



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill]
PARA EXPRESSÃO DO GENE RELACIONADO À CALOSE, PARA
POTENCIAL TOLERÂNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA**

LARA RODRIGUES NESRALLA

**DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO EM
AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2018**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill]
PARA EXPRESSÃO DO GENE RELACIONADO À CALOSE, PARA
POTENCIAL TOLERÂNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA**

LARA RODRIGUES NESRALLA

ORIENTADOR: RICARDO CARMONA

**DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO EM
AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2018**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill]
PARA EXPRESSÃO DO GENE RELACIONADO À CALOSE, PARA
POTENCIAL TOLERÂNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA**

LARA RODRIGUES NESRALLA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE -EM AGRONOMIA.

APROVADA POR:

Ricardo Carmona, Universidade de Brasília;

(Orientador)

Nara Oliveira Silva Souza, Universidade de Brasília;

Elibio Rech, Embrapa Cenargen;

Sabine Viana;

BRASÍLIA/DF, 22 de FEVEREIRO de 2018.

FICHA CATALOGRÁFICA

Nesralla, Lara

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill] PARA EXPRESSÃO DO GENE RELACIONADO À CALOSE, PARA POTENCIAL TOLERÂNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA

Brasília, 2018.

Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

NESRALLA, L. . TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill] PARA EXPRESSÃO DO GENE RELACIONADO À CALOSE, PARA POTENCIAL TOLERÂNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA

Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2018, 40f. MESTRADO.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: LARA RODRIGUES NESRALLA

TÍTULO: TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill] PARA EXPRESSÃO DO GENE RELACIONADO À CALOSE, PARA POTENCIAL TOLERÂNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA

GRAU: MESTRE ANO: 2018

É concedida à Universidade de Brasília de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

--- Nome: LARA RODRIGUES NESRALLA

Tel. (61)99609-9134

Email: Lnesralla@gmail.com

Foco.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
2. Objetivos.....	13
3. Revisão bibliográfica.....	14
3.1 A cultura da soja.....	14
3.2 Ferrugem Asiática da soja	14
3.2.3 Taxonomia do fungo.....	15
3.2.4 Epidemiologia e sintomatologia.....	15
3.2.5 Medidas de controle	16
3.2.6 Doenças fúngicas: fontes de resistência.....	16
3.3 Calose.....	17
3.3.1 Síntese. Regulação e degradação de calose.....	17
3.3.2 Genes que codificam possíveis sintetizadores de calose..	18
3.3.3 Deposição de calose e a defesa contra patógenos.....	18
3.4 Transformação genética de plantas.....	18
3.4.1 O sistema Biobalístico.....	18
3.4.2 Método de seleção: co-transformação.....	20
3.4.3 Cultura de tecidos.....	20
4. Metodologia	
4.1 Local e condução dos experimentos.....	21
4.2 Transformação genética.....	21
4.2.1 Preparo do material vegetal.....	21
4.2.2 Preparo das partículas de tungstênio e precipitação do DNA sobre as micro partículas e colocação nas membranas para bombardeio....	22
4.2.3 Preparação e desenvolvimento do DNA: vetor para transformação..	22
4.2.4 Bombardeamento.....	23
4.3 Cultivo e análise das plantas transformadas.....	24
4.3.1 Cultivo.....	24

4.3.2 Aclimação.....	24
4.3.3 Extração de DNA genômico.....	25
4.3.4 PCR.....	25
4.3.5 Dot-Blot.....	26
4.3.6 Sequenciamento	27
5. Resultados e Discussão.....	28
6. Conclusão.....	32
7. Referências bibliográficas	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema demonstrativo do processo de bombardeamento de genes através da biobalística. (Fonte: Carneiro et al., 2004).

Figura 2. Representação esquemática do vetor pCAMBIA-35S-AtGSL5-GFP. O gene da calose está localizado entre o promotor constitutivo CaMV35S e o gene repórter GFP.

Figura 3. Acelerador de partículas. (Fonte: Rech e Aragão 1998).

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose (1%) para identificação dos fragmentos após PCR. As bandas circuladas são plantas identificadas como positivas e a banda dentro do quadrado é a indicação do controle positivo. *MM – marcador de peso molecular – 1kB Plus DNA ladder (Thermo Fischer, Massachusetts, EUA).

Figura 5. Análise de Dot-Blot para detectar o gene Gsl5 codificador da calose. Do canto superior esquerdo 1 - D15; 2 - H4; 3 - 155; 4 - 40; 5 - 24; 6 - 152; 7- 37 (controle negativo); 8 - Vetor (Controle positivo na concentração de 10 ng).

Figura 6. Representação do alinhamento utilizando o programa *Clustal Omega, Multiple Sequence Alignment*, EMBL-EBI, da sequência obtida do resultado do sequenciamento com a sequência do vetor utilizado para as transformações genéticas. Os locais indicados por asteriscos representam a compatibilidade das sequências.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações e quantidades para o preparo das amostras e em sequência para a utilização da técnica dot-blot para identificação do gene de interesse.

Tabela 2. Eficiência de transformação pelo processo de biobalística considerando plantas transformadas e plantas confirmadas positivas em análises posteriores. *- Bombardeamento seguido pelo número do mesmo. Ex.: B1. Bombardeamento número 1. **- Porcentagem de plantas aclimatadas quando comparado ao total de embriões transformados. *** - Porcentagem de plantas positivas quando comparado ao total de plantas aclimatadas.

RESUMO

Atualmente a ocorrência de perdas na produção da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill no Brasil é decorrente, entre outros fatores, de doenças fúngicas. A engenharia genética é uma importante ferramenta para solucionar esses problemas, visto que possibilita a introdução de genes exógenos nas plantas, os quais favorecem a resposta de defesa destas a estresses envolvendo esses patógenos causadores de doenças. Dentre esses genes destaca-se o Gsl5, que atua no espessamento da parede celular das plantas. Com o objetivo de obter plantas transgênicas de soja cuja parede celular fosse mais espessa e retardasse o avanço do fungo, o gene Gsl5 foi utilizado para transformação de embriões de soja via biobalística. Foram bombardeados 1080 embriões e destas 357 plantas desenvolveram e foram analisadas pelo método da PCR, do Dot-Blot e do sequenciamento para assim se obter a taxa e a eficiência da transformação e para se obter a confirmação da inserção do gene na planta.

Palavras chave: *Glycine max* (L.) Merrill; doenças fúngicas; engenharia genética; retardar;

1. Introdução

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill]) é uma planta originária da China e pertencente à família Leguminosae. Planta herbácea, anual com ciclo de vida variando entre 75 e 200 dias, dependendo da cultivar (Embrapa Soja, 2017). É uma das principais culturas utilizadas no Brasil e no mundo. No cenário mundial, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja (Embrapa Soja, 2017) e seus grãos, farelos e óleo atendem ao mercado interno e a exportações. Diante do grande volume cultivado no país, a soja é constantemente ameaçada por diferentes tipos de patógenos. A importância e consequência econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra (Embrapa Soja, 2017).

O crescente aumento do número de doenças causadas por fungos, vírus, insetos e nematoides é devido a expansão da cultura da soja para novas áreas e também como consequência da monocultura. A doença de maior impacto atual é a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, que vem sendo detectada desde as safras de 2000/2001 e já está amplamente distribuída, pois seus esporos são facilmente disseminados pelo vento (Vencato, 2010). O fungo somente terá sucesso na infecção na planta hospedeira se ocorrerem a germinação de esporos, formação de apressório e penetração (Goellner et al. 2010). A doença se caracteriza pelo desfolhamento precoce das plantas impedindo-as de completar a formação dos grãos (Vencato, 2010), levando a perdas acentuadas na produtividade e afetando diretamente a rentabilidade do produtor e a economia do país. Devido à disseminada presença desta doença nas últimas safras, os gastos com o controle químico atingem valores altos, elevando o custo de produção da cultura (Yorinori e Lazzarotto, 2004).

O uso de variedades com resistência genética a patógenos é uma estratégia para proteger as plantações, sendo esta a forma mais eficaz e econômica de se obter o controle de doenças (Silva et al., 2008). Contudo, atualmente os programas de melhoramento não têm conseguido produzir variedades resistentes na mesma escala em que surgem novos patógenos (Priolli et al., 2002). Desta forma, o uso de ferramentas modernas da biologia molecular com o intuito de se obter variedades com resistência genética são uma forma de auxiliar e aumentar a agilidade do melhoramento clássico. A tecnologia da transgenia permite ao pesquisador introduzir genes de outros organismos ou espécies não relacionadas em plantas economicamente importantes.

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram uma variedade de mecanismos químicos e físicos para se proteger, sendo um deles a deposição de calose, a qual é um polímero (1,3)- β -glucano com ramificações (1,6)- β -glucano (Luna, 2011). deBary (1863) descobriu o espessamento da parede celular das plantas, chamado papila, em locais onde fungos haviam penetrado. Mangin (1895) relatou que esta papila era formada basicamente por calose. A calose funciona como uma barreira física eficaz, e tem a sua produção induzida nos locais de ataque do patógeno nos estágios iniciais da infecção, constitui-se de uma forma de defesa rápida a qual contribui para o aumento da imunidade da planta (Voigt, 2014). Esta barreira faz com que o patógeno penetre mais lentamente, permitindo que a planta hospedeira tenha tempo para desencadear defesas adicionais tais como a produção de fitoalexinas e uma resposta hipersensitiva (Brown et al., 1998). Ellinger (2013) demonstrou em seu experimento plantas de *Arabidopsis thaliana* super expressando o gene da calose, e com isso conferiu, nos estágios iniciais da infecção causada pelo fungo do míldio, resistência a penetração deste. Desta forma, através da transformação genética e a inserção deste gene na planta, espera-se que ocorra uma super expressão da calose e, conseqüentemente, um maior espessamento da parede celular dificultando e até inviabilizando a penetração do fungo da ferrugem asiática, *Phakopsora pachyrhizi*.

A inserção deste gene traria como consequência positiva a diminuição do uso de agrotóxicos, beneficiando não somente os produtores, reduzindo os custos de produção, mas também o consumidor final, colocando à sua disposição um alimento com menos resquícios de químicos e com preço mais acessível. Adicionalmente, a redução no uso de fungicidas diminuiria o impacto ambiental do cultivo da soja (Melchers e Stuiver, 2000).

Diante dos fatos relatados acima, o objetivo deste trabalho é desenvolver soja transgênica com uma elevada expressão do gene da calose, criando assim uma barreira física contra a penetração do fungo, e permitindo que a planta possa desencadear outros mecanismos de defesa.

2. Objetivo geral

Modificar geneticamente plantas de soja, inserindo um gene de calose, para torná-las resistentes a ferrugem asiática.

Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência da transformação por biobalística utilizando técnicas de biologia molecular e sequenciamento;
- Cultivo e desenvolvimento das plantas em ambiente controlado;
- Realização de bioensaios para descrição da possível resistência ao fungo;

3. Revisão Bibliográfica

3.1 A cultura da Soja

A soja é uma planta anual, herbácea, ereta, com caule ramificado, esverdeado e piloso, com folhas alternas e compostas por três folíolos. Planta autógama, ou seja, a autopolinização ocorre quando as flores se abrem, ou pouco antes (Shibles et al. 1975). O crescimento, desenvolvimento e rendimento desta cultura resultam da interação entre o potencial de rendimento de um cultivar, que é geneticamente determinado, e o ambiente. Quando ocorrem mudanças no ambiente, estas refletem no desenvolvimento da planta, de modo que altos rendimentos são obtidos quando as condições ambientais são favoráveis durante todos os estádios de desenvolvimento da soja (Herman, 1997).

A soja (*Glycine max* L.) é uma espécie originária da Ásia, onde vem sendo cultivada a centenas de anos. O cultivo expandiu-se pela China antiga até tornar-se base de alimentação da população. Foi em 1908 que a soja grão e seus derivados foram enviados a Europa e então passaram a receber atenção mundial. Atualmente é a oleaginosa mais cultivada no mundo, representando mais que 50% da produção (Aprosoja, 2017). O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de soja em grãos, farelo e óleo (Parra, 2006). O bom desempenho da soja brasileira está agregado ao desenvolvimento de tecnologias e a adequação dessas tecnologias às condições climáticas de cada região. Porém esta produtividade crescente é constantemente ameaçada por ataque de pragas e doenças, que varia de acordo com a região e as características edafoclimáticas das mesmas. Atualmente a cultura da soja no Brasil sofre com a ameaça de diversas doenças, entre elas está a ferrugem asiática, que é considerada a doença de maior severidade para a cultura no mundo.

3.2 Ferrugem Asiática da soja

A doença é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, e foi relatada pela primeira vez no Japão em 1902 (Bromfield e Hartwig, 1980). Foi descrita no Brasil, pela primeira vez, no final da safra 2000/01. Nesta safra, encontrava-se disseminada nas principais regiões produtoras, causando perdas na ordem de 112.000 toneladas ou US\$ 24,70 milhões (Yorinori, 2002). Os primeiros sintomas da doença iniciam nas folhas da parte inferior e se multiplicam até atingir o topo da planta. O período crítico da doença tem se mostrado na fase reprodutiva da cultura, a partir do florescimento, porém pode ocorrer já nos primeiros estádios de desenvolvimento. O sucesso da

infecção do patógeno depende da sequência de eventos determinada pela germinação de esporos, formação de apressório e penetração. Entre os fatores abióticos, a temperatura e o molhamento foliar exercem papel fundamental (Goellner et al. 2010).

3.2.3 Taxonomia do fungo

O fungo que causa a ferrugem asiática da soja pertence à classe Basidiomycetes, ordem Uredinales, Família Phakopsoraceae, gênero *Phakopsora* e espécie *pachyrhizi* (Sinclair & Hartman, 1999). Bauer et al. (2008) propõe para “classe” o enquadramento em Urediniomycetes.

3.2.4 Epidemiologia e sintomatologia

O sucesso da infecção pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* depende da deposição de uredósporos viáveis sobre a superfície das folhas, juntamente com um período de molhamento foliar contínuo de, no mínimo, seis horas e temperaturas variando de 15 a 28 graus Celsius. As condições ideais para que o processo de infecção ocorra encontram-se em torno de 12 horas de molhamento foliar com temperaturas entre 16 e 26,5 graus Celsius (Bonde et al. 1976).

A infecção se inicia quando os uredósporos germinam emitindo um tubo germinativo que cresce sobre a superfície da folha até que se forma um apressório, que é a estrutura que adere à superfície do hospedeiro e facilita a penetração do fungo. É um parasita obrigatório que penetra diretamente através da epiderme, diferindo-se de outras ferrugens, as quais penetram através dos estômatos (Herbário virtual de fitopatologia, 2017).

Os sintomas da ferrugem podem surgir em qualquer momento do ciclo de desenvolvimento da cultura (Azevedo et al., 2004). Inicialmente, os sintomas são caracterizados por manchas ou pontos cloróticos ou castanho-acinzentados que podem escurecer à medida que envelhecem e com o passar do tempo essas lesões aumentam de tamanho (Reis et al., 2006). Nessas manchas forma-se pústulas ou urédias que se abrem e expõe uma massa de esporos denominados uredósporos (Yorinori, 1977).

As urédias à medida que envelhecem adquirem uma coloração castanho-claro a castanho-escuro e é na extremidade dessas que se abrirá um pequeno poro por onde os esporos vão ser liberados (Reis et al., 2006). Estes esporos adquirem uma coloração bege; eles se acumulam nas urédias de onde serão dispersos pela ação do vento ou da chuva (Reis et al., 2006).

A ferrugem asiática da soja é uma doença que ataca severamente a planta e se medidas de controle não forem adotadas, o rápido amarelamento, bronzeamento e queda prematura das folhas, impedem a formação total dos grãos. Quanto mais precoce essa desfolha ocorrer, maiores os danos sobre o rendimento e qualidade de grãos. Se a desfolha ocorrer ainda no estágio vegetativo, pode ocorrer o aborto floral e a queda prematura de vagens, acarretando em grandes perdas na lavoura (Yorinori et al., 2002).

3.2.5 Medidas de controle

A obtenção de uma planta resistente tem se mostrado um grande desafio aos programas de melhoramento. O método, atual, de controle mais eficiente é o químico, utilizando fungicidas de ação preventiva e curativa. Cinco genes que condicionam resistência vertical foram relatados na literatura (Rpp1, Rpp2, Rpp3, Rpp4 e Rpp5), no entanto esta estabilidade não se mostra duradoura devido à grande variabilidade genética do patógeno fazendo com que esses genes apresentem uma baixa eficiência em campo (Koga et al., 2008).

O controle químico deve ser aliado ao manejo integrado da cultura e o planejamento deve ser iniciado antes da semeadura da soja, evitando assim gastos desnecessários tanto com o uso de fungicidas como com o de outros insumos. Técnicas devem ser adotadas para que esse manejo cultural e químico se torne eficiente: a semeadura de cultivares precoces e no início da época recomendada para cada região objetivando escapar de períodos de maior potencial de inóculo do fungo; evitar plantios adensados, pois dificultam que o fungicida atinja o terço inferior e médio das plantas; monitorar a lavoura desde o início do crescimento da soja, e ao primeiro sinal da doença, buscar orientação para a escolha correta da medida de controle ou do fungicida diante da situação; estar atento à tecnologia de aplicação empregada e seguir as orientações técnicas de aplicação. Seguindo as recomendações técnicas desde a identificação da doença no campo, escolha de fungicida, dose e o momento correto de aplicação, diminuir-se-á a incidência da doença e o prejuízo causado (Yorinori, 2004).

3.2.6 Doenças fúngicas: fontes de resistência

Segundo Punja (2001), as abordagens para aumentar a resistência de plantas a fungos podem ser divididas em 5 grupos:

- 1) Substâncias envolvidas na resposta hipersensitiva e em interações com fatores de virulência;
- 2) Substâncias que regulam a defesa da planta (peróxido de hidrogênio, etileno, ácido salicílico);

3) Proteínas diretamente tóxicas ao patógeno (quitinases e glicanases), proteínas antifúngicas (osmotinas), peptídeos antimicrobianos (lectinas), proteínas inativadoras de ribossomos e fitoalexinas;

4) Proteínas que destroem ou neutralizam um componente do fungo (lipases, ácido oxálico);

5) Proteínas que aumentem as defesas estruturais das plantas (liglina, calose);

Gostaríamos de ressaltar no presente trabalho a de número 5. As proteínas estruturais podem conferir resistência as plantas ou mesmo retardar o avanço do fungo quando infecta um determinado tecido vegetal, em especial a calose (GSL5), que confere um aumento da espessura da parede celular quando a planta está sob ataque do fungo. Tal observação foi relatada por Ellinger (2013), ao utilizar plantas de *Arabidopsis thaliana* geneticamente transformadas para super expressarem o gene da calose, gerando um aumento na parede celular conferindo resistência ao fungo do míldio (Família Peronosporaceae).

3.3 Calose

A calose é um homopolímero linear formado de B-1,3-glucano com ramificações B-1,6. Estudos bioquímicos indicam que a calose é sintetizada por uma classe de enzimas denominadas sintetizadores de calose. É produzida em estágios específicos de desenvolvimento das paredes celulares das plantas, possui papel importante na comunicação intercelular das plantas e tem múltiplas funções durante os diferentes estágios de desenvolvimento vegetal. Sintetizada pela influência de injúrias, calor, frio, metais pesados e vários patógenos (Chen e Kim, 2009).

3.3.1 Síntese e degradação de Calose

A síntese de calose é catalisada por um complexo de enzimas associadas com a membrana plasmática. Um componente chave deste complexo é uma subunidade catalítica denominada calose sintase (CalS) (Li et al. 2003). Outros componentes são a UDP-glicosil transferase (UGT1) e sintase da sacarose (SuSy). Esses componentes podem ser diferentes dependendo da localização subcelular e do tipo de enzima calose sintase. A degradação ocorre pelas enzimas β -glucanases, contudo esta via não é muito estudada (Ruan *et al.*, 2004).

3.3.2 Genes que codificam possíveis sintetizadores de calose

Richmond e Somerville (2000) identificaram 12 genes que são possíveis sintetizadores de calose na planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Chem e Kim (2009) contruíram a árvore filogenética desses genes, onde o nome de cada gene deriva de “glucan synthase-like” (Gsl) ou “callose synthase” (Cal). Dentre os genes encontrados por eles destaca-se o interesse particular pelo *Gsl5*, que confere defesa contra patógenos, a partir do espessamento da parede celular da planta (Ellinger, 2013).

3.3.3 Deposição de calose e a defesa contra patógenos

Deposição de calose nos tecidos é um dos primeiros eventos a ocorrer na planta para se defender contra patógenos. O acúmulo de calose, denominado papila, é criado rapidamente nos locais de penetração do patógeno (Li et al. 2012). Esta papila serve como uma barreira mecânica, formada no espaço entre a membrana plasmática e a parede celular, e além desta barreira outras substâncias também são encontradas no local como lipídios, pectina, toxinas antimicrobianas. O acúmulo de calose previne uma penetração rápida e profunda do patógeno nos tecidos; foi demonstrado que o gene *GSL5* tem um papel nesse acúmulo de calose quanto a resposta da planta para a penetração de fungos (Jacobs et al., 2003). Este gene foi o que esteve em questão no presente trabalho.

3.4 Transformação genética de plantas

A transformação genética consiste na transferência (introdução) de um ou vários genes em um organismo sem a necessidade de fecundação ou cruzamento. Estes genes podem ser provenientes de outras plantas, microrganismos ou animais e são responsáveis por características agrônomicas de interesse, como resistência ou tolerância a pragas e doenças, a herbicidas e a diferentes tipos de estresse (Brasileiro e Alencar, 1999).

Diversos métodos estão descritos atualmente para a introdução de genes em plantas, sendo agrupados em indiretos e diretos. A transferência indireta é aquela na qual utiliza-se um vetor, a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* ou *A. Rhizogenes*, para intermediar a transformação (Andrade, 2003). A transformação direta é baseada em métodos físicos ou químicos, neste caso a aceleração de partículas (biobalística).

Para a cultura da soja, os mais utilizados são a biobalística e a transformação utilizando *Agrobacterium tumefaciens* (Trick et al., 1997).

3.4.1 O sistema Biobalístico

O método de biobalística foi desenvolvido por Sanford em 1988 com o objetivo de introduzir material genético no genoma nuclear de vegetais. Essa técnica permite a transferência gênica estável e rápida para espécies de importância agrônômica. A metodologia consiste em acelerar micropartículas a altas velocidades (superiores a 1.500km/h) carregando o DNA adsorvido de modo que atravessem a parede celular e a membrana plasmática das células vegetais, de forma não letal, e que acabam alojando-se aleatoriamente nas organelas celulares. O DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular e assim pode ser integrado no genoma do organismo receptor (Aragão e Rech, 1998).

É uma técnica bastante versátil e pode ser utilizada para a transformação de diferentes tipos de tecidos e células, independentemente do genótipo, o que elimina incompatibilidades biológicas como é o caso do uso de *Agrobacterium tumefaciens* (Trick et al., 1997).

As micropartículas utilizadas podem ser de ouro, sendo mais uniformes e inertes biologicamente, ou tungstênio, precisam ter alta densidade, pouca reatividade química e para células vegetais ter diâmetro em torno de 0.2 a 1.5 μm (Aragão e Rech, 1998).

Com um acelerador de partículas que utiliza gás hélio sob pressão, o equipamento é simples de ser utilizado. As micropartículas são bombardeadas no tecido vegetal, porém apenas uma pequena fração da parte do vegetal será atingida e nem todas as áreas expressarão o gene introduzido, primeiramente devido ao fato de que o tiro se espalha por toda a área da placa utilizada e muitas vezes não atinge o tecido vegetal e segundo que, quando atinge o tecido vegetal, se alojam aleatoriamente na célula. Esta baixa eficiência torna necessário um método eficiente de seleção das plantas transformadas. O esquema deste processo de transformação é demonstrado na figura.

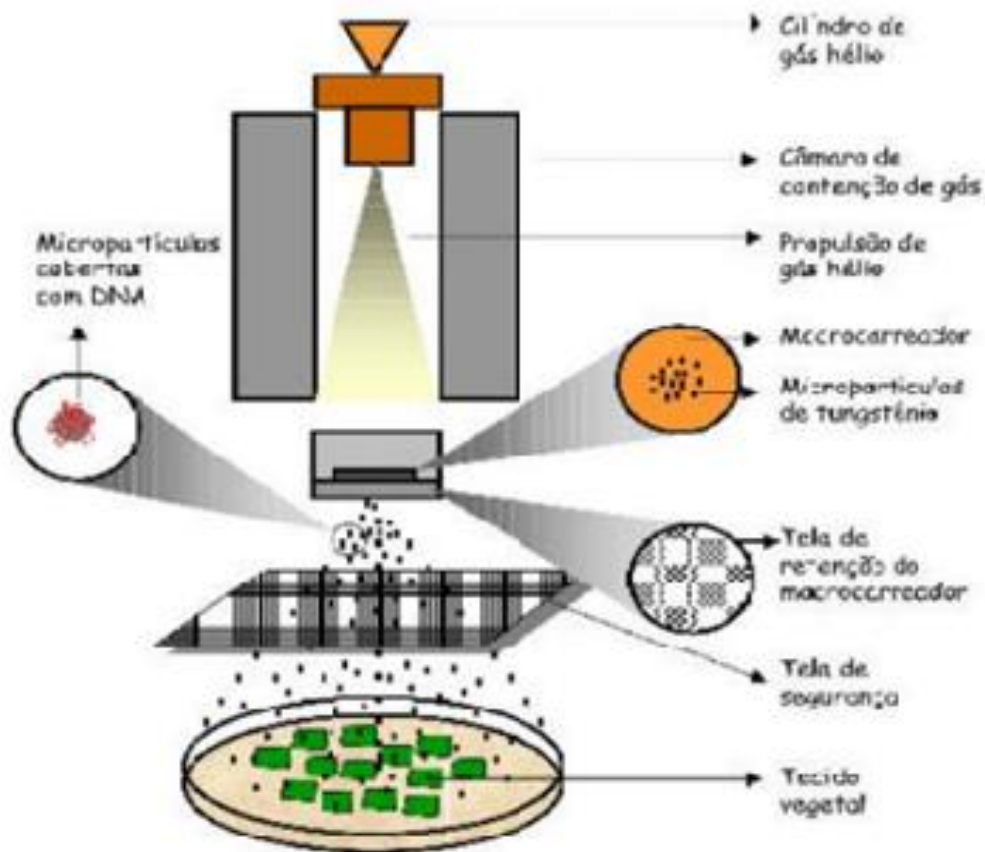


Figura 1. Esquema demonstrativo do processo de bombardeamento de genes através da biobalística. (Fonte: Carneiro et al., 2004).

3.4.2 Método de seleção: co-transformação

Devido a necessidade de um método eficiente de seleção é necessário utilizar na transformação, além do gene de interesse, também um gene marcador de seleção (gene repórter), o qual possibilita a identificação do material transformado. A co-transformação é o método mais utilizado e simples para este tipo de seleção (Bodanese-Zanettini e Pasquali, 2004).

A técnica de co-transformação permite que, com a inserção do gene de marcação, as plantas transformadas sejam selecionadas com mais facilidade (Scutt et al., 2002). Para genes em plasmídeos separados, a frequência da co-transformação é de 50% (Aragão e Brasileiro, 2002).

A recomendação é de que plantas transgênicas comercialmente utilizadas não possuam antibióticos (que seriam utilizados como gene repórter), então a segregação e a possibilidade de escolha dessas plantas é essencial. Esta preocupação vem da possibilidade de transferência horizontal do transgene marcador das células vegetais para bactérias patogênicas presentes no trato intestinal humano (Bodanese-Zanettini e Pasquali, 2004).

3.4.3 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos vegetais é realizada pela cultura asséptica *in vitro*, em recipientes de vidro, de células, tecidos e órgãos de plantas extraídos previamente de uma planta matriz. Com a criação de um ambiente artificial com fatores químicos (meio de cultura, com nutrientes e hormônios necessários para determinada espécie de planta) e fatores físicos (luz e temperatura) controlados, visando fornecer condições adequadas para o desenvolvimento da espécie em cultivo (Silva Neto e Andrade, 2011). Neste caso para o desenvolvimento de embriões de soja previamente transformados.

4. Metodologia

4.1 Local e condução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia Sintética da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada no Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte (final) Caixa Postal 02372 – Brasília, DF – CEP 70770-917.

4.2 Transformação genética de *Glycine Max*

O método de transformação genética utilizado foi o bombardeamento de partículas (biobalística). Foi utilizado gás hélio sob alta pressão e micropartículas de tungstênio envoltas por DNA, de acordo com o método patenteado pela Embrapa (Aragão e Rech., 1998), com pequenas modificações, descritas a seguir.

4.2.1 Preparo do material vegetal: sementes

As sementes de soja utilizadas foram BR-16 devidamente esterilizadas. Aproximadamente 300 sementes foram imersas em 300 mL de etanol 70% durante 1 minuto e transferidas para 300mL de hipoclorito de sódio a 1% durante 20 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas 4 vezes com água estéril e embebidas em água destilada por 16 horas, em temperatura ambiente. As sementes desempestadas foram retiradas da água, de 10-15 sementes por vez, e colocadas em uma placa de Petri estéril contendo papel filtro. Com o auxílio de uma pinça e um bisturi, cada semente teve seus cotilédones abertos e seu eixo embrionário retirado. Sob um microscópio estereoscópico (lupa) as folhas primárias destes embriões foram cortadas para expor a região meristemática a fim de ser bombardeada. Em seguida os embriões foram colocados em placa de Petri contendo água estéril para serem posicionados nas placas para bombardeio com as micropartículas revestidas de DNA.

Em fluxo laminar, os embriões foram secos em papel filtro estéril, sendo 15 embriões acomodados por vez em sulcos no meio de cultura em placas de Petri contendo 12 mL de meio de bombardeamento (sais MS, 30g/lL de sacarose, 8 g/L de phytigel, pH 5,7). Estes sulcos foram dispostos em forma de círculo no centro da placa, tendo a região meristemática dos embriões direcionada para cima e para o centro. O bombardeamento foi realizado com partículas de tungstênio.

4.2.2 Preparo das partículas de tungstênio e precipitação do DNA sobre as micropartículas e colocação nas membranas para bombardeio

Este procedimento foi realizado pesando-se 60mg de micropartículas de tungstênio M10, colocadas em tudo de micro centrifuga de 1.5mL e adicionados 1mL de etanol 70%. As partículas foram mantidas em agitador por 15 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 3.000 g durante 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 1mL de água estéril, colocadas em agitador por 15 minutos e em centrifugadas a 3.000g durante 5 minutos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Na última lavagem, a água estéril foi descartada e as micropartículas foram ressuspensas em 1mL de glicerol 50%.

Para ocorrer a precipitação do DNA sobre as micropartículas, foi realizada agitação durante 30 segundos e transferência para alíquotas de 50ul em tubos de microcentrifuga. Foram adicionados 5uL de DNA plasmidial (1ug/uL) em uma alíquota de 50ul de partículas e imediatamente adicionado 50ul de CaCl₂ a 2.5M e homogeneizado, em sequência foi adicionado 20ul de espermidina 0.1 M e homogeneizado. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente, sob agitação lenta por 10 minutos. Em seguida foram centrifugados por 10 segundos a 3.000 g e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 150mL de etanol absoluto e homogeneizado. Foi realizada centrifugação a 3.000g por 10 segundos, e este processo foi repetido uma vez. Por fim foram adicionados 24ul de etanol absoluto por amostra e submetidos a ultrassom por 3 segundos.

Estas amostras contendo 24ul de reação foram distribuídas na região central de cada membrana transportadora, 6ul por membrana. As membranas foram previamente posicionadas sobre seus devidos suportes, os discos das membranas. Estes discos foram transferidos para placas de Petri contendo gel de sílica e colocados no dessecador por 5 minutos, após este tempo estavam prontos para serem utilizados.

4.2.3 Preparação e desenvolvimento do DNA: vetor para transformação

O vetor utilizado para as transformações genéticas em embriões de soja foi o pCAMBIA-35S-AtGSL5-GFP, Ellinger, 2013, sem modificações. O vetor foi enviado para sequenciamento pela a empresa Macrogen (Coréia do Sul) para checagem da sequência. O vetor foi multiplicado utilizando células competentes DH5a de *E. coli*, extraído das mesmas com o auxílio do kit da Qiagen (Hilden, Alemanha) Plasmid Maxi Kit 25, conforme especificações do fabricante. O vetor possui 15.056 pares de base, onde o fragmento de interesse consiste em um promotor constitutivo (CaMV35S) dirigindo o gene da calose fusionado ao EGFP e um terminador, como mostra a figura 3.

O outro vetor utilizado para a co-transformação continha o gene de seleção *Ahas*, o qual possui uma mutação em sua sequência codificadora a qual confere resistência específica aos herbicidas da classe das imidazolinonas (Sathasivan et al., 1990), que inclui o imazapyr.

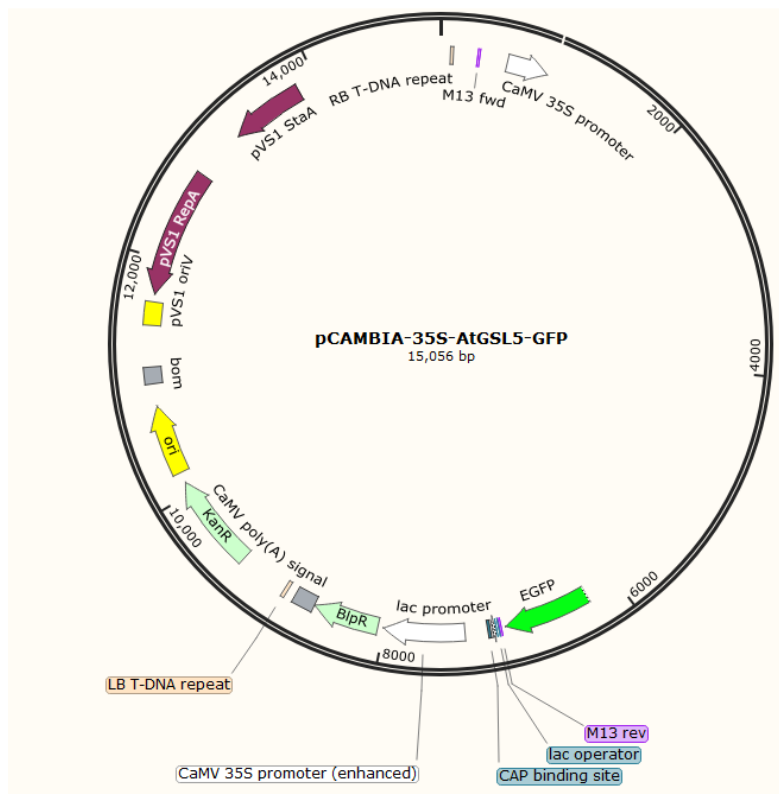


Figura 2. Representação esquemática do vetor pCAMBIA-35S-AtGSL5-GFP. O gene da calose está localizado entre o promotor constitutivo CaMV35S e o gene repórter GFP.

4. 2.4 Bombardeamento

Após a disposição dos embriões nas placas de Petri e a preparação dos discos das membranas, ambos foram inseridos no acelerador de partículas por hélio a alta pressão (Figura 4). A pressão do vácuo utilizada foi de 27 polegadas de Hg e a pressão do gás hélio de 1200 psi. A pressão aplicada faz com que a membrana contendo o DNA seja direcionada para as placas de Petri contendo os embriões, a tela de proteção não permite que a membrana passe e assim somente o DNA é “atirado” sobre os embriões, resultando na transformação genética.

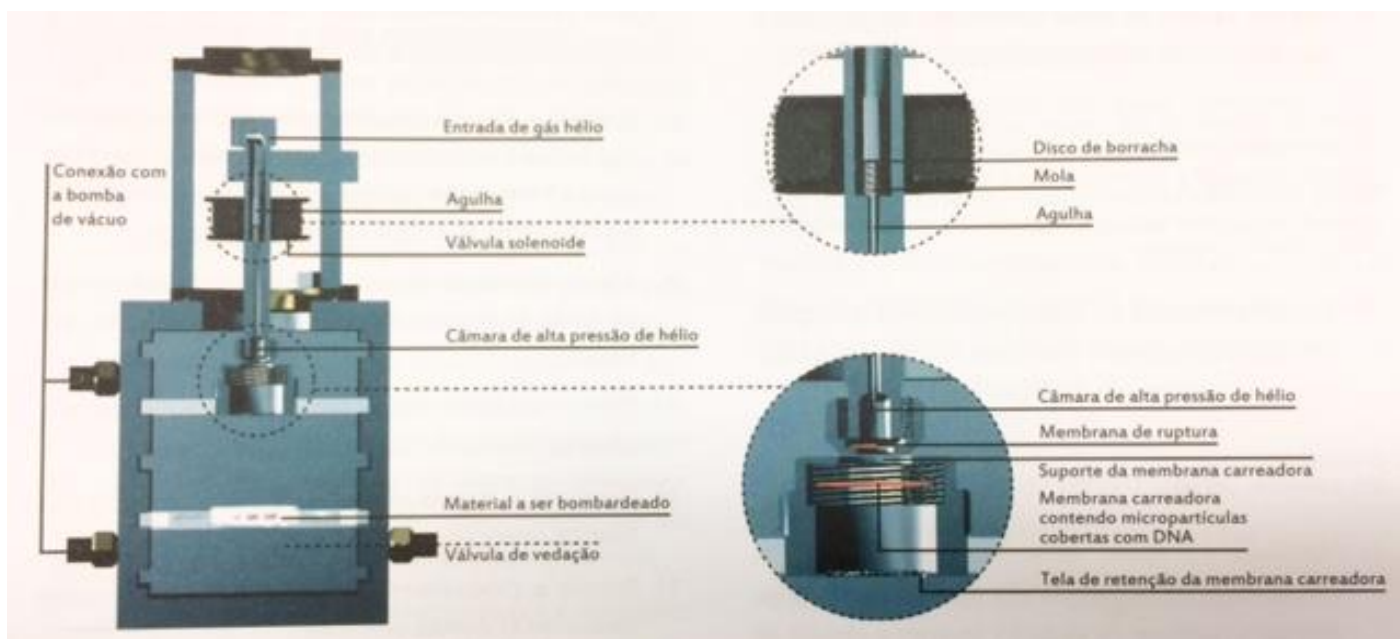


Figura 3. Acelerador de partículas. (Fonte: Rech e Aragão 1998).

4.3 Cultivo e análise das plantas transformadas

4.3.1 Cultivo das plantas pós-transformadas

Após a transformação, os embriões foram mantidos por 24 horas nas placas de Petri contendo meio de bombardeamento. Em seguida foram transferidas para recipientes contendo meio de crescimento e seleção o qual, contém, além dos nutrientes necessários para o desenvolvimento dos embriões, BAP (22,2 μ M de benzilaminopurina (BAP) para o enraizamento e *imazapyr* (na concentração final de 500 η M), um herbicida o qual um dos vetores transformados contém um gene de resistência para seleção das plantas transformadas. Estas células são totipotentes, no que se refere ao seu potencial de regenerarem um organismo inteiro com os estímulos apropriados.

4.3.2 Aclimação das plântulas transformadas

Com aproximadamente 30 dias, as plântulas bem desenvolvidas e confirmadas como positivas após análises: extração de DNA genômico, PCR, Dot-Blot e sequenciamento; foram transplantadas para a casa de vegetação em copos plásticos contendo substrato de terra e vermiculita (1/2:1), e cobertas com sacos plásticos. Após o terceiro dia foram feitos cortes no saco plástico possibilitando maior entrada de ar. Após uma semana os sacos plásticos foram retirados. Aos 60 dias foram transplantadas para vasos maiores contendo substrato de terra.

4.3.3 Extração de DNA genômico

A extração de DNA foi feita, das plantas aclimatadas após aproximadamente 30 dias, de acordo com Manual de transformação genética de plantas (2015), com pequenas modificações. Brevemente, foram macerados 20-40mg de tecido da folha fresco em um tubo de microcentrifuga de 1.5ml utilizando um pistilo de vidro; em seguida foram adicionados 200ul de CTAB e as amostras foram incubadas em banho seco por 20 minutos a 65 graus Celsius. Foram adicionados 200ul de clorofil e as amostras foram colocadas no agitador por 3 minutos. Em seguida foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo. Um volume de isopropanol, aproximadamente 150ul, foi adicionado ao sobrenadante e centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e 200ul de etanol 70% foram adicionados ao *pellet*. Foi realizada nova centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. O etanol foi descartado deixando o *pellet* para secar por aproximadamente 10 minutos e, por fim, o mesmo foi ressuspenso em 30ul de água milli-Q autoclavada. Anexo 2.

4.3.4 PCR – Reação em cadeia da polimerase

A PCR (1x) foi composta por: tampão de PCR com magnésio (10x, Sigma-Aldrich St Louis, MO, EUA, P2192-1VL), DNTP's (10mM), *primers* para a identificação do transgene (*Primer Forward* – 5' TCCAGTCAATGCAAACGAGGA 3', *Primer Reverse* – 5' GTCTTGTAGTTGCCGTCGTC 3', a 10mM), *taq* polimerase (Sigma-Aldrich St Louis, MO, EUA, D1806) e água milli-Q autoclavada. Este primer foi desenvolvido de modo que identificasse,

no vetor de transformação, uma parte do gene codificador da calose e o início do gene repórter GFP; este continha 430 pares de bases. O DNA foi utilizado em concentração de 10ng. O volume final da PCR foi de 25ul. As condições da PCR foram: 95 graus Celsius por 5 minutos, 38 ciclos de 95 graus por 30 segundos, 54 graus por 30 segundos, 72 graus por 1 minuto, e ao final 72 graus por 5 minutos. O fragmento esperado era de 430 pares de bases. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em um tampão TAE 1x e em gel de agarose 1% com brometo de etídio (0.5 µg mL) e visualizados com luz ultravioleta em aparelho de foto documentação (Bio-Rad).

4.3.5 Dot-Blot

O dot-blot foi realizado com as amostras nas concentrações como mostra a tabela 1.

Tabela 1. Concentrações e quantidades para o preparo das amostras e em sequência para a utilização da técnica dot-blot para identificação do gene de interesse.

Amostras (ng)	Concentração[ng/ul]	Para 1 micro-grama (ul)	Água estéril (ul)	SSC 20x (ul)
D15	936,5	1,1	13,9	7,5
H4	187,3	5,3	9,7	7,5
155	277,5	3,6	11,4	7,5
40	494,9	2,0	13,0	7,5
24	325,9	3,1	11,9	7,5
152	268,4	3,7	11,3	7,5
37	320,0	3,1	11,9	7,5
Vetor (positivo)	10	1	14	7,5

As amostras foram preparadas, conforme as quantidades da tabela acima, e em seguida o DNA foi desnaturado por 5 minutos a 100 graus Celsius e colocado no gelo por 5 minutos. As amostras foram aplicadas na membrana manualmente e secou à temperatura ambiente. O DNA foi fixado com UV utilizando o UV Stratalinker 1800 no programa “auto cross link”. Depois de fixado, submetido a pré-hibridização com a solução Ultrahyb da Ambion (10 mL) e incubado a 42 graus Celsius por 4 horas. Durante a pré-hibridização foi produzida a sonda GFP que foi utilizada para hibridizar com o DNA na membrana. No preparo da sonda GFP utilizou-se 0.5 microlitros de fragmento amplificado de PCR contendo o gene GFP na concentração de 42 nanogramas e 44.5 microlitros de água estéril. Ferveu-se por 5 minutos e em seguida foi colocado por mais 5 minutos no gelo, por fim foi adicionado ao tubo de reação. Adicionou-se alfa32p-dctp e incubou-se a reação

por 30 minutos a 37 graus Celsius. Novamente a reação foi colocada por 5 minutos a 100 graus Celsius, e em seguida 5 minutos no gelo, com isso obteve-se a sonda GFP. Em sequência, adicionou-se a solução de pré-hibridização ao tubo de reação contendo a sonda, este foi mantido a 42 graus Celsius por 12 horas.

Após o DNA ter sido hibridizado e fixado na membrana, adicionou-se a sonda a esta membrana que continha o DNA e foi deixado para secar naturalmente a temperatura ambiente por aproximadamente 4 horas. A sonda interagiu com o DNA e após a membrana seca foram realizadas 2 lavagens com SSC 2x por 10 minutos cada; 1 lavagem com SSC 1x e incubação a 42 graus Celsius por 15 minutos, por fim 1 lavagem com SSC 0.1x e novamente incubação por 42 graus Celsius por 15 minutos. Após lavada a membrana foi colocada em um cassete da Amersham LIFE SCIENCE durante 6 horas e em seguida foi colocada no equipamento FLA-3000 da Fujifilm de onde foram obtidas as imagens para posterior análise.

4.3.6 Sequenciamento

A análise da sequência dos fragmentos obtidos foi realizada conforme descrito a seguir. Primeiramente o produto obtido após a PCR foi utilizado para realizar uma ligação no vetor pGEM T-*easy* (Promega), utilizando o kit pGem T-*easy vector systems* (Promega) com a seguinte reação: 2x Ligation buffer – 5ul; vetor pGem (50ng) – 1ul; produto da PCR (25ng) – 1ul; T4 ligase DNA – 1ul; água milli-Q estéril – 2ul, totalizando 10ul de reação. A ligação foi colocada a 4 graus Celsius durante 16 horas. Com a ligação terminada a reação foi utilizada para transformar células competentes de bactéria, DH5-alfa pelo método de choque térmico. De forma breve, *ependorfs* com células competentes foram retirados de refrigeração a -80°C e mantidos por 10 minutos em gelo; o DNA plasmidial foi adicionado (1ul - cerca de 20 ng) às células e em seguida estas foram incubadas em gelo por 30 minutos. As amostras foram transferidas para um banho a 42°C durante exatamente 45 segundos e colocadas em gelo por 2 a 5 minutos. Foram adicionados 500 µL de meio de crescimento das bactérias, LB. Os tubos contendo as células transformadas foram transferidos para uma estufa 37°C por 50 minutos sob agitação de 180 rpm. Por fim foram distribuídos 100ul da reação em placas de petri contendo antibiótico de seleção (10 ul de ampicilina) e meio de cultura, LB. Estas placas foram mantidas em estufa a 37°C por 16 horas. Na sequência, as colônias bacterianas que cresceram foram coletadas foi extraído o DNA utilizando o kit e protocolo da QIAGEN Spin Miniprep Kit (250) (Hilden, Alemanha), segundo especificações do fabricante.

Foi realizada nova PCR utilizando o DNA extraído das células bacterianas com as mesmas condições descritas anteriormente. As amostras de DNA foram enviadas a empresa Macrogen, sede na Coréia do Sul, a qual realizou o sequenciamento.

5. Resultados e Discussão

Após a transformação genética pela técnica da biobalística ter sido realizada, durante a fase de cultura de tecidos, os embriões que se regeneraram em meio de cultivo, contendo o herbicida *imazapyr* e meio de enraizamento, foram posteriormente aclimatados em casa de vegetação. Após a aclimação, foram realizadas reações de amplificação, PCR, seguidas de análises por Dot-Blot e finalizando com análises de sequenciamento.

O desenvolvimento inicial das plantas em meio de cultura perdurou por aproximadamente 30 dias e em seguida plantas transformadas, que se mostraram resistentes ao meio de seleção contendo o herbicida *imazapyr*, foram aclimatadas em casa de vegetação para posteriores análises. O número total de embriões bombardeados e analisados foi de 1080, deste total 357 plantas regeneraram e desenvolveram no meio de seleção, estas foram às utilizadas para posteriores análises.

A eficiência do processo foi avaliada sob duas óticas, como descreve a tabela 2. Plantas mortas no processo de seleção ainda em meio de cultura foram descartadas.

Tabela 2. Eficiência de transformação pelo processo de biobalística considerando plantas transformadas e plantas confirmadas positivas em análises posteriores. *- Bombardeamento seguido pelo número do mesmo. Ex.: B1. Bombardeamento número 1. **- Porcentagem de plantas aclimatadas quando comparado ao total de embriões transformados. *** - Porcentagem de plantas positivas quando comparado ao total de plantas aclimatadas.

Amostras	B1*	B2*	B3*	B4*	B5*	B6*
Plantas mortas em meio de seleção	171	55	134	118	121	109
Plantas aclimatadas em casa de vegetação - transformadas	9	119	43	61	55	70
Plantas confirmadas positivas por testes moleculares	0	6	3	1	4	1
Total de embriões transformados	180	180	180	180	180	180
Eficiência considerando o total embriões transformados **	5 %	66 %	24 %	33 %	30 %	39 %
Eficiência do processo considerando as plantas aclimatadas ***	0 %	5%	7%	2 %	7 %	1.4 %

As plantas aclimatadas representam as quais foram transformadas e incorporaram o vetor AHAS que confere resistência ao herbicida e permite o desenvolvimento das plantas em meio de cultura. Por fim as plantas confirmadas positivas por testes moleculares continham os dois vetores, AHAS e o vetor contendo o gene de interesse.

No presente trabalho, quando se consideram as porcentagens de plantas aclimatadas (n=357), em relação ao total de embriões transformados (n=1080), obteve-se um resultado bem elevado com uma taxa de 34% de eficiência na transformação, mostrando que a técnica foi eficiente, bem executada e está de acordo com valores encontrados na literatura. De forma similar, Li et al. (2004) obteve um resultado de 50% de taxa de co-transformação, utilizando técnica semelhante à do presente estudo. Em seu trabalho, Droste et al. (2002) obtiveram uma taxa de transformação de 36 %, e Wiebke et al. (2006), obtiveram uma taxa de transformação de 12%, mas neste estudo foi utilizado um sistema integrado de Biobalística-*Agrobacterium*.

Quando analisadas as plantas aclimatadas (n=357), em relação às plantas positivas confirmadas com o uso de técnicas moleculares (n=15), é possível observar uma eficiência de aproximadamente 4%. Esta baixa taxa de conversão das plantas aclimatadas em plantas positivas mostra a baixa eficiência das técnicas atuais de transformação (Pôssa, 2010). Possíveis explicações para esta baixa taxa de conversão são: a fragmentação do vetor contendo o gene de interesse devido

à alta pressão e velocidade do processo e o não desprendimento entre o material genético e as partículas utilizadas (partículas de tungstênio), não ocorrendo assim a introdução do DNA no genoma da planta.

A identificação das plantas positivas foi realizada por PCR, utilizando primers específicos, desenhados para a região terminal do gene da calose indo até a região inicial do gene repórter GFP, dando um total de 430 pares de bases de extensão. A identificação dos fragmentos foi realizada por eletroforese (Figura 6). A não detecção dos fragmentos sugere que as plantas não foram transformadas. Anexo 1.

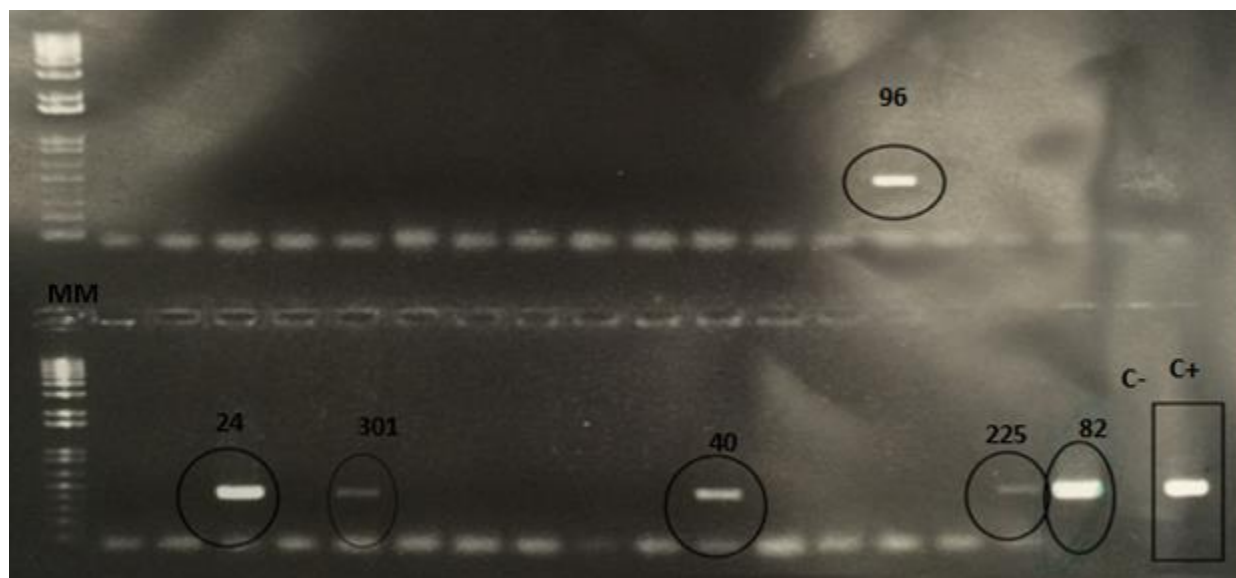


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose (1%) para identificação dos fragmentos após PCR. As bandas circuladas são plantas identificadas como positivas e a banda dentro do quadrado é a indicação do controle positivo. *MM – marcador de peso molecular – 1kB Plus DNA ladder (Thermo Fischer, Massachusetts, EUA).

A re-confirmação da transformação foi realizada pela técnica de Dot-Blot com uma sonda específica para a região terminal da calose e inicial do GFP (Figura 7). Os pontos pretos representam locais onde a sonda se ligou e ocorreu a identificação do fragmento de interesse, no local onde não apareceu nada demonstra a não identificação do fragmento desejado, neste caso, o controle negativo.

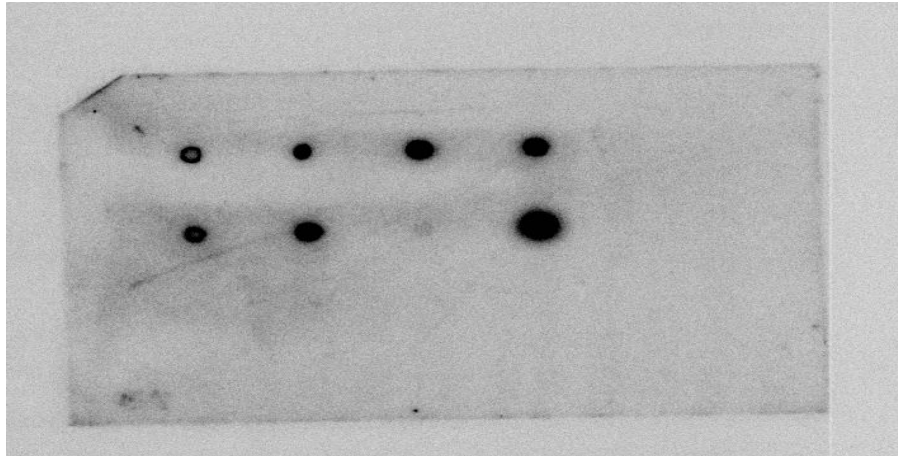


Figura 5. Análise de Dot-Blot para detectar o gene *Gsl5* codificador da calose. Do canto superior esquerdo 1 - D15; 2 - H4; 3 - 155; 4 - 40; 5 - 24; 6 - 152; 7- 37 (controle negativo); 8 - Vetor (Controle positivo na concentração de 10 ng).

Para se ter a concretização da confirmação das plantas transformadas foi realizado o sequenciamento do fragmento desejado. Após nova extração do DNA das plantas positivas, foi realizada uma PCR, o produto obtido foi ligado ao vetor pGem T-Easy e transformado em células de *E. Coli* DH5-alfa. Após as células terem multiplicado em meio de cultivo, o DNA foi extraído e enviado para sequenciamento (Macrogen, Coréia do Sul). O resultado obtido confirmou os resultados anteriores, como pode ser observado na figura 6.

pCAMBIA-35S-AtGSL5-GFP ResultadoSequenciamento	actcataatggttccagtagcgttcttgtcatggatgcctggattccagtcaatgcaaac -----TCCAGTCAATGCAAAC *****
pCAMBIA-35S-AtGSL5-GFP ResultadoSequenciamento	gaggatattattcaatgaagcttttagcagaggacttcgcatcatgcagattgtcactgg GAGGATATTATTCAATGAAGCTTTTAGCAGAGGACTTCGCATCATGCAGATTGTCACTGG *****
pCAMBIA-35S-AtGSL5-GFP ResultadoSequenciamento	gaagaaatcaaaaggcgatgtcgcggccgcggtgagcaagggcgaggagctgttcaccgg GAAGAAATCAAAAGGCGATGTCGCGGCCGCGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAACGG *****
pCAMBIA-35S-AtGSL5-GFP ResultadoSequenciamento	ggtggtgccccatcctggtcgcagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtc GGTGGTGCCCATCCTGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTG *****
pCAMBIA-35S-AtGSL5-GFP ResultadoSequenciamento	cggcgagggcgaggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatttgaccac CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAC *****
pCAMBIA-35S-AtGSL5-GFP ResultadoSequenciamento	cggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccttcacctacggcgtgcagtg CGGCAAGCTGCCGTGCGCTGGCCACCTCGTGACCACCTTCACTACGGCGTGCAAGTG *****
pCAMBIA-35S-AtGSL5-GFP ResultadoSequenciamento	cttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcagcactttttcaagtcgccatgcccga CTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGA *****
pCAMBIA-35S-AtGSL5-GFP ResultadoSequenciamento	aggctacgtccaggagcgcaccatnttnttcaaggacgacggcaactacaagacccgcgc AGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGAC----- *****

Figura 6. Representação do alinhamento utilizando o programa *Clustal Omega, Multiple Sequence Alignment*, EMBL-EBI, da sequência obtida do resultado do sequenciamento com a sequência do vetor utilizado para as transformações genéticas. Os locais indicados por asteriscos representam a compatibilidade das sequências.

Após o sequenciamento foi possível observar que as sequências eram compatíveis e havia somente a presença de mutações pontuais dentro do fragmento sequenciado, formado por 430 pares de bases, as quais acreditamos não serem prejudiciais ao processamento da proteína (locais sem asterisco são pontos de discordância entre as sequências).

Apenas um bioensaio foi realizado. Em uma placa de petri de vidro, foram colocadas uma folha de planta não transformada e uma folha de uma das plantas identificadas como positiva, e inoculadas com esporos do fungo causador da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*.

O resultado deste ensaio foi inconclusivo visto que ambas as folhas foram infectadas pelo fungo impossibilitando de quantificar o dano causado.

Devido a problemas na casa de vegetação com a aplicação de produtos químicos, 13 das 15 plantas, confirmadas nos três métodos descritos acima, morreram. Quanto às duas que sobraram, uma gerou uma única semente e a outro gerou duas sementes, totalizando um total de 3 sementes obtidas das plantas confirmadas positivas, estas sementes foram plantadas e neste momento estão crescendo para futuras análises.

6. Conclusão

Com o presente trabalho pode-se concluir que as técnicas para transformação genética de plantas disponíveis atualmente ainda não alcançaram sua máxima eficiência, havendo necessidade do desenvolvimento de novas alternativas e/ou aprimoramento das existentes. Foi possível concluir também que o gene da calose foi inserido na planta de soja com sucesso, obtendo-se plantas positivas e confirmando-as por meio de técnicas moleculares utilizadas. Contudo, a

realização de bioensaios não foi bem-sucedida, o que impossibilitou uma conclusão concreta sobre a possível resistência da planta de soja ao fungo da ferrugem asiática, necessitando de mais análises das plantas confirmadas e também de sua progênie.

A realização de trabalhos, como o descrito nesta dissertação é de extrema importância visto que, o fungo causador da ferrugem asiática em soja é uma das doenças mais incidentes nesta cultura na atualidade, causando perdas devastadoras aos produtores. O alcance de uma possível resistência é de extrema importância para reduzir prejuízos econômicos aos produtores e também prejuízos ambientais devido ao elevado número de fungicidas utilizados para a prevenção a esta doença.

7. Referências bibliográficas

Andrade, S.R.M. Transformação de plantas. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 28p

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

Aragão, F. J. L.; Vianna, G. R.; Rech, E. L. Feijão Transgênico: Um produto da engenharia genética. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. Brasília-DF: v. 5, p. 48-51, 1998.

Associação dos produtores de soja do Mato Grosso. A soja no mundo. Cuiabá. Disponível em: <<http://www.aprosoja.com.br/site/canal/viewCanal.htm>>. Acesso em: 6 Jun. 2017

Azevedo, L. A. S., Juliatti, F. C., Balardin, R. S.; Silva, O. C. Programa Syntinela: Monitoramento da dispersão de *Phakopsora pachyrhizi* e alerta contra a ferrugem asiática da soja. Campinas, EmopiGráfica e Editora, 2004.

Bauer, R.; Dominik, B.; Oberwinkler, F. *Ustilaginomycotina*, 2008. Disponível em: <<http://tolweb.org/Ustilaginomycotina/20530>>. Acesso em: 07 Jun. 2017

Bodanese-Zanettini, M. H.; Pasquali, G. Plantas transgênicas. In: Mir L. (ed) *Genôminca*. Primeira edição. Atheneu, São Paulo, 721-736. 2004.

Bonde, M. R.; Melching, J. S.; Bromfield, K. R. Histology of the susceptible-pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi*, the case of soybean rust. *Phytopathology*, v. 66, n. 11, p. 1290-1294, 1976

Brasileiro, A. C. M., Carneiro, V. T. C., Manual de transformação genética de plantas – segunda edição rev. Ampl. – Brasília, DF: Embrapa, 2015. 453p.

Brasileiro, A. C. M.; Alencar, D. M. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília-DF: Ed Embrapa-SPI, v. 2, p. 679-736, 1999.

Bromfield Kr, Hartwig Ee, 1980. Resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) and mode of inheritance. *Crop Science* 20: 254-255

Brown I, Trethowan J, Kerry M, Mansfield J, Bolwell GP (1998) Localization of components of the oxidative crosslinking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *Plant J* 15: 333–343

Carneiro, A. A.; Carneiro, N. P.; Paiva, E. Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas. Sete Lagoas- MG: Embrapa milho e sorgo, nº 32, 42p., 2004

Chen XY, Kim JY (2009) Callose synthesis in higher plants. *Plant Signal Behav* 4:489–492

deBary A (1863) Recherchessur le développement de quelques champignons parasites. *Ann Sci Nat Bot Biol Veg* 20: 5–148

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.

Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., et al. (2013). Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in *Arabidopsis*. *PlantPhysiol.* 161, 1433–1444. doi: 10.1104/pp.112.211011

Embrapa. A soja no Brasil. Londrina. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br>>. Acessoem: 07 Jun. 2017d.

Goellner, K. et al. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of asian soybean rust. *Molecular Plant Pathology*, Sant Paul, v. 11, n. 2, p. 169- 77, 2010.

Herbario virtual de fitopatologia .Ferrugem Asiática. Disponível em: <<http://www.ufpel.tche.br/faem/dfs/herbario/sobre.php>>. Acesso em: 05 Jun 2017.

Herman, J.C. (Ed.) Como a planta de soja se desenvolve.Tradução de G.M. de Souza Câmara.Piraciaba: Potafós, 1997. 22p. (Special Report, 53).

Jacobs AK, Lipka V, Burton RA, Panstruga R, Strizhov N, Schulze- Lefert P, Fincher GB (2003) An *Arabidopsis* callose synthase, *GSL5*, is required for wound and papillary callose formation. *Plant Cell* 15:2503–2513

Joly, A.B.; Leitão Filho, H.F. Botânica econômica: principais culturas brasileiras. São Paulo: HUCITEC-EDUSP, 1979, 114pgs

Koga, L. J.; Canteri, M. C.; Calvo, E. S.; Unfried, J. R.; Garcia, A.; Harada, A.; Kiihl, R. A. S. Análise multivariada dos componentes da resistência à ferrugem-asiática em genótipos de soja. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1277-1286, out. 2008.

Li J, Burton RA, Harvey AJ, Hrmova M, Wardak AZ, Stone BA, Fincher GB (2003) Biochemical evidence linking a putative callose synthase gene with (1 → 3)-b-D-glucan biosynthesis in barley. Plant Mol Biol 53:213–225

Li, H.Y., Y.M. Zhu, Q. Chen, R.L. Conner, X.D. Ding, J. Li & B.B. Zhang, 2004. Production of transgenic soybean plants with two anti-fungal protein genes via *Agrobacterium* and particle bombardment. Biol Plant 48: 367–374

LiW, ZhaoY, LiuC, YaoG, WuS, HouC, ZhangM, Wang D (2012) Callose deposition at plasmodesmata is a critical factor in restricting the cell-to-cell movement of Soybean mosaic virus. Plant Cell Rep 31:905–916

Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J (2011) Callose deposition: a multifaceted plant defense response. Mol Plant Microbe Interact 24: 183–193

Mangin L (1895) Recherchessur les Péronosporées. Bull SocHist Nat Autun 8: 55–108

Melchers, L.S. and Stuvier, M.H. Novel genes for disease-resistance breeding. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, vol. 3, no. 2, p. 147-152.

Parra, J.R.P. Editorial. Visão Agrícola: soja. Piracicaba, v.5, p.60-62, jan. 2006

Possa, K. F. Superexpressão em plantas transgênicas de milho do gene SbMATE, que confere tolerância ao alumínio em sorgo. Lavras-MG, 2010. Dissertação de tese de mestrado no Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras.

Priolli, R. H. G.; Mendes-Junior, C. T.; Arantes, N. E.; Contel, E. P. B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. *Genetic and Molecular Biology*, v. 25, n. 2, p. 185-193, 2002.

Punja, Z. K. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a review of process and future prospects. *Can J. Plant Pathol.* 23: 216-235. 2001.

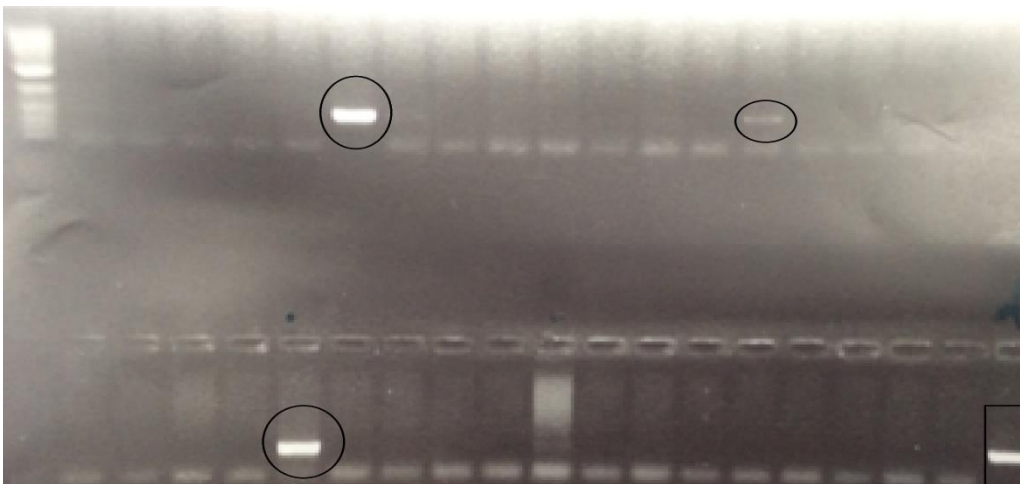
Reis, E.M.; Blum, M.M.C.; Camara, R.K. Escala diagramática para estimar a severidade da ferrugem da soja. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.31, 10 p., 2006.

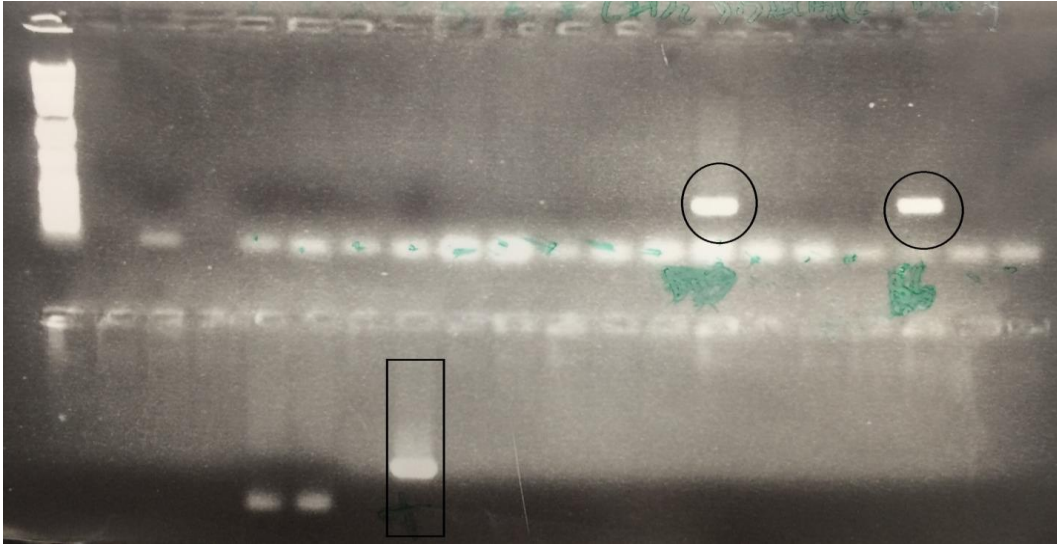
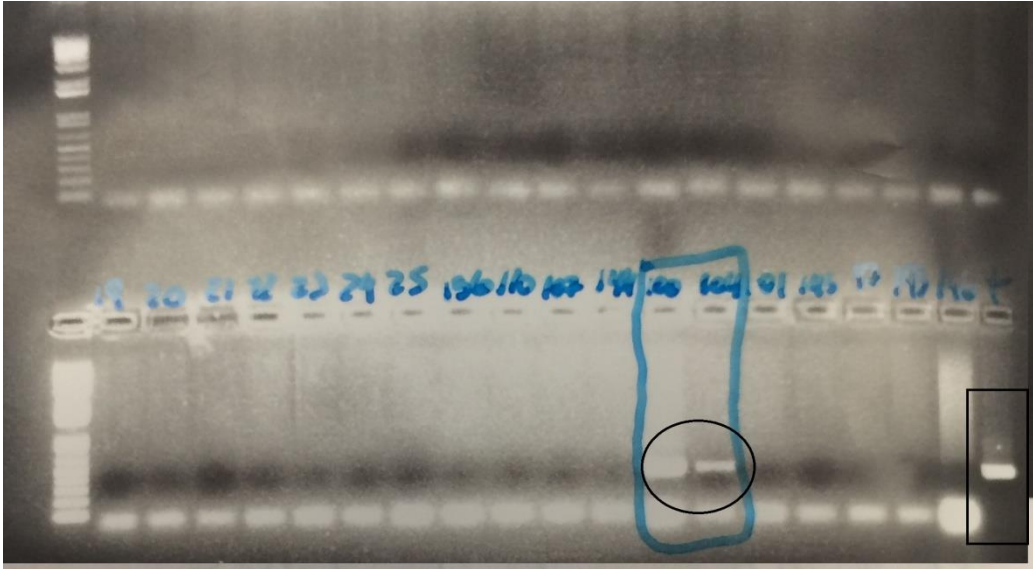
Richmond TA, Somerville CR (2000) The cellulose synthase superfamily. *Plant Physiol* 124:495–498

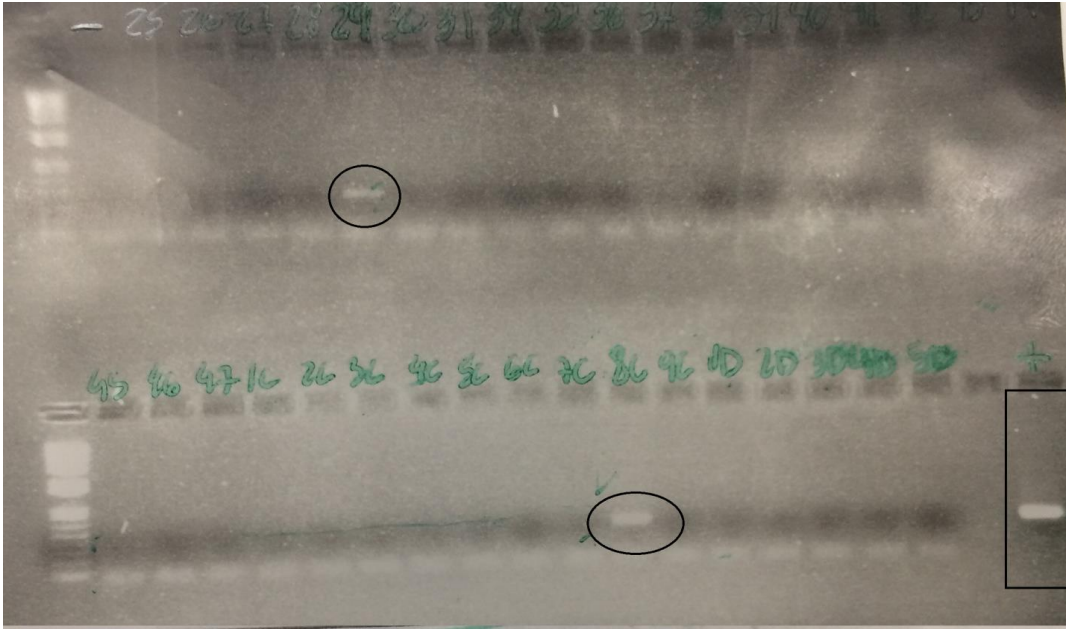
Ruan YL, Xu SM, White R, Furbank RT (2004) Genotypic and developmental evidence for the role of plasmodesmatal regulation in cotton fiber elongation mediated by callose turnover. *Plant Physiol* 136:4104–4113

- Sanford, J. C.; The biolistic process. *Trends in Biotechnology* 6: 299-302. 1998.
- Scutt, C., P.; Zubko E.; Meyer P., Techniques for the removal of marker genes from transgenic plants. *Biochimie* 84: 119-126. 2002.
- Shibles, R. et al. Soybean. In: Evans, L.T. *Crop Physiology – some case histories*. Londres: Cambrigde University Press, 1975, cap.6, p.151-189
- Silva Neto, S. P.; Andrade, S. R. M. Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JÚNIOR, F. B. *Biotecnologia estado da arte e aplicações na agropecuária*. 1ª Ed: Planaltina-DF, Embrapa-Cerrados, p. 411-434, 2011.
- Silva, T. F.; Corrêa, R. L.; Castilho, Y. G.; Silvie, P.; Belot, J. L.; Vaslin, M. F. S. Widespread distribution and a new recombinant species of Brazilian virus associated with cotton blue disease. *Virology Journal*, v. 5, n. 123, p. 2-32, 2008
- Sinclair, J. B.; Hartman, G. L. Soybean rust. *Compendium of soybean diseases*. 4. ed. Saint Paul: APS Press, 1999. p. 25-26
- Trick, H. N.; Dinkings, R. D.; Santarém E. R.; Samoloylov V. Recent advances in soybean transformation. *Plant Tissue Cult. Biotechnology* 3: 9-24. 1997.
- Vencato, A. Z., et al. *Anuário Brasileiro da Soja*. Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta Santa Cruz, p. 144, 2010.
- Voigt C. A. (2014). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae, *Front. Plant Sci.*, 5, p. 168
- Wiebke-Strohm B, Droste A, Pasquali G, Osorio MB, Bücken-Neto L, Passaglia LMP, Bencke M, Homrich MS, Mar-M and Bodanese-Zanettini MH (2011) Trans-genic fertile soybean plants derived from somatic embryos transformed via the combined DNA-free particle bom-bardment and Agrobacterium system. *Euphytica* 177:343-354.
- Yorinori, J. T.; Nunes Junior, J.; Lazzarotto, J. J. Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. Londrina: EmbrapaSoja, 2004, 36 p.
- Yorinori, J. T.; Nunes Junior, J.; Lazzarotto, J. J. Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. Londrina: EmbrapaSoja, 2004, 36 p.
- Yorinori, J.T. Doenças da soja. In.: *A soja no Brasil Central*. Campinas: Fundação Cargill. p. 158– 215, 1977.
- Yorinori, J.T. Situação atual das doenças potenciais no cone sul. In: *Congresso Brasileiro de Soja, II*. 2002, Foz do Iguaçu. Anais... Londrina: EmbrapaSoja, 2002. P. 171-187.

Anexo 1. Imagens de Géis de agarose para a identificação de outras plantas positivas







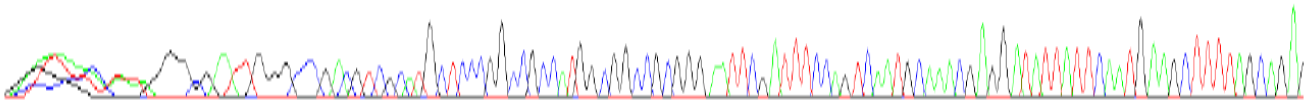
Anexo 2. Sequenciamento do fragmento



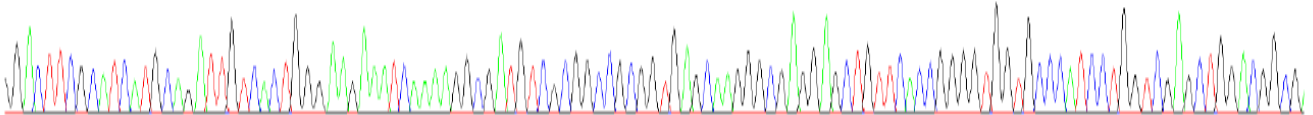
File: cal_8_2_M13F.ab1 Run Ended: 2017/9/27 20:30:46 Signal G:502 A:476 C:836 T:533

Sample: cal_8_2_M13F Lane: 23 Base spacing: 15.737433 1285 bases in 15654 scans Page 1 of 2

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
GNNNNNNN NNW GGGC A TTG GGCC G A GTTCGC ATGCTCCGGCCGCATGGCGGCCGGG AATTCGATTTCCAGTCAATGCAAACGAGG ATATTATTC AATGAAGCTTTTAGCAGA



130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
GGACTTCGCATCATGCAGATTGTCAGTGG AAGAAATCAAAGGCATGTCGGGCCGGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCG



250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
ACGTAAACGGCCACAAGTTCAAGCTGTCCGGCAGGGCAGGGCGATGCCACTACGGCAAGCTGACCCGTAAGTTCATCTGCACCACGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGAC