

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Transformação genética de soja [*Glycine max* (L.) MERRILL] com um gene que codifica uma osmotina de *Solanum nigrum* var. *americanum*, visando a resistência a moléstias fúngicas

Ricardo Luís Mayer Weber

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: Profa. Dra. Maria Helena Bodanese Zanettini

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Pinheiro Margis

Porto Alegre, março de 2007

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

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.

“... You live you learn

You love you learn

You cry you learn

You lose you learn

You bleed you learn

You scream you learn...

... You grieve you learn

You choke you learn

You laugh you learn

You choose you learn

You pray you learn

You ask you learn

You live you learn...”

(Alanis Morissette)

À minha família dedico.
Aos que me aturaram, agradeço;
aos que não, eu rezo.

Agradecimentos

Resolvi não citar nomes, pois a lista seria imensa e ficaria maior que a dissertação. Agradeço a todos que estiveram do meu lado nas horas felizes e tristes, que me deram puxões de orelha, que não deixaram eu perder o rumo, que me incentivaram e me deram força, que me deram colo, que me ouviram com a maior paciência do mundo, que me deram suporte emocional e financeiro, que me fazem muito feliz, que me ensinaram muito, que me incentivam a ser quem eu sou, que são meu porto-seguro, que me acolheram, que se dedicaram ao meu trabalho, que me aturaram, que viraram noites comigo, que sonham comigo, que mostram que a amizade verdadeira e incondicional existe, que se preocupam comigo, que acreditam no meu potencial, que dividem um cérebro comigo, que compreendem as minhas ausências, que... bom, vamos parar por aqui.

Apreendi que não devemos ter medo de ser feliz, que devemos vencer os obstáculos, pois nunca estamos sós.

Obrigado por tudo!

Sumário

Resumo.....	7
Abstract.....	9
1) Introdução.....	11
2) Objetivos.....	23
3) Materiais e métodos.....	24
4) Resultados.....	31
5) Discussão.....	41
6) Conclusões e perspectivas.....	52
7) Referências bibliográficas.....	54

Resumo

Visando o aumento da resistência a fungos patogênicos, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de introduzir o gene *SnOLP*, que codifica uma osmotina de *Solanum nigrum* var. *americanum*, em cultivares de soja. A estratégia escolhida foi a transformação por biobalística, utilizando o plasmídeo pCL1390-UBQ3-SnOLP, que contém o gene *SnOLP* e o gene *hpt II*, que confere resistência ao antibiótico higromicina. Conjuntos de embriões somáticos globulares das cultivares IAS-5, Bragg e BRSMG 68 Vencedora foram utilizados como alvo. Os conjuntos bombardeados foram transferidos para meio seletivo visando obter material estavelmente transformado. Os conjuntos higromicina-resistentes correspondendo a cinco, 12 e 13 eventos de transformação independentes nas cultivares Bragg, IAS-5 e BRSMG 68 Vencedora, respectivamente, foram sequencialmente transferidos para meio de proliferação D20 (sem higromicina), maturação (MSM6) e regeneração (MSO). Um total de 114, 70 e 211 embriões histodiferenciados das cultivares Bragg, IAS-5 e BRSMG 68 Vencedora, respectivamente, foram obtidos. A partir destes, foram regeneradas oito plantas da cultivar IAS-5, correspondentes a três eventos de transformação independentes e 30 plantas da cultivar Bragg, de um evento de transformação. Nenhuma planta da cultivar BRSMG 68 Vencedora foi regenerada. Em consequência de um acidente, foram recuperadas apenas duas plantas adultas de IAS-5, cada uma proveniente de um evento de transformação independente e 12 plantas de Bragg, todas do mesmo evento de transformação.

A presença do transgene nas plantas foi detectada por PCR e a expressão da proteína recombinante através de *Western blot*. A herança do transgene seguiu o padrão Mendeliano, para um gene dominante, na linhagem I4 de IAS-5. As progênes das plantas transgênicas de Bragg apresentaram uma segregação excepcional, com deficiência de plantas transformadas. Resultados preliminares dos bioensaios utilizando extratos protéicos totais não mostraram atividade antifúngica dessas plantas transgênicas.

Abstract

Aiming to enhance resistance to fungal pathogens, the present work was carried out with the objective of introducing a gene (*SnOLP*) coding an osmotin-like protein from *Solanum nigrum* var. *americanum* in soybean cultivars [*Glycine max* (L.) Merrill]. Biolistic transformation was the strategy elected, using the plasmid pCL1390-UBQ3-SnOLP, which contain the *SnOLP* gene and the selectable marker *hpt II* gene. Somatic globular embryo clusters of IAS-5, Bragg and BRSMG 68 Vencedora cultivars were used as target tissues. Bombarded embryo clusters were transferred to selective medium containing hygromycin, aiming to obtain stable transformed material. Hygromycin-resistant embryogenic clusters corresponding to five, 12 and 13 independent transformation events of Bragg, IAS-5 and BRSMG 68 Vencedora cultivars, respectively, were sequentially transferred to proliferation D20 (without hygromycin), maturation and regeneration media. A total of 70, 114 and 211 histodifferentiated embryos were obtained from IAS-5, Bragg and BRSMG 68 Vencedora cultivars, respectively. Eight plants corresponding to three independent transformation events were recovered for cultivar IAS-5 and 30 plants from one transformation event for Bragg cultivar. No one plant for BRSMG 68 Vencedora cultivar was regenerated. As a consequence of an accident, only two adult plants for IAS-5 cultivar, each one proceeding from an independent transformation event and 12 plants for Bragg, all them from the same transformation event, were obtained. The integration and expression of the *SnOLP* transgene into the genomes of transformed plants were confirmed by PCR and Western *blot*. The 14 progeny from IAS-5 cultivar segregated as a single

dominant locus as predicted by Mendelian principles. The transgenic Bragg progenies segregated in an exceptional manner, with fewer *SnOLP*-positive plants. Preliminary bioassays using total protein extracts of transgenic plants did not show antifungal activity.

1) Introdução

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivada é uma espécie anual, diplóide ($2n=40$), de autofecundação e pertencente à família Fabaceae (Hymowitz, 1976; EMBRAPA Soja, 2006). Nativa da China e explorada há mais de 5000 anos, é uma das mais antigas plantas cultivadas. Apresenta uma grande importância econômica, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial, perdendo apenas para os Estados Unidos.

Entre os diversos fatores que limitam os altos rendimentos da soja, as doenças estão entre os mais importantes e difíceis de controlar. A expansão da cultura para novas áreas, a monocultura e a utilização de práticas inadequadas têm aumentado o número de doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides, além de outras anormalidades desconhecidas (Suzuki & Yuyama, 2005). Apesar do uso de fungicidas e outras técnicas que visam o controle ou a eliminação dos patógenos, as moléstias fúngicas são responsáveis por grandes prejuízos nas colheitas todos os anos.

Diversos fungos atacam culturas de soja. Os patógenos mais comumente envolvidos com podridão de sementes e morte de plântulas são: *Pythium* sp., *Phytophthora sojae*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium* sp. Esses dois últimos, juntamente com *Macrophomina phaseoli*, *Sclerotium rolfsii* e *S. sclerotiorum*, são também responsáveis por podridões radiculares, do colo e da haste (Bonato, 2000; COODETEC, 2002; Reis & Casa, 2002). Os autores salientam que, em

soja, não há fonte de resistência a esses fungos, sendo este um grande desafio para os programas de melhoramento.

Recentemente, a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, foi detectada pela primeira vez no Brasil (safra 2000/2001). De acordo com as informações da safra de soja de 2001/2002, perdas de até 90% foram constatadas em propriedades no estado da Bahia, onde a doença ocorreu com alta severidade (Yorinori, 2002). Desde então, tem sido alvo de inúmeros estudos, face à sua agressividade e poder de dano, causando a desfolhação prematura e redução drástica no rendimento de grãos. Como referido para outros fungos, não há cultivares resistentes à ferrugem asiática até o presente momento (Utiamada, 2003; Suzuki & Yuyama, 2005).

Assim, o desenvolvimento de alternativas que contribuam para o controle das doenças fúngicas da soja, bem como de outras plantas economicamente importantes é de grande interesse, destacando-se a prospecção de novos compostos antifúngicos e a transgenia visando à resistência a esses patógenos.

1.1) Cultura de tecido e melhoramento genético da Soja

Devido à posição de destaque na economia do país, a soja vem sendo alvo de constantes esforços para o melhoramento genético. Entretanto, estudos para cultivares brasileiras demonstram uma estreita base genética em seu germoplasma (Priolli *et al.*, 2002). Este fato, associado ao endocruzamento, pode levar à restrição da recombinação gênica e à limitação da variabilidade. Além disso, a fonte de recursos genéticos, representada por espécies afins, também é

inacessível para a soja, devido à incompatibilidade sexual dos cruzamentos interespecíficos e intergenéricos (Hu & Bodanese-Zanettini, 1995).

Pelos motivos acima enumerados, a eficiência dos métodos tradicionais de cruzamento para o melhoramento tem sido bastante limitada, fazendo com que as pesquisas tenham sido direcionadas à utilização de técnicas como a transformação genética. A engenharia genética abre a perspectiva de que genes derivados de outras plantas, relacionadas ou não, e mesmo de outros organismos, possam ser utilizados em programas de melhoramento (revisão em Bodanese-Zanettini & Pasquali, 2004).

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).

Dois métodos de transferência de genes têm sido utilizados na transformação de diferentes tecidos de soja, estes incluem: (1) bombardeamento de partículas, utilizando meristemas de brotos como alvo (McCabe *et al.*, 1988; Christou *et al.*, 1989; Aragão *et al.*, 2000), e culturas embriogênicas em suspensão (Finer & McMullen, 1991; Stewart *et al.*, 1996; Donaldson & Simmonds 2000); e (2) sistema *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando como alvo explantes

cotiledonares derivados de plântulas de 5-7 dias (Hinchee *et al.*, 1988; Olhoft *et al.*, 2003), sementes maduras (Paz *et al.*, 2006), cotilédones imaturos (Parrot *et al.*, 1989; Yan *et al.*, 2000), e culturas embriogênicas em suspensão (Trick & Finer, 1998).

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 se tornado amplamente utilizado para a transformação genética de plantas, sendo capaz de superar as restrições estabelecidas pela necessidade de compatibilidade hospedeiro-*Agrobacterium* e as dificuldades encontradas para a regeneração de plantas a partir de protoplastos (Bodanese-Zanettini & Pasquali, 2004).

A embriogênese somática constitui o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se através de diferentes estádios embriogênicos dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (Merkle *et al.*, 1995). Esses embriões podem se originar diretamente a partir do tecido (embriogênese direta) ou através de um estágio intermediário, o calo (embriogênese indireta). O embrião somático apresenta uma estrutura bipolar, com meristema apical e radicular e sem conexão física com o tecido de origem (Tisserat, 1991). O padrão de desenvolvimento de um embrião somático em dicotiledôneas apresenta características morfológicas semelhantes às daquelas do

embrião zigótico passando pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Fernando *et al.*, 2002; Santos *et al.*; 2006).

A eficiência na produção de embriões somáticos, a partir de cotilédones imaturos, bem como o potencial de conversão destes embriões em plantas, apresenta diferenças significativas entre as cultivares de soja (Parrott *et al.*, 1989; Bailey *et al.* 1993; Santos *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2001; Meurer *et al.*, 2001). Tal dependência do genótipo tem limitado a transformação genética àqueles genótipos que respondem bem à cultura *in vitro*.

A embriogênese somática como sistema de regeneração de soja *in vitro* tem sido reconhecida por seu potencial em produzir um grande número de plantas independentemente transformadas (Finer & McMullen, 1991). Como a origem dos embriões secundários é unicelular, o tecido embriogênico passou a ser um dos alvos mais utilizados 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, é afastado o problema do quimerismo (Finer, 1988; Sato *et al.*, 1993; Droste *et al.*, 2002).

O tecido embriogênico com potencial de proliferação, ou seja, a embriogênese repetitiva, pode ser obtido pelo estabelecimento de culturas em suspensão, que foram utilizadas em vários trabalhos que empregaram esse tecido-alvo (Finer & McMullen, 1991; Stewart *et al.*, 1996; Trick & Finer, 1998; Donaldson & Simmonds, 2000). Um procedimento mais simples para o estabelecimento e proliferação de embriões somáticos de cotilédones imaturos, mais rápido e menos laborioso do que as culturas embriogênicas em suspensão,

foi desenvolvido por Santarém *et al.* (1997), utilizando um meio semi-sólido descrito por Wright *et al.* (1991). Através deste procedimento, Santarém & Finer (1999) produziram plantas transgênicas da cultivar “Jack”, indicando que esta estratégia seria bastante promissora para a recuperação de plantas transgênicas de soja.

Nos primeiros trabalhos de transformação de soja via bombardeamento realizados em nossos laboratórios, utilizando o protocolo desenvolvido por Santarém & Finer (1999), com modificações, foram obtidas plantas expressando o gene repórter que codifica a β -glicuronidase (*gusA*) e o gene marcador de resistência ao antibiótico higromicina (higromicina-fosfotransferase - *hpt*) (Droste *et al.*, 2002). As plantas transgênicas obtidas eram férteis e totalmente transformadas. Mais recentemente foram iniciadas pesquisas visando à introdução de genes de interesse agrônomo, na expectativa de gerar plantas que possam ser importantes comercialmente. Como resultados destes trabalhos, foram obtidas plantas transformadas com o gene que codifica uma quitinase, derivado de *Metarhizium anisopliae*, visando resistência a moléstias fúngicas (Sachet, 2003); e a soja *Bt*, expressando um gene sintético, que codifica uma δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis*. As plantas *Bt* apresentam alta toxicidade à lagarta *Anticarsia gemmatalis* (Homrich *et al.*, 2006).

1.2) Transformação genética visando à resistência a moléstias fúngicas

Os principais objetivos na geração de plantas geneticamente modificadas consistem em aumentar a resistência vegetal a herbicidas e patógenos, aumentar a tolerância a estresses abióticos, melhorar a qualidade nutricional do produto

vegetal e produzir proteínas e biopolímeros de interesse técnico e farmacêutico (Yuan & Knauf, 1997; Grover *et al.*, 1999; Herbers & Sonnewald, 1999).

Entre as estratégias desenvolvidas para aumentar a resistência a patógenos, incluindo fungos fitopatogênicos, encontra-se a obtenção de plantas que constitutivamente produzam altos níveis de proteínas ou compostos capazes de limitar o desenvolvimento dos microrganismos (Bushnell *et al.*, 1998). Estes incluem proteínas relacionadas à patogênese, tais como as enzimas hidrolíticas (quitinases e glicanases), proteínas antifúngicas (osmotinas e taumatina, por exemplo), peptídeos antimicrobiais, proteínas que inativam ribossomos e fitoalexinas (Punja, 2001).

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 & Legrand, 1998; Salmeron & Vernooij, 1998; Kern, 2003). 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).

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.

1.3) Osmotinas

A família de proteínas PR-5 (Pathogenesis-related proteins-5) (Van Loon & Van Strien, 1999) compreende proteínas vegetais envolvidas em diversos processos tais como o desenvolvimento (Neale *et al.*, 1990), proteção contra estresse osmótico (LaRosa *et al.*, 1992) e tolerância ao congelamento (Newton & Duman, 2000). Além disso, as PR-5 também permeabilizam a membrana plasmática de fungos e oomicetos (Abad *et al.*, 1996; Yun *et al.*, 1997).

A família PR-5 é multigênica, bastante conservada entre as plantas e animais (nestes é chamada de PR5L), tais como insetos e nematódeos, indicando que possuem um importante papel na rota evolutiva desses organismos (Shatters *et al.*, 2006)

As osmotinas (osmotin-like proteins ou OLPs) são proteínas de aproximadamente 26 kDa pertencentes à família PR-5, que apresentam um alto grau de homologia com a proteína taumatina (Yun *et al.*, 1997). Estas proteínas são produzidas em plantas sob diferentes condições de estresse biótico (patógenos) ou abiótico (estresse hídrico, baixa temperatura) (Singh *et al.*, 1987; Zhu *et al.*, 1995). Osmotinas foram identificadas em diversas plantas, tais como morango (Zhang & Shih, 2006), *Atriplex nummularia*, uma planta halófila (Casas *et al.*, 1992), *Arabidopsis thaliana* (Capelli *et al.*, 1997) e soja (Onishi *et al.*, 2006). A alta similaridade na seqüência peptídica de proteínas de diferentes espécies com a osmotina do tabaco, faz com que essas proteínas sejam comumente denominadas na literatura de osmotin-like proteins (OLPs) (Singh *et al.*, 1987).

A proteína osmotina recebeu este nome, pois a sua expressão é induzida em condições de baixo potencial hídrico. Nessa condição chega a ser acumulada cerca de 15 vezes mais do que em condições hídricas normais (Singh *et al.*, 1989). Sob condições de estresse osmótico, como em células de tabaco adaptadas a crescer em quantidades elevadas de cloreto de sódio (NaCl) ou polietileno glicol (PEG), a osmotina pode representar até 12% do total de proteínas (Singh *et al.*, 1987). Outros fatores que estimulam a expressão da osmotina são: o ácido abscísico (ABA), ferimentos, vírus do mosaico do tabaco e etileno (Singh *et al.*, 1989; Neale *et al.*, 1990; Casas *et al.*, 1992).

A osmotina é mais abundante em tecidos como raízes, epiderme, corola e botões florais imaturos, que são os locais mais propensos a serem atacados por fungos (LaRosa *et al.*, 1992), ficando acumulada nos vacúolos (Capelli *et al.*, 1997). O trabalho de Jami *et al.* (2006) descreve a expressão do transcrito do gene *SnOLP* (Osmotin-like protein de *Solanum nigrum* var. *americanum*) como sendo tecido-específica e regulada pelo desenvolvimento, corroborando com os dados obtidos por LaRosa *et al.* (1992) para a osmotina do tabaco.

Como outras proteínas da família PR-5, as osmotinas podem atuar permeabilizando as membranas celulares dos fungos, o que impede a manutenção do gradiente de pH, resultando em prejuízo para o desenvolvimento do patógeno (Yun *et al.*, 1997) sendo, desta forma, capazes de inibir o crescimento *in vitro* de vários patógenos. Abad *et al.* (1996) evidenciaram que o crescimento de hifas de *Bipolaris*, *Fusarium* e *Phytophthora* (fungos fitopatôgenos com importância econômica) é inibido pela osmotina, que também causa lise do esporo, inibe a germinação dos mesmos ou reduz a sua viabilidade. Os autores

ressaltam que não existem estudos suficientes sobre o espectro de ação da osmotina contra outras espécies de fungos.

O mecanismo de ação antifúngica dessas proteínas ainda não é completamente conhecido. Pesquisas sugerem que algumas proteínas da parede celular dos fungos, quando superexpressadas, conferem resistência à osmotina, enquanto esferoplastos (células que perderam parcialmente sua parede celular, perdendo sua forma original e assim tornando-se arredondadas) exibem sensibilidade à osmotina. O trabalho de Yun *et al.*, (1997) demonstrou que proteínas da parede celular fúngica são responsáveis pela resistência à osmotina, e sugere que a membrana plasmática seria o alvo específico dessa proteína. Assim, a parede celular atuaria como uma barreira física, impedindo a interação direta da osmotina com a membrana plasmática dos fungos. Os mesmos autores, em trabalho posterior, mostraram que a osmotina induz uma cascata de eventos ativada por MAP quinases (Mitogen-activated protein) na regulação de alguns genes relacionados a componentes da parede celular. As mudanças na parede celular, que permitiriam o acesso da osmotina à membrana plasmática, aumentariam a sua citotoxicidade, podendo levar à morte celular (Yun *et al.*, 1998).

Em relação a plantas geneticamente transformadas com genes que codificam osmotinas, há poucos estudos encontrados na literatura. Liu *et al.* (1994) relataram que folhas de batata transgênica, expressando a osmotina de tabaco, exibiram um decréscimo nos sintomas da doença causada pelo fungo *Phytophthora infestans*, demonstrando que a osmotina pode ser utilizada como uma fonte de resistência a infecções fúngicas. Zhu *et al.* (1995) obtiveram,

também, plantas de batata tolerantes a *Phytophthora infestans*. O diferencial deste último trabalho é a transformação com duas osmotinas mutantes, o que permitiu aos autores identificar a porção N-terminal como a região possivelmente responsável pela atividade antifúngica da proteína. Plantas transgênicas de tomate com comprovada resistência a fungos foram obtidas por Ouyang *et al.* (2005).

Recentemente, foi sugerida a possível aplicação da osmotina no tratamento de doenças em humanos, pois ela mimetiza a atividade de um hormônio ligado a perda de peso e redução da ocorrência de doenças cardíacas, diabetes e alguns tipos de tumores (Narasimhan *et al.*, 2005)

1.4) Isolamento do gene de osmotina de *Solanum nigrum* var. *americanum*

No gênero *Solanum*, encontra-se um amplo conjunto de genes que conferem resistência a patógenos (Vleeshouwers *et al.*, 2000). *Solanun nigrum* var. *americanum*, uma erva daninha da família Solanaceae, é um exemplo de planta que apresenta resistência, por exemplo, a *P. infestans*. Portanto, admite-se que os genes do tipo PR-5 de *S. nigrum* tenham potencial para controle de fungos (revisão em Zhu *et al.*, 1995), mas não existem estudos conclusivos sobre este assunto.

O trabalho de Campos *et al.* (2002) descreve a clonagem e a caracterização de genes que codificam proteínas PR-5 de *S. nigrum* var. *americanum*, que apresentam alto grau de homologia com a osmotina de tabaco (*Nicotiana tabacum*). A equipe coordenada pela Dra. Maria Fátima Grossi de Sá (CENARGEN-EMBRAPA) construiu um vetor contendo um dos genes isolados e

caracterizados por Campos *et al.* (2002), o qual foi disponibilizado para a realização do presente trabalho. Uma ORF (*Open Reading Frame*) de 744 pares de bases (pb), que codifica uma osmotina neutra, com massa molecular calculada de 26,8 kDa foi utilizada na construção desse vetor.

2) Objetivos

2.1) Geral

Introduzir, nas cultivares de soja IAS-5, Bragg e Vencedora, um gene que codifica uma osmotina de *Solanum nigrum* var. *americanum* por meio da estratégia de transformação via biobalística, com a perspectiva de aumentar a resistência a moléstias fúngicas dessas plantas.

2.2) Específicos

- Transformar tecido embriogênico com o gene *SnOLP*, via biobalística;
- Obter plantas transgênicas adultas e férteis;
- Avaliar, em nível molecular, as plantas obtidas (transformantes primários) quanto à presença e expressão do transgene;
- Realizar testes de progênes para o estudo da herança do transgene;
- Conduzir um bioensaio para testar extratos das plantas transgênicas quanto à capacidade de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos de interesse comercial.

3) Materiais e métodos

3.1) Material vegetal

Embriões somáticos das cultivares de soja Bragg, IAS-5 e BRSMG 68 Vencedora (sementes gentilmente fornecidas pela Embrapa-Soja) foram induzidos a partir de cotilédones imaturos, proliferados e mantidos como descrito por Droste *et al.* (2002)

3.2) Plasmídeo

O vetor de transformação genética utilizado nesse estudo foi o pCL1390-UBQ3-SnOLP (Figura 1), contendo o gene de resistência à higromicina (*hpt II*), regulado pelo promotor do RNA 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV 35S) e pelo terminador CaMV 35S, e o gene *SnOLP* de *Solanum nigrum* var. *americanum* sob controle do promotor UBQ-3 (*Arabidopsis thaliana*-ubiquitin3 promoter) e o terminador do gene da nopaline synthase. O gene SnOLP utilizado neste estudo foi isolado e caracterizado por Campos *et al.* (2002). O plasmídeo foi utilizado na concentração final de $1 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$, e precipitado em partículas de tungstênio (M10, Dupont, Wilmington, DE).

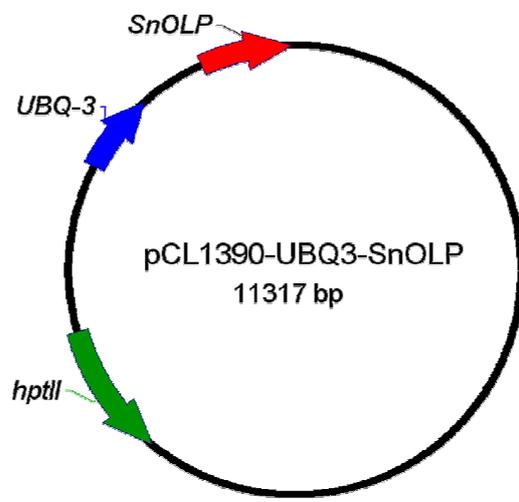


Figura 1 – Esquema do vetor pCL1390-UBQ3-SnOLP.

3.3) Transformação de soja e produção de sementes T1

O bombardeamento de partículas, utilizando o aparelho de baixa pressão *Particle Inflow Gun – PIG* (Finer *et al.*, 1992), a seleção dos tecidos transformados e a regeneração de plantas foram realizados como descrito previamente por Droste *et al.* (2002). Quinze conjuntos embriogênicos com aproximadamente 3 mm de diâmetro foram colocados em cada placa de Petri, contendo meio D20 (sais de MS – Murashige & Skoog, 1962; vitaminas do B5 – Gamborg *et al.*, 1968; 20mg/L de 2,4-D; 3% de sacarose, 0,3% de Phyttagell[®]; pH 6,4). Foram preparadas seis placas para cada cultivar. Cada placa foi bombardeada uma única vez. A seleção dos tecidos transformados foi realizada em meio D20 complementado com 12,5 mg L⁻¹ de higromicina-B, durante 14 dias, seguidos de três meses no mesmo meio de cultura contendo 25 mg L⁻¹ de higromicina-B, com trocas quinzenais para meio fresco. Após o período de seleção, os conjuntos embriogênicos foram subcultivados em meio D20, sem antibiótico, por quatro

meses – com subcultura a cada 15 dias – para o estabelecimento e proliferação dos mesmos.

Para promover a histodiferenciação, conjuntos de embriões resistentes à higromicina foram transferidos para meio MSM6 (Finer & McMullen, 1991). Após quatro semanas, os embriões foram separados e subcultivados em meio MSM6 fresco por mais quatro semanas. Todos os embriões histodiferenciados foram colocados em placas de Petri estéreis, sem meio de cultura, durante 48 horas, para promover a dessecação parcial e aumentar o potencial de conversão em plantas adultas (Merkle *et al.*, 1995).

Os embriões histodiferenciados, parcialmente dessecados, foram transferidos para meio de conversão MSO, contendo sais do MS, vitaminas do B5, 3% de sacarose, 0,3% de Phytigel[®] e pH 6.4 (ajustado antes de autoclavar). Na etapa de conversão os embriões histodiferenciados se desenvolvem em plântulas. Os embriões germinados em placa de Petri foram individualmente transferidos para vidros, contendo o mesmo meio, para a fase de conversão em plantas. As plântulas obtidas foram transferidas para copos plásticos com vermiculita umedecida com solução nutritiva (MS meia força), cobertos com filme plástico. Depois de duas semanas, as plantas foram gradativamente expostas ao ambiente menos úmido e, então, transferidas para potes com solo orgânico e colocadas em casa de vegetação.

Os regenerantes primários (T_0) se referem às plantas transgênicas recuperadas dos explantes originalmente submetidos ao bombardeamento de partículas. A geração T_1 é composta por plantas derivadas de sementes obtidas

da autopolinização das plantas T₀, que se desenvolveram em um telado, com luminosidade natural e temperatura ambiente. Cabe ressaltar que a T₁ foi semeada na época recomendada para o plantio de soja no RS. O teste Qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para confirmar se os dados de segregação encontrados neste estudo estavam de acordo com a probabilidade Mendeliana esperada (3:1). O nível de significância foi determinado para valores de $\alpha = 0,05$.

3.4) Extração de DNA genômico e identificação das plantas transgênicas por PCR

As reações de PCR foram realizadas utilizando DNA genômico extraído de tecidos de folhas de todas as plantas regeneradas da T₀ e de uma amostra da T₁, utilizando o método CTAB, descrito por Doyle & Doyle (1987), com algumas modificações. Os iniciadores (*primers*) utilizados na amplificação do gene *SnOLP* foram PPS1 5' CGCGGATCCATGGGCTACTTGAGATCT 3' e PCTP 5' CCCAAGCTTTTACTTGGCCACTTCATC 3', descritos por Campos *et al.* (2002). Estes iniciadores amplificam 744 pb do gene *SnOLP*. As condições das reações de amplificação para esse gene foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 25 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 2 min, e extensão final a 72°C por 5 min. Os iniciadores utilizados para detectar o gene *hpt II* foram *hptFor* 5' GCGATTGCTGATCCCCATGTGTAT 3' e *hptRev* 5' GGTTTCCACTATCGGCGAGTACTT 3'. Estes iniciadores amplificam um fragmento de 462 pb. As condições das reações para esse par de iniciadores foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos a 94°C por 45s, 52°C por 45s, 72°C por 45s e extensão final a 72°C por 2 min. Todas as

reações de amplificação foram realizadas em um termociclador da marca Thermo Hybaid. Os componentes básicos utilizados nas reações de amplificação (25µl) de ambos os genes foram: 200µM de dNTPs, 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, 5U/µl), tampão de reação 1X com 2mM de MgCl₂, 100nM de cada oligonucleotídeo iniciador e cerca de 100ng de cada amostra de DNA. Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.5) Western blot

Cerca de 200mg de folhas frescas de plantas da geração T₀ foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 500 µl de tampão de extração de proteínas [50 mM de Tris-HCl (pH 6.8), 1% β-mercaptoethanol, 0,2% PVP-40] (Brasileiro & Carneiro, 1998). As preparações foram fortemente agitadas por 30 minutos a 4°C e, então, centrifugadas a 12.000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e misturado ao tampão para a migração em géis SDS-PAGE. O extrato protéico de cada planta foi separado em gel SDS-PAGE 12% e transferido para uma membrana de nitrocelulose. As amostras foram realizadas em duplicata, sendo um gel transferido para a membrana e o outro corado com Comassie Blue para a visualização da integridade dos extratos protéicos e uniformidade da migração na eletroforese. A presença da proteína SnOLP foi detectada usando um anticorpo policlonal contra a proteína osmotina do tabaco (gentilmente cedido pelos Dr. Bernard Fritig and Dr. Pierrette Geoffroy - Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du C.N.R.S - França). A banda correspondente à

proteína SnOLP foi visualizada utilizando o *kit* ECL Western *Blot* Detection and Analysis System (GE Healthcare).

3.6) Bioensaios

Os bioensaios para testar a atividade antifúngica da proteína SnOLP, produzida em plantas transgênicas de soja, foram realizados no Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa (CENARGEN / EMBRAPA). O micélio de fungos de espécies com importância agrônômica (*Macrophomina phaseolina* – gentilmente cedido pela Dra. Maria José Chacar da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF; *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* gentilmente fornecido pela Dra. Marília Santos Silva da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF; e *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, gentilmente cedido pela Dra. Leila Costamilan da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS) foram inoculados no centro de placas de Petri (8,5 cm de diâmetro) contendo 8,5 ml do meio BDA (*Batata Dextrose Agar*). Após a inoculação, as placas foram incubadas, durante 24 a 48 horas, a 28 °C, para permitir o crescimento das hifas, até o diâmetro total do micélio atingir cerca de 5 cm.

Os extratos protéicos totais para o bioensaio foram preparados da mesma forma que os utilizados para o Western *blot* (ver item anterior), porém com a utilização de 5 g de folhas jovens em 12,5 ml de tampão, e a substituição do β -mercaptoetanol por 50 mM de NaCl, no tampão de extração. Essa medida foi adotada, pois foi observado que o β -mercaptoetanol interfere no crescimento dos fungos. A concentração de proteínas foi determinada, através do método descrito por Bradford (1976), utilizando BSA como proteína padrão.

Discos de papel filtro, estéreis, umedecidos com alíquotas (< 60µL) contendo 200µg do extrato protéico total de folhas jovens de soja transgênica, foram radialmente distribuídos na superfície do meio de cultura, a cerca de 0,5cm da margem de crescimento do micélio. O tampão (60µL) e extratos de plantas não transformadas (200µg) serviram como controle negativo. O controle positivo empregado foi 2.000U de nistatina, um composto antifúngico isolado de *Streptomyces noursei*. As placas de Petri foram então incubadas por 12 a 48 horas (dependendo da espécie do fungo), a 28°C. A presença ou ausência de halos de inibição de crescimento dos fungos ao redor dos discos de papel foi utilizada para avaliar a possível atividade antifúngica dos extratos. As amostras foram preparadas em triplicata. Nos bioensaios foi testado o extrato protéico de uma planta positiva da geração T₁ de cada cultivar (baseados nos dados do PCR). O controle negativo foi preparado com plantas não transformadas – com o cuidado de utilizar sempre a mesma cultivar da planta positiva testada.

4) Resultados

4.1) Obtenção de plantas transgênicas

Os dados referentes à etapa de cultura *in vitro* e transformação genética estão sumarizados na Tabela 1. Um total de 90 conjunto de embriões somáticos, de cada cultivar, foram bombardeados com o plasmídeo pCL1390-UBQ3-SnOLP. Após a etapa de seleção em meio contendo o antibiótico, foram obtidos conjuntos de embriões resistentes à higromicina correspondendo a cinco, 12 e 13 eventos de transformação independentes nas cultivares Bragg, IAS-5 e BRSMG 68 Vencedora, respectivamente.

Os conjuntos resistentes à higromicina foram transferidos para meio D20, sem antibiótico, visando à obtenção de clones dos eventos de transformação. A seguir, os conjuntos proliferados passaram para a etapa de maturação (histodiferenciação) e subsequentemente para etapa de regeneração (conversão dos embriões em plantas). Foram obtidos 114, 70 e 211 embriões histodiferenciados das cultivares Bragg, IAS-5 e BRSMG 68 Vencedora, respectivamente. A partir destes, foram regeneradas oito plantas da cultivar IAS-5, correspondentes a três eventos de transformação independentes; 30 plantas da cultivar Bragg, de um evento de transformação; e nenhuma planta da cultivar BRSMG 68 Vencedora.

Na etapa em que as plantas se encontravam em potes com vermiculita e solução nutritiva, ocorreu um imprevisto que quase interrompeu a realização

deste trabalho. Uma solução nutritiva, utilizada para regar as plantas, estava contaminada com um herbicida, o que levou à perda de grande número de indivíduos regenerados. Após esse incidente foram recuperadas apenas duas plantas de IAS-5, cada uma proveniente de um evento de transformação independente (plantas I3 e I4) e 12 plantas de Bragg (plantas B1 a B12), todas do mesmo evento de transformação. Essas plantas adultas sobreviventes foram utilizadas para todos os demais experimentos descritos nesse trabalho. Dentre as plantas da cultivar Bragg, duas (B6 e B10) foram eliminadas das análises devido a uma forte infestação com ácaros, que as deixou bastante debilitadas.

Tabela 1 – Sumário dos dados referentes às etapas de cultura de tecidos e transformação genética com o vetor pCL1390-UBQ-SnOLP para as Bragg, IAS-5 e BRSMG 68 Vencedora.

Cultivar	CEB	EvT	EH	EG	ER	EvTAI	PACV
Bragg	90	5	114	78	30	1	12
IAS-5	90	12	70	23	8	2	2
BRSMG 68 Vencedora	90	13	211	76	0	0	0

Abreviações: CEB = conjuntos de embriões bombardeados, EvT = eventos de transformação, EH = embriões histodiferenciados, EG = embriões germinados, ER = embriões regenerados, EvTAI = eventos de transformação após incidente, PACV = plantas adultas na casas de vegetação.

4.2) Caracterização molecular das plantas transgênicas

4.2.1) Confirmação da integração do transgene por PCR

Todas as plantas obtidas foram analisadas, através de PCR, para confirmar a integração dos genes *hpt II* e *SnOLP* no genoma das cultivares de soja, (Figuras 2 e 3, respectivamente). Uma das plantas, correspondente a um dos putativos eventos de transformação independente, da cultivar IAS-5 (I3), não apresentou produtos de PCR para qualquer um dos genes testados, sendo considerada “escape”.

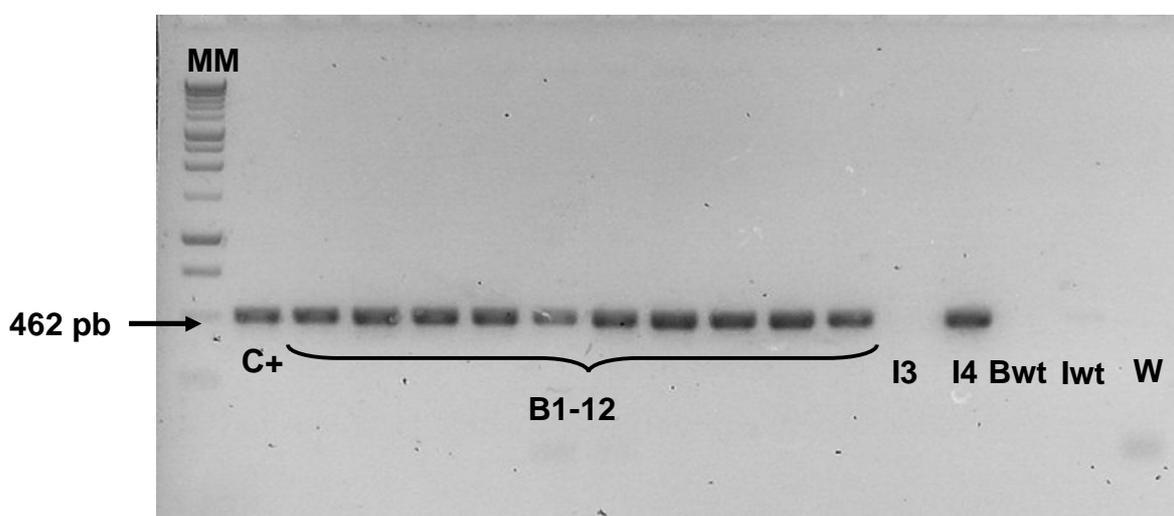


Figura 2 – Gel de agarose 1% mostrando a amplificação de um segmento de 462 pares de bases do gene *hpt II* em plantas da geração T_0 . MM: marcador de peso molecular (1kb DNA ladder, Promega); C+: controle positivo (vetor pCL1390-UBQ-SnOLP); B1-12: plantas da cultivar Bragg; I3 e I4: plantas da cultivar IAS-5; Bwt e lwt: plantas não transformadas das cultivares Bragg e IAS-5, respectivamente; W: controle negativo da reação de PCR.

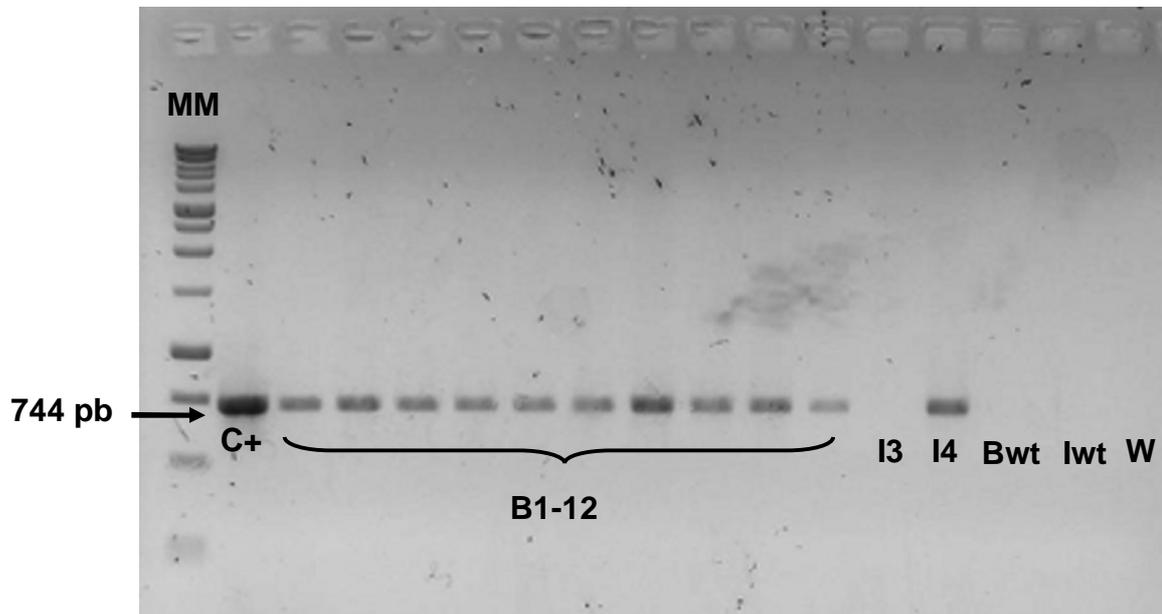


Figura 3 – Gel de agarose 1% mostrando a amplificação de um segmento de 744 pares de bases do gene *SnOLP* em plantas da geração T₀. MM: marcador de peso molecular (1kb DNA ladder, Promega); C+: controle positivo (vetor pCL1390-UBQ-SnOLP); B1-12: plantas da cultivar Bragg; I3 e I4: plantas da cultivar IAS-5; Bwt e lwt: plantas não transformadas das cultivares Bragg e IAS-5, respectivamente; W: controle negativo da reação de PCR.

As plantas positivas apresentam os fragmentos de 462 e 744 pares de bases (pb) referentes aos genes *hpt II* e *SnOLP*, respectivamente. Os controles negativos, compostos por plantas não transformadas de ambas cultivares (Bwt e lwt, referentes às cultivares Bragg e IAS-5, respectivamente) e a reação da PCR sem a adição de DNA (W) não apresentam bandas referentes a produtos amplificados.

4.2.2) Determinação da expressão do produto do transgene por Western blot

Para verificar se o gene *SnOLP* inserido está sendo transcrito e traduzido, foi realizado um experimento de *Western blot*. Após a separação das proteínas por eletroforese em gel SDS 12%, transferência para membrana de nitrocelulose e revelação, usando anticorpo contra a osmotina do tabaco, uma única banda de aproximadamente 27 kDa, correspondente à proteína SnOLP, foi detectada apenas nas plantas positivas para a reação de PCR (Figura 4A). O gel corado com Comassie Blue, o qual foi submetido à eletroforese simultaneamente com o gel que foi transferido para a membrana, mostra o perfil protéico das amostras e sua integridade (Figura 4B). Não foi detectada banda nas plantas não transformadas de ambas as cultivares, e nem na planta I3, caracterizada como “escape”.

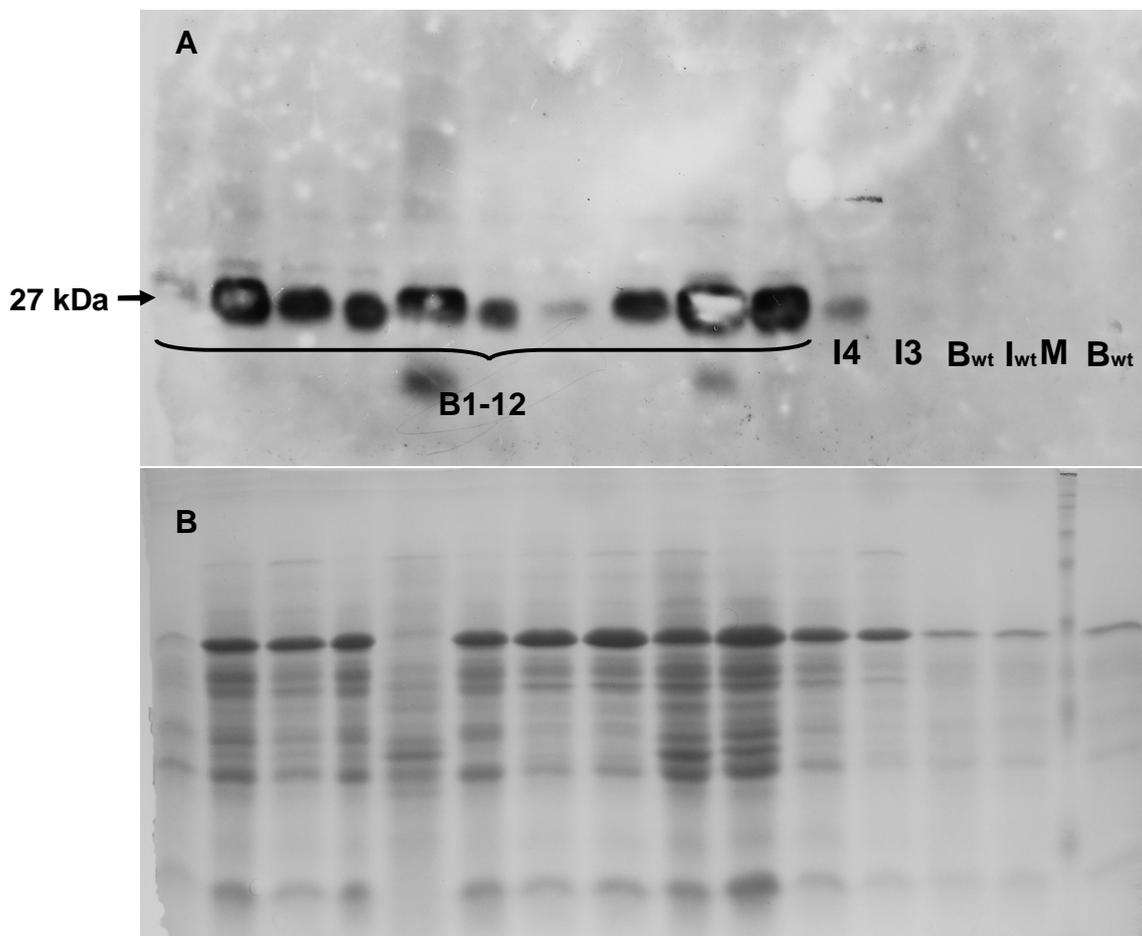


Figura 4 – A) Detecção da proteína recombinante SnOLP por Western *blot* na geração T₀. B1-12: plantas da cultivar Bragg; I3 e I4: plantas da cultivar IAS-5; B_wt e I_wt: plantas não transformadas das cultivares Bragg e IAS-5, respectivamente; M: marcador de peso molecular. **B)** Gel corado com Comassie Blue, o qual foi submetido à eletroforese simultaneamente com o gel que foi transferido para a membrana. As canaletas seguem a mesma ordem da figura anterior.

4.3) Análise da segregação do gene *SnOLP* nas progênes

Todas as plantas da geração T₀ se desenvolveram normalmente e produziram sementes. Para verificar o padrão de herança do gene *SnOLP* na geração T₁, entre 20 e 30 indivíduos das progênes da planta positiva de IAS-5

(I4) e de uma amostra de três plantas de Bragg (progênes das plantas B1, B7 e B12 da T₀) foram semeados e analisados através de PCR. Os dados estão sumarizados na Tabela 2 e um exemplo dos géis utilizados para a análise do padrão de herança está apresentado na Figura 5. O teste Qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para confirmar se os dados de segregação encontrados neste estudo estavam de acordo com a probabilidade Mendeliana esperada para um locus dominante (3:1). O nível de significância foi determinado para valores $\alpha = 0,05$.

A progênie da planta I4 apresentou o padrão de herança Mendeliana esperado para um locus dominante (3:1; transgênicas : não-transgênicas). Nas progênes B7 e B12 foi verificada uma deficiência de plantas transformadas, sendo que a proporção das duas classes de plantas desvia do esperado de 3:1, aproximando-se da proporção 1:1. A análise da progênie da planta B1 indica que esta obedece à proporção esperada, embora o valor de χ^2 obtido esteja muito próximo do nível de significância. Os dados para essa progênie também se aproximam da proporção de 1:1 encontrada nas demais progênes de Bragg testadas.

Tabela 2 – Segregação do gene *SnOLP* em plantas da geração T₁ obtidas através de autofecundação de plantas T₀.

Planta T ₀	<i>SnOLP</i> ⁺	<i>SnOLP</i> ⁻	Total	Proporção testada	χ^2
I4	24	6	30	3:1	0,17
B1	11	9	20	3:1	3,26
B7	16	13	29	3:1	5,07*
B12	14	12	26	3:1	5,13*

Presença (*SnOLP*⁺) e ausência (*SnOLP*⁻) do gene foi determinada por PCR.

* P < 0,05

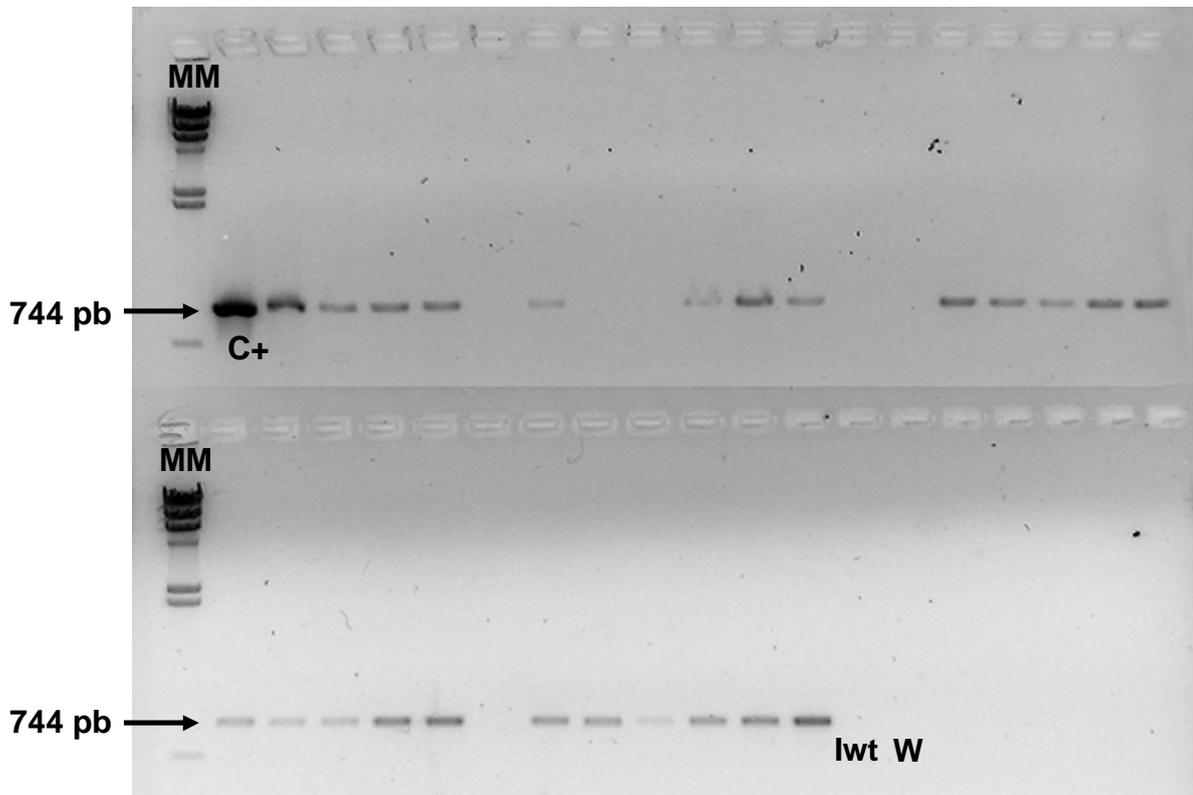


Figura 5 – Exemplo da análise do padrão de herança: gel de agarose 1% mostrando a amplificação de um segmento de 744 pares de bases do gene *SnOLP* em plantas da progênie de I4. MM: marcador de peso molecular (Lambda DNA *EcoRI/HindIII*); C+: controle positivo (vetor pCL1390-UBQ-*SnOLP*); lwt: planta não transformada da cultivar IAS-5; W: controle negativo da reação de PCR.

4.4) Bioensaios com fungos de importância econômica

A atividade da proteína recombinante *SnOLP* foi avaliada através de testes de inibição do crescimento do micélio, *in vitro*, de três isolados de diferentes espécies de fungos fitopatogênicos. Para esse experimento foram testadas duas plantas positivas da geração T₁, uma da cultivar IAS-5 (planta 20 da progênie de I4) e uma planta positiva da cultivar Bragg (planta 18 da progênie de B7). As

plantas selvagens utilizadas como controle negativo se encontravam no mesmo estágio de desenvolvimento das plantas transformadas.

Os discos saturados com tampão, extratos de plantas transformadas e não transformadas, não apresentaram sinal de inibição do crescimento do micélio para nenhum dos fungos testados (Figuras 6). O controle positivo (nistatina) apresentou halo de inibição do crescimento em duas espécies testadas, *Macrophomina phaseolina* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. O fungo *Fusarium solani* f. sp. *glycines* se mostrou tolerante à nistatina.

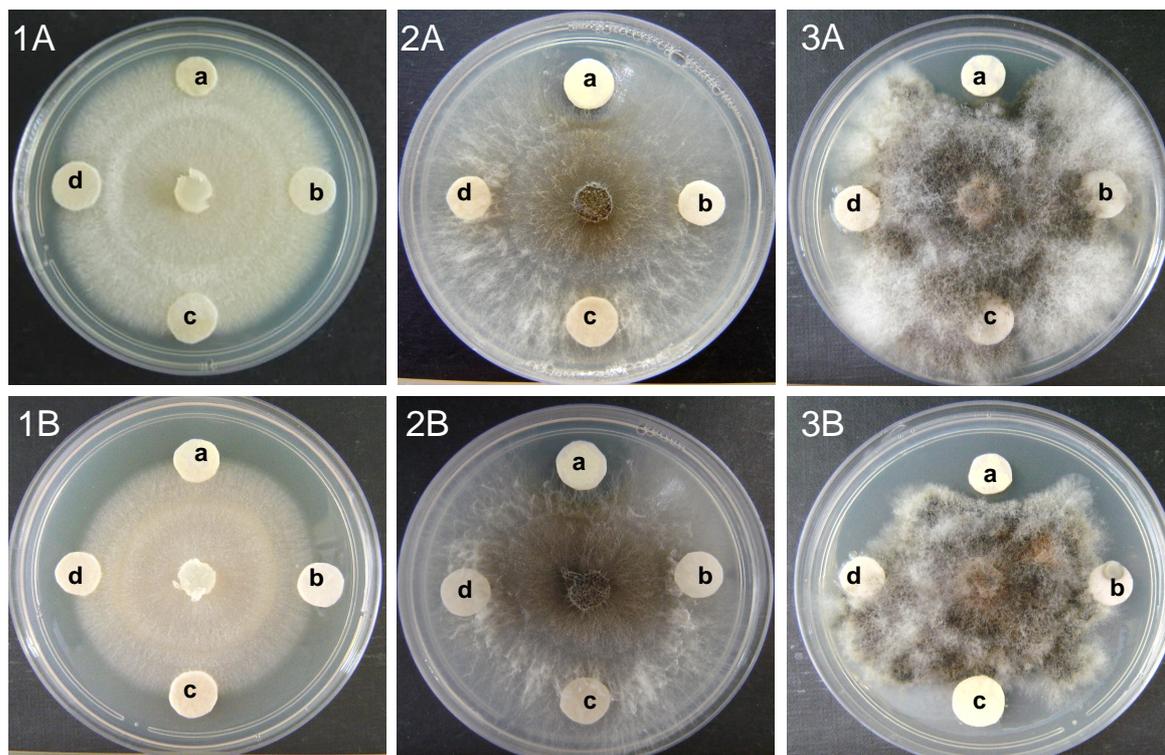


Figura 6 – Bioensaios com fungos de interesse agrônomo. Legenda: **1** – *Fusarium solani* f. sp. *glycines*; **2** – *Macrophomina phaseolina*; **3** – *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*; **A** – planta 20 da progênie I4 de IAS-5; **B** – planta 18 da progênie B7 de Bragg; **a** – 2000U de nistatina; **b** – tampão de extração de proteínas; **c** – 200µg de extrato da planta transgênica; **d** - 200µg de extrato da planta não transformada.

5) Discussão

5.1) *SnOLP* e a obtenção de plantas transgênicas

A introdução de genes de interesse, em cultivares de soja recomendadas para o plantio no Brasil, é uma das principais metas dos trabalhos realizados por nossa equipe.

A aplicabilidade de genes da família PR-5 na transformação genética de plantas, com o objetivo de promover uma resposta mais efetiva das mesmas frente a fungos fitopatogênicos, representa uma alternativa ao emprego de técnicas tradicionais, tais como a aplicação de fungicidas. Os insumos químicos são notoriamente prejudiciais ao ambiente, onerosos e, principalmente para o controle de moléstias fúngicas, pouco eficazes.

Velazhahan & Muthukrishnan (2004), produziram plantas de tabaco expressando constitutivamente uma PR-5 de arroz, bastante similar à osmotina, que apresentaram resistência ao fungo *Alternaria alternata*. Guo *et al.* (2004) desenvolveram plantas de uma gramínea de amplo uso como forração (*Agrostis palustris*), expressando o gene *pr5k* de *Arabidopsis thaliana* que mostraram atraso significativo no desenvolvimento dos sintomas causados pelo fungo *Sclerotinia homoeocarpa*, uma doença importante para essa cultura. Esses são apenas dois exemplos dos trabalhos que mostram a atividade antifúngica de proteínas PR-5 em plantas geneticamente modificadas.

Em um trabalho desenvolvido por Campos e colaboradores (comunicação pessoal), a proteína SnOLP recombinante, produzida em *Escherichia coli*, foi capaz de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos como: *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium solani* f. sp. *glycines* e *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica*. Os pesquisadores utilizaram de 1 a 3 µg da proteína purificada em ensaios idênticos ao realizado no presente trabalho. A intensidade da resposta variou bastante de fungo para fungo. A resposta parece ser espécie específica, uma vez que diferentes níveis de sensibilidade foram observados entre os patógenos analisados, corroborando dados obtidos anteriormente por Liu *et al.* (1994) e Abad *et al.* (1996).

Abad *et al.* (1996) demonstraram que 100 µg de uma osmotina nativa de tabaco não causou efeito em *Macrophomina phaseolina*. Do mesmo modo, na presença de 100 µg da referida proteína, o crescimento de hifas de *Colletotrichum* spp. e de *Phytophthora* spp. foi apenas levemente inibido. Os dados obtidos por Campos (comunicação pessoal) quando comparados aos resultados descritos por Abad *et al.* (1996) indicaram que a proteína SnOLP possui alto poder antifúngico, uma vez que exerce poder inibitório no crescimento de hifas dos organismos testados, em concentrações consideradas sub-inibitórias em relação ao descrito para a osmotina de tabaco.

A transformação genética de plantas com genes de osmotinas já foi realizada em alguns trabalhos, empregando o gene oriundo de tabaco. Duas plantas foram transformadas com esse gene: tomate (Ouyang *et al.*, 2005) e batata (Liu *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1995). Nesses casos os transgenes foram

expressos com sucesso e as proteínas recombinantes foram produzidas em quantidades suficientes para conferir um aumento significativo na tolerância a fungos fitopatogênicos. Desse modo, a introdução de genes de osmotinas em plantas apresenta-se como uma estratégia promissora para o controle de sintomas e doenças provocadas por fungos, aumentando a produtividade das culturas, reduzindo custos e contribuindo para um menor impacto ambiental, vinculado ao uso de fungicidas.

O objetivo do presente trabalho foi verificar o potencial do gene *SnOLP*, que codifica uma osmotina de *Solanum nigrum* var. *americanum*, para a obtenção de plantas transgênicas de soja com maior resistência a moléstias fúngicas. Os conjuntos higromicina-resistentes correspondendo a cinco, 12 e 13 eventos de transformação independentes nas cultivares Bragg, IAS-5 e BRSMG 68 Vencedora, respectivamente, foram sequencialmente transferidos para meio de proliferação, maturação e regeneração. Um total de 114, 70 e 211 embriões histodiferenciados das cultivares Bragg, IAS-5 e BRSMG 68 Vencedora, respectivamente, foram obtidos. A partir destes, foram regeneradas oito plantas da cultivar IAS-5, correspondentes a três eventos de transformação independentes; 30 plantas da cultivar Bragg, de um evento de transformação; e nenhuma planta da cultivar BRSMG 68 Vencedora. Em consequência de um acidente, foram recuperadas apenas duas plantas de IAS-5, cada uma proveniente de um evento de transformação independente e 12 plantas de Bragg, todas do mesmo evento de transformação.

Em soja, diferenças entre cultivares quanto à capacidade de produção de embriões somáticos a partir de cotilédones imaturos, bem como quanto à

habilidade dos mesmos se converterem em plantas foi registrada em diversos trabalhos (Parrott *et al.*, 1989; Bailey *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2004). Além disso, foi constatado que não há relação direta entre a capacidade de produção de embriões e frequência de conversão (Bailey *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2001). Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram esta constatação. Por exemplo, para a cultivar BRSMG 68 Vencedora foi obtido um elevado número de embriões histodiferenciados (211), mas nenhum desses foi convertido em planta. Por outro lado, para Bragg foram obtidos 114 embriões histodiferenciados, dos quais 30 (26%) foram convertidos em plantas.

A cultivar BRSMG 68 Vencedora foi utilizada pela primeira vez em trabalho de transformação genética via biobalística, enquanto as cultivares IAS-5 e Bragg já haviam sido identificadas como competentes para a transformação e regeneração de plantas transgênicas via embriogênese somática (Droste *et al.*, 2002; Homrich *et al.*, 2006).

A caracterização molecular das plantas adultas de Bragg e IAS-5 obtidas iniciou com a confirmação da integração dos transgenes no genoma hospedeiro. Apenas uma das plantas, correspondente a um putativo evento independente de transformação (I3), não apresentou produtos de PCR para qualquer um dos genes testados, sendo considerada “escape”. “Escapes” são comuns em trabalhos de transformação genética e denotam alguma falha no processo de seleção dos transformantes. A integração dos transgenes *hpt II* e *SnOLP* foi comprovada nas demais plantas de Bragg e IAS-5, que apresentavam os fragmentos amplificados referentes aos mesmos. Os controles negativos,

compostos por plantas não transformadas de ambas cultivares e a reação da PCR sem a adição de DNA não apresentaram bandas referentes a produtos amplificados. Estes resultados comprovaram o sucesso da inserção do DNA exógeno nas plantas de soja regeneradas. Em termos de avaliação da eficiência do protocolo utilizado, há dificuldade em comparar os resultados do presente trabalho com os obtidos por outros grupos de pesquisa devido a: (a) diferentes genótipos utilizados, os quais apresentam variação na competência para a transformação genética e regeneração de plantas; (b) diferentes métodos de transformação e (c) diferentes tecidos-alvo utilizados.

A confirmação da expressão do gene *SnOLP* foi obtida pela técnica de Western *blot*. Uma única banda de aproximadamente 27 kDa, detectada pela reação com anticorpo anti-osmotina de tabaco, foi detectada nas plantas PCR-positivas, indicando que a mesma corresponde à proteína SnOLP. A utilização do anticorpo heterólogo para detecção de outra proteína da mesma família é possível devido ao alto grau de identidade entre as proteínas PR-5, que se mantêm evolutivamente muito conservadas entre plantas, animais e microrganismos (Shatters *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2006). No presente estudo foi utilizado com sucesso o anticorpo contra a osmotina do tabaco para a identificação da expressão da osmotina de *Solanum nigrum var. americanum*. A equipe da Profa. Dra. Maria Fátima Grossi de Sá está trabalhando na produção de um anticorpo homólogo específico pra a proteína SnOLP.

Em um trabalho recentemente publicado, Onishi *et al.* (2006) encontraram uma osmotina em soja, codificada pelo gene *GmOLPa* que, por análise *in silico*, não possui atividade antifúngica e está relacionada ao estresse hídrico e

tolerância a sais em raízes. O peptídeo codificado por esse gene apresenta pouca similaridade com as demais osmotinas. Podemos afirmar que o anticorpo utilizado em nosso trabalho não interage com a proteína GmOLPa, pois não foi detectada banda referente à osmotina nas plantas selvagens, de ambas as cultivares, e na planta “escape” I3.

5.2) Segregação do gene *SnOLP* nas progênes

A progênie da planta I4 segregou como o esperado da proporção Mendeliana para um locus dominante simples (3:1). As progênes de Bragg (B1, B7 e B12) segregaram de maneira excepcional, com uma deficiência de plantas transgênicas, com uma proporção de aproximadamente 1:1 (transgênica : não-transgênica). A ocorrência de plantas não transgênicas na progênie obtida pela autofertilização de plantas transgênicas T_0 , indica que tais plantas eram hemizigotas para o gene *SnOLP*.

De acordo com Campbell *et al.* (2000), os transgenes, devido ao modo de integração no genoma vegetal, são considerados hemizigotos nos transformantes primários (T_0). Portanto, espera-se que eles se comportem como genes dominantes, e no caso de autofecundação, segreguem em uma proporção Mendeliana de 3:1 (transgênicos : não-transgênicos). No entanto, os loci transgênicos que têm sido introduzidos em várias espécies de plantas superiores apresentam, freqüentemente, padrões excepcionais de expressão e herança, que têm ocorrido na freqüência entre 10 e 50% em algumas linhas (Yin *et al.*, 2004)

As progênes das plantas transgênicas de Bragg (B1, B7 e B12) mostraram um padrão de segregação excepcional, aproximando-se de 1:1. Tal proporção já

foi registrada em outros trabalhos de transformação por biobalística (Christou *et al.*, 1989; Altpeter *et al.*, 1996). É interessante salientar que as três plantas acima citadas apresentaram o mesmo padrão de herança, o que sugere que elas são resultantes de um mesmo evento de transformação, como foi inicialmente suposto.

Taxas de segregação excepcionais podem resultar de inúmeros fatores, que incluem a inativação da expressão do transgene, inserções que levam a mutações letais e falhas na transmissão do transgene para a descendência. A inativação da expressão é frequentemente observada quando o transgene está presente em múltiplas cópias e pode ser responsável pela alteração na segregação (Yin *et al.*, 2004). Esse resultado não pode ser extrapolado para o nosso estudo, pois a análise da progênie foi realizada com base em dados de amplificação do gene *SnOLP* através de PCR e não com base na expressão do transgene.

A segregação não Mendeliana de transgenes pode ser creditada, também, à ausência de transmissão por um dos gametas. Christou *et al.* (1989) observou uma taxa de segregação de 1:1, na progênie oriunda de autofecundação de plantas transformadas de soja, decorrente da falha de transmissão do transgene para a próxima geração através do pólen. Cruzamentos recíprocos das plantas transformadas com plantas não transformadas serão necessários para verificar se está havendo o bloqueio da transmissão do transgene através de um dos gametas.

A determinação do número de cópias, através de Southern *blot* não foi realizada neste trabalho por problemas na extração de DNA e clivagem dos mesmos. Na continuidade dos experimentos esta etapa será realizada, pois ajudará a elucidar várias questões tais como a confirmação do número de eventos de transformação e uma possível explicação para o padrão de herança do transgene. Segundo Homrich (comunicação pessoal) as análises moleculares mostraram que um mesmo conjunto de embriões somáticos higromicina-resistentes pode conter dois ou mais eventos de transformação independentes.

A próxima etapa do trabalho será a obtenção da geração T_2 , imprescindível para a resolução das questões referentes à segregação gênica. Além disso, a produção da segunda geração (T_2) poderá garantir a obtenção de plantas homocigotas para o gene *SnOLP*, o que será de grande valor para realização de testes posteriores, pois garantirá a uniformidade na progênie gerada a partir dessas plantas. Isso é essencial para a continuidade dos testes *in vitro* bem como para a realização dos bioensaios *in vivo*, nos quais as plantas serão desafiadas com fungos fitopatogênicos.

5.3) Bioensaios com fungos de importância econômica

Tendo em vista que as plantas da geração T_0 apresentavam expressão da proteína recombinante *SnOLP*, a atividade antifúngica da mesma foi analisada através de testes de inibição do crescimento do micélio, *in vitro*, de três isolados de diferentes espécies de fungos fitopatogênicos.

Os fungos foram escolhidos devido a sua importância econômica. *Fusarium solani* f.sp. *glycines* causa a podridão vermelha da raiz (PVR) ou síndrome da

morte súbita da soja, doença com crescente importância econômica no Brasil. *Macrophomina phaseolina*, considerado um dos patógenos mais prevalentes no Brasil, causa a podridão do carvão. *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* é o agente etiológico da ramulose, uma das doenças fúngicas mais importantes em culturas de algodão no Brasil, causando prejuízos consideráveis. Apesar da ausência de registro de ataque em soja, esse último fungo foi incluído no bioensaio, pois apresenta uma boa resposta nesse tipo de experimento e, também, por ter sido utilizado no ensaio com SnOLP purificada (Campos, comunicação pessoal).

Conforme observado nos testes com a proteína purificada (Campos, comunicação pessoal), SnOLP inibe fortemente o crescimento de *Phytophthora nicotiana* var. *parasítica*. Entretanto, devido a dificuldades técnicas de obtenção de culturas deste fungo, não foi possível realizar o teste com essa espécie. Mesmo não sendo um patógeno da soja (causa podridão de colo e raízes em espécies de *Citrus*), é interessante testá-lo para comparar os dados com os já obtidos com a proteína SnOLP purificada.

O experimento com a ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) também não foi realizado, pois não foram obtidos uredosporos viáveis para a realização dos testes. Esse experimento é de extrema importância. Se a planta transgênica apresentar um aumento de tolerância à ferrugem asiática, teremos uma ferramenta muito promissora para contornar os prejuízos avassaladores que essa moléstia vem causando.

Os resultados obtidos não demonstraram atividade antifúngica da proteína SnOLP contra os fungos *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Fusarium solani* f.sp. *glycines*. Podemos levantar uma série de hipóteses para explicar a ausência dessa atividade:

- (a) Apesar da proteína ter sido detectada na geração T₀, a mesma poderia não estar sendo expressa na geração T₁, devido à metilação ou algum outro mecanismo de silenciamento gênico. A integração das cópias *in tandem*, normal em transformações por biobalística, poderia levar à metilação dos transgenes (Kumar & Fladung, 2001). Mesmo ocorrendo esse processo, a expressão do transgene pode ser restaurada em gerações subsequentes, embora a reversão ocorra com uma frequência bastante pequena e sejam necessárias várias gerações para obtenção de desmetilação total ou parcial do transgene (Finnegan & McElroy, 1994; Deineko *et al.*, 2000). Por outro lado, há evidências de que o silenciamento gênico pode ocorrer de novo em qualquer geração, até mesmo na descendência de plantas que expressam ativamente o transgene (Fu *et al.*, 2000). Isso é uma hipótese para casos em que a presença do transgene é detectada no genoma de plantas transformadas, mas nenhuma ou pequena quantidade de seu produto é sintetizada. Uma vez que a proteína recombinante foi detectada na plantas transgênicas da geração T₀, serão realizados Western blots visando verificar a SnOLP nas plantas T₁, o que confirmaria a expressão do gene, cuja presença foi mostrada por PCR.
- (b) O nível de expressão pode estar muito baixo e com isso a proteína não é produzida em quantidade suficiente para inibir o crescimento dos fungos.

Christensen *et al.* (1992) mostraram que em tecidos não meristemáticos e/ou não estressados, o nível de expressão do promotor da ubiquitina tende a ser baixo. Isso pode ter sido responsável por um baixo nível de expressão de SnOLP. Um ensaio do tipo ELISA deverá ser feito para avaliar a expressão do transgene em plantas transformadas.

- (c) A quantidade de proteína recombinante nos extratos protéicos totais pode ser insuficiente para inibir o crescimento dos micélios dos fungos testados. Liu *et al.* (1994) obtiveram plantas transgênicas de batata superexpressando o gene da osmotina de tabaco, sob controle do promotor 35S, chegando a um nível de 2% do total de proteínas celulares. Os extratos protéicos totais das plantas transformadas, não mostraram resultado positivo em bioensaios semelhantes ao do presente trabalho, o que foi atribuído à baixa taxa de expressão do transgene. Entretanto em testes *in vivo*, essas plantas apresentaram decréscimo nos sintomas da doença após serem inoculadas com *Phytophthora infestans*. Ensaaios com a proteína purificada confirmaram os resultados dos testes *in vivo*. Dados bastante similares foram obtidos por Zhu *et al.* (1995). Com base nesses resultados, pode-se concluir que testes com extratos de proteínas totais, *in vitro*, não são conclusivos para comprovar se plantas transgênicas obtidas apresentam ou não um aumento na tolerância a moléstias fúngicas.
- (d) A proteína SnOLP poderia estar interagindo com algum outro composto, protéico ou não, do extrato feito a partir das folhas. Esse composto poderia estar inibindo a atividade antifúngica através de interações ou mudanças conformacionais na proteína.

6) Conclusões e perspectivas

Os resultados apresentados nesta dissertação incluem a obtenção e caracterização molecular de plantas transgênicas expressando o gene *SnOLP*, a análise do padrão de herança do transgene e um ensaio inicial para testar a atividade antifúngica. As principais conclusões obtidas são as seguintes:

- a) Foram geradas plantas transgênicas de soja, que expressam o gene *SnOLP* de *Solanum nigrum* var. *americanum*;
- b) A herança do transgene seguiu o padrão Mendeliano, para um gene dominante, na linhagem I4 de IAS-5. As progênies das plantas transgênicas de Bragg apresentaram uma segregação excepcional, com deficiência de plantas transformadas;
- c) Resultados preliminares dos bioensaios utilizando extratos protéicos totais não mostraram atividade antifúngica dessas plantas transgênicas.

Este trabalho abre amplas perspectivas para a continuidade do estudo dessas plantas geneticamente modificadas produzidas. Apesar do resultado dos bioensaios não terem sido positivos, ainda será importante testar o efeito do extrato dessas plantas frente a outros fungos *in vitro*. Após essa etapa, testes *in vivo* deverão ser conduzidos, pois esses poderão comprovar a real eficácia dessas plantas frente a fungos fitopatogênicos. A obtenção de plantas homozigotas é indispensável para a realização dos testes, uma vez que garantirá a uniformidade entre plantas descendentes das mesmas. Outras análises

moleculares serão feitas para uma melhor caracterização das plantas transgênicas, visando à determinação do número de cópias e a quantificação da expressão gênica, o que permitirá a resposta de questões não elucidadas completamente neste trabalho.

7) Referências bibliográficas

Abad LR, D'Urzo MP, Liu D, Narasimhan ML, Reuveni M, Zhu JK, Niu X, Singh NK, Hasegawa PM, Bressan RA (1996) Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci* 118: 11-23.

Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, Vasil IK (1996) Integration and expression of the high molecular weight glutenin subunit 1AX1 gene into wheat. *Nat. Biotechnol.* 14: 1155-1159.

Aragão FJL, Sarokin L, Vianna GR, Rech L (2000) Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants at high frequency. *Theoretical And Applied Genetics* 101, n. 1/2: 1-6

Bailey MA, Boerma HR, Parrott WA (1993) Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29: 102-108.

Bodanese-Zanettini MH, Pasquali G (2004) Plantas transgências. In: Mir L (org) *Genômica*. Atheneu, SP, pp 721-734.

Bonato ER (ed.) (2000) *Estresses em soja*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 254p.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Brasileiro ACM, Carneiro VTC (1998) Manual de transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI, pp 75-92.

Bushnell WR, Somers DA, Giroux RW, Szabo LJ, Zeyen RJ (1998) Genetic engineering of disease resistance in cereals. *Can J Plant Pathol* 20 (2): 137-220.

Campbell BT, Baenziger PS, Miltra A, Sato S, Clemente T (2000) Inheritance of multiple transgenes in wheat. *Crop Sci* 40: 1133-1141.

Campos MA, Ribeiro SG, Rigden DJ, Monte DC, Grossi de Sá MF (2002) Putative pathogenesis-related genes within *Solanum nigrum* L. var. *americanum* genome: isolation of two genes coding for PR5-like proteins phylogenetic and sequence analysis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 00: 1-12.

Capelli N, Diogon T, Greppin H, Simon P (1997) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an osmotin-like protein from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 191: 51-56.

Casas AM, Nelson DE, Raghothoma KG, D'Urzo MP, Singh NK, Bressan RA, Hasegawa PM (1992) Expression of osmotin-like genes in the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Plant Physiol.* 99: 329-337.

Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689.

Christou P, Swain WF, Yang NS, 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.

Deineko EV, Novoselya TV, Zagorskaya AA, Filipenko EA, Shumnyi VK (2000) Expression instability of the marker *nptII* gene in transgenic tobacco plants. *Russ J Plant Physiol* 47: 394-399.

Donaldson PA, Simmonds DH (2000) Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. *Plant Cell Rep* 19: 478-484.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.

Droste A, Leite PCP, Pasquali G, Mundstock EC, Bodanese-Zanettini MH (2001) Regeneration of soybean via embryogenic suspension culture. *Sci. Agric.* 58: 753-758.

Droste A, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH (2002) Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. *Euphytica* 127: 367-376.

Embrapa Soja, disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br>> Acesso em novembro de 2006.

Fernando JA, Vieira MLC, Geraldi IO, Appezzato-da-Gloria B (2002) Anatomical study of somatic embryogenesis in *Glycine max* (L.) Merrill. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45: 277-241.

Finer JJ (1988) Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Rep* 7: 238-241.

Finer JJ, McMullen MD (1991) Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell Dev Biol* 27: 175-182.

Finer JJ, Vain P, Jones MW, Mc Mullen MD (1992) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep* 11:323-328.

Finnegan H., McELroy (1994) Transgene inactivation plants fight back! *BioTechnology* 12: 883-888.

Fritig B, Heitz T, Legrand M (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr Opin Immunol* 10: 16-22.

Fu X, Duc LT, Fontana S, Bong BB, Tinjuangjun P, Sudhakar D, Twyman RM, Christou P, Kohli A (2000) Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Res.* 9:11-9.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research.* 50: 151-158.

Grover A, Sahi C, Sanan N, Grover A (1999) Taming abiotic stresses in plants through genetic engineering: current strategies and perspective. *Plant Sci* 143:101-111.

Guo Z, Bonos S, Meyer WA, Day PR, Belanger FC (2004) Transgenic creeping bentgrass with delayed dollar spot symptoms. *Molecular Breeding* 11: 95-101.

Herbers K and Sonnewald U (1999) Production of new/modified proteins in transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol* 10:163-168.

Hinchee MA, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, Fischhoff DA, Re DB, Fraley RT, Horsch RB (1988). Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Biotechnology* 6: 915-922.

Hofmann N, Nelson RL, Korban SS (2004) Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 77: 157-163.

Homrich MS, Passaglia LMP, Pereira JF, Albuquerque ACS, Bertagnolli PF, Cardoso MB, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH (2006) Plantas transgênicas de soja (*Glycine max*) resistentes à lagarta *Anticarsia gemmatalis*. In: IV Congresso Brasileiro de Soja – Resumos. Pág. 52. Londrina, PR.

Hu C–Y, 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.

Hymowitz T (1976) Soybeans *Glycine max* (Leguminosae-Papilionatae). In: Simmonds NW (ed) *Evolution of Crop Plants*. New York, Longman Inc, pp. 159-160.

Jami SK, Swathi Anuradha T, Guruprasad L, Kirti PB (2006) Molecular, biochemical and structural characterization of osmotin-like protein from black nightshade (*Solanum nigrum*). *J Plant Physiol.* 164(3): 238-52.

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.

Kumar S, Fladung M (2001) Controlling transgene integration in plants. *Trends in Plant Science* 6: 155-159.

LaRosa PC, Chen Z, Nelson DE, Singh NK, Hasegawa PM, Bressan RA (1992) Osmotin gene expression is posttranscriptionally regulated. *Plant Physiol.* 100: 409-415.

Liu D, Raghothama KG, Hasegawa PM, Bressan RA (1994) Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 1888-1892.

Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toros JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzunn S, 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, Christou P (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Biotechnology* 6: 923-926.

Melchers LS, Stuiver MH (2000) Novel genes for disease-resistance breeding. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 147-152.

Merkle SA, Parrott WA, Flinn BS (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe T..A. (ed.) In vitro embryogenesis in plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp.155-203.

Meurer CA, Dinkins RD, Redmond CT, McAllister KP, Tucker DT, Wlaker DR, Parrott WA, Trick HN, Essig JS, Frantz HM, Finer JJ, Collins GB (2001) Embryogenic response of multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars across three locations. In Vitro–Plant. 37: 62-67.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

Narasimhan ML, Coca MA, Jin J, Yamauchi T, Ito Y, Kadowaki T, Kim KK, Pardo JM, Damsz B, Hasegawa PM, Yun DJ, Bressan RA (2005) Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. Molecular Cell 17: 171-180.

Neale AD, Wahleithner JA, Lund M, Bonnett HT, Kelly A, Meeks-Wagner DR, Peacock WJ, Dennis ES (1990) Chitinase, β -1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. Plant Cell 2: 673-684.

Newton SS, Duman JG (2000) Na osmotin-like protein cryoprotective protein from the bitter-sweet nightshade *Solanum dulcamara*. Plant Molecular Biology 44: 581-589.

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

Onishi M, Tachi H, Kojima T, Shiraiwa M, Takahara H (2006) Molecular cloning and characterization of a novel salt-inducible gene encoding an acidic isoform of PR-5 protein in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Plant Physiol Biochem.* 44:574-80.

Ouyang B, Chen YH, Li HX, Qian CJ, Huang SL, Ye ZB (2005) Transformation of tomatoes with osmotin and chitinase genes and their resistance to *Fusarium* wilt. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80: 517-522.

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

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

Priolli RHG, Mendes-Junio CT, Arantes NE, Contel EPB (2002) Characterization of Brazilian soybean cultivar using microsatellite markers. *Genet Mol Biol* 25 (2): 185-193.

Punja ZM (2001) Genetic engineering of plantas to enhance resistance to fungal pathogens – a review of progress and future prospects. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 216-235.

Reis EM, Casa RT (2002) Com fungicida, safra tranqüila. *Cultivar*, 35, 32-33.

Sachet R (2003) 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. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 52p.

Salmeron JM, Vernooij B (1998) Transgenic approaches to microbial disease resistance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol* 1: 347-352.

Santarém ER, Finer JJ (1999) Transformation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 35: 451-455.

Santarém ER, Pelissier B, Finer JJ (1997) Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 33: 13-19.

Santos KGB, Mariath JEA, Moço MCC, Bodanese-Zanettini MH (2006) Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.): Ontogeny of somatic embryos. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49: 49-55.

Santos KGB, Mundstock E, Bodanese-Zanettini MH (1997) Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. *Plant Cell Reports* 16: 859-864.

Sato S, Newell C, Kolacz K, Tredo L, Finer JJ, Hinchee M (1993) Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Rep* 12: 408-413.

Shatters RG, Boykin LM, Lapointe SL, Hunter WB, Weathersbee AA (2006) Phylogenetic and Structural Relationships of PR5 Gene Family Reveals an Ancient Multigene Family Conserved in Plants and Select Animal Taxa. *Journal of Molecular Evolution* 63(1):12-29.

Singh NK, Bracker CA, Hasegawa PM, Handa AK, Buckel S, Hermodson MA, Pfankoch E, Regnier FE, Bressan RA (1987) Characterization of osmotin. *Plant. Physiol.* 85: 529-536.

Singh NK, Nelson DE, Kuhn D, Hasegawa PM, Bressan RA (1989) Molecular cloning of osmotin and regulation of expression by ABA and adaptation to low water potential. *Plant. Physiol.* 90: 1096-1101.

Stewart CN, Adang MJ, All JN, Boerma HR, Cardineau G, Tucker D, Parrott WA (1996) Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene. *Plant Physiol.* 112, 121-129.

Suzuki S, Yuyama MM (eds) (2005) Boletim Técnico da soja. Fundação MT, 228p.

Thompson CE, Fernandes CL, Souza ON, Salzano FM, Bonatto SL, Freitas LB (2006) Molecular Modelling of Pathogenesis-related Proteins of Family 5. Cell Biochemistry And Biophysics 44: 385-394.

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, Finer JJ (1998) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. Plant Cell Rep 17: 482-488.

Trick HN, Dinkings RD, Santarém ER, Samoylov V, Meurer CA, Walker DR, Parrott WA, Finer JJ, Collins GB (1997) Recent advances in soybean transformation. Plant Tiss Cult Biotechnol 3: 9-24.

Utiamada CM (2003) Doenças da cultura da soja. Correio Agrícola 2, 2-5.

Van Loon LC, Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology 55: 85-97.

Velazhahan R, Muthukrishnan S (2004) Transgenic tobacco plants constitutively overexpressing a rice thaumatin-like protein (PR-5) show enhanced resistance to *Alternaria alternata*. Biol. plant. 47: 347-354.

Vleeshouwers VGAA, Van Dooijeweert W, Govers F, Kamoun S, Colon LT. 2000. The hypersensitive response is associated with the host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*? Planta 210: 853-864.

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

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

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

Yorinori JT, Morel WP, Frederick RD, Costamilan LM, Bertagnoli PF (2002) Epidemia de ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, em 2001 e 2002. In: XXXV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2002, Recife. Fitopatologia Brasileira. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2002. v. 27. p. S178.

Yuan L, Knauf VC (1997) Modification of plants components. *Current Opinion in Biotechnology* 8:227-233.

Yun DJ, Ibeas JI, Lee H, Coca MA, Narasimhan ML, Uesono Y, Hasegawa PM, Pardo JM, Bressan RA (1998) Osmotin, a Plant Antifungal Protein, Subverts Signal Transduction to Enhance Fungal Cell Susceptibility. *Molecular Cell* v.1: 807-817.

Yun DJ, Zhao Y, Pardo JM, Narasimhan ML, Damsz B, Lee H, Abad LR, D'Urzo MP, Hasegawa PM, Bressan, RA (1997) Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7082–7087.

Zhang Y, Shih DS (2006) Isolation of an osmotin-like protein gene from strawberry and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. *J Plant Physiol.* 2006 164: 68-77.

Zhu B, Chen THH, Li PH (1995) Activation of two osmotin-like protein genes by abiotic stimuli and fungal pathogen in transgenic potato plants. *Plant Physiol.* 108: 929-937.