

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

PARROTT, W.A.; HOFFMAN, L.M.; HILDEBRAND, D.F.; WILLIAMS, E.G.; COLLINS, G.B. Recovery of primary transformants of soybean. **Plant Cell Reports**, v.7, p.615-617, 1989.

PUNJA, Z.K. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a review of process and future prospects. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.23, p.216-235, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.v1.

SANTOS, K.G.B.; MUNDSTOCK, E.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Genotype-specific normalization of soybean embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. **Plant Cell Reports**, v.16, p.856-864, 1997.

SCUTT, C.P.; ZUBKO, E.; MEYER, P. Techniques for the removal of marker genes from transgenic plants. **Biochimie**, v.84, p.119-1126, 2002.

SUHASINI, K.; SAGARE, P.; KRISHNAMURTHY, K.V. Study of aberrant morphologies and lack of conversion of somatic embryos of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.32, p. 6-10, 1996.

TRICK, H.N.; DINKINGS, R.D.; SANTARÉM, E.R.; SAMOYLOV, V.; MEURER, C.A.;
WALKER, D.R.; PARROTT, W.A., FINER, J.J.; COLLINS, G.B. Recent advances in
soybean transformation. **Plant Tissue Culture Biotechnology**, v.3, p.9-24, 1997.

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

YAN, B.; SRINIVASA REDDY, M.S.; COLLINS, G.B. *Agrobacterium tumefaciens* –
mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using immature
zygotoc cotyledon explants. **Plant Cell Reports**, v.19, p.1090-1097, 2000.

Table 1. Response of embryogenic clusters of two soybean cultivars following co-transformation with plasmids pMOG463*chit1* and pGusHyg and regeneration of transgenic plants

Experiment	MR	BC	HRT	TE	HE	RP	AP	FAP
Conquista	1:1	180	52	8	387	12	2	1
IAS-5	4:1	225	59	7	380	42	11	9

Abbreviations: MR = Molar ratio; BC = Number of bombarded clusters; HRT = Number of hygromycin-resistant tissues; TE = Number of transformation events; HE = Number of histodifferentiated embryos; RP = Number of regenerated plantlets; AP = Number of recovered adult plants; FAP = Number of fertile adult plants.

Table 2. Profile of transformed soybean plants derived from independent transformation events, containing *gusA/hpt* and/or *chit1* genes determined by hybridization analysis of PCR products

Cultivar	Transformation events	Number of analyzed		PCR analysis	
		embryos	plants	<i>gusA</i> ⁺ / <i>hpt</i> ⁺ ⁽¹⁾	<i>chit1</i> ⁺
Conquista	1	2	0	+	-
	2.1	4	0	+	-
	2.2	2	0	+	+
	3.1	2	0	+	-
	3.2	3	0	+	+
	4	1	0	+	+
	5	10	0	+	-
	6.1	4	1	+	-
	6.2	1	0	+	+
Total	9	29	1	9	4
IAS-5	3.1	na	2	+	-
	3.2	na	3	+	+
	4	na	1	+	+
	6.1	na	1	+	+
	6.2	na	1	+	-
	7	na	1	+	-
Total	6	---	9	6	3

⁽¹⁾ DNA from embryos of cultivar MG/BR46 Conquista were probed with a 1.8 kb *gusA* fragment; DNA from plants of cultivar IAS-5 were probed with 1.8 kb *hpt* fragment. Amplified DNAs were present (+) or absent (-); na = not analyzed.

Figure 1. (A) Soybean somatic embryo clusters used as target tissues for bombardment (bar = 2 mm); (B) Histochemical GUS expression two days post-bombardment (bar = 2 mm); (C) Histodifferentiated embryo cluster after one month on maturation medium (bar = 4 mm); (D) Individualized histodifferentiated embryos on conversion medium (bar = 5 mm), trumpet embryos are indicated by arrows; (E) Regenerated plantlet in a plastic pot with vermiculite; (F) Transgenic adult plants.

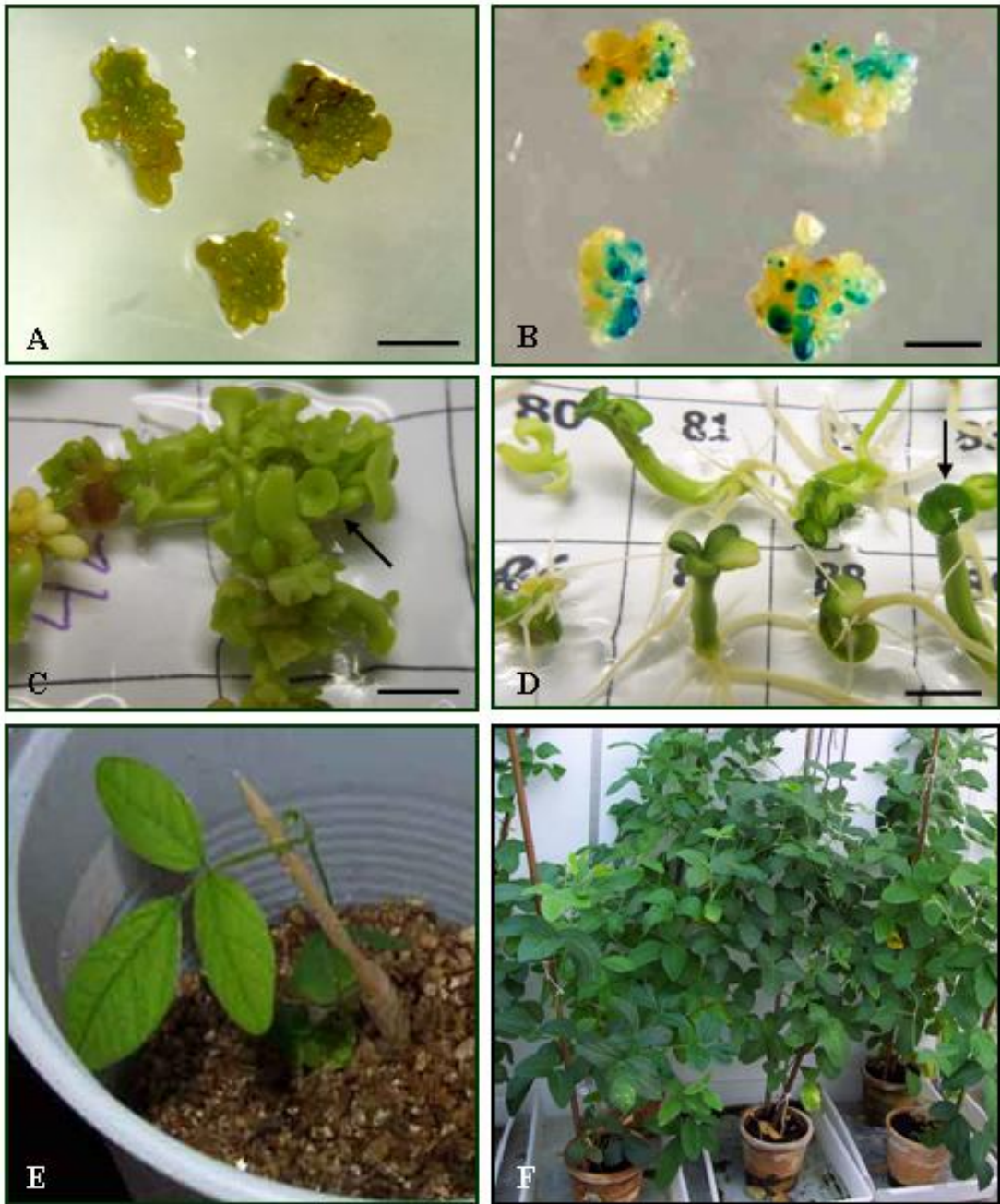
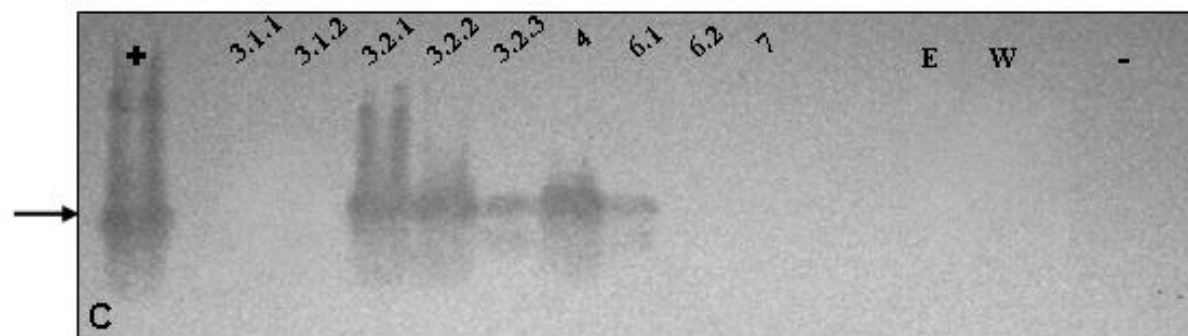
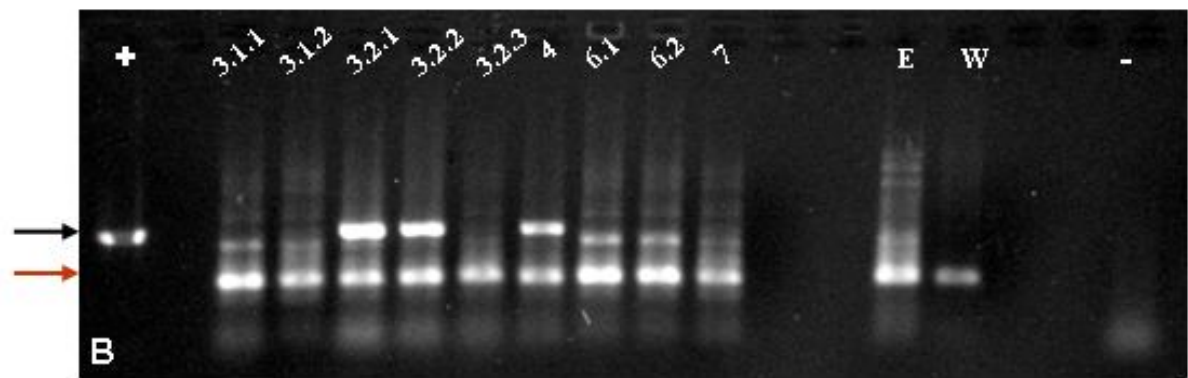
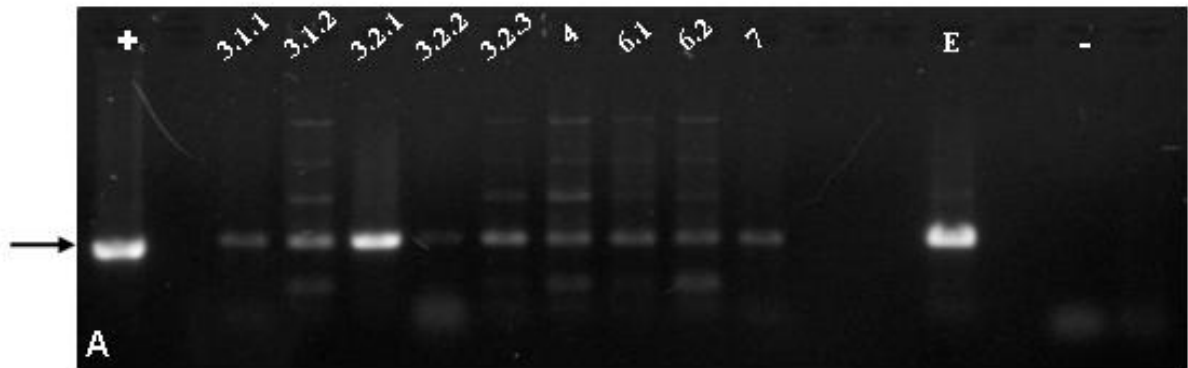


Figure 2. (A and B) Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained from the amplification of DNA samples from transgenic and non-transgenic soybean plants and embryos. Arrow is indicating fragments corresponding to the 622 bp *hpt* (A) and the 750 bp *chit1* (B) gene fragments from IAS-5 transgenic plants (numbered according to the transformation events). (+), positive controls: in (A) DNA from pGusHyg and in (B) DNA from pMOG463*chit1*; E, external group: DNA from a transgenic soybean plant containing a *hpt* gene; (-), negative control: reaction without DNA; the red arrow in (B) indicates the amplification of the probably related endogenous chitinase gene; (C) Hybridization analysis of PCR products of *chit1* gene (as in B) probed with a 750 bp *chit1* fragment. DNAs with positive hybridization signal are indicated by arrow. W, DNA from a non-transgenic IAS-5 plant.



Capítulo III

Discussão Geral

DISCUSSÃO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi a introdução de um gene que codifica uma quitinase de *Metarhizium anisopliae*, em soja, visando a obtenção de plantas com maior resistência a moléstias fúngicas. A estratégia escolhida foi a co-transformação via bombardeamento utilizando os plasmídeos pMOG463*chit1*, contendo o gene de interesse e pGusHyg, contendo o gene repórter *gusA* e o gene marcador *hpt*, que confere resistência ao antibiótico higromicina. Foram conduzidos dois experimentos envolvendo as cultivares MG/BR46 Conquista (Experimento I) e IAS-5 (Experimento II). Em ambos os experimentos foi seguido o protocolo estabelecido por Droste *et al.* (2002), variando apenas as proporções dos plasmídeos utilizados. As proporções de pGusHyg:pMOG463*chit1* foram de 1:1 e 1:4 nos Experimentos I e II, respectivamente. A alteração do protocolo no Experimento II foi baseada em estudos recentes que mostraram um aumento na taxa de co-transformação com o aumento na proporção do plasmídeo contendo o gene de interesse em relação ao plasmídeo contendo o gene marcador (Chen *et al.*, 1998; Bettany *et al.*, 2002).

Foram obtidas frequências de co-transformação semelhantes para MG/BR46 Conquista e IAS-5. Entretanto, não foi possível avaliar o efeito das diferentes proporções de plasmídeos utilizadas uma vez que as cultivares foram testadas em experimentos independentes e a resposta ao processo de transformação é genótipo-específica (Trick *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2002; Wiebke, 2005; Silva, 2005). Futuros experimentos deverão ser delineados para testar a eficiência da co-transformação de uma mesma cultivar, quando são utilizadas diferentes proporções do plasmídeo que contém o gene de interesse em relação àquela do plasmídeo com o gene marcador.

Os embriões histodiferenciados apresentaram diferentes morfologias, semelhantes às descritas por Buchheim *et al.* (1989), Santos *et al.* (1997) e Droste *et al.* (2002). Embora não tenha sido realizada a classificação morfológica dos embriões maduros, observou-se que um grande número destes embriões apresentou a forma de trompete ou cotilédones fusionados. Este fato explica, em parte, a baixa conversão dos embriões maduros em plantas, o que também foi observado por Droste *et al.* (2002). Segundo Suhasini *et al.* (1996), a ausência de meristema apical nestes tipos de embrião seria o motivo da baixa

conversão. Este fato não é específico de embriões transformados, uma vez que o mesmo foi observado em culturas de tecidos não transformados (Santos *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos demonstraram que a cultivar MG/BR46 Conquista, apesar de apresentar uma excelente capacidade de indução de embriões, alto potencial de proliferação e maturação dos mesmos, demonstra uma baixa taxa de conversão em plantas. Apesar do número de embriões histodiferenciados ter sido semelhante para as duas cultivares (387 e 380 para MG/BR46 Conquista e IAS-5, respectivamente), apenas duas plantas adultas da primeira cultivar foram regeneradas, enquanto 11 plantas adultas foram obtidas para a segunda cultivar.

Em soja, tem sido demonstrado que a capacidade de conversão em plantas é altamente dependente do genótipo (Bailey *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1997; Donaldson & Simmonds, 2000; Droste *et al.*, 2001; Meurer *et al.*, 2001; Droste *et al.*, 2002; Silva, 2005; Wiebke, 2005). A baixa eficiência dos protocolos para regeneração de plantas *in vitro* é um dos principais fatores limitantes para a obtenção de plantas transgênicas de soja. Embora as taxas de conversão obtidas no presente trabalho (3 e 11 % para MG/BR46 Conquista e IAS-5, respectivamente) pareçam, a primeira vista, muito baixas, valores semelhantes foram obtidos em trabalhos prévios. Wiebke (2005), em estudo envolvendo a transformação de embriões somáticos de soja utilizando o bombardeamento e *Agrobacterium* de maneira integrada, registrou uma eficiência de conversão de 12%, similar à obtida neste estudo para IAS-5.

O sucesso da co-transformação depende da eficiência na qual dois (ou mais) transgenes independentes são transferidos para a célula da planta e integrados em seu genoma (= eficiência de co-transformação). Em termos de eficiência do processo, uma ampla variação, de 10 a 90%, na eficiência de co-transformação tem sido registrada quando é utilizado o sistema *Agrobacterium* (Ebinuma *et al.*, 2001). Utilizando técnicas de transferência direta, vários grupos registraram eficiências de co-transformação de 18 a 88% (Campbell *et al.*, 2000; Bettany *et al.*, 2002). Em soja, uma eficiência 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). Os resultados obtidos no presente trabalho permitem calcular uma taxa de co-transformação de 44% para a cultivar MG/BR46

Conquista e de 50% para a IAS-5. Não é possível a comparação direta dos nossos resultados com os registrados por Christou *et al.* (1990), uma vez que há diferenças nos métodos de transformação e/ou no tecido-alvo utilizado. Não encontramos na literatura trabalhos de soja utilizando embriões somáticos como alvo para estudos de co-transformação, via biolística, tratando-se este, portanto, do primeiro trabalho a descrever tal procedimento e resultados.

A escolha da estratégia de co-transformação foi baseada na possibilidade de obtenção de plantas livres de genes de seleção na progênie resultante de cruzamento sexual das plantas geneticamente transformadas. Em muitos trabalhos, tem sido verificada a integração dos dois ou mais transgenes no mesmo locus, mas há registros de integração em loci separados no genoma da planta (Campbell *et al.*, 2000; François *et al.*, 2002; Miki & Mchugh, 2004). Em experimentos de co-transformação de feijão via bombardeamento, Aragão *et al.* (1996) obtiveram 50% da integração dos transgenes em loci separados.

As próximas etapas do presente estudo deverão incluir análises da segregação dos transgenes na geração T1 das plantas co-transformadas, bem como da expressão do transgene de interesse (*chit1*). O padrão de segregação permitirá verificar se os transgenes foram integrados num mesmo locus, ou em loci independentes. Havendo a expressão do gene de interesse, as plantas serão desafiadas com fitopatógenos importantes para a cultura da soja visando avaliar sua resistência e/ou suscetibilidade à infecção. O primeiro patógeno a ser testado será o fungo *Rhizoctonia solani*, uma vez que plantas de tabaco expressando este mesmo gene *chit1* apresentaram consistente resistência a este fungo (Kern, 2003).

Capítulo IV

Referências Bibliográfica dos Capítulos I e III

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aragão FJL, Barros LMG, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Faria JC and Rech EL (1996) Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theor Appl Genet*, 93: 142-150.
- Bailey MA, Boerma HR and Parrott WA (1993) Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In Vitro Cell Dev Biol*, 29: 102- 108.
- Bennett PM, Livesey CT, Nathwani D, Reeves DS, Saunders JR and Wise R (2004) An assessment of the risks associated with the use of antibiotic resistance genes in genetically modified plants: report of the Working Party of the British for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* 53: 418-431.
- 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 Tiss Org Cult* 68: 177-186.
- Bodanese-Zanettini MH and Pasquali G (2004). Plantas transgências. In Mir L (org) *Genômica*. Atheneu, SP, pp 721-734.
- Bogo MR, Rota CA, Pinto HJr, Ocampo M, Correa CT, Vainstein MH and Schrank, A (1998) A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Curr Microbiol* 37: 221-225.
- Bonato E. R (ed.) (2000) *Estresses em soja*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 254p.
- Brasileiro ACM and Lacorte C (1998) Manual de transformação genética de plantas. In: Brasileiro ACM and Carneiro VTC (eds). Brasília: EMBRAPA-SPI, pp 75-92.
- Buchheim JA, Colburn SM and Ranch JP (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol* 89: 768-775.
- Campbell BT, Baenziger PS, Miltra A, Sato S and Clemente T (2000) Inheritance of multiple transgenes in wheat. *Crop Sci* 40: 1133-1141.

- Chen L, Marmey P, Taylor NJ, Brizard J, Espinoza C, D'Cruz P, Huet H, Zhang S, Kochko A, Beachy RN and Faquet CM (1998) Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nature Biotech.* 16: 1060-1064.
- Christou P, McCabe DE, Martinell BJ and Swain WF (1990) Soybean genetic engineering-commercial products of transgenic plants. *Tibtech* 8: 145-151.
- Christou P, Swain WF, Yang NS and McCabe DE (1989) Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7500-7504.
- COODETEC (2002) Doenças emergentes em soja. Cascavel: COODETEC: BAYER. *Crop Sci*, 51p. CSA (2000) Report of American Medical Association Council on Scientific Affairs. Report 10. Disponível em: <<http://www.ama-assn.org/ama/pub/article/2036-4030.html>> Acesso em 22 out. 2002.
- Donaldson PA and Simmonds DH (2000) Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. *Plant Cell Rep* 19: 478-484.
- Droste A (1998) Embriogênese somática, transformação e regeneração de plantas férteis de cultivares brasileiras de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 97p.
- Droste A, Leite PCP, Pasquali G, Mundstock EC and Bodanese-Zanettini MH (2001) Regeneration of soybean via embryogenic suspension culture. *Sci. Agric.* 58: 753-758.
- 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.
- Embrapa Soja, disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br>> Acesso em 7 abril 2005.
- Endo S, Sugita K, Sakai M, Tanaka H and Ebinuma H (2002) Single-step transformation for generating marker-free transgenic rice using the ipt-type MAT vector system. *Plant J* 30(1): 115-122.

- Finer JJ (1988) Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Rep* 7: 238-241.
- Finer JJ and McMullen MD (1991) Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell Dev Biol* 27: 175-182.
- François IEJA, Broekaert WF and Cammue BPA (2002) Different approaches for multi-transgene-stacking in plants. *Plant Sci* 163: 281-295.
- Fritig B, Heitz T and Legrand M (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr Opin Immunol* 10: 16-22.
- Guerra MP, Torres AC and Teixeira JB (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JS.(eds). *Cultura de Tecido e Transformação Genética de Plantas*, Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPQ, v. 2, pp. 533-568.
- Hadi MZ, McMullen MD and Finer JJ (1996) Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Rep* 15: 500-505.
- Hinchee MA, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, Fischhoff DA, Re DB, Fraley RT and Horsch RB (1988). Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Biotechnology* 6: 915-922.
- Hu C–Y and Bodanese-Zanettini MH (1995) Embryo culture and embryo rescue for wide cross hybrids. In: Gamborg OL and Phillips (eds) *Plant Cell, Tissue and Organ Cultures: Fundamental Methods*. Berlin, pp. 129-141.
- Hunold R, Bronner R and Hahne G (1994) Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. *Plant J* 5(4): 593-604.
- Hymowitz T (1976) Soybeans *Glycine max* (Leguminosae-Papilionatae). In: Simmonds NW (ed) *Evolution of Crop Plants*. New York, Longman Inc, pp. 159-160.
- James C (2004) Global status of commercialized transgenic crops: 2004. ISAAA Briefs, 32.
- Kasprzewska A (2003) Plant chitinases – regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* 8: 809-824.

- Kern MF (2003) Expressão de uma quitinase de *Metarhizium anisopliae* em *Nicotina tabacum*: obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças fúngicas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 83p.
- Ko TS, Lee S, Krasnyanski S and Korban SS (2003) Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theor Appl Genet* 107: 439-447.
- Kuiper HA, Kleter GA, Noteborn H and Kok EJ (2001) Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J* 27: 503-528.
- Lacorte C, Aragão FJL, Vainstein MH and Rech EL (1999) Biobalística. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JS. *Cultura de Tecido e Transformação Genética de Plantas*, Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPq, v. 2, pp. 761-781.
- 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(3): 367-374.
- Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toros JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzunn S and Scala F (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7860-7865.
- McCabe E, Swain WF, Martinell BJ and Christou P (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Biotechnology* 6: 923-926.
- Melchers LS and Stuijver MH (2000) Novel genes for disease-resistance breeding. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 147-152.
- Meurer CA, Dinkins RD, Redmond CT, Mcallister KP, Tucker DT, Walker DR, Parrott WA, Tick HN, Essig JS, Frantz HM, Finer JJ and Collins GB (2001) Embryogenic response of multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars across three locations. *In Vitro Cell Dev Biol* 37: 62-67.
- Miki B and McHugh S (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol* 107: 193-232.

- Moravciková J, Matusiková I, Libantová J, Bauer Miroslav and Mlynárová (2004) Expression of a cucumber class III chitinase and *Nicotiana plumbaginifolia* class I glucanase genes in transgenic potato plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 79: 161-168.
- 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.
- Parrott WA, Hoffman LM, Hildebrand DF, Willians EG and Collins GB (1989) Recovery of primary transformants of soybean. *Plant Cell Rep* 7: 615-617.
- Priolli RHG, Mendes-Junio CT, Arantes NE and Contel EPB (2002). Characterization of Brazilian soybean cultivar using microsatellite markers. *Genet Mol Biol* 25 (2): 185-193.
- Punja ZK (2001) Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a review of process and future prospects. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 216-235.
- Reddy MSS, Dinkins RD and Collins GB (2003) Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. *Plant Cell Rep* 21: 676-683.
- Salmeron JM and Vernooij B (1998) Transgenic approaches to microbial disease resistance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol* 1: 347-352.
- Sambrook J and Russel DW (eds) (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, v.1.
- Santos KGB, Mundstock E and Bodanese-Zanettini MH (1997) Genotyp-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of ethylene inhibitor. *Plant Cell Rep* 16: 859-864.
- Sato S, Newell C, Kolacz K, Tredo L, Finer JJ and Hinchee M (1993) Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Rep* 12:408-413.
- Scutt CP, Zubko E and Meyer P (2002) Techniques for the removal of marker genes from transgenic plants. *Biochimie* 84: 119-1126.

- Silva AM (2005) Avaliação do potencial embriogênico e transformação genética de cultivares-elite de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] utilizando a Biolística e o sistema *Agrobacterium* de maneira integrada. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 67p.
- Suhasini K, Sagare P and Krishnamurthy KV (1996) Study of aberrant morphologies and lack of conversion of somatic embryos os chickpea (*Cicer arietinum* L.). In Vitro Cell Dev Biol 32P: 6-10.
- Suzuki S and Yuyama MM (eds) (2005) Boletim Técnico da soja. Fundação MT, 228p.
- Tisserat B (1991) Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: Dixon RA (ed) Plant Cell Culture – A Practical Approach. IRL Press, Oxford, 79-106.
- Trick HN, Dinkings RD, Santarém ER, Samoylov V, Meurer CA, Walker DR, Parrott WA, Finer JJ and Collins GB (1997) Recent advances in soybean transformation. Plant Tiss Cult Biotechnol 3: 9-24.
- Trick HN and Finner JJ (1998) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. Plant Cell Rep 17: 482-488.
- Wiebke B (2005) Transformação genética de embriões somáticos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] utilizando o bombardeamento e sistema *Agrobacterium* de maneira integrada. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 80p.
- Yan B, Srinivasa Reddy MS and Collins GB (2000) *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using immature zygotic cotyledon explants. Plant Cell Rep 19: 1090-1097.