**AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE REGENERAÇÃO E INFECÇÃO
POR *AGROBACTERIUM* EM GENÓTIPOS DE SOJA SELECIONADOS
PARA ALTO TEOR DE PROTEÍNA**

VICTOR AUGUSTUS MARIN

Biólogo

Orientadora: Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Genética e Melhoramento de
Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Agosto - 1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Marin, Victor Augustus

Avaliação dos processos de regeneração e infecção por *Agrobacterium* em genótipos de soja selecionados para alto teor de proteína / Victor Augustus Marin. - - Piracicaba, 1996.
113p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.
Bibliografia.

1. Soja - Cultura de tecido 2. Soja - Genótipo - Melhoramento 3. Soja - Regeneração
"in vitro" I. Título

CDD 633.34

**AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE REGENERAÇÃO E INFECÇÃO
POR *AGROBACTERIUM* EM GENÓTIPOS DE SOJA SELECIONADOS
PARA ALTO TEOR DE PROTEÍNA**

VICTOR AUGUSTUS MARIN

Aprovada em 01.10.1996

Comissão julgadora:

Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira

ESALQ/USP

Prof. Dr. Isaias Olívio Geraldi

ESALQ/USP

Profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória

ESALQ/USP

Maria Lúcia Carneiro Vieira
Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira
- Orientadora -

Aos meus pais Antonio (*in memoriam*) e Onice

OFEREÇO

À minha esposa Cláudia

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À ESALQ/USP, através do Departamento de Genética, pela possibilidade de realizar o curso de mestrado.

À Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira, pelo apoio, orientação e confiança durante a condução do trabalho.

Ao Dr. Márcio de Castro Silva Filho, do Departamento de Genética da ESALQ/USP e às Dras. Márcia Cristina Furlaneto e Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, UEL, pelos auxílios na condução dos experimentos para transformação do *Agrobacterium*.

Ao Dr. Isaias Olívio Geraldi, do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pelas sementes de soja fornecidas para a realização desta pesquisa e auxílio na execução das análises estatísticas.

Ao Dr. Akihiko Ando, do Setor de Radiogenética, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA, pela permissão da utilização do equipamento fotográfico acoplado à lupa.

Ao Laboratório de Análise de Sementes da ESALQ/USP, pelo armazenamento das sementes de soja.

À bibliotecária Silvana Marchizelli Gregório e à funcionária Aparecida Elisabeth dos Santos da Silva, do Departamento de Genética da ESALQ/USP pela colaboração prestada.

Ao técnico Carlos Alberto de Oliveira e à Lissandra Muzaranho pelo apoio e imprescindível auxílio durante a execução da parte experimental.

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética pelas facilidades proporcionadas no transcorrer da pesquisa.

Aos colegas do Laboratório: Adriana, Alexandre, Cássio, Edna, Gilda, Gustavo, Ilene, Lúcia Hoffman, Lúcia Mayeda, Luciana, Luciano, Maria, Marcelo e Sandro pelo auxílio, apoio e convivência durante todos estes anos.

Aos meus colegas do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de mestrado concedida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Cultura de tecidos.....	3
2.1.1. Embriogênese somática.....	4
2.1.2. Organogênese.....	7
2.1.3. Protoplastos.....	12
2.2. Transformação de soja mediada por <i>Agrobacterium</i>	13
2.2.1. A bactéria	13
2.2.2. O processo de infecção	14
2.2.3. O plasmídeo Ti	16
2.2.4. A função dos genes de virulência	16
2.2.5. Transferência da região-T	18
2.2.6. Vetores para a transformação genética mediada pelo <i>Agrobacterium</i>	20
2.2.7. Histórico da infecção do <i>Agrobacterium tumefaciens</i> em soja	21
2.2.8. Fatores que aumentam a frequência de transformação em soja mediada pelo <i>Agrobacterium</i>	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Materiais biológicos	31
3.1.1. Genótipos de soja	31

3.1.2. Vetor plasmidial	31
3.1.3. <i>Agrobacterium</i>	33
3.2. Métodos	33
3.2.1. Cultura de tecidos	33
3.2.1.1. Indução de organogênese a partir de explantes cotiledonares dos genótipos PI 123439, BR 80-14853 e IAC-Foscarim.....	33
3.2.1.2. Indução de organogênese a partir do nó cotiledonar do genótipo PI 123439.....	35
3.2.1.3. Indução de organogênese a partir dos nós cotiledonares dos genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim.....	37
3.2.1.4. Indução de organogênese a partir dos nós cotiledonares dos genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim.....	38
3.2.1.5. Indução de organogênese a partir do nó cotiledonar do genótipo BR 80-14853.....	39
3.2.2. Testes de tolerância dos genótipos BR 80-14853 e PI 123439 à kanamicina	40
3.2.3. Ensaio para verificar a suscetibilidade dos explantes a claforan (cefotaxima sódica)	41
3.2.4. Ensaio para verificar a suscetibilidade dos explantes a acetosiringone e ao meio APM	42
3.2.5. Infecção dos genótipos BR 80-14853 e PI 123439 pelas linhagens selvagens de <i>Agrobacterium</i>	44
3.2.6. Infecção da petúnia (<i>Petunia hybrida</i> [Mitchell]) por linhagens selvagens de <i>Agrobacterium</i>	45
3.2.7. Verificação da resistência da linhagem GV2260 desarmada ao antibiótico claforan	46
3.2.8. Transformação de <i>Agrobacterium</i>	47

3.2.9. Ensaio de infecção do genótipo BR 80-14853 pela linhagem GV2260 de <i>Agrobacterium</i>	48
3.2.10. Ensaio de infecção do genótipo PI 123439 pela linhagem GV2260 de <i>Agrobacterium</i>	50
3.2.11. Alterações no ensaio de infecção do genótipo BR 80 - 14853 pela linhagem GV2260 de <i>Agrobacterium</i>	51
3.2.12. Análise da expressão transitória dos genótipos BR 80-14853 e PI 123439	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. Cultura de tecidos	54
4.1.1. Indução de organogênese a partir de explantes cotiledonares dos genótipos PI 123439, BR 80-14853 e IAC-Foscarim.....	54
4.1.2. Indução de organogênese a partir do nó cotiledonar do genótipo PI 123439.....	56
4.1.3. Indução de organogênese a partir dos nós cotiledonares dos genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim.....	58
4.1.4. Indução de organogênese a partir dos nós cotiledonares dos genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim.....	59
4.1.5. Indução de organogênese a partir do nó cotiledonar do genótipo BR 80-14853.....	61
4.2. Teste de tolerância dos genótipos BR 80-14853 e PI 123439 à kanamicina	65
4.3. Ensaio para verificar a suscetibilidade dos explantes a claforan (cefotaxima sódica)	69
4.4. Ensaio para verificar a suscetibilidade dos explantes a acetosiringone e ao meio APM	71

4.5. Infecção dos genótipos BR 80-14853 e PI 123439 pelas linhagens selvagens de <i>Agrobacterium</i>	74
4.6. Infecção da petúnia (<i>Petunia hybrida</i> [Mitchell]) por linhagens selvagens de <i>Agrobacterium</i>	75
4.7. Verificação da resistência da linhagem GV2260 desarmada ao antibiótico claforan	75
4.8. Transformação do <i>Agrobacterium</i>	76
4.9. Infecção da linhagem GV2260 de <i>Agrobacterium</i> em explantes derivados de nós cotiledonares do genótipo BR 80-14853..	76
4.10. Infecção da linhagem GV2260 de <i>Agrobacterium</i> em explantes derivados de nós cotiledonares do genótipo PI 123439.....	77
4.11. Alterações no método de infecção, utilizando o genótipo BR 80-14853	78
4.12. Avaliação da atividade do gene da β -glucuronidase na expressão transitória.....	79
5. CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE FIGURAS

1. Plasmídio pEA24	32
2. Formação de gemas no genótipo PI 123439, após 14 dias de cultura em meio MS/2 suplementado com frutose e concentrações variadas de BA (em μM): a) 0,0; b) 0,1; c) 0,5; d) 2,5; e) 5,0 e f) 7,5 (barra = 1,0 mm)	80
3. Formação de gemas no genótipo PI 123439, após 14 dias de cultura em meio MS/2 suplementado com sacarose e concentrações variadas de BA (em μM): a) 0,0; b) 0,1; c) 0,5; d) 2,5; e) 5,0 e f) 7,5 (barra = 1,0 mm)	81
4. Formação de brotos no genótipo BR 80-14853, após 44 dias de cultura em meio MS/2 suplementado com sacarose e duas concentrações de BA (em μM): a) 2,5 e b) 5,0 (barra = 1,0 cm).....	82
5. Formação de brotos no genótipo BR 80-14853, após 44 dias de cultura em meio MS/2 suplementado com frutose e duas concentrações de BA (em μM): a) 2,5 e b) 5,0 (barra = 1,0 cm).....	83
6. Formação de brotos no genótipo IAC-Foscarim, após 44 dias em cultura em meio MS/2 suplementado com frutose e duas concentrações de BA (em μM): a) 2,5 e b) 5,0 (barra = 1,0 cm).....	84
7. Brotos do genótipo BR 80-14853 excisados e enraizados (barra = 1cm).	85
8. a) Aclimatação em casa de vegetação de planta regenerada do genótipo BR 80-14853; b) Planta desenvolvida	86
9. Teste de tolerância a kanamicina para o genótipo PI 123439, após 35 dias de cultura (barra = 1,0 cm).	87
10. Teste de tolerância a kanamicina para o genótipo BR 80-14853,	

após 35 dias de cultura (barra = 1,0 cm).	88
11. Efeito do antibiótico kanamicina (50 µg/ml) em nós cotiledonares do genótipo BR 80-14853, após 35 dias (barra branca = 1cm).	89
12. Nó cotiledonar do genótipo BR 80-14853 infectado com a linhagem GV2260 de <i>Agrobacterium</i> , duas semanas após a inoculação (barra = 1cm).	90
13. a) Expressão transitória do gene GUS observada no genótipo PI 123439; b) Explante controle (barra = 1mm).....	91
14. a) Expressão transitória do gene GUS observada no genótipo BR 80-14853; b) Explante controle (barra = 1mm).....	92

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Componentes utilizados para o teste GUS, com as suas respectivas concentrações	53
2. Resposta <i>in vitro</i> de explantes cotiledonares do genótipo PI 123439, avaliada após 30 dias, na presença de diversas concentrações de BA.....	56
3. Formação de gemas e brotos em culturas desenvolvidas a partir de nós cotiledonares do genótipo PI 123439. Dados não transformados....	62
4. Formação de gemas e brotos em culturas desenvolvidas a partir de nós cotiledonares do genótipo BR 80-14853. Dados não transformados.....	62
5. Formação de gemas e brotos em culturas desenvolvidas a partir de nós cotiledonares do genótipo IAC-Foscarim. Dados não transformados.....	63
6. Análise da variância do número de gemas regeneradas em 4 tratamentos (2,5µMBA + 30gl ⁻¹ frutose; 5,0µMBA + 30gl ⁻¹ frutose; 2,5µMBA + 30gl ⁻¹ sacarose e 5,0µMBA + 30gl ⁻¹ sacarose). Dados transformados para $V_{\bar{x}+1} (1) = GL$ (graus de liberdade) = 20 (PI 123439), 44 (BR 80-14853) e 35 (IAC-Foscarim). F = frutose e S = sacarose.....	63
7. Análise da variância do número de brotos regenerados em 4 tratamentos (2,5µMBA + 30gl ⁻¹ frutose; 5,0µMBA + 30gl ⁻¹ frutose; 2,5µMBA + 30gl ⁻¹ sacarose e 5,0µMBA + 30gl ⁻¹ sacarose). Dados transformados para $V_{\bar{x}+1} (1) = GL$ (graus de liberdade) = 20 (PI 123439), 44 (BR 80-14853) e 35 (IAC-Foscarim). F = frutose e S =	

sacarose.....	64
8. Formação de gemas, brotos e brotos excisados a partir de culturas desenvolvidas a partir de nós cotiledonares do genótipo BR 80-14853. Dados não transformados.	64
9. Análise da variância do número de gemas e brotos regenerados do genótipo BR 80-14853 em 4 tratamentos (2,5µMBA + 30gl ⁻¹ frutose; 5,0µMBA + 30gl ⁻¹ frutose; 2,5µMBA + 30gl ⁻¹ sacarose e 5,0µMBA + 30gl ⁻¹ sacarose). Dados transformados para $\sqrt{Vx+1}$. (1) = GL (graus de liberdade) = 108 (gemas), 108 (brotos) e 108 (brotos excisados). F = frutose e S = sacarose.	65
10. Número médio de gemas formadas ($\pm$ desvio padrão) após 21 dias de exposição dos explantes dos genótipos BR 80-14853 (BR) e PI 123439 (PI) a diversas concentrações do antibiótico kanamicina. Dados não transformados.....	67
11. Quadro da análise de variância dos dados relativos ao número de gemas formadas nas diferentes concentrações de kanamicina, para o genótipo BR 80-14853. Dados transformados para $\sqrt{Vx+1}$	67
12. Teste de Tukey das médias de gemas formadas nas diferentes concentrações de kanamicina do genótipo BR 80-14853. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 1%.....	68
13. Quadro da análise de variância dos dados relativos ao número de gemas formadas nas diferentes concentrações de kanamicina, para o genótipo PI 123439. Dados transformados para $\sqrt{Vx+1}$	68
14. Teste de Tukey das médias de gemas formadas nas diferentes concentrações de kanamicina do genótipo PI 123439. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de	

1%.....	69
15. Médias ($\pm$ desvio padrão) de gemas, após 21 dias de permanência dos explantes dos genótipos BR 80-14853 (BR) e PI 123439 (PI) nas diversas concentrações de claforan (cefotaxima sódica). Dados não transformados.....	70
16. Análise de variância dos dados relativos ao número de gemas formadas nas diferentes concentrações de claforan, para o genótipo PI 123439. Dados transformados para $\sqrt{Vx}+1$	70
17. Análise de variância dos dados relativos ao número de gemas formadas nas diferentes concentrações de claforan, para o genótipo BR 80-14853. Dados transformados para $\sqrt{Vx}+1$	71
18. Número médio de gemas formadas após a passagem dos explantes, dos genótipos BR 80-14853 (BR) e PI 123439 (PI), sob agitação de 160 rpm, por 16 horas, em várias concentrações de acetosiringone e no meio APM. Dados não transformados.....	72
19. Quadro da análise de variância dos dados relativos ao número de gemas formadas nas diferentes concentrações de acetosiringone e do meio APM, para o genótipo BR 80-14853. Dados transformados para $\sqrt{Vx}+1$	73
20. Quadro da análise de variância dos dados relativos ao número de gemas formadas nas diferentes concentrações de acetosiringone e do meio APM, para o genótipo PI 123439. Dados transformados para $\sqrt{Vx}+1$	73
21. Teste de Tukey das médias de gemas formadas nas diferentes concentrações de acetosiringone e do meio APM do genótipo PI 123439. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 1%.....	74

AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE REGENERAÇÃO E INFECÇÃO POR *AGROBACTERIUM* EM GENÓTIPOS DE SOJA SELECIONADOS PARA ALTO TEOR DE PROTEÍNA

Autor: VICTOR AUGUSTUS MARIN

Orientadora: Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

RESUMO

Esta pesquisa teve como principais objetivos o desenvolvimento de um protocolo de regeneração de plantas de soja *in vitro* e a obtenção de tecidos transformados, utilizando-se o *Agrobacterium tumefaciens* como vetor de transformação.

Inicialmente, os objetivos foram direcionados para obter um protocolo de regeneração *in vitro* para três genótipos de soja. Utilizando-se nós-cotiledonares como explantes, inoculados em meio de cultura MS/2 suplementado com 2,5 μ M de BA + 30 g/l de sacarose + 0,7% (p/v) de ágar, obteve-se altas taxas de regeneração e múltipla brotação.

Vencida a etapa da cultura *in vitro*, dois métodos de infecção foram avaliados, usando-se a linhagem GV2260 de *Agrobacterium*. Após ferir os explantes com bisturi, foram feitos dois cocultivos: em meio líquido por 16 h e em meio sólido por 48 h. Este procedimento interferiu drasticamente no processo de regeneração, sendo que apenas 8% dos explantes apresentaram brotos, a maioria, com vitrificação. No segundo método, os explantes foram infectados, na região onde ocorre a regeneração, com uma seringa contendo uma cultura líquida do *Agrobacterium*. Em seguida, procedeu-se o cocultivo em meio sólido por 48 h. Este ensaio mostrou 96% de regeneração com brotação abundante. Nos dois

processos, foi observada a expressão transitória do gene da β -glucuronidase (GUS), usado como reporter na construção do plasmídio.

Fica demonstrado neste trabalho que a utilização do *Agrobacterium* como vetor de transformação de soja independe do método de infecção. Porém, a regeneração de brotos está condicionada à não exposição dos explantes ao cocultivo em meio líquido.

EVALUATION OF INFECTION AND REGENERATION PROCESSES BY *AGROBACTERIUM* IN SOYBEAN GENOTYPES SELECTED FOR HIGH PROTEIN CONTENT

Author: VICTOR AUGUSTUS MARIN

Adviser: Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

SUMMARY

This research had as main aims the development of an protocol for *in vitro* soybean plant regeneration and also to obtain transformed tissues, using *Agrobacterium tumefaciens* as a transformation vector.

At first, the aims were managed to achieve an *in vitro* regeneration protocol for three soybean genotypes. Using cotyledonary node as explants, inoculated in MS/2 medium supplemented with 2,5 μ M BA + 30 g/l sucrose + 0,7% (w/v) agar, multiple shoots and high regeneration rates were achieved.

After the *in vitro* culture procedures, two infection methods were evaluated using *Agrobacterium* GV2260 strain. After injuring the explants with a scalpel, two cocultivates were made: in liquid medium for 16 hours and solid medium for 48 hours. This procedure interferred drastically on the regeneration process, so that only 8% of explants showed shoots, the majority with vitrification. In the second method, the explants were infected on the region where the regeneration occurs with a *Agrobacterium* liquid culture syringe. Thus, the cocultivate in solid medium for 48 hours was performed. This assay showed 96% of regeneration with abundant budding. In both processes it was observed

the transient expression of β -glucuronidase gene (GUS), used as a reporter in the plasmid construction.

This work has shown that the use of *Agrobacterium* as a soybean transformation vector is independent from the infection method. Therefore, shoot regeneration is conditioned to explants non exposition to cocultivate in liquid medium.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma das espécies cultivadas de maior importância no mercado mundial. Em torno de 50 milhões de hectares são plantados anualmente, resultando em mais de 100 milhões de toneladas de grãos. A semente de soja, em média, contém uma alta concentração de proteína e óleo, 40 e 20%, respectivamente (Widholm, 1988 e Christou et al., 1990b).

Muitos esforços têm sido feitos usando-se métodos de melhoramento genético, no sentido de aumentar a produtividade em soja. Assim, os caracteres relacionados com a produtividade sempre receberam atenção especial por parte dos pesquisadores, além de outros relacionados a aspectos agronômicos, tais como altura da planta, acamamento, precocidade, etc. No entanto, caracteres relacionados com a constituição química dos grãos, não têm sido significativamente pesquisados, de modo que a qualidade do óleo, além do teor e qualidade da proteína, têm permanecido praticamente inalterados nos genótipos de soja lançados nos últimos 50 anos (Wilcox, 1989). Certos acréscimos no teor de óleo têm ocorrido visto que este caráter tem correlação positiva com a produção de grãos (Marschalek, 1995).

Portanto, há um grande interesse em se aumentar o teor protéico da semente bem como reduzir a sua deficiência em aminoácidos sulfurados, como a metionina e cisteína.

A base genética da soja cultivada é extremamente pequena, sendo a maioria dos genótipos de soja em uso, derivada de poucas linhas parentais. Como

consequência, para algumas características, os avanços produzidos por programas de melhoramento genético tendem a se tornar limitados. Uma técnica apontada como sendo capaz de auxiliar em determinadas etapas do melhoramento genético da soja é a cultura de tecidos (Goodman & Kiser, 1985 e Roth et al., 1985), sendo esta uma condição básica para a obtenção de plantas transgênicas.

Assim, os objetivos deste trabalho foram o de desenvolver um protocolo de regeneração de plantas de soja *in vitro* e de obter tecidos transformados, usando para isto o *Agrobacterium* como vetor. Este trabalho teve como meta principal otimizar os processos de regeneração de plantas e de infecção de explantes pelo *Agrobacterium*, utilizando como material vegetal, genótipos de soja já selecionados para alto teor de proteína. Esta etapa é fundamental para a introdução de genes exógenos, visando o incremento de aminoácidos, como a metionina, nos grãos de soja.

O fato do gene da albumina 2S ter uma quantidade alta de metionina pode fazer com que este seja um forte candidato para auxiliar no melhoramento de genótipos de soja deficientes em metionina, via tecnologia do DNA recombinante. Este gene foi clonado por Gander et al. (1991) e há interesse em introduzi-lo na soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura de tecidos

Consideráveis esforços têm sido dispendidos durante os últimos trinta anos para regenerar plantas saudias a partir de células e tecidos de soja; entretanto, a soja é uma das espécies mais difíceis de ser manipulada *in vitro*, sendo chamada de recalcitrante por vários pesquisadores (Kerns et al., 1986; Mroginski & Kartha, 1985 e Widholm et al., 1992).

A variabilidade genética do germoplasma da soja cultivada no continente americano é extremamente pequena e a maioria dos genótipos em uso, é derivada de poucas linhas parentais. Como consequência, para algumas características, os avanços obtidos em programas de melhoramento convencionais tendem a se tornar limitados. Paralelamente, um grande esforço tem sido direcionado visando o melhoramento genético de certas características da soja, usando técnicas da engenharia genética. Entretanto, os sucessos com essas pesquisas têm sido limitados, devido à falta de um eficiente sistema de transformação e a inabilidade para regenerar plantas a partir dos tecidos transformados (Christou et al., 1990b; Davey et al., 1988 e Lee & Komatsuda, 1995).

A cultura de células e tecidos vegetais pode gerar uma variabilidade de natureza genética, dita variação somaclonal (Larkin & Scowcroft, 1981). Segundo Specht & Graef (1996) este é um termo que descreve um fenômeno que

ocorre em plantas regeneradas *in vitro*, as quais possuem um fenótipo diferente das plantas doadoras de explantes. Entretanto, este efeito mutagênico da cultura de tecidos é indesejado quando o objetivo é a obtenção de plantas transgênicas, regeneradas a partir de explantes transformados.

Além da soja ser recalcitrante, tem sido demonstrado que culturas de tecidos e células de soja podem ser contaminadas por uma bactéria de cor rosa e crescimento lento, denominada *Methylobacterium mesophilicum* (Holland & Polacco, 1992). Corpe (1985) demonstrou que esta bactéria, frequentemente chamada de PPFM (“pink-pigmented facultative methylotrophic”), pode ser detectada em muitas plantas, incluindo a soja, por pressão das folhas em um meio sólido, contendo metanol como única fonte de carbono.

Holland & Polacco (1992) detectaram a bactéria PPFM em culturas de calos de soja, quando os calos foram homogeneizados e colocados em meio contendo metanol. Por outro lado, Widholm (1996) não detectou a presença dessa bactéria em qualquer uma das culturas. A razão pela não contaminação pela PPFM, pode ser devida a um gás (“chlorine”) usado para a esterilização da semente. O grupo de Widholm detectou PPFMs nas superfícies de folhas de 40 espécies de plantas crescidas em casa de vegetação, incluindo a soja, usando o método de Corpe (1985) de pressão das folhas.

2.1.1. Embriogênese somática

Até 1972, não havia sido relatado sucesso na obtenção de plantas de soja, quer seja a partir da cultura de tecidos, ou da cultura de calos (Kimball & Bingham, 1973). Hoje, tem-se um número razoável de informações que relatam a regeneração de plantas a partir de diferentes tecidos, tanto via organogênese, como via embriogênese somática (Christianson et al., 1983; Ranch et al., 1985;

Lazzeri et al., 1985; Barwale et al., 1986a; Finer & Nagasawa, 1988 e Finer & Mc Mullen, 1991).

Christianson et al. (1983) foram os primeiros a descrever a regeneração via embriogênese somática em soja. Eles descrevem um sistema, no qual o tecido embriogênico foi inicialmente obtido do eixo de embriões zigóticos. Essas culturas embriogênicas proliferaram, mas a repetibilidade do sistema foi baixa e, a origem dos embriões não foi relatada. Posteriormente, estudos histológicos realizados por Finer (1988) mostraram que embriões proliferativos tiveram sua origem superficialmente, com um pequeno número de células contribuindo para a formação do embrião somático. Entretanto, Hartweck et al. (1988) observaram que embriões somáticos de soja nem sempre são derivados da superfície. A origem dos embriões primários (os primeiros embriões derivados do explante inicial) é dependente do tecido do explante e do nível de auxina no meio de indução. Segundo Finer et al. (1996) as culturas embriogênicas também podem ser usadas em experimentos de transformação, se a origem dos embriões for conhecida e as limitações de natureza biológica das culturas embriogênicas forem entendidas. Estas limitações incluem, a dificuldade em se desenvolver culturas embriogênicas proliferativas e problemas com a redução na fertilidade das plantas regeneradas, sendo esses acentuados em culturas prolongadas.

Vários trabalhos usaram embriões zigóticos como fonte de explante na esperança deste material ser responsivo em cultura. Como já foi mencionado, Christianson et al. (1983) foram os primeiros a descrever um sistema de embriogênese somática em soja. Esses pesquisadores usaram os sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), altos níveis de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenóxiacético - 5,0 mg/l) modificando o meio basal, por substituição da fonte de nitrogênio por citrato de amônio. Posteriormente, nenhum tecido friável produziu embriões somáticos. Entretanto, os embriões somáticos, quando transferidos para o meio de Cheng et al. (1980) originaram brotos. Subsequentemente, Lippman & Lippman

(1984) induziram embriões somáticos a partir de cotilédones de embriões imaturos de *Glycine max*, pelo tratamento com 2,4-D. Li et al. (1985) usaram calos derivados de embriões jovens para produzirem uma suspensão a partir da qual células isoladas foram coletadas. A posterior produção de proembriões ocorreu quando as células isoladas foram colocadas em gotas em suspensão, sendo que os proembriões produziram embriões somáticos em meio com BA (6-benzilaminopurina) e IAA (ácido indol acético). As plântulas foram produzidas quando os calos foram colocados em meio líquido, mas não foi relatado se essas plântulas se desenvolveram em plantas adultas.

Um dos trabalhos mais completos sobre embriogênese somática, a partir de explantes de embriões zigóticos de soja, é o de Ranch et al. (1985), que utilizaram explantes cotiledonares oriundos de embriões zigóticos. A concentração de 2,4-D no meio basal MS, teve um efeito significativo na embriogênese. A inclusão de maltose ou glicose como fonte de carbono foi também benéfica para a embriogênese. Os embriões somáticos obtidos foram normais morfológicamente e se desenvolveram em plântulas depois da transferência para meio sem hormônio. A cultura subsequente, em meio contendo IBA (ácido indol butírico), foi benéfica para que as plantas sobrevivessem após transferência para o solo.

Embora o 2,4-D tenha sido usado para estimular a embriogênese a partir de embriões zigóticos, Barwale et al. (1986a) realizaram um trabalho usando 43 μM de NAA (ácido naftaleno acético) em meio suplementado com tiamina e ácido nicotínico, para aumentar a resposta embriogênica. Entretanto, obtiveram regeneração de calos, via organogênese, mas neste caso, a cultura necessitou de 13,3 μM de BA e 0,2 μM de NAA e as concentrações dos sais de MS, foram aumentadas quatro vezes. Desta forma, 54 genótipos mostraram respostas similares.

Lazzeri et al. (1987a) estudaram o efeito do NAA na embriogênese somática de soja e concluíram que esta auxina estimula a embriogênese mais que o 2,4-D, com uma alta proporção de embriões somáticos se assemelhando aos embriões zigóticos. Em experimentos posteriores, Lazzeri et al. (1987b) mostraram que embriões anormais eram mais frequentes em pH baixo e também que a embriogênese somática é inexecutável para aplicações na transformação de soja, visto que é baixa a eficiência de regeneração.

Já Hammat & Davey (1987) obtiveram embriogênese somática a partir de embriões zigóticos, no estágio globular e coração, usando sais do meio B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado com vitaminas, 2% (p/v) de sacarose, 0,1 mg/l de IBA e 10% (v/v) de leite de côco; o meio de cultura foi semi-solidificado com agarose, sendo que os explantes derivados de embriões zigóticos no estágio de coração foram os mais responsivos.

Finer & Nagasawa (1988) obtiveram embriões somáticos a partir de cotilédones imaturos inoculados em meio contendo altos níveis de 2,4-D (40 mg/l), para indução de calos embriogênicos. Embriões somáticos foram formados a partir dos cotilédones excisados, depois de um a dois meses de cultura. Para haver o crescimento da suspensão embriogênica, o nível de 2,4-D foi diminuído para 5 mg/l, sendo mantida essa concentração para a proliferação de embriões. Finer & McMullen (1991) verificaram que a germinação destes embriões pode ser aumentada grandemente pelo uso de uma passagem a seco.

2.1.2. Organogênese

Alguns pesquisadores têm obtido sucesso com a regeneração de plantas de explantes nodais de soja. Cheng et al. (1980) estimularam a múltipla brotação a partir de segmentos do nó-cotiledonar. A germinação das sementes, na presença de BA e IBA, induziu a formação de brotos na região do nó e, a

subsequente cultura dos segmentos nodais destas plântulas, em meio com os mesmos hormônios, promoveu o desenvolvimento de brotos.

Cheng et al. (1980) também observaram que as altas concentrações de BA inibiam o crescimento das gemas dos explantes em cultura, enquanto baixas concentrações, embora menos efetivas para promover a formação de gemas e brotos, permitiram o crescimento normal das gemas. Informações semelhantes foram também obtidas por Saka et al. (1980). Nestes trabalhos, também se verificou que a substituição de frutose por sacarose, como fonte de carbono, promovia o crescimento de gemas.

Kameya & Widholm (1981) regeneraram plantas de explantes hipocotiledonares de *Glycine canescens* e *Glycine tomentella*, sendo que, provavelmente, os brotos surgiram a partir de meristemas apicais pré-existent. Estes autores observaram também que a espécie *Glycine canescens*, possui uma maior capacidade para formar gemas e brotos. Esta observação foi confirmada por Widholm & Rick (1983) que obtiveram brotos de calos e culturas em suspensão de *Glycine canescens*, e por Lazzeri et al. (1986) que utilizaram como fonte de explantes de *Glycine canescens*, gemas florais, tecidos de folhas e de caule, obtendo brotos, que foram enraizados. Culturas de tecidos a partir de hipocótilo de *Glycine soja* foram também conduzidas por Jiang et al. (1986) que obtiveram calos e posteriormente brotos e plântulas.

Ambos, Hymowitz et al. (1986) e Hammatt et al. (1986) trabalharam com um grande número de acessos de uma série de espécies de *Glycine*. Entretanto, somente obtiveram plantas a partir de explantes cotiledonares de um único genótipo de *Glycine clandestina*. Em trabalhos subsequentes, Davey et al. (1988) usando o meio B5, acrescentado de 4,4 μM de BA e 0,025 μM de IBA, para induzir calos a partir de pecíolos, folhas e cotilédones de plântulas, observaram que somente calos nodulares, verdes e sólidos, produziram gemas. Dos cinco acessos avaliados, apenas dois (G1231 e G1145), foram

morfologicamente competentes. As gemas se desenvolveram em brotos após transferência do calo para um meio basal similar, somente reduzindo BA. Os brotos enraizaram em meio livre de hormônios e suplementado com 0,2% (p/v) de carvão ativado. Uma extensão deste trabalho com 30 acessos mostrou que 12 deles, das espécies de *Glycine canescens*, *Glycine falcata*, *Glycine latrobeana* e *Glycine tomentella* foram morfogeneticamente competentes. O acesso G1171 de *Glycine canescens* foi superior, com produção de brotos em mais de 70% das culturas. A regeneração ainda ocorreu, embora numa baixa frequência, quando o hormônio BA foi substituído por 1,0 mg/l de cinetina, ou zeatina. Mais recentemente, se tem demonstrado que este processo de regeneração pode ser também aplicado a *Glycine argyrea* (Kumar et al. 1991), a *Glycine cyrtoloba* - G1418 e *Glycine latrobeana* - G1252 (Jones et al. 1988).

Barwale et al. (1986b) descreveram um sistema de regeneração organogênico que é mais eficiente em termos de número de plantas regeneradas do que a via embriogênica. Eixos embrionários foram excisados de sementes imaturas de soja, de 54 genótipos, removendo-se as folhas primárias e colocando-os em meio MS, no escuro, para ocorrer a regeneração. Este meio contém um alto nível de BA (13,3 μ M), o qual induz múltipla brotação nos genótipos. Depois da incubação por 1 a 2 semanas no escuro, os tecidos foram transferidos para mesmo meio, porém com baixa concentração de BA e colocados sob iluminação para promover o alongamento dos brotos. Meristemas primários e axilares foram induzidos para formar múltiplos brotos e estes foram coletados quando atingiram comprimentos de 0,5 a 1,0 cm. Os brotos foram colocados para enraizar em meio livre do hormônio. Por esse método, se obtém de três a oito brotos por eixo, sendo recomendado em experimentos de transformação de soja, via biobalística, como descrito por McCabe et al. (1988).

Em trabalho realizado na Companhia Monsanto, Wright et al. (1986) demonstraram uma ampla formação de brotos usando um processo similar

ao de Cheng et al. (1980) obtendo entretanto, uma frequência mais alta de brotos (20 brotos produzidos por nó, depois de quatro meses). As sementes foram germinadas em meio MS contendo a metade da concentração recomendada de sais inorgânicos (MS/2) suplementado com 5 μ M de BA. Esta concentração produziu 3,5 vezes mais brotos do que 1 μ M de BA. Após 14 dias, os nós cotiledonares foram excisados e colocados no mesmo meio para estimular a regeneração, sendo feitas seis transferências. Os brotos, apresentando 1 cm de comprimento, foram colocados em meio B5 sem hormônio, para enraizar e então transferidos para casa de vegetação. Neste trabalho, somente as sementes germinadas na presença do hormônio produziam múltiplos brotos; em meio MS/2 com 5 μ M de BA, a fonte de carbono foi considerada irrelevante. Entretanto Saka et al. (1980) descreveu que a frutose foi superior à glicose e à sacarose para promover o crescimento de brotos.

Graybosch et al. (1987) analisaram três genótipos de soja utilizando o método de Wright et al. (1986) e verificaram se a progênie derivada da cultura de tecidos (R_0), apresentava variação somaclonal. Os pesquisadores analisaram a progênie das plantas oriundas da cultura de tecidos (geração R_1) sob condição de campo, não observando variabilidade para acamamento e maturidade, entre sete progênies. Porém, foi detectada pequena variabilidade para produção em duas das 19 progênies quando comparadas aos genótipos controles (sem passar pela cultura de tecidos). Duas das 89 progênies analisadas na geração R_1 mostraram variação genética qualitativa para o caráter esterilidade. Neste trabalho, conclui-se que as células alteradas geneticamente ocorrem com uma baixa frequência. O tempo de cultura (aproximadamente 26 semanas) pode não ter sido suficiente para permitir a acumulação de novas alterações genéticas.

Graybosch et al. (1987) observaram diferenças na resposta dos genótipos no que se refere à produção de brotos e tempo para ocorrer a

regeneração. Barwale et al. (1986b) também observaram consideráveis variações entre 178 linhas de *Glycine max* e *Glycine soja* para a habilidade em regenerar brotos dos nós cotiledonares.

Delzer et al. (1990) utilizando o método de Wright et al. (1986) determinaram a frequência de regeneração em alguns genótipos de soja (dez genótipos de soja, em grupos de maturidade classificados de 00 a II). O número médio de brotos e de plantas regeneradas (brotos que enraizaram) foi 23,2 e 6,2 por nó-cotiledonar, respectivamente. Embora não se tenha detectado diferença significativa para a frequência de formação de brotos por genótipo, o número de plantas regeneradas de cada genótipo diferiu significativamente ($P < 0,01$).

Wright et al. (1987b) utilizaram como fonte de explante folhas primárias oriundas de 27 variedades de *Glycine max*, compreendendo vários grupos de maturidade (00 a VIII). Explantes foliares (2,1 a 4,0 mm em tamanho) oriundos de plantas com cinco dias de idade, produziram brotos em meio com 2,4,5-T (ácido 2,4,5 triclorofenóxiacético) e sulfato de adenina. Adição de BA e picloram ou ácido piroglutâmico estimulou a regeneração; observou-se também que a resposta da regeneração é dependente do tipo de frasco utilizado, sendo que houve desenvolvimento de brotos em tubos de vidro, mas não em placas de Petri de plástico. Foram testados, também como fonte de explante, hipocótilo e raiz de cinco dias de idade, sendo que ambos formaram calos, mas nenhum produziu estruturas regenerativas. Neste trabalho, não foram contadas gemas ou brotos, somente foi avaliado se os explantes apresentavam regeneração ou não.

Wright et al. (1987a) também tiveram sucesso na proliferação de brotos e obtenção de plantas férteis a partir do epicótilo de soja. Sementes foram germinadas em meio MS contendo 5 μ M de BA por 14 dias, sendo os epicótilos removidos em pequenas partes de 7,0 mm, em média. Cada parte foi induzida a formar calos e brotos em meio SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) suplementado

com 5,2 mM de fosfato de amônio monobásico e 74 μ M de 3AP (3-aminopiridina) e 20 μ M de cinetina, por cinco semanas. A proliferação de brotos foi mantida em meio N6 (Chu, 1978) contendo 1,75 mM de sulfato de amônio, 2,1 nM de picloram e 0,1 μ M de BA, sendo os brotos produzidos e enraizados em meio B5 sem reguladores de crescimento. Cada parte do epicótilo produziu de um a tres brotos, sendo que esta proliferação pôde ser mantida indefinidamente, somente transferindo-se mensalmente a cultura para meio fresco. Uma das culturas produziu brotos por 5 anos. É importante notar que uma média de mais de 2000 brotos pode ser obtida, após um período de seis meses de cultura, entretanto, aproximadamente 206 poderiam enraizar e destes, 10 alcançariam a maturidade, isto em decorrência de uma pobre diferenciação vascular.

2.1.3. Protoplastos

A divisão de protoplastos de soja foi descrita há vários anos por Kao et al. (1970) e Miller et al. (1971). Após esses trabalhos, protoplastos foram extensivamente usados em estudos de fusão (Mroginski & Kartha, 1985). Plântulas de soja foram usadas por vários pesquisadores em virtude de ser fácil o isolamento de protoplastos. Calos foram obtidos de protoplastos de raiz (Xu et al., 1982), cotilédone (Hammatt et al., 1987) e de hipocótilo (Newell & Luu, 1985).

Newell & Luu (1985) regeneraram plantas a partir de protoplastos derivados de hipocótilo de *Glycine canescens* e Hammatt et al. (1987), a partir de protoplastos derivados de cotilédone de *Glycine canescens* e *Glycine clandestina*.

Apenas em 1988, Wei & Xu conseguiram regenerar plantas a partir de protoplastos utilizando cotilédones de *Glycine max*. Posteriormente, outros trabalhos também regeneraram plantas a partir de protoplastos de *Glycine max*

(Luo et al., 1990 e Dhir et al., 1991). Entretanto, a reprodutibilidade é baixa e é dependente do genótipo, não sendo possível usar rotineiramente estes protocolos.

2.2. Transformação de soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

2.2.1 A bactéria

O *Agrobacterium* é uma bactéria fitopatogênica do solo, pertencente a família Rhizobiaceae que compreende, entre outros, os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Phyllobacterium*, que são bactérias fixadoras de nitrogênio.

O gênero *Agrobacterium* inclui cinco espécies, que também podem ser agrupadas em três biovars, sendo esta classificação baseada em características fisiológicas, bioquímicas e nutricionais que são determinadas por genes cromossômicos da bactéria, como a temperatura máxima de crescimento ou a aptidão em crescer em determinados meios (Melchers & Hooykaas, 1987). Segundo Otten et al. (1992) a biovar I compreende a maioria das linhagens WHR (“wide host range”) de *A. tumefaciens*, *A. radiobacter* e algumas *A. rhizogenes*. A biovar II inclui a maioria das *A. rhizogenes* e *A. rubi*. A biovar III corresponde a *A. vitis*, anteriormente classificadas como *A. tumefaciens* LHR (“limited host range”) que infectam quase exclusivamente a videira.

A infecção da célula vegetal pelo *Agrobacterium tumefaciens* resulta na doença conhecida como “crown gall disease”, caracterizada pela formação de tumores nos locais da infecção. *A. rhizogenes*, que apresenta características semelhantes às de *A. tumefaciens*, causa a doença conhecida como síndrome das raízes em cabeleira (“hairy root disease”)(Riker, 1930).

As agrobactérias são relativamente comuns em solos cultivados ou não, sendo que a maioria dos isolados não é patogênica. Mesmo em solos onde a incidência da galha é alta, as cepas avirulentas são de 10 a 100 vezes mais

numerosas do que as cepas virulentas. Esses dois tipos de bactérias são geralmente encontrados em estreita associação com as raízes das plantas nas galhas induzidas pelas linhagens virulentas ou no solo adjacente à planta contaminada. São encontradas em todo mundo, entretanto são mais frequentes em regiões de clima temperado. Essa preferência pelos climas amenos está provavelmente ligada à sensibilidade dessas bactérias à alta temperatura (Brasileiro, 1993).

Mais de 643 espécies vegetais são susceptíveis à infecção por *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, sendo a maioria (60%) dicotiledôneas e mais raramente monocotiledôneas e gimnospermas. Embora a sua incidência seja baixa, mesmo entre as dicotilêdoneas, a doença pode tomar proporções devastadoras em certas espécies vegetais, conduzindo a perda quase total da produção (Brasileiro, 1993).

2.2.2. O processo de infecção

O *Agrobacterium* somente infecta a planta, se esta apresentar um ferimento, pois a planta nesta situação irá exudar compostos fenólicos que irão atrair a bactéria para esta região, causando a formação do tumor (Nester et al., 1984). Esta atração ocorre graças a um quimiotactismo positivo da bactéria em relação aos compostos fenólicos exudados e a presença de um a seis flagelos na membrana da bactéria, o que proporciona a sua mobilidade no solo (Brasileiro, 1993).

O segundo passo da infecção é a ligação da bactéria na célula vegetal. Os genes envolvidos nesta ligação estão localizados no cromossomo do *Agrobacterium* e incluem os genes *chvA*, *chvB*, *pscA* (ou *exoC*) e *att*. Mutações nestes locos tornam as bactérias avirulentas à muitas espécies de plantas, como visto por Matthysse (1987). A síntese de fibrilas de celulose pela bactéria vai

favorecer a formação de agregados de células bacterianas ao redor das células vegetais (Matthysse et al., 1981).

Depois da bactéria ter-se agregado à célula vegetal, os compostos fenólicos irão ativar os genes situados na região de virulência (região-*vir*) (Stachel & Nester, 1986). Com a ativação destes genes *vir*, ocorrem alterações na região do T-DNA do plasmídeo Ti, culminando com a sua transferência para a célula da planta (Zambryski et al., 1989). A ativação dos genes *vir* e a transferência da região-T para a célula da planta será detalhada mais adiante.

A interação *Agrobacterium*-célula da planta, é um processo altamente evoluído e tem como finalidade, transformar o tecido da planta em células produtoras de carbono e nitrogênio, que serão utilizados pela bactéria. Para isso, o T-DNA ("transferred DNA") carrega para o genoma da planta genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de opinas e de fitohormônios. Os hormônios vegetais sintetizados, ácido indol acético (uma auxina) e isopentenyl-AMP (uma citocinina), vão induzir um desbalanço hormonal, que tem como consequência uma multiplicação incontrolada das células transformadas, assim como das células vizinhas, resultando na formação do tumor. Este se caracteriza pela produção de opinas, que de acordo com Dessaux et al. (1993) são moléculas simples formadas pela condensação de um aminoácido com um carboidrato.

Baseado no tipo das opinas produzidas no tumor, as agrobactérias são classificadas como linhagens nopalina, octopina, succimanopina, e leucinopina. As opinas formadas nos tumores podem ser metabolizadas somente pelo *Agrobacterium tumefaciens* infectante, não sendo possível ser metabolizado por qualquer outro organismo do solo ou por outro *Agrobacterium*. Então, o *Agrobacterium* cria para si um nicho favorável, pela modificação genética das células da planta, sendo este processo denominado "colonização genética" (Hooykaas & Beijersbergen, 1994). A opina também induz a transferência conjugativa do plasmídeo Ti da linhagem que está fazendo a infecção na planta,

para linhagens que estão presentes no solo, mas que não possuem o plasmídio Ti, ou seja, avirulentas, tornando-as virulentas. Isto faz com que estas infectem as células vegetais que ainda não foram infectadas, demonstrando a importância das opinas no processo de infecção. Essa teoria da utilização da opina como intermediária química do parasitismo é conhecida como o “conceito de opinas” (Brasileiro, 1993).

2.2.3. O plasmídio Ti

Segundo Hooykaas & Beijersbergen (1994), o plasmídio, chamado de Ti, do *Agrobacterium tumefaciens* contém aproximadamente 200 kb, sendo este extra-cromossomal, estando presente na célula bacteriana com um baixo número de cópias, mas podendo ser transferido via conjugação para outra bactéria. Estes autores relatam também que metade do plasmídio Ti é ocupado por três regiões funcionais: região de replicação; região de conjugação e região de catabolismo de opinas. Porém, nenhuma destas regiões é requerida para a transferência dos oncogenes. A outra metade do plasmídio, contém a região-T, a qual possui genes que conferem o caráter tumorogênico nas células da planta e a região de virulência (região-*vir*), que é indispensável para a transferência da região-T.

2.2.4. A função dos genes de virulência

A região-*vir*, está localizada adjacente a fronteira esquerda da região-T, formando um *regulon*, isto é, um conjunto de operons coregulados pelas mesmas proteínas regulatórias e está organizada em oito *operons* ou unidades transcricionais chamadas de *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* e *virH*, com um tamanho de, aproximadamente, 40 kb. Os operons *virA*, *virB*, *virD* e *virG* são

absolutamente essenciais à formação do tumor, em virtude de mutações nestes *operons* eliminarem a sua formação em todas as espécies de plantas, enquanto os *operons* *virC*, *virE*, *virF* e *virH*, influenciam somente na eficiência da transferência da região-T, atenuando a tumorigênese ou na restrição dos hospedeiros da bactéria (Zambryski et al., 1989; Brasileiro, 1993 e Hooykaas & Beijersbergen, 1994).

As etapas do processo de infecção se iniciam com a ativação dos genes *vir* pelos compostos liberados pela célula lesada, que são essencialmente compostos fenólicos e monossacarídeos (Ankenbauer & Nester, 1990).

Endoh et al. (1993) verificaram que para a indução dos genes *vir*, primeiramente são ativadas pelo acetosiringone e açúcar, as proteínas *virA* e *virG*. A proteína *virA* é um “sensor” atuando diretamente ou indiretamente como um receptor para os compostos fenólicos da planta. A proteína *virG* atua como um ativador transcricional dos demais *operons* *vir*, atuando nas regiões promotoras desses operons. Especificamente, a proteína *virG* consegue reconhecer uma sequência de 12 pb (pares de bases), chamada *vir-box*, que está presente nas regiões 5' de todos os operons *vir*, estimulando a transcrição desses genes. Hooykaas & Beijersbergen (1994) relatam que esta é uma proteína citoplasmática, podendo também estar associada com a membrana do *Agrobacterium*. Jin et al. (1990a) demonstraram que a proteína *virA* tem uma atividade de autokinase, resultando em fosforilação no resíduo histidina. O grupo fosfato pode ser transferido diretamente da proteína *virA* para a proteína *virG*, a qual torna-se ativada (Jin et al., 1990b).

A proteína *virA* está localizada na membrana interna do *Agrobacterium*, consistindo de dois domínios, um domínio periplasmático na região do terminal-N, que é o alvo da fosforilação e um domínio citoplasmático na região do terminal-C, o qual irá ativar a proteína *virG* (Melchers et al., 1989).

Vários açúcares atuam sinergicamente com o acetosiringone na indução dos genes *vir* (Ankenbauer & Nester, 1990). Shimoda et al. (1993) verificaram que o produto do gene cromossomal *chvE* é necessário para o aumento na eficiência de indução por açúcares. O domínio periplasmático da proteína *virA* é necessário à indução dos genes *vir*, isto sugerindo que o complexo formado depois da ligação dos monossacarídeos com a proteína *chvE* interage com o domínio periplasmático do *virA*, fazendo com que a proteína *virA* se torne sensível à ativação através dos compostos fenólicos.

Todos os genes do T-DNA, apesar de sua origem procariota, possuem sinais de regulação que podem ser reconhecidos pelo sistema eucarioto vegetal (Brasileiro, 1993).

Uma vez que todos os genes da região *vir* são ativados, se inicia o processo de transferência da região-T para a célula vegetal.

2.2.5. Transferência da região-T

Depois da ativação dos genes *vir*, uma fita única da molécula de DNA (a fita-T) é produzida, ou seja, ocorrem cortes nas fronteiras direita e esquerda, que são sequências repetidas diretas, possuindo 25 pb e são ativas em somente uma orientação (5'→3'). A fronteira direita é essencial para a tumorigênese, mas a fronteira esquerda é dispensável, indicando polaridade do processamento do T-DNA (Zambryski, 1992).

Em adição à fronteira direita, uma segunda sequência chamada “overdrive” é necessária para aumentar a eficiência no processo de transferência (Peralta et al., 1986).

Segundo Hooykaas e Beijersbergen (1994) os cortes são introduzidos em sítios específicos nas fronteiras, isto é, entre a terceira e quarta base. O *operon virD* é o responsável pelo corte no T-DNA, através da produção

das proteínas *virD1* e *virD2*. A proteína *virD1* exibe uma atividade de topoisomerase, que converte o DNA “supercoiled” a um DNA relaxado (Ghai & Das, 1989), permitindo que a proteína *virD2* clive a fita inferior do DNA e esta se ligue na região 5’ do DNA clivado, protegendo esta região de exonucleases no *Agrobacterium* e nas células da planta hospedeira. Esta proteína tem também uma função ativa no movimento da fita-T do *Agrobacterium* em direção às células da planta (Ward & Barnes, 1988).

As proteínas *virD* interagem com uma ou ambas as proteínas codificadas pelo *operon virC* (proteínas *virC1* e *virC2*), ligando-se à região “overdrive” e estimulando de alguma forma a produção da fita-T (Ji et al., 1988).

A fita-T é formada pelo deslocamento da fita inferior do DNA da região-T e pela síntese de uma cópia na direção 5’→3’, dessa mesma fita (Stachel et al., 1986). Segundo Brasileiro (1993), também são necessárias várias outras enzimas para a produção da fita-T, sendo estas codificadas provavelmente por genes do cromossomo bacteriano.

O *operon virE* codifica duas proteínas que, presumivelmente, estabilizam a fita-T. A proteína *virE2* se fixa à fita-T e a protege contra nucleases vegetais. A proteína *virE1* tem a função de aumentar a estabilidade da proteína *virE2* (McBride & Knauf, 1988).

O *operon virB* codifica proteínas que, provavelmente, estão localizadas na membrana do *Agrobacterium*, onde podem formar uma estrutura (*pilus* ou poro) necessária para a transferência da fita-T da bactéria para a célula vegetal (Thorstenson et al., 1993).

De acordo com Hooykaas & Beijersbergen (1994), quando as plantas são infectadas, elas secretam compostos antimicóticos; entretanto, para sobreviver, as agrobactérias através do *operon virH* (formalmente *pinF*) produzem proteínas que tem função de inativação desses compostos, produzidos pela planta ferida, inibindo-os.

A proteína *virF*, um fator de virulência em algumas plantas e, a proteína *virE2*, são ativas na célula da planta. Os mutantes defectivos em *virE* e *virF* podem ser complementados pela produção de proteínas *virE2* e *virF*, respectivamente, em plantas transgênicas; entretanto, não está ainda determinada a função de *virE2* e de *virF* nas células vegetais (Hooykaas e Beijersbergen, 1994).

Estudos de mapeamento genético mostram que as inserções da fita-T são aleatoriamente distribuídas nos cromossomos das plantas. A integração ocorre preferencialmente dentro de locos ativamente transcritos e, uma ou mais cópias do T-DNA podem ser transferidas e integradas. Em alguns casos, as cópias extras têm sido encontradas altamente ligadas umas nas outras, enquanto em outros estudos, elas têm sido encontradas dispersas no genoma da planta. Essas cópias extras estão ligadas em tandem ou numa orientação invertida (Jorgensen et al., 1987).

Segundo Brasileiro (1993), esse sistema de transferência da fita-T de *Agrobacterium* apresenta analogias claras com a conjugação bacteriana. As funções de conjugação de *E. coli*, bem como a origem de transferência (ori T) são análogas às funções em *Agrobacterium*, correspondendo às fronteiras direita e esquerda e ao *operon virD*, respectivamente.

2.2.6. Vetores para a transformação genética mediada pelo *Agrobacterium*

De acordo com Arruda (1993), com base no conhecimento dos mecanismos de transformação mediados pelo *Agrobacterium tumefaciens*, foram desenvolvidos vetores de transformação que carregam genes marcadores, além de conter sítios para a inserção de genes de interesse.

Klee et al. (1987) descreveram que as linhagens de *Agrobacterium* usadas para a introdução de genes em plantas, ou seja, as linhagens ditas

“engenheiradas”, não possuem os oncogenes em seu plasmídio, mas retêm os genes de virulência (região-*vir*), localizados no plasmídio Ti desarmado e os genes do cromossomo bacteriano (*chv*, *pscA* e *att*). Usualmente, essas construções de plasmídios quiméricos possuem promotores de plantas e genes bacterianos que conferem resistência a drogas ou antibióticos, fazendo com que esses marcadores sejam eficientes para a seleção de células ou plantas transformadas.

Os vetores podem ser divididos em dois tipos: cointegrados (sistema *in cis*) nos quais os genes *vir* e o T-DNA modificado estão no mesmo *replicon* (Zambryski et al., 1983) e binário (sistema *in trans*), onde o T-DNA modificado é mantido em um plasmídio distinto do Ti (Hoekema et al., 1983).

De acordo com Lacorte & Mansur (1993), não existem, aparentemente, diferenças entre os sistemas binários ou cointegrados, no entanto, os vetores binários têm sido mais utilizados, pois se obtém um número maior de células contendo este vetor nos experimentos de transformação bacteriana. Além disso, para a construção de vetores cointegrados é necessário que o plasmídio Ti desarmado e o vetor intermediário apresentem regiões de homologia, o que limita o número de linhagens que podem ser utilizadas.

2.2.7. Histórico da infecção do *Agrobacterium tumefaciens* em soja

Segundo Fisk & Dandekar (1993), o grande número de relatos sobre transformação em tecidos vegetais, quando comparado ao baixo número de plantas transgênicas obtidas, está relacionado ao fato que, a dificuldade em se obter plantas transgênicas é devida a inabilidade dos tecidos transformados em sofrer regeneração (Tepfer, 1990; Van Wordragen & Dons, 1992 e Ishida et al., 1996).

O *Agrobacterium* tem sido usado para transformar a soja, porém esta espécie, nos primeiros experimentos, não se mostrou muito suscetível a esta

bactéria, não formando tumores *in vitro*, não tendo sido considerada um hospedeiro para o *A. tumefaciens* (DeCleene & DeLey, 1976; Leemans et al., 1982 e Matthysse & Gurlitz, 1982).

O primeiro experimento de sucesso na indução de tumores em plantas de soja (*Glycine max*) foi reportado por Pedersen et al. (1983). Foram utilizadas três linhagens de *Agrobacterium*, duas do tipo nopalina e uma octopina. Tumores puderam ser induzidos em caule, limbo, pecíolos foliares e raízes em todos os genótipos avaliados, usando-se as três linhagens da bactéria, sendo as inoculações feitas em plantas com quatro a seis semanas e os sítios de inoculação isolados com plásticos, para prevenir a desidratação do ferimento. A transformação foi confirmada pela análise de opinas e hibridação molecular. Foram também obtidas culturas em suspensão dos calos transformados e posteriormente, isolados protoplastos, os quais não se desenvolveram em plantas; entretanto, regeneraram parede, dividiram e formaram calo, sem um suplemento de hormônios exógenos. Em uma extensão deste trabalho, a dinâmica dos hormônios endógenos IAA e citocininas, durante o ciclo de crescimento de células clonadas da galha, foi comparada com calos não transformados de soja. Nos tecidos transformados foram observados altos níveis de zeatina em relação aos níveis do tipo não transformado. Nenhuma diferença nos níveis de acumulação de auxina foi detectada entre os dois tipos de tecido (Wyndaele et al., 1985).

De acordo com Christou (1991) grandes esforços foram direcionados para se verificar a especificidade do *Agrobacterium* com o hospedeiro. Lianzheng et al. (1984) estudaram a interação de 15 linhagens de *Agrobacterium* com 1553 variedades de *Glycine max*, *Glycine soja* e *Glycine gracilis* e observaram que para *G. max*, em 984 variedades, apenas 25 desenvolveram tumores, alguns dos quais produziram nopalina e exibiram hormônio autotrófico. Em estudo similar, Owens & Cress (1985), utilizando

bactérias derivadas de *A. tumefaciens* e cotilédones como fonte de explante, analisaram 24 genótipos de *Glycine max* e três de *G. soja*, para verificar a resposta ao *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*. Baseados no peso dos tumores de oito semanas, depois da infecção com *A. tumefaciens*, três genótipos de *G. max* e um de *G. soja* foram classificados como altamente suscetíveis, dez como moderadamente suscetíveis, 11 como fracamente suscetíveis e dois como não suscetíveis. Dos 26 genótipos inoculados com *A. rhizogenes*, somente sete responderam de uma forma clara à suscetibilidade, por formar raízes pequenas e carnosas nos sítios de infecção internodal. Ambos os grupos demonstraram que células de soja poderiam ser transformadas com *Agrobacterium*; entretanto, não se obteve plantas regeneradas a partir dos tumores transgênicos.

Outros investigadores também relataram resultados de experimentos envolvendo infecção de plântulas com o *Agrobacterium* (Facciotti et al., 1985 e Byrne et al., 1987) e, subsequente descoberta da produção de linhas tumorogênicas, exibindo crescimento independente de hormônios e resistência a kanamicina. Nenhuma destas pesquisas, entretanto, resultou na obtenção de plantas transgênicas.

No trabalho de Byrne et al. (1987), foram utilizadas duas linhagens de *A. tumefaciens* (A208 e A281) e uma de *A. rhizogenes* (C58C1) e vários genótipos de *G. max*, *G. soja* e *G. canescens*. Foi observada a formação de tumor em dois genótipos de *G. soja* inoculados com a linhagem A208, enquanto um genótipo de *G. canescens* mostrou pequena resposta. O genótipo Peking (*G. max*), provou ser um excelente hospedeiro para a infecção com *Agrobacterium*, pois 100% das inoculações com a linhagem A208 resultaram em tumores. Os experimentos posteriores, somente com o genótipo Peking, utilizando várias bactérias do tipo nopalina e octopina, demonstraram que a frequência de tumor nas linhagens nopalina foi de 100%, em contraste com a frequência de tumor usando linhagens octopina, que variou de 27 a 72%. O tamanho do tumor foi

menor do que o dos tumores de nopalina, em todos os casos. Estes resultados sugerem que a maior resposta da soja à infecção do *Agrobacterium* é causada quando o plasmídeo Ti é do tipo nopalina.

Segundo Hood et al. (1987) e Hansen et al. (1994), uma alternativa para aumentar a frequência de formação de tumor e o número de hospedeiros de *Agrobacterium*, envolve o desenvolvimento de linhagens de bactérias altamente virulentas. Entretanto, Faccioli et al. (1985) descreveram que a transformação de células de soja nem sempre resulta na formação do tumor.

Espécies selvagens de *Glycine* parecem ser mais promissoras à transformação. Rech et al. (1988) e Rech et al. (1989), usando *A. rhizogenes* para induzir a formação de raízes em *G. canescens* e *G. clandestina*, obtiveram plantas intactas regeneradas dos tecidos transformados, observando que hipocótilos de plântulas de *G. clandestina* e *G. canescens* foram mais responsivos do que cotilédones após a infecção. A natureza transgênica destas plantas foi confirmada por análise molecular. Infelizmente, numerosas tentativas para utilizar-se as condições de transformação de sojas selvagens, não tiveram sucesso em *G. max* (soja cultivada), a não ser para o genótipo Peking.

No trabalho de Rech et al. (1988), os brotos de *G. canescens* foram regenerados usando-se o meio B5 contendo 10 mg/l de BA e 0,005 mg/l de IBA. Em trabalho mais recente, Jones et al. (1991) descreveram a regeneração de plantas de *G. argyrea*, utilizando *A. rhizogenes*, foi obtida a partir de raízes transformadas, quando cultivadas em meio B5 com 1,1 mg/l de BA e 0,005 mg/l de IBA por 40 a 50 dias para induzir a formação de calos e gemas, seguindo-se uma transferência para um meio de composição similar, mas com BA reduzido para 0,2 mg/l.

O primeiro trabalho descrevendo o sucesso na obtenção de plantas transformadas de soja usando *Agrobacterium tumefaciens* como vetor foi o de Hinchee et al. (1988). O processo usado para regenerar plantas foi a organogênese

e a infecção ocorreu nos cotilédones do genótipo Peking, o qual foi selecionado pela alta suscetibilidade à linhagem A208 de *Agrobacterium*. Os cotilédones inoculados com esta linhagem, mostraram resistência a kanamicina e atividade da β -glucuronidase (GUS). Depois da inoculação, os explantes foram cultivados em meio para indução de brotos contendo kanamicina. As plantas regeneradas foram avaliadas para expressão do gene GUS, três a quatro meses após a inoculação. Aproximadamente 6% dos brotos produzidos nos cotilédones selecionados em kanamicina mostraram-se transformados, com base em ensaios para atividade de GUS. A progênie de duas dessas plantas mostraram segregação do fenótipo resistência a kanamicina e expressão de GUS em uma razão de 3:1, indicando que houve uma inserção única do plasmídeo no genoma da planta. Utilizou-se também neste trabalho outro plasmídeo, que conferia à planta transgênica, resistência a kanamicina e tolerância a glifosato, sendo obtida uma planta transformada. A sua progênie segregou em uma razão de 3:1, para resistência ao antibiótico e tolerância ao glifosato. Para Bond & Gresshoff (1993), a baixa frequência de transformação obtida no trabalho de Hinchey et al. (1988) e a dificuldade de reprodutibilidade em outros laboratórios de pesquisa, têm limitado a aplicação deste sistema em outros genótipos de soja, além do Peking.

Transformantes quiméricos primários de soja foram obtidos usando-se um sistema via embriogênese somática em conjunto com a infecção com *Agrobacterium* por Parrot et al. (1989). Os tecidos derivados de cotilédones imaturos foram cocultivados com *Agrobacterium* carregando um gene que codifica para a zeína de 15KD. O DNA extraído de folhas de plantas regeneradas foi hibridizado com uma sonda de RNA sintético, específico para a sequência do gene da zeína. Entretanto, nenhuma progênie transformada foi obtida de qualquer um dos transformantes primários putativos. Os autores atribuíram que devido à origem multicelular dos embriões somáticos em soja, as plantas regeneradas

foram quiméricas e não ocorreu transformação nas células das linhas germinativas (Parrot et al, 1989).

Para Christou (1991), trabalhos adicionais envolvendo a infecção de sementes em germinação de soja na presença do *Agrobacterium* ou a microinjeção de DNA em ovário de soja, não demonstraram convincentemente a integração estável do DNA exógeno no genoma da planta. Em ambos os casos, a hibridização e a PCR foram evidências primárias da transformação estável. Devem ser efetuados testes moleculares ("Southern blots") para confirmar a integração e posteriormente observar se houve segregação mendeliana na progênie R₂. Esses dados adicionais são essenciais para confirmar a transformação estável.

No trabalho de Chee et al. (1989), foram inoculados plúmulas, nós e tecidos cotiledonares adjacentes em sementes em germinação com o *Agrobacterium tumefaciens*. A resistência a kanamicina foi detectada em 16 plantas de soja que mostraram alguma expressão do DNA introduzido. Foi obtida uma frequência de transformação primária de 0,7% (16 plantas transformadas de um total de 2200 plantas R₀) e cerca de 1/10 dessas plantas produziu progênes R₁ transformadas. Para Finer et al. (1996) este método evita a inclusão de etapas de cultura de tecidos, mas a baixa frequência de transformação do sistema torna-o não prático para muitas aplicações.

Protoplastos de soja podem ser efetivamente transformados usando-se processos rotineiros. Vários grupos relataram independentemente, a obtenção de calos transformados pela introdução do DNA em protoplastos de soja. A eficiência da eletroporação (Christou et al., 1987; Lin et al., 1987 e Widholm et al., 1992) ou o do cocultivo com *Agrobacterium* (Baltes et al., 1987) foram demonstrados. Houve expressão dos genes *nrpII*, *CAT* ou de síntese de nopalina. Entretanto, nenhuma planta foi obtida e a regeneração a partir de protoplastos transformados ainda é uma barreira para a obtenção de plantas de soja transgênicas.

Para a transformação de protoplastos de soja, é importante selecionar variedades que sejam suscetíveis ao *Agrobacterium* e que a cultura de protoplastos tenha a capacidade de regenerar plantas a partir de calos ou tecidos transformados. Entretanto, estes problemas não afetam espécies selvagens de *Glycine*, por razões ainda não bem esclarecidas (Newell & Luu, 1985 e Hammatt et al., 1987)

Outro método de transformação de plantas é chamado biobalística e foi descrito por Sanford (1988). Plantas de soja têm sido obtidas pelo uso do bombardeamento de partículas usando-se eixos embrionários (Christou 1990a; Christou 1990b e McCabe et al., 1988) ou suspensão embriogênica (Finer & McMullen, 1991; Finer & Nagasawa, 1988; Sato et al., 1993 e Parrot et al., 1994).

A maioria das plantas transformadas, obtida pelo bombardeamento de eixos embrionários, foi quimérica para a expressão dos genes, devido a natureza do tecido utilizado como alvo e o método para a proliferação e regeneração. Entretanto, as plantas obtidas a partir da cultura de tecidos (plantas R_0), mesmo sendo quiméricas, podem produzir progênies R_1 e R_2 , que segregam de maneira mendeliana, demonstrando a integração do DNA em tecidos germinativos (McCabe et al., 1988).

Segundo Finer et al. (1996), o bombardeamento em culturas de suspensão embriogênica é mais eficiente para a transformação, em virtude da ocorrência da proliferação de tecidos na superfície de embriões somáticos, sendo estes facilmente atingidos pelo bombardeamento. Contudo, há alguns problemas com este sistema, relacionados com a cultura de tecidos, que são: o esforço requerido para o estabelecimento da cultura *in vitro* e dependendo do tempo da cultura, as plantas regeneradas podem apresentar variações, como esterilidade parcial ou completa.

2.2.8. Fatores que aumentam a frequência de transformação em soja mediada pelo *Agrobacterium*

Muitos fatores podem influenciar na virulência bacteriana e consequentemente, no aumento da frequência de transformação de plantas.

Vários experimentos têm demonstrado que para uma efetiva expressão dos genes *vir*, são necessários um meio com pH<5,7 (Stachel et al., 1985 e Bolton et al., 1986), uma fonte de carbono, como sacarose (Alt-Moerbe et al., 1988) e uma temperatura abaixo de 30 °C (Stachel et al., 1985) durante o cocultivo.

Owens & Smigocki (1988) observaram que a presença de acetosiringone (10 µM) ou siringaldeído (1 µM), dois compostos fenólicos, no processo de infecção foi um estímulo para a formação de galhas em cotilédones de *G. max*, genótipo Peking, quando foi utilizada a linhagem A348 de *A. tumefaciens*, carregando genes *vir* do tipo octopina. Entretanto, quando foi utilizada a linhagem A281, carregando genes *vir* do tipo L,L-succimanopina, isso não ocorreu. Pode-se especular que alguns tecidos de soja secretam quantidades sub ótimas de moléculas sinal para ativar os genes *vir* da linhagem A281. Como suporte para este trabalho, Jin et al. (1987) descreveram que vários genes *vir* da linhagem A348 são de fato expressos em níveis mais altos em resposta à acetosiringone que os mesmos genes em A281.

Byrne et al. (1987) reportaram que os genótipos de soja Corsoy 79 não responderam à qualquer infecção por linhagens de *A. tumefaciens* enquanto o genótipo Peking não respondeu à linhagem A281; entretanto, nos estudos de Delzer et al. (1990), tanto Corsoy 79 como Peking formaram tumores em resposta às linhagens de *A. tumefaciens* avaliadas (C58, A208 e A281). Esta diferença pode ser devido à adição de 20 µM de acetosiringone no inóculo da bactéria por

Delzer et al. (1990) embora, esta adição não elimine completamente a variação genotípica à suscetibilidade. Também é possível que diferentes tecidos variem em suscetibilidade ao *A. tumefaciens*, indicando que são necessários testes para se determinar a sua suscetibilidade.

Chang & Chan (1991) demonstraram que o conteúdo de compostos fenólicos em batata ou tabaco foi dez vezes maior que em soja (*G. max* - genótipo ADOC) e a quantidade do composto liberado foi diferente em vários tecidos. A adição de uma cultura em suspensão de batata ao meio usado para a infecção de cotilédones de soja, aumentou a frequência de transformação para 64%, enquanto os controles tinham somente 3,3%. A adição de 200 μ M de acetosiringone na solução também aumentou a frequência de transformação para 35,5%. Esses resultados demonstraram que compostos fenólicos naturais, presentes em culturas em suspensão da batata, podem efetivamente induzir a expressão dos genes *vir*.

Utilizando três linhagens de *A. tumefaciens* (A281, Ach5 e N2/73) Godwin et al. (1991) verificaram a eficiência de transformação em pH = 5,2; 5,5 e 5,8 com e sem a presença de acetosiringone em folhas de soja (*G. max* - genótipo não conhecido). Não se obteve nenhum tumor com a linhagem Ach5 (octopina), em qualquer pH. A presença de 200 μ M de acetosiringone no cocultivo, aumentou em muito a virulência das linhagens N2/73 (nopalina) e A281 (L,L-succimanopina) em todos os pHs avaliados. Isto foi mais marcante com a A281, a qual induziu tumorogênese em somente um explante na ausência de acetosiringone, enquanto cinco a nove explantes formaram tumores depois do cocultivo na presença de acetosiringone. Os autores observaram também, que a adição de BA no meio de cocultivo aumentou significativamente a subsequente tumorogênese em tabaco. Isto foi demonstrado posteriormente por Lee & Komatsuda (1994) que compararam dois sistemas de regeneração, com diferentes vetores desarmados e genótipos de soja. Neste experimento, os tecidos que

regeneraram por organogênese possuem maior capacidade de transformação genética que aqueles derivados do processo de embriogênese somática.

O genótipo Peking 501 apresentou 5,4% de transformação quando se utilizou a via embriogênica para obter-se regeneração e 12,23%, no processo de organogênese. O genótipo Bominori mostrou 0,0% de transformação na via embriogênica e 4,0% na organogênica.

Em experimento subsequente, Lee & Komatsuda (1995) analisaram o efeito da concentração da bactéria na transformação, observando que a tumorogênese é baixa a 5×10^4 células formadoras de colônia (c.f.c.)/ml, aumentando significativamente no máximo de 5×10^6 c.f.c./ml e diminuindo em altas concentrações, isto é, 5×10^8 a 5×10^{10} c.f.c./ml nas duas linhagens bacterianas avaliadas (A208 e A281). Em todos os pHs testados (5,0; 5,5; 5,8; 6,5 e 7,0), a presença de acetosiringone no cocultivo afetou a virulência da A208 e A281. A concentração de 40 μ M de acetosiringone foi a mais adequada, sendo que altas concentrações (300 μ M) diminuíram a virulência do *A. tumefaciens* criticamente. Obteve-se uma melhor frequência em pH baixo, o ótimo valor foi 5,8, em uma concentração de 40 μ M de acetosiringone, o que resultou em uma maior eficiência de transformação. Os pHs acima de 5,8 reduziram a tumorogênese. Estes autores verificaram também que o sistema de regeneração de plantas que inclui BA como fonte de fitohormônio, foi essencial para uma efetiva transformação genética em soja.

Com base na revisão apresentada sobre cultura de tecidos e transformação genética da soja, percebe-se que há necessidade de se dar continuidade a estes estudos de tal forma a obter protocolos eficientes de regeneração de planta e de infecção por *A. tumefaciens*, visando utilizá-los em experimentos de transformação estável de genótipos de soja, de interesse agronômico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais biológicos

3.1.1. Genótipos de soja

Inicialmente foram utilizados três genótipos de soja: BR 80-14853, PI 123439 e IAC-Foscarim; no entanto, apenas os dois primeiros genótipos foram efetivamente usados para a regeneração de plantas e infecção com o *Agrobacterium*, pois os explantes do genótipo IAC-Foscarim apresentaram regeneração de brotos severamente vitrificados.

Estes genótipos de soja possuem um alto teor de proteína na semente e, foram cedidos pelo Prof. Isaías Olívio Geraldi, do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

3.1.2. Vetor plasmidial

O plasmídio utilizado para a transformação do *Agrobacterium* foi cedido pela pesquisadora Elionor Rita Pereira de Almeida, da EMBRAPA/CENARGEN, sendo que este vetor binário possui o gene quimérico construído a partir do gene BE2S1 da proteína de reserva da castanha do Pará, que confere um aumento de aproximadamente 18% no teor de metionina e 8% no teor de cisteína.

Segundo Gander et al. (1991), essa construção contém sequências de terminação do próprio gene sob o controle do 35S-35S, que é o promotor 35S do CaMV (vírus do mosaico da couve-flor) duplicado e seguido da sequência “leader” (sequência do RNA à frente do códon ATG de iniciação da tradução) do AMV (vírus do mosaico da alfafa), que aumenta a eficiência da tradução. Esse gene quimérico deve se expressar em todas as células da planta. A construção desse gene foi denominada pEA 24.

O vetor binário pEA24 (Figura 1) carrega o gene “reporter” GUS sob o controle do promotor 35S, o marcador de seleção *nptII* (neomicina fosfotransferase II), que confere à planta transformada resistência ao antibiótico kanamicina além dos genes de resistência à estreptomicina (300 µg/ml) e espectinomicina (100 µg/ml) em *Escherichia coli* e *Agrobacterium*.

Figura 1. Plasmídeo pEA24. Legenda: RB e LB - Bordas direita e esquerda do T-DNA, GUS - gene *uidA* da β -glucuronidase, 35S - promotor 35S do CaMV, BNG - gene BE2S1 da proteína de reserva 2S da castanha do Pará, 35S-35S AMV - promotor 35S duplicado e seguido da “leader” do vírus do mosaico da alfafa, *Pnos* - promotor da nopalina sintase e *nptII* - gene da neomicina fosfotransferase II.

3.1.3. *Agrobacterium*

Foram utilizadas três linhagens selvagens de *Agrobacterium tumefaciens*: A208, C58 e B6S3 e três de *Agrobacterium rhizogenes*: 8196, A4 e A4T para a infecção dos genótipos BR 80-14853 e PI 123439. Estas linhagens de *Agrobacterium* foram cedidas pela Universidade de Nottingham, Inglaterra.

Além destas linhagens selvagens, também foi utilizada a linhagem GV2260 da espécie *Agrobacterium tumefaciens*, sendo esta caracterizada como uma linhagem desarmada (sem os oncogenes na região do T-DNA), com resistência cromossomal ao antibiótico rifampicina (50 µg/ml) e com resistência plasmidial ao antibiótico carbenecilina (100 µg/ml). Esta linhagem foi cedida pela Profa. Suzeley de Castro França, da UNAERP, de Ribeirão Preto, SP.

Todas as linhagens foram mantidas em refrigerador (4°C), em placas de Petri, contendo 20 ml de meio APM sólido (Tepfer & Casse-Delbart, 1987), sendo este composto por: extrato de levedura - 5g/l; (NH₄)₂SO₄ - 2g/l; NaCl - 5g/l; caseína hidrolizada -0,5g/l; manitol -8g/l e bacto-ágar -15g/l. O pH do meio foi ajustado para 6,6, com solução 1M de NaOH, antes da autoclavagem.

3.2. Métodos

3.2.1. Cultura de tecidos

3.2.1.1. Indução de organogênese a partir de explantes cotiledonares dos genótipos PI 123439, BR 80-14853 e IAC-Foscarim

Este experimento foi baseado no protocolo de Hinchey et al. (1988). As sementes dos genótipos PI 123439, BR 80-14853 e IAC-Foscarim foram

lavadas em água corrente e esterilizadas em etanol 70% (v/v), por 40 segundos e, em hipoclorito de sódio 2% (v/v) contendo 0,02% (v/v) de Tween 80, por 20 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas em água destilada, deionizada e esterilizada, sendo então colocadas para germinar em 20 ml de meio MS sólido (ágar 0,7%, p/v), com 1/6 da sua concentração original e livre de hormônios. Foram usados frascos de 5 x 10 cm, com capacidade de 250 ml, os quais foram autoclavados (120°C, 1 atm, 20 minutos) e mantidos após a inoculação das sementes sob $30 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de radiação luminosa (16 horas de luz) e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para o genótipo PI 123439, a indução de organogênese a partir de explantes cotiledonares foi efetuada em dois experimentos. No primeiro experimento, 300 sementes deste genótipo foram colocadas para germinar. Após 14 dias da instalação, os cotilédones foram excisados e inoculados em meio B5, abaxial e adaxialmente, com diversas concentrações do hormônio BA (6-benzilaminopurina - Sigma): 0; 0,1; 0,5; 2,5; 5,0 e 7,5 μM .

Passados 30 dias da inoculação, os explantes foram avaliados e transferidos para meio B5 sem hormônios, visando a indução de brotos.

Para cada concentração de hormônio, foram utilizados 15 explantes cotiledonares, sendo avaliada a porcentagem de raízes e de calos formados.

No segundo experimento, 200 sementes do genótipo PI 123439 foram colocadas para germinar durante 10 dias. Depois deste período, 60 cotilédones foram excisados e colocados em meio B5 + 5 μM BA, abaxial e adaxialmente e, após 4 semanas, foram transferidos para meio B5 sem hormônios. Estas alterações foram efetuadas em função dos resultados obtidos no primeiro experimento.

Para os genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim, a indução de organogênese a partir de explantes cotiledonares foi efetuada seguindo o mesmo

protocolo utilizado no segundo experimento do genótipo PI 123439. No entanto, para os genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim, foram colocadas 300 sementes para germinar.

3.2.1.2. Indução de organogênese a partir do nó cotiledonar do genótipo PI 123439

A indução de organogênese a partir de nós cotiledonares foi baseada no protocolo de Wright et al. (1986) e foi utilizada para todos os genótipos (PI 123439, BR 80-14853 e IAC-Foscarim).

Neste experimento, 600 sementes do genótipo PI 123439 foram esterilizadas conforme a descrição apresentada no item 3.2.1.1. e, em seguida, foram colocadas para germinar em meio MS contendo a metade da sua concentração original (MS/2), solidificado com 0,15% (p/v) de Phytigel (Sigma) e suplementado com BA nas concentrações: 0; 0,1; 0,5; 2,5; 5,0 e 7,5 μ M.

Após 14 dias da instalação, os nós cotiledonares foram excisados das plântulas. O epicótilo foi removido a uma distância de 2 a 3 mm do nó; o hipocótilo e qualquer broto axilar foi cortado rente ao nó; os cotilédones foram removidos a uma distância de 5 mm do nó e, o segmento nodal ficou com um tamanho de 0,5 a 1,0 cm.

Após 7 dias de cultura, para cada concentração de hormônio BA, foram utilizados 12 nós cotiledonares, sendo que seis nós foram colocados em meio de cultura suplementado com sacarose e, os outros seis nós, em meio de cultura suplementado com frutose.

Ao final de duas semanas de cultura em meio suplementado com frutose ou sacarose, foi contado o número de gemas e de brotos (considerados com um tamanho superior a 5 mm) e, em seguida, os nós cotiledonares foram

cortados ao meio e transferidos para meio fresco, cujo procedimento foi denominado de primeira transferência.

Passados 28 dias da primeira transferência, novamente foi contado o número de brotos e, em seguida, os nós cotiledonares foram transferidos para meio fresco, cujo procedimento foi denominado de segunda transferência.

Após 28 dias da segunda transferência, repetiu-se o mesmo procedimento e transferiu-se os nós cotiledonares para meio fresco na ausência do hormônio BA, cujo procedimento foi denominado de terceira transferência. A quarta transferência (última transferência) foi realizada depois de 28 dias.

Foram obtidos, das concentrações 2,5 μ M BA + frutose, 2,5 μ M BA + sacarose, 5,0 μ M BA + frutose e 5,0 μ M BA + sacarose, o número médio de gemas e brotos formados, somando-se o número de gemas e brotos de cada nó cotiledonar, e dividindo-se pelo número total de nós cotiledonares. Isto foi efetuado para cada concentração de hormônio combinada com uma das fontes de carbono.

Em cada transferência, foram excisados os brotos que apresentavam um comprimento maior que 2 cm. Estes foram colocados em frascos de 2,5 x 8,5 cm, com capacidade de 30 ml, contendo 10 ml de meio B5 sem a presença de hormônio, visando o seu enraizamento e alongamento.

Após o enraizamento, as plantas regeneradas do genótipo PI 123439 foram transferidas para a casa de vegetação, mediante tratamento de aclimação. Para isso, as plantas foram retiradas do meio de cultura e transferidas para copos plásticos com capacidade de 300 ml, contendo substrato Plantmax (Agrocères) e base perfurada. Os copos plásticos foram cobertos com sacos plásticos transparentes e perfurados, durante 4 dias. Após este período, estes sacos foram retirados.

As plantas foram regadas, borrifadas com água destilada e mantidas no substrato até apresentarem um bom enraizamento. Em seguida, foram transferidas para vasos com capacidade de 20 litros, contendo uma mistura de terra e composto orgânico na proporção de 2:1, respectivamente.

A instalação deste experimento obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 concentrações de hormônio (2,5 μ M BA e 5,0 μ M BA) x 2 fontes de carbono (sacarose e frutose), com 6 repetições (6 nós cotiledonares), para o genótipo PI 123439. Foram avaliados os efeitos das concentrações hormonais dentro das fontes de carbono. Os dados obtidos neste experimento foram transformados em valores $\sqrt{x} + 1$ para efeito de análise estatística. Para a comparação de médias, foi efetuado o Teste de Tukey.

3.2.1.3. Indução de organogênese a partir dos nós cotiledonares dos genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim

Neste experimento, foi realizada a indução de organogênese a partir de nós cotiledonares, utilizando-se sementes dos genótipos IAC-Foscarim e BR 80-14853, seguindo-se os mesmos procedimentos do experimento que utilizou o genótipo PI 123439 (3.2.1.2.). Assim, 600 sementes dos genótipos IAC-Foscarim e BR 80-14853 foram esterilizadas conforme a descrição apresentada no item 3.2.1.1. e, os nós cotiledonares transferidos para meio de cultura com as mesmas concentrações de hormônio BA : 0; 0,1; 0,5; 2,5; 5,0 e 7,5 μ M.

No entanto, foi observado neste experimento, alta incidência de contaminação por microrganismos, não sendo efetuadas as análises estatísticas. Desta forma, foram efetuados novos experimentos.

3.2.1.4. Indução de organogênese a partir dos nós cotiledonares dos genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim

Neste experimento, a indução de organogênese a partir de nós cotiledonares, utilizando-se sementes dos genótipos IAC-Foscarim e BR 80-14853, foi avaliada em meio de cultura contendo somente duas concentrações de hormônio BA: 2,5 e 5,0 μM . Assim, foram realizadas quatro transferências dos nós cotiledonares para meio fresco visando avaliar a resposta à fonte de carbono (sacarose e frutose), como realizado para o genótipo PI 123439 (3.2.1.2.). No entanto, o hormônio BA foi retirado do meio de cultura, no momento em que os nós cotiledonares foram cortados e transferidos para meio fresco, sendo denominada esta etapa de primeira transferência. No experimento utilizando-se o genótipo PI 123439 (3.2.1.2.), o hormônio BA foi retirado na terceira transferência.

Foram obtidos, das concentrações 2,5 μM BA + frutose, 2,5 μM BA + sacarose, 5,0 μM BA + frutose e 5,0 μM BA + sacarose, o número médio de gemas e brotos formados, somando-se o número de gemas e brotos de cada nó cotiledonar e dividindo-se o resultado pelo número total de nós cotiledonares. Isto foi efetuado para cada concentração de hormônio combinada com uma das fontes de carbono e para cada um dos genótipos.

Para o genótipo BR 80-14853 foram colocados 12 nós no meio com 2,5 μM BA + frutose, 11 nós no meio com 2,5 μM BA + sacarose, 13 nós no meio com 5,0 μM BA + frutose e 12 nós no meio com 5,0 μM BA + sacarose. Para o genótipo IAC-Foscarim foram colocados 10 nós no meio com 2,5 μM BA + frutose, 13 nós no meio com 2,5 μM BA + sacarose, 9 nós no meio com 5,0 μM BA + frutose e 7 nós no meio com 5,0 μM BA + sacarose.

O procedimento estatístico obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 concentrações de hormônio (2,5 μM BA e 5,0 μM BA) x 2 fontes de carbono (sacarose e frutose), com diferente número de repetições (nós cotiledonares) entre os tratamentos, nos genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim. Foram avaliados os efeitos das concentrações hormonais dentro das fontes de carbono. Os dados obtidos neste experimento foram transformados em valores $\sqrt{x} + 1$ para efeito de análise estatística. Para a comparação de médias, foi efetuado o Teste de Tukey.

3.2.1.5. Indução de organogênese a partir do nó cotiledonar do genótipo BR 80-14853

Em decorrência do alto valor obtido para o coeficiente de variação no experimento descrito no item 3.2.1.4., quando foi utilizado o genótipo BR 80-14853, novamente 600 sementes deste genótipo foram colocadas para germinar. Neste experimento, utilizou-se apenas as concentrações de 2,5 e 5,0 μM BA e as duas fontes de carbono. Foi usado um número maior de nós cotiledonares, na tentativa de diminuir o valor do coeficiente de variação. O phytigel foi substituído por ágar 0,7% (p/v), em virtude da observação de que o phytigel pode causar uma maior vitrificação nos brotos regenerados.

Foram colocados 25 nós no meio com 2,5 μM BA + frutose, 23 nós no meio com 2,5 μM BA + sacarose, 31 nós no meio com 5,0 μM BA + frutose e 33 nós no meio com 5,0 μM BA + sacarose.

Foram obtidos, das concentrações 2,5 μM BA + frutose, 2,5 μM BA + sacarose, 5,0 μM BA + frutose e 5,0 μM BA + sacarose, o número médio de gemas, brotos e brotos excisados formados, somando-se o número de gemas, brotos e brotos excisados de cada nó cotiledonar e dividindo-se o resultado pelo

número total de nós cotiledonares. Isto foi efetuado para cada concentração de hormônio combinada com uma das fontes de carbono.

A instalação deste experimento obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 concentrações de hormônio (2,5 μ M BA e 5,0 μ M BA) x 2 fontes de carbono (sacarose e frutose), com diferente número de repetições (nós cotiledonares) entre os tratamentos do genótipo BR 80-14853. Foram avaliados os efeitos das concentrações hormonais dentro das fontes de carbono. Os dados obtidos neste experimento foram transformados em valores $\sqrt{x} + 1$ para efeito de análise estatística. Para a comparação de médias, foi efetuado o Teste de Tukey.

3.2.2. Testes de tolerância dos genótipos BR 80-14853 e PI 123439 à kanamicina

Logo após 14 dias da germinação das sementes dos genótipos BR 80-14853 e PI 123439 em meio MS/2 + 2,5 μ M BA + sacarose 30 g/l + ágar 0,7% (p/v), os nós cotiledonares foram excisados das plântulas e colocados no mesmo meio, acrescido do antibiótico kanamicina.

Esse antibiótico, assim como o hormônio BA, foi acrescentado ao meio de cultura após a autoclavagem.

Em todos os experimentos, o antibiótico kanamicina (solução estoque 100 mg/5 ml) foi diluído em água destilada e deionizada, sendo que a solução foi esterilizada em filtro de 0,22 μ M (Millipore). O hormônio BA (solução estoque 10 mg/10 ml) foi preparado da mesma forma.

Para cada genótipo, foram avaliados as várias concentrações de kanamicina: 0, 50, 100, 200 e 300 μ g/ml. Foram usados 21 explantes para cada concentração do antibiótico.

O meio (250 ml) foi colocado em erlenmeyers com capacidade de 1 litro. Após a autoclavagem, o hormônio e o antibiótico foram adicionados e, no interior da câmara de fluxo laminar, 20 ml de meio + hormônio + antibiótico foram vertidos em frascos previamente autoclavados.

Depois de duas semanas, os explantes foram novamente transferidos para meio fresco, contendo hormônio BA e várias concentrações de kanamicina. A avaliação do número de gemas e brotos foi realizada após 7 dias da transferência, sendo obtido o número médio de gemas formadas, somando-se o número de gemas obtidas de cada nó cotiledonar e dividindo-se o resultado pelo número total de nós cotiledonares. Isto foi efetuado para as várias concentrações do antibiótico e para cada um dos genótipos.

O procedimento estatístico obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se 5 tratamentos (concentrações de kanamicina) e 21 repetições (nós cotiledonares), tanto para o genótipo BR 80-14853 como para o genótipo PI 123439. Os dados obtidos neste experimento foram transformados em valores $\sqrt{x} + 1$ para efeito de análise estatística. Para a comparação de médias, foi efetuado o Teste de Tukey.

3.2.3. Ensaio para verificar a suscetibilidade dos explantes a claforan (cefotaxima sódica, Hoescht)

Foram colocadas 800 sementes do genótipo BR 80-14853 para germinar em meio MS/2 + 2,5 μ M BA + sacarose 30g/l + ágar 0,7% (p/v). Passados 14 dias da instalação do experimento, os nós cotiledonares foram inoculados em meio fresco MS/2 + 2,5 μ M BA + sacarose 30g/l + ágar 0,7% (p/v), contendo várias concentrações de claforan: 0; 100; 300 e 500 mg/l. Para cada concentração, foram utilizados 16 nós cotiledonares. Apenas na

concentração de 100 mg/l, do genótipo BR 80-14853, foram utilizados 13 nós cotiledonares.

Após 21 dias de cultura, os nós cotiledonares foram cortados ao meio e transferidos para meio fresco. Nesta etapa foi feita a avaliação do número médio de gemas.

Estes procedimentos também foram realizados para o genótipo PI 123439.

Para a obtenção do número médio de gemas formadas, foi somado o número de gemas de cada nó cotiledonar dividindo-se o resultado pelo número total de nós cotiledonares. Isto foi efetuado para as várias concentrações do antibiótico e para cada um dos genótipos.

O procedimento estatístico obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se 4 tratamentos (concentrações de claforan) e 16 repetições (nós cotiledonares) para o genótipo PI 123439. Para o genótipo BR 80-14853 utilizou-se também 4 tratamentos porém o número de repetições não foi o mesmo. Os dados obtidos neste experimento foram transformados em valores $\sqrt{x+1}$ para efeito de análise estatística.

3.2.4. Ensaio para verificar a suscetibilidade dos explantes a acetosiringone e ao meio APM

Foram colocadas 800 sementes dos genótipos PI 123439 e BR 80-14853 para germinar em meio MS/2 + 2,5 μ M BA + sacarose 30g/l + ágar 0,7% (p/v).

Para cada genótipo, após duas semanas da instalação, os nós cotiledonares foram excisados das plântulas e colocados em erlenmeyers de 125 ml, contendo 50 ml de água destilada, deionizada e esterilizada e diversas

concentrações de acetosiringone: 0; 20; 40; 100; 200 e 300 μ M. Para cada meio contendo as diferentes concentrações de acetosiringone, foram colocados 16 nós cotiledonares, menos para a concentração 40 μ M do genótipo BR 80-14853, no qual foram usados 10 nós cotiledonares. O composto fenólico foi adicionado após a autoclavagem.

Os nós cotiledonares também foram colocados em erlenmeyers contendo apenas meio APM, sem acetosiringone.

A solução estoque do acetosiringone (20 mM) foi preparada diluindo-se 0,08 g deste composto em 0,75 ml de etanol (P.A.) e completando-se com 4,25 ml de água destilada e deionizada, sendo a solução esterilizada em filtros de 0,22 μ M (Millipore).

Os experimentos efetuados para se verificar a suscetibilidade dos explantes a acetosiringone e ao meio APM, foram realizados sob agitação de 150 rpm (mesa agitadora orbital TE-140, Tecnal), por 16 horas; após este período os explantes foram transferidos para meio sólido MS/2 + 2,5 μ M BA + sacarose 30g/l + ágar 0,7% (p/v).

Após 35 dias da cultura, os nós foram cortados em duas partes e, em seguida, foi realizada a avaliação do número médio de gemas.

Para a obtenção do número médio de gemas formadas, foi somado o número de gemas obtidas de cada nó cotiledonar dividindo-se o resultado pelo número total de nós cotiledonares. Esta avaliação foi efetuada para cada concentração de acetosiringone e meio APM e para cada genótipo.

A instalação deste experimento obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se 7 tratamentos (6 concentrações de acetosiringone + o meio APM) e 16 repetições (nós cotiledonares) para o genótipo PI 123439. Para o genótipo BR 80-14853 utilizou-se também 7 tratamentos porém o número de repetições não foi o mesmo. Os dados obtidos

neste experimento foram transformados em valores $\sqrt{x} + 1$ para efeito de análise estatística. Para a comparação de médias, foi efetuado o Teste de Tukey.

3.2.5. Infecção dos genótipos BR 80-14853 e PI 123439 pelas linhagens selvagens de *Agrobacterium*

Foram colocadas 100 sementes do genótipo BR 80-14853 para germinar em meio MS/2 na ausência de hormônio e, outras 400 sementes, para germinar em meio MS/2 + 2,5 μ M BA + sacarose 30 g/l + ágar 0,7% (p/v).

Após 14 dias da instalação do experimento, as sementes foram colocadas para germinar na presença do hormônio e 120 nós cotiledonares foram excisados e infectados com três linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*: A208, C58 e B6S3 e com três linhagens de *Agrobacterium rhizogenes*: 8196, A4 e A4T. Foram infectados 20 nós com cada linhagem.

As bactérias foram colocadas em placas de Petri contendo 20 ml de meio APM sólido, após vedação com parafilme (3M) e estocadas em refrigerador. Uma alíquota foi retirada da placa, usando-se uma alça de platina e inoculada em um frasco contendo 10 ml de meio APM líquido.

Após 16 horas da inoculação, o caldo bacteriano foi então centrifugado a 5000 rpm (centrífuga FANEM, modelo Baby II 206) por nove minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspensionado em 5 ml de NaCl (0,85% v/v), previamente autoclavado. Para infectar os nós cotiledonares com a cultura bacteriana, foi utilizada uma seringa estéril e placas de Petri para depositar os nós, sendo que esta infecção foi feita a uma profundidade aproximada de 2 mm.

Como controle, 40 nós cotiledonares foram infectados apenas com solução de NaCl 0,85% (v/v), sendo que 20 nós foram obtidos de sementes que

germinaram em meio com 2,5 μ M BA e, 20 outros nós, obtidos de sementes que germinaram em meio sem o referido hormônio.

Com a linhagem A208 foram infectados 40 nós cotiledonares, sendo que 20 nós foram obtidos de sementes que germinaram em meio com hormônio e, outros 20 nós, obtidos de sementes que germinaram em meio na ausência do hormônio. A utilização desta linhagem como controle foi baseada nos trabalhos de Byrne et al. (1987), Hinchey et al. (1988), Delzer et al. (1990) e Lee & Komatsuda (1995), que relataram ser esta muito virulenta em soja.

Após 30 dias da infecção, foi feita a avaliação para se verificar a presença de tumores ou raízes.

O protocolo utilizado para o genótipo BR 80-14853 foi também utilizado para o genótipo PI 123439.

3.2.6. Infecção da petúnia (*Petunia hybrida* [Mitchell]) por linhagens selvagens de *Agrobacterium*

Baseando-se no trabalho de Horsch et al. (1985), discos foliares (0,6 mm), foram excisados após 40 dias da germinação de sementes de petúnia em meio MS. Esta espécie foi utilizada, em virtude de ser muito responsiva ao *Agrobacterium*, efetuando-se a infecção em discos foliares para se verificar se ocorreu cura bacteriana (perda do plasmídeo) nas linhagens selvagens de *Agrobacterium*.

Os discos foliares foram colocados em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo solução de NaCl (0,85% p/v) + a cultura bacteriana. As linhagens utilizadas e o preparo da cultura bacteriana estão descritos no item 3.2.5. Assim, discos foram mergulhados nestas placas durante 2 a 3 minutos e, em seguida, passados em papel de filtro para retirar o excesso de líquido e

colocados novamente em meio MS, adaxialmente. Foram utilizados 10 discos foliares para cada linhagem de *Agrobacterium*.

Após 3 dias da infecção, os discos foram transferidos para novo meio, acrescentando-se carbenicilina (Sigma), na concentração de 500 µg/ml. O procedimento para a preparação da solução estoque foi semelhante ao efetuado para o antibiótico kanamicina, conforme descrito no item 3.2.2.

Após 14 dias, os discos foram transferidos para o mesmo meio e quatro semanas depois, foi feita a avaliação, verificando-se a ocorrência de tumores ou raízes.

3.2.7. Verificação da resistência da linhagem GV2260 desarmada ao antibiótico claforan

Foram coletadas alíquotas de uma cultura sólida da linhagem GV2260 de *Agrobacterium* em meio contendo os antibióticos, rifampicina (50 µg/ml) e carbenicilina (100 µg/ml). Em seguida, estas alíquotas foram colocadas em frascos contendo 10 ml de meio APM líquido e mantidas “overnight” sob agitação de 160 rpm.

Após este período, foram espalhados 200 µl da cultura bacteriana em placas de Petri, contendo 100 e 300 µg/ml de claforan. Como controle, 200 µl da cultura bacteriana foram espalhados em placa sem claforan.

As placas contendo as culturas bacterianas foram incubadas em estufa (B.O.D., Consul NT705). Após 3 dias, as placas foram observadas, avaliando-se em que concentração o antibiótico não permitiu o crescimento da bactéria.

3.2.8. Transformação do *Agrobacterium*

Para se obter as células competentes e a transformação do *Agrobacterium*, foi utilizado o protocolo de An et al. (1988).

Foi coletada uma alíquota da bactéria desarmada GV2260, com uma alça de platina. Este inóculo foi colocado em 5 ml de meio APM líquido, em frascos de 4,5 x 10 cm, com capacidade de 100 ml, contendo os antibióticos rifampicina (50 µg/ml) e carbenecilina (100 µg/ml). Os frascos foram tampados com algodão e envolvidos com papel alumínio.

A cultura bacteriana foi incubada, por 24 horas, a 28 °C, sob agitação de 160 rpm (mesa agitadora orbital TE-140, Tecnal).

Após este período, foram retirados 2 ml da cultura e transferidos para erlenmeyers, com capacidade de 125 ml, contendo 50 ml de meio APM líquido. Em seguida, estes foram colocados sob agitação por 5 horas.

Após a agitação, os 50 ml foram colocados em tubos de centrifuga, permanecendo sob centrifugação de 5000 rpm (centrífuga Sorwall GS3), por um período de 5 minutos.

Ao final, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspendido em 1 ml de CaCl₂ (20 mM), gelado e, em seguida, este pellet foi transferido para tubos eppendorfs, com capacidade de 1,5 ml e deixado no gelo por 15 minutos. Nesta etapa, foram obtidas as células competentes.

Posteriormente, alíquotas de 100 µl foram colocadas em novos eppendorfs e foi adicionado 1µg de DNA plasmidial, deixando-se no gelo, por 30 minutos.

Os eppendorfs foram retirados do gelo e colocados em nitrogênio líquido e então, incubados a 37°C, por 5 minutos. Em seguida, em cada

ependorf foi adicionado 1 ml de meio APM livre de antibióticos, sendo esses tubos incubados a 28°C sob agitação de 100 rpm, por 4 horas. Os tubos foram centrifugados por 30 segundos, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo o “pellet” em 100 µl de meio APM, sem os antibióticos.

Os 100 µl de meio APM líquido, contendo a bactéria transformada, foram espalhados com uma alça de Drigalsk em placa de Petri de 7 cm de diâmetro, contendo 20 ml de meio APM sólido com os seguintes antibióticos: 50 µg/ml de rifampicina, 100 µg/ml de carbenecilina, 300 µg/ml de estreptomicina e 100 µg/ml de espectinomicina. As placas foram incubadas em estufa (B.O.D. Consul NT705), a 28 °C, por 2 a 3 dias.

Como controle, foi inoculada a bactéria nas mesmas condições de cultura, sem passar pelo processo de transformação.

3.2.9. Ensaio de infecção do genótipo BR 80-14853 pela linhagem GV2260 de *Agrobacterium*

Sementes do genótipo BR 80-14853 foram esterilizadas conforme a descrição apresentada no item 3.2.1.1. e colocadas para germinar em meio de cultura descrito no item 3.2.3. Após 14 dias da instalação do experimento, foram excisados os nós cotiledonares das plântulas.

Posteriormente, uma alíquota da linhagem GV2260 de *Agrobacterium* foi colocada “overnight” sob agitação e, em seguida, foi inoculada em placa de Petri, contendo 20 ml de meio APM sólido, contendo os antibióticos descritos no item 3.2.8. e incubada em B.O.D., sob temperatura constante de 27°C, por 2 a 3 dias.

Após este período, a bactéria foi colocada novamente em meio APM líquido, sendo esta cultura bacteriana centrifugada (FANEM) a 5000 rpm, por nove minutos.

Após a centrifugação, o “pellet” foi ressuspendido em 5 ml de NaCl (0,85%) e, em seguida, 500 µl dessa solução bacteriana foram pipetados e colocados em erlenmeyers de 125 ml de capacidade, contendo 25 ml de meio MS/2 + 2,5 µMBA + sacarose 30g/l

Antes da autoclavagem, o pH do meio foi ajustado para 5.8 com o uso de NaOH (1M) e após a autoclavagem foram adicionados 40 µM de acetosiringone.

Como controle, foram utilizados dois erlenmeyers contendo apenas 500 µl de NaCl (0,85%) no meio de cultura, sem a adição da bactéria.

Em todos os erlenmeyers, foram colocados cinco nós cotiledonares, sendo que estes nós foram feridos com um bisturi na região onde ocorre a regeneração (ao redor do epicótilo). Os nós cotiledonares no interior de erlenmeyers foram colocados sob agitação de 160 rpm “overnight” para o cocultivo em meio líquido e depois transferidos para frascos contendo 10 ml de meio MS/2 + 2,5 µMBA + sacarose 30g/l + ágar 0,7% (p/v), permanecendo nesta condição por 48 horas, sob temperatura não superior a 30 °C.

Após este período, os nós cotiledonares foram desinfetados em 50 ml de água destilada, deionizada e esterilizada, contendo 500 mg/l de claforan, por 30 minutos.

Posteriormente, os nós foram lavados três vezes em água destilada, deionizada e esterilizada e, em seguida, foram colocados em papel de filtro para retirar o excesso de água e transferidos para frascos contendo 10 ml de meio MS/2 + 2,5 µMBA + sacarose 30g/l + ágar 0,7% (p/v), acrescentado de 300 µg/ml de claforan, visando impedir o crescimento da bactéria.

Os nós cotiledonares permaneceram neste meio durante 14 dias sendo então, transferidos para novo meio, no qual foi acrescentado o antibiótico kanamicina (100 µg/ml), após a autoclavagem.

Após 14 dias de cultura, os nós cotiledonares foram cortados em duas partes e transferidos para meio de cultura contendo apenas o antibiótico kanamicina, pois o claforan e o hormônio foram retirados, nesta fase. Além desta transferência, foram efetuadas mais duas, em intervalos de 14 dias, caracterizando o término do experimento.

Para este ensaio foram utilizados 200 nós cotiledonares, divididos em duas repetições de 100 nós, sendo que cada repetição foi realizada em intervalo de uma semana.

3.2.10. Ensaio de infecção do genótipo PI 123439 pela linhagem GV2260 de *Agrobacterium*

O procedimento utilizado para a infecção do genótipo PI 123439 foi o mesmo descrito para o genótipo BR 80-14853, conforme apresentado no item 3.2.9. porém diferindo nos seguintes aspectos:

Para o genótipo PI 123439 foram utilizados 500 nós cotiledonares. A desinfecção dos nós foi realizada com 0,2% de água sanitária e com o antibiótico claforan (1000 mg/l), por 60 minutos; após a lavagem, os nós permaneceram em meio contendo claforan (300 µg/ml), por 42 dias

Além disso, foram realizadas três transferências dos nós cotiledonares para meio fresco, em intervalos de 14 dias de cultura. Na primeira transferência, os nós cotiledonares foram transferidos para meio fresco, contendo claforan (100 µg/ml) e kanamicina (100 µg/ml); na segunda transferência, os nós foram transferidos para meio contendo apenas 50 µg/ml de kanamicina e 100

$\mu\text{g/ml}$ de claforan e na terceira transferência, os nós foram transferidos ao meio de cultura, contendo o antibiótico claforan ($100 \mu\text{g/ml}$), na ausência de kanamicina.

Este experimento, também foi realizado em duas semanas, sendo que em cada etapa foram infectados 240 explantes.

3.2.11. Alterações no ensaio de infecção do genótipo BR 80-14853 pela linhagem GV2260 de *Agrobacterium*

Neste ensaio, foram colocadas 1200 sementes para germinar, sendo que apenas 440 nós cotiledonares foram infectados conforme descrição apresentada no item 3.2.5., acrescentando $40 \mu\text{M}$ de acetosiringone aos 5 ml de NaCl (0,85%).

Os nós cotiledonares foram excisados e colocados em meio MS/2 + $2,5 \mu\text{MBA}$ + sacarose 30g/l + ágar 0,7% (p/v), por 24 horas. Após este período, os nós cotiledonares foram feridos com seringa na região onde ocorre a regeneração, como descrito no item 3.2.5. e, em seguida, foram colocados para o cocultivo em meio sólido, durante 48 horas.

Após este período de cocultivo, os nós cotiledonares foram lavados em 1000 mg/l de claforan + 0,2% de água sanitária, por 60 minutos e então, foram mantidos em meio MS/2 + $2,5 \mu\text{MBA}$ + sacarose 30g/l + ágar 0,7% (p/v) + $250 \mu\text{g/ml}$ de claforan, por 14 dias.

Posteriormente, os nós cotiledonares foram transferidos para meio fresco contendo $200 \mu\text{g/ml}$ de claforan onde foram mantidos por 14 dias.

Após este período, os nós cotiledonares foram cortados em duas partes, transferidos para meio sem hormônio, porém contendo claforan ($150 \mu\text{g/ml}$), por duas semanas.

Posteriormente, os nós cotiledonares foram novamente transferidos e mantidos em meio contendo claforan na concentração de 100 µg/ml, por mais duas semanas.

Além disso, neste experimento, não foi acrescentado kanamicina em nenhuma das transferências.

3.2.12. Análise da expressão transitória dos genótipos BR 80-14853 e PI 123439.

A verificação da expressão transitória foi efetuada após 48 horas de exposição dos nós cotiledonares em meio MS/2 + 2,5 µMBA + sacarose 30 g/l + ágar 0,7% (p/v) + claforan, nos experimentos de infecção dos genótipos PI 123439 (item 3.2.10.) e BR 80-14853 (item 3.2.11.).

Os nós cotiledonares foram cortados ao meio, desprezando-se os cotilédones e qualquer broto e em seguida, foram colocados em eppendorfs, com capacidade 1,5 ml, contendo 200 µl da solução de estoque, visando determinar a atividade do gene GUS (β-glucuronidase). Os componentes da solução estoque estão apresentados na Tabela 1 (Stomp, 1992).

A atividade do gene GUS foi verificada pela reação histoquímica. Assim, os eppendorfs contendo os nós cotiledonares foram colocados em banho maria a 37°C, durante 48 horas, ou seja, até o aparecimento da cor azul na região infectada do tecido nodal. Após 48 horas, os nós cotiledonares foram retirados da solução e mantidos em álcool 70% (v/v).

Tabela 1: Componentes utilizados para o teste GUS, com as suas respectivas concentrações.

Solução Estoque	Concentração final	Mistura (μl/ml)
Tampão fosfato (NaPO_4) 1M pH=7,0	100mM	100
EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) 0,25M	10mM	40
Triton X-100 10%	0,1%	10
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (ferrocianidro de potássio trihidratado) 5mM	0,5mM	100
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (ferricianidro de potássio) 5mM	0,5mM	100
X-GLU 0,02M	1,0mM	50
Subtotal		400
Água destilada, deionizada e esterilizada		600
Volume final		1000

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultura de tecidos

4.1.1. Indução de organogênese a partir de explantes cotiledonares dos genótipos PI 123439, BR 80-14853 e IAC-Foscarim

Como no ensaio de indução de organogênese, a partir de explantes cotiledonares do genótipo PI 123439, foi dividido em dois experimentos, tem-se que no primeiro deles foi avaliada a resposta *in vitro* dos explantes às diversas concentrações de hormônio BA, cujos resultados estão apresentados na Tabela 2. Pode-se verificar que houve a formação de raiz ou de calo, após 30 dias de cultura na presença de BA. Neste experimento empregou-se 88% dos cotilédones os quais foram excisados após a germinação das sementes. No entanto, não foi constatada a regeneração de brotos, independente da concentração de hormônio ou da posição que os cotilédones se encontravam no meio de cultura (adaxial ou abaxialmente).

No segundo experimento, foi avaliada a resposta *in vitro* dos cotilédones, após 30 dias de cultura, na presença somente da concentração de 5 μ M de BA. Os resultados obtidos, foram semelhantes aos apresentados anteriormente. Neste experimento, empregou-se 70% dos cotilédones excisados após a germinação das sementes, e verificou-se apenas a formação de raiz ou de calo.

Os experimentos de indução de organogênese, a partir de explantes cotiledonares dos genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim, foram realizados em uma única etapa. Observou-se igualmente, apenas a formação de raiz ou de calo, após 30 dias de cultura, na presença de 5 μ M BA. Nestes experimentos empregaram-se 45 e 42% dos cotilédones excisados após a germinação das sementes dos genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim, respectivamente.

Portanto, não foi observada regeneração de brotos, ocorrendo apenas a formação de pequenos calos brancos e rizogênese. Estes resultados diferem daqueles obtidos por Hinchey et al. (1988), onde mais de 70% dos cotilédones cultivados em meio B5 + 5,0 μ M BA produziram brotos adventícios em todos os genótipos de soja avaliados, sendo que a resposta de regeneração variou entre os genótipos.

A dificuldade em se obter regeneração de brotos, a partir de explantes cotiledonares de certos genótipos também foi demonstrada no trabalho de Hammatt et al. (1986). Esses autores, trabalhando com várias espécies de *Glycine*, somente obtiveram plantas regeneradas de explantes cotiledonares de um único genótipo de *Glycine clandestina*.

Além disso, nestes experimentos realizados com os genótipos PI 123439, BR 80-14853 e IAC-Foscarim, ficou demonstrada a dificuldade em se obter gemas e brotos a partir de calos brancos e friáveis, confirmando a observação de Davey et al. (1988) quando descreveram que somente calos nodulares e compactos produzem gemas.

Por estes resultados, pode-se confirmar a recalcitrância do explante cotiledonar da soja *in vitro*, tal como foi relatado por Kerns et al. (1986), Mroginski & Kartha (1985) e Widholm et al. (1992).

Para todos os genótipos estudados, grande parte dos explantes foi contaminada por uma bactéria rosa, de crescimento lento, aparecendo em cultura

após 30 dias ou mais da data de excisão dos explantes. Esta bactéria é chamada de PPFM (Corpe, 1985; Holland & Polacco, 1992 e Widholm, 1996).

Tabela 2. Resposta *in vitro* de explantes cotiledonares do genótipo PI 123439, avaliada após 30 dias, na presença de diversas concentrações de BA.

Concentração BA (μ M)	Formação de Raiz ^a	Formação de Calo ^b
	(%)	(%)
0	6,7	0,0
0,1	6,7	53,3
0,5	20,0	80,0
2,5	20,0	86,7
5,0	6,7	93,3
7,5	0,0	93,3

^aRaiz formada a partir da nervura central dos cotilédones

^bCalos pequenos, brancos e friáveis formados nas extremidades dos cotilédones

4.1.2. Indução de organogênese a partir do nó cotiledonar do genótipo PI 123439

Neste experimento de indução de organogênese a partir de nós cotiledonares, foi avaliada a resposta *in vitro* dos nós cotiledonares do genótipo PI 123439, após 14 dias de cultura, na presença de diversas concentrações de hormônio BA e de frutose ou sacarose. Os resultados estão apresentados nas Figuras 2 e 3.

Por estas figuras, pode-se constatar que não houve formação de gemas, na presença de 0, 0,1 e 0,5 μ M BA + frutose ou sacarose. Assim, estas concentrações de hormônio, independente da fonte de carbono, foram

desprezadas do experimento. Neste ensaio, empregou-se 88% dos nós cotiledonares, os quais foram excisados após a germinação das sementes.

A concentração 7,5 μM BA no meio de cultura, apesar de favorecer a formação de um bom número de gemas (7,33 gemas/nó para o meio com frutose e 5,5 gemas/nó para o meio com sacarose), não induziu o alongamento das mesmas e, portanto, também foi excluída do experimento (Figuras 2 e 3).

Assim, foi observado que somente as concentrações de 2,5 e 5,0 μM BA foram favoráveis à formação de gemas e brotos (sendo considerados brotos quando apresentavam um tamanho superior a 5 mm), tanto na presença de sacarose como de frutose (Figuras 2 e 3). Foi observada uma diferença significativa entre as médias nas concentrações 2,5 e 5,0 μM BA, independente da fonte de carbono presente no meio de cultura, como pode ser observado nas Tabelas 3 e 6.

Para o caráter, número de brotos produzidos (Tabela 7), não foi observada diferença significativa entre as concentrações de BA, independente da fonte de carbono utilizada. Como pode ser observado na Tabela 3, houve uma tendência de diminuição do número de brotos e gemas quando a concentração 5,0 μM foi combinada com sacarose.

O fitoregulador foi mantido até a terceira transferência no experimento. Entretanto, os brotos excisados das culturas desenvolvidas na presença de 2,5 ou 5,0 μM de BA, mesmo sendo transferidos para meio B5 livre de hormônios, apresentaram uma múltipla regeneração em sua base.

Como relatado nos trabalhos de Cheng et al. (1980), Saka et al. (1980), Wright et al. (1986) e Delzer et al. (1990), esta pesquisa demonstrou que a adição de hormônios no meio de cultura, visando a germinação das sementes, é importante para estimular a múltipla brotação. Porém, há também necessidade de uma redução ou retirada total deste hormônio no decorrer do processo de

regeneração, para que posteriormente ocorra o alongamento e enraizamento dos brotos excisados. Estes resultados confirmam o encontrado por Davey et al. (1988); Barwale et al. (1986a); Barwale et al. (1986b); Wright et al. (1986); Hinchee et al. (1988) e Wright et al. (1987).

Foi também observado neste experimento, que não houve diferença significativa entre a adição de sacarose ou frutose ao meio de cultura para a formação de brotos (Tabelas 3 e 7), concordando com o trabalho de Wright et al. (1986). Porém, Saka et al. (1980), visando a formação de brotos, descreveu que o meio de cultura suplementado com frutose foi superior ao suplementado com glicose ou sacarose.

O número médio de brotos produzido (Tabela 3) neste trabalho foi pequeno se comparado ao indicado nos protocolos de Wright et al. (1986), Graybosch et al. (1987) e Delzer et al. (1990). Provavelmente, houve um efeito do genótipo da soja o qual contribuiu para as diferenças na frequência de regeneração entre os estudos.

4.1.3. Indução de organogênese a partir dos nós cotiledonares dos genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim

Foram avaliados, neste experimento, os genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim, seguindo-se o mesmo protocolo do genótipo PI 123439. As taxas de germinação foram de 60% para IAC-Foscarim e 80% para BR 80-14853. Contudo, houve uma grande contaminação pela bactéria rosa, ocasionando a perda dos dois experimentos. Portanto, novos ensaios foram realizados com os genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim.

4.1.4. Indução de organogênese a partir dos nós cotiledonares dos genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim

Como os resultados com o genótipo PI 123439 demonstraram que somente as concentrações de 2,5 e 5,0 μM BA, na presença de frutose ou sacarose, mostraram ampla formação de gemas e brotos, somente estas duas concentrações foram utilizadas.

Além disso, foi retirado o hormônio logo na primeira transferência, no sentido de evitar múltipla brotação na base dos brotos excisados, após a transferência para meio sem hormônio, visando o seu alongamento. Esta retirada do hormônio na primeira transferência vai contra o protocolo de Wright et al. (1986) que descreve a necessidade da manutenção do hormônio BA em todas as transferências efetuadas durante o experimento.

As taxas de germinação foram de 50% para o genótipo BR 80-14853 e 70% para o genótipo IAC-Foscarim.

Como pode ser observado nas Tabelas 4, 6 e 7, para o genótipo BR 80-14853, não houve diferença significativa entre as concentrações 2,5 e 5,0 μM BA, na presença de frutose ou sacarose para a formação de gemas ou brotos, como pode também ser constatado nas Figuras 4 e 5. A exemplo do que ocorreu com a PI 123439, para esse genótipo (BR 80-14853), há uma tendência de diminuição do número de brotos quando a concentração 5,0 μM BA é suplementada com sacarose.

Utilizando o genótipo IAC-Foscarim, também não se detectou diferença estatística na formação de gemas entre as concentrações 2,5 e 5,0 μM BA no meio de cultura suplementado com frutose ou sacarose (Tabela 5 e 6). Contudo, a análise dos dados relativos à formação de brotos detectou uma diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, entre o número de brotos

formado na presença de frutose e sacarose, independente da concentração do hormônio utilizada (Tabela 5 e 7).

Os resultados obtidos com os três genótipos, demonstraram que não existe diferença entre a concentração de 2,5 μ M e 5,0 μ M BA para a formação de brotos. Portanto, nos experimentos seguintes e no de transformação, foi utilizada a menor concentração (2,5 μ M BA), em virtude desta reduzir, pelo menos em tese, qualquer tipo de alteração causada pelo estresse *in vitro*. Esta alteração poderia gerar variação somaclonal (Larkin & Scrowcroft, 1981).

Além disso, nos experimentos seguintes, decidiu-se por usar sacarose como fonte de carbono ao invés de frutose pois, nas etapas anteriores, pode-se constatar que não houve diferença significativa na formação de brotos, nos genótipos avaliados (Tabela 7), exceto para o genótipo IAC-Foscarim. Wright et al. (1986), também, não observaram influência significativa de uma das fontes de carbono sobre a regeneração em soja.

Os brotos regenerados do genótipo IAC-Foscarim apresentaram-se bastante vitrificados se comparados com aqueles dos genótipos PI 123439 e BR 80-14853 (Figura 6). Em virtude disso, este genótipo deixou de ser utilizado nos demais experimentos.

O aparecimento da bactéria rosa foi melhor controlado nos experimentos envolvendo os genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim, em virtude de se ter feito uma rigorosa seleção dos explantes, observando desde a germinação, o aparecimento ou não de colônias da bactéria rosa na região de regeneração ou na região abaxial dos cotilédones. Entretanto, mesmo com este rigor, houve o aparecimento da bactéria em alguns dos nós cotiledonares durante as culturas, mas sem afetar as avaliações, pois esta surgiu na região adaxial dos nós cotiledonares.

4.1.5. Indução de organogênese a partir do nó cotiledonar do genótipo BR 80-14853

Como os coeficientes de variação (C.V.), nos ensaios visando a formação de gemas e brotos do genótipo BR 80-14853 (4.1.4.), foram muito altos (Tabelas 6 e 7), foi feito este experimento testando novamente as concentrações 2,5 e 5,0 μM BA, na presença de frutose ou sacarose e, substituído o phytigel por ágar, em virtude do phytigel poder causar uma maior vitrificação em soja.

Neste experimento, a taxa de germinação foi de 90%. Após a germinação das sementes, uma rigorosa avaliação foi efetuada nas plântulas para se verificar a presença ou não da bactéria rosa, sendo mantido este “screening” durante todo o experimento. Como observado nas Tabelas 8 e 9, não foram detectadas diferenças significativas entre as médias dos tratamentos para a formação de gemas, brotos ou número de brotos excisados, nas diferentes concentrações de BA (2,5 e 5,0 μM) em meio de cultura suplementado com frutose ou sacarose.

Durante este experimento, foi produzido um grande número de brotos (234 brotos excisados de um total de 112 nós cotiledonares) os quais foram excisados e enraizados *in vitro* (geração R_0). Estes brotos foram transferidos para a casa de vegetação, sendo obtidas sementes destas plantas (geração R_1). Houve uma perda de 50% das plantas da geração R_0 , quando foi feita a sua aclimação (Figuras 7 e 8).

Pelas análises estatísticas, não foram detectadas diferenças significativas entre as duas concentrações de hormônios para o caráter número de brotos excisados (Tabela 9). Com este resultado, confirma-se a recomendação da concentração de 2,5 μM BA em meio de cultura MS, suplementado com sacarose (30g/l) e ágar (0,7%, p/v).

Além disso, pôde-se verificar que o aumento do número de repetições (número de nós cotiledonares), não foi suficiente para diminuir os valores dos coeficientes de variação, pois esses permaneceram altos (Tabela 9). Estes coeficientes parecem ser intrínsecos ao caráter estudado.

Tabela 3. Formação de gemas e brotos em culturas desenvolvidas a partir de nós cotiledonares do genótipo PI 123439. Dados não transformados.

Concentração de BA (μM) + Fonte de Carbono	Gemas ^a($\bar{x} \pm s$)	Brotos ^b($\bar{x} \pm s$)
2,5 + frutose	2,00 $\pm$ 0,89	6,33 $\pm$ 3,72
2,5 + sacarose	3,16 $\pm$ 0,41	6,33 $\pm$ 0,81
5,0 + frutose	7,33 $\pm$ 2,50	7,17 $\pm$ 3,25
5,0 + sacarose	5,33 $\pm$ 2,60	4,00 $\pm$ 1,10

^aGemas formadas por nó-cotiledonar, avaliadas na primeira transferência;

^bNúmero total de brotos formados por nó-cotiledonar, avaliado durante as quatro transferências.

Tabela 4. Formação de gemas e brotos em culturas desenvolvidas a partir de nós cotiledonares do genótipo BR 80-14853. Dados não transformados.

Concentração de BA (μM) + Fonte de Carbono	Gemas ^a($\bar{x} \pm s$)	Brotos ^b($\bar{x} \pm s$)
2,5 + frutose	4,50 $\pm$ 3,65	0,92 $\pm$ 2,02
2,5 + sacarose	5,10 $\pm$ 3,05	1,20 $\pm$ 1,77
5,0 + frutose	6,30 $\pm$ 4,11	0,80 $\pm$ 1,23
5,0 + sacarose	3,90 $\pm$ 2,06	0,41 $\pm$ 0,67

^aGemas formadas por nó-cotiledonar, avaliadas na primeira transferência;

^bNúmero total de brotos formados por nó-cotiledonar, avaliado durante as quatro transferências.

Tabela 5. Formação de gemas e brotos em culturas desenvolvidas a partir de nós cotiledonares do genótipo IAC-Foscarim. Dados não transformados.

Concentração de BA (μM) + Fonte de Carbono	Gemas ^a ($\bar{x} \pm s$)	Brotos ^b ($\bar{x} \pm s$)
2,5 + frutose	4,70 $\pm$ 3,88	1,40 $\pm$ 1,50
2,5 + sacarose	3,30 $\pm$ 4,76	0,40 $\pm$ 0,65
5,0 + frutose	6,00 $\pm$ 3,27	1,90 $\pm$ 2,08
5,0 + sacarose	3,60 $\pm$ 1,61	0,85 $\pm$ 1,07

^aGemas formadas por nó-cotiledonar, avaliadas na primeira transferência;

^bNúmero total de brotos formados por nó-cotiledonar, avaliado durante as quatro transferências.

Tabela 6. Análise da variância do número de gemas regeneradas em 4 tratamentos (2,5 μMBA + 30 gl^{-1} frutose; 5,0 μMBA + 30 gl^{-1} frutose; 2,5 μMBA + 30 gl^{-1} sacarose e 5,0 μMBA + 30 gl^{-1} sacarose). Dados transformados para $\sqrt{x+1}$. (1) = GL (graus de liberdade) = 20 (PI 123439), 44 (BR 80-14853) e 35 (IAC-Foscarim). F = frutose e S = sacarose.

Causas de Variação	QM			
	GL	PI	BR	Fos
Tratamentos	3	1,505**	0,243 (ns)	0,943 (ns)
Concentrações Hormonais/F	1	3,933**	0,657 (ns)	0,043 (ns)
Concentrações Hormonais/S	1	0,576*	0,018 (ns)	0,331 (ns)
Meio de cultura (F Vs S)	1	0,004 (ns)	0,055 (ns)	2,071 (ns)
Resíduo	(1)	0,130	0,550	0,687
Média		2,28	2,34	2,15
C.V. (%)		15,80	31,70	38,60

* = 5% ; ** = 1% e (ns) = não significativo

Tabela 7. Análise da variância do número de brotos regenerados em 4 tratamentos (2,5µMBA + 30gl⁻¹ frutose; 5,0µMBA + 30gl⁻¹ frutose; 2,5µMBA + 30gl⁻¹ sacarose e 5,0µMBA + 30gl⁻¹ sacarose). Dados transformados para $\sqrt{x+1}$. (1) = GL (graus de liberdade) = 20 (PI 123439), 44 (BR 80-14853) e 35 (IAC-Foscarim). F = frutose e S = sacarose.

Causas de Variação	QM			
	GL	PI	BR	Fos
Tratamentos	3	0,389 (ns)	0,094 (ns)	0,409 (ns)
Concentrações Hormonais/F	1	0,106 (ns)	0,001 (ns)	0,067 (ns)
Concentrações Hormonais/S	1	0,682 (ns)	0,281 (ns)	0,120 (ns)
Meio de cultura (F Vs S)	1	0,378 (ns)	0,001 (ns)	1,040 *
Resíduo	(1)	0,236	0,200	0,193
Média		2,59	1,27	1,37
C.V. (%)		18,80	35,20	32,10

* = 5%; ** = 1% e (ns) = não significativo

Tabela 8. Formação de gemas, brotos e brotos excisados a partir de culturas desenvolvidas a partir de nós cotiledonares do genótipo BR 80-14853. Dados não transformados.

Concentração de BA (µM) + Fonte de Carbono	Gemas ^a ($\bar{x} \pm s$)	Brotos ^b ($\bar{x} \pm s$)	Brotos Excisados ^c ($\bar{x} \pm s$)
2,5 + frutose	4,44 ± 3,46	2,64 ± 1,87	1,92 ± 1,47
2,5 + sacarose	5,39 ± 3,16	2,97 ± 2,46	2,39 ± 2,02
5,0 + frutose	4,70 ± 3,28	2,39 ± 1,80	2,00 ± 1,82
5,0 + sacarose	4,36 ± 2,26	2,60 ± 1,90	2,15 ± 1,66

^aGemas formadas por nó-cotiledonar, avaliadas na primeira transferência;

^bNúmero total de brotos formados por nó-cotiledonar, avaliado durante as quatro transferências;

^cNúmero de brotos excisados e enraizados.

Tabela 9. Análise da variância do número de gemas e brotos regenerados do genótipo BR 80-14853 em 4 tratamentos (2,5µMBA + 30gl⁻¹ frutose; 5,0µMBA + 30gl⁻¹ frutose; 2,5µMBA + 30gl⁻¹ sacarose e 5,0µMBA + 30gl⁻¹ sacarose). Dados transformados para $\sqrt{x+1}$. (1) = GL (graus de liberdade) = 108 (gemas), 108 (brotos) e 108 (brotos excisados). F = frutose e S = sacarose.

Causas de Variação	QM			
	GL	Gemas	Brotos	Brotos excisados
Tratamentos	3	0,233 (ns)	0,023 (ns)	0,063 (ns)
Concentrações Hormonais/F	1	0,160 (ns)	0,004 (ns)	0,000 (ns)
Concentrações Hormonais/S	1	0,040 (ns)	0,047 (ns)	0,030 (ns)
Meio de cultura (F Vs S)	1	0,500 (ns)	0,018 (ns)	0,160 (ns)
Resíduo	(1)	0,402	0,299	0,260
Média		2,30	1,84	1,69
C.V. (%)		27,57	29,71	30,17

* = 5% ; ** = 1% e (ns) = não significativo

4.2. Teste de tolerância dos genótipos BR 80-14853 e PI 123439 à kanamicina

Para ambos os genótipos, a taxa de germinação foi de 80%. Mesmo após a excisão dos explantes e sua transferência para meio contendo kanamicina, ocorreu o aparecimento da bactéria rosa, porém esta apareceu somente em alguns dos explantes, no final do ensaio, não interferindo na avaliação.

Pelas análises estatísticas (Tabelas 11 e 13) pode-se constatar diferenças entre as médias de tratamentos (diferentes concentrações de kanamicina no meio de cultura), para os dois genótipos, demonstrando que este antibiótico inibiu drasticamente a formação de gemas, mesmo em baixas

concentrações (Figuras 9,10 e 11). As médias dos tratamentos são apresentadas na Tabela 10.

Através do Teste de Tukey, foi verificado que para o genótipo BR 80-14853 (Tabela 12), o tratamento utilizado como controle (0 μ M) foi significativamente diferente dos demais, havendo, como esperado, uma grande diminuição do número médio de gemas na presença do antibiótico. Este resultado foi verificado também para o genótipo PI 123439 (Tabela 14). A concentração de 50 μ g/ml não diferiu das demais (100, 200 e 300 μ g/ml) e todas provocaram uma redução no número médio de gemas, comprovando a eficiência deste antibiótico como agente seletivo, não permitindo o desenvolvimento de gemas e consequentemente de brotos não transformados.

A partir destes resultados, foi adotada a concentração de 100 μ g/ml de kanamicina, como sugerida nos trabalhos de Hinchee et al. (1988), Owens & Smigocki (1988) e Chang & Chan (1991). A concentração de 50 μ g/ml, usada nos trabalhos de Kumar et al. (1991) e Lee & Komatsuda (1994) não foi adotada em virtude de nesta concentração poder haver o aparecimento de escapes, ou seja, brotos não transformados que, de alguma forma, ficam tolerantes a este antibiótico e se desenvolvem normalmente, acarretando em um falso transformante.

Tabela 10. Número médio de gemas formadas ($\pm$ desvio padrão) após 21 dias de exposição dos explantes dos genótipos BR 80-14853 (BR) e PI 123439 (PI) a diversas concentrações do antibiótico kanamicina. Dados não transformados.

Genótipo	Kanamicina ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	50	100	200	300
BR	$7,64 \pm 4,38$	$2,62 \pm 1,99$	$2,38 \pm 2,46$	$2,38 \pm 2,39$	$1,62 \pm 2,04$
PI	$5,95 \pm 4,67$	$1,05 \pm 1,43$	$0,71 \pm 1,49$	$0,76 \pm 1,22$	$0,43 \pm 1,25$

Tabela 11. Quadro da análise de variância dos dados relativos ao número de gemas formadas nas diferentes concentrações de kanamicina, para o genótipo BR 80-14853. Dados transformados para $\sqrt{X+1}$.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	23,60	5,900	13,948 **
Resíduo	100	42,33	0,423	
Total	104	65,93	0,634	

Média = 1,924

C.V. (%) = 33,80

Tabela 12. Teste de Tukey das médias das gemas formadas nas diferentes concentrações de kanamicina para o genótipo BR 80-14853. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 1%.

Concentração (μM)	Média
0	2,85 a
50	1,82 b
200	1,73 b
100	1,71 b
300	1,51 b

Tabela 13. Quadro da análise de variância dos dados relativos ao número de gemas formadas nas diferentes concentrações de kanamicina, para o genótipo PI 123439. Dados transformados para $\sqrt{x+1}$.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	25,92	6,480	20,313**
Resíduo	100	31,86	0,319	
Total	104	57,78	0,555	

Média = 1,496

C.V. (%) = 37,75

Tabela 14. Teste de Tukey das médias das gemas formadas nas diferentes concentrações de kanamicina para o genótipo PI 123439. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 1%.

Concentração (μ M)	Média
0	2,48 a
50	1,36 b
200	1,26 b
100	1,24 b
300	1,14 b

4.3. Ensaio para verificar a suscetibilidade dos explantes a claforan (cefotaxima sódica)

Neste experimento, as taxas de germinação foram de 78 e 75% para os genótipos BR 80-14853 e PI 123439, respectivamente. O número médio de gemas formadas, para os dois genótipos, nas diversas concentrações de claforan, está apresentado na Tabela 15.

Não foram observadas diferenças significativas entre as médias dos tratamentos (concentrações de claforan) para a formação de gemas nos dois genótipos analisados, como pode ser observado nas Tabelas 16 e 17. A concentração de 500 mg/l não foi utilizada em virtude de provocar uma maior necrose dos tecidos, embora alguns trabalhos utilizem esta concentração para eliminar o *Agrobacterium*, após as 48 horas de cocultivo em meio sólido (Parrott et al., 1989 e Chang & Chan, 1991).

Mesmo não sendo detectadas diferenças significativas foi observada uma tendência de diminuição do número médio de gemas, para o genótipo BR 80-

14853, conforme se aumentou a concentração de claforan; isto não foi observado para o genótipo PI 123439 (Tabela 15).

A bactéria *Methylobacterium mesophilicum*, apesar do rigor com que foi feita a seleção dos explantes, apareceu em massa nos experimentos com os dois genótipos. Entretanto, como os explantes foram avaliados após 21 dias de cultura, a bactéria não teve tempo de influenciar na regeneração ou contaminar o meio de cultura.

Tabela 15. Médias ($\pm$ desvio padrão) de gemas, após 21 dias de permanência dos explantes dos genótipos BR 80-14853 (BR) e PI 123439 (PI) nas diversas concentrações de claforan (cefotaxima sódica). Dados não transformados.

Genótipo	Claforan (mg/l)			
	0	100	300	500
BR	10,69 $\pm$ 4,13	10,46 $\pm$ 4,63	8,38 $\pm$ 4,16	7,94 $\pm$ 4,02
PI	7,25 $\pm$ 3,77	8,50 $\pm$ 3,31	7,62 $\pm$ 3,67	8,25 $\pm$ 2,72

Tabela 16. Análise de variância dos dados relativos ao número de gemas formadas nas diferentes concentrações de claforan, para o genótipo PI 123439. Dados transformados para $\sqrt{x+1}$.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	0,69	0,23	0,58 (ns)
Resíduo	60	24,35	0,40	
Total	63	25,04	0,39	

Média = 2,92

C.V. (%) = 21,66

Tabela 17. Análise de variância dos dados relativos ao número de gemas formadas nas diferentes concentrações de claforan, para o genótipo BR 80-14853. Dados transformados para $\sqrt{x+1}$.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	2,05	0,68	1,46 (ns)
Resíduo	57	26,78	0,47	
Total	60	28,83	0,48	

Média = 3,10

C.V. (%) = 22,09

4.4. Ensaio para verificar a suscetibilidade dos explantes a acetosiringone e ao meio APM

O número médio de gemas formadas na presença de diferentes concentrações de acetosiringone e contendo o meio APM, para os genótipos PI 123439 e BR 80-14853, está mostrado na Tabela 18. Para o genótipo BR 80-14853, não se observaram diferenças entre os tratamentos (Tabela 19), porém, o número médio de gemas formadas na presença de diferentes concentrações de acetosiringone foi maior em relação ao controle. Este fato foi inesperado, pois o acetosiringone é tóxico se utilizado em altas concentrações (Lee & Komatsuda, 1995). Sendo assim, as médias deveriam ter abaixado em relação à do controle (0 μ M).

Para o genótipo PI 123439, foi detectada diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 20). Também neste caso, houve um efeito não esperado, pois as médias dos tratamentos foram superiores às do controle (Tabela 18).

Pelo Teste de Tukey (Tabela 21), observa-se que a média relativa à concentração de 300 μM de acetosiringone difere significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, daquela da concentração de 200 μM , da média do meio APM e do controle; a média da concentração de 40 μM difere da do meio APM e do controle e, as médias das concentrações de 100 μM , 20 μM , 200 μM , 0 μM e do meio APM não diferem estatisticamente entre si.

Foi observado que o meio APM e a adição de acetosiringone não influenciam na formação de gemas, pois as médias observadas nas concentrações de acetosiringone foram superiores à do controle (Tabela 18). Entretanto, Lee & Komatsuda (1995) observaram que altas concentrações de acetosiringone inibem a virulência do *Agrobacterium*. Nos trabalhos de Owens & Smigocki (1988), Delzer et al. (1990) e Lee & Komatsuda (1995) foi demonstrado que baixas concentrações deste composto fenólico, 10 μM , 20 μM e 40 μM , promovem uma maior eficiência na formação de tumores. Em vista disso, foi adotada a concentração de 40 μM de acetosiringone nos experimentos de transformação.

Tabela 18. Número médio de gemas formadas após a passagem dos explantes, dos genótipos BR 80-14853 (BR) e PI 123439 (PI), sob agitação de 160 rpm, por 16 horas, em várias concentrações de acetosiringone e no meio APM. Dados não transformados.

Genótipo	Acetosiringone (μM)						
	APM	0	20	40	100	200	300
BR	7,00 $\pm$ 4,26	6,81 $\pm$ 5,37	9,19 $\pm$ 5,65	7,30 $\pm$ 5,96	8,75 $\pm$ 5,18	9,38 $\pm$ 3,99	7,88 $\pm$ 3,61
PI	4,19 $\pm$ 3,67	3,38 $\pm$ 2,47	7,00 $\pm$ 4,73	8,69 $\pm$ 3,91	6,69 $\pm$ 3,68	4,88 $\pm$ 2,12	9,81 $\pm$ 3,90

Tabela 19. Quadro da análise de variância dos dados relativos ao número de gemas formadas nas diferentes concentrações de acetosiringone e do meio APM, para o genótipo BR 80-14853. Dados transformados para $\sqrt{x}+1$.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	6	3,81	0,635	0,822 (ns)
Resíduo	99	76,48	0,772	
Total	105	80,29	0,765	

Média = 2,88

C.V. (%) = 30,51

Tabela 20. Quadro da análise de variância dos dados relativos ao número de gemas formadas nas diferentes concentrações de acetosiringone e do meio APM, para o genótipo PI 123439. Dados transformados para $\sqrt{x}+1$.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	6	19,47	3,245	6,934 **
Resíduo	105	49,11	0,468	
Total	111	68,58	0,618	

Média = 2,59

C.V. (%) = 26,41

Tabela 21. Teste de Tukey das médias dos tratamentos para o genótipo PI 123439. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 1%.

Concentração (μM)	Média
300	3,23 a
40	3,04 ab
100	2,68 abc
20	2,66 abcd
200	2,38 bcde
APM	2,15 cdef
0	2,00 cdef

4.5. Infecção dos genótipos BR 80-14853 e PI 123439 pelas linhagens selvagens de *Agrobacterium*

As taxas de germinação foram de 92 e 77% para os genótipos PI 123439 e BR 80-14853, respectivamente. Dos 20 nós cotiledonares excisados e infectados com as linhagens selvagens de *Agrobacterium*, apenas metade desses nós foi avaliada, em virtude do restante ter sido contaminado pelas linhagens de *Agrobacterium*.

Para ambos os genótipos houve a formação, em todas as linhagens avaliadas, de um pequeno tumor na região do epicótilo cortado. Entretanto, este tumor não foi devido à infecção com os *Agrobacterium tumefaciens* (A208, C58 e B6S3) ou *A. rhizogenes* (8196, A4 e A4T) e sim pelo ferimento causado pela agulha da seringa, uma vez que este tipo de tumor foi também verificado nos controles.

Para sanar dúvidas relativas à possibilidade de cura bacteriana (perda dos plasmídios) foi efetuada uma outra infecção em discos foliares de

petúnia (*Petunia hybrida*). A escolha da petúnia se deve ao fato desta planta ser responsiva, quando infectada com *Agrobacterium* (Horsch et al., 1985).

4.6. Infecção da petúnia (*Petunia hybrida* [Mitchell]) por linhagens selvagens de *Agrobacterium*

Dos dez discos foliares utilizados para controle, nenhum apresentou a formação de tumor ou raiz, apenas seis dos discos ficaram mais amarelados.

Nenhuma alteração foi detectada quando foram utilizadas as três linhagens de *A. rhizogenes* (8196, A4 e A4T), sendo que, apenas a linhagem B6S3 de *A. tumefaciens* mostrou virulência, pois dos dez explantes infectados, sete apresentaram a formação de tumor ao redor do disco foliar. Este resultado mostrou que as linhagens A4T, A4, 8196, A208 e C58 provavelmente perderam o seu plasmídio.

Comparando-se os resultados obtidos em petúnia com aqueles obtidos usando-se a soja (item 4.5.) observou-se que a linhagem B6S3 não foi infectiva em nós cotiledonares de soja. Segundo Deblaere et al. (1985), a linhagem B6S3 transfere um baixo número de cópias de T-DNA que é integrado ao genoma da planta (de 3 a 4 cópias), indicando que essa linhagem é pouco infectiva. Outros experimentos devem ser conduzidos no sentido de avaliar o efeito dos genótipos utilizados (BR 80-14853 e IAC-Foscarim), do explante (nó cotiledonar), das linhagens de *Agrobacterium* e de suas interações.

4.7. Verificação da resistência da linhagem GV2260 desarmada ao antibiótico claforan

Foi avaliado se a bactéria GV2260 desarmada não apresenta crescimento em meio contendo 100 µg/ml ou 300 µg/ml de claforan. Das duas

placas contendo 100 µg/ml, apenas uma apresentou duas colônias, verificando-se a eficiência parcial desta concentração. Nas placas contendo 300 µg/ml não houve crescimento da bactéria, demonstrando ser esta concentração ideal, a qual também foi utilizada nos trabalhos de Rech et al. (1989) e Kumar et al. (1991).

Na ausência de claforan, foi observado crescimento bacteriano em toda a superfície da placa controle. Isto indica que nos experimentos de transformação deve-se adicionar este antibiótico ao meio de cultura, pois pode ocorrer a contaminação do meio e consequentemente do explante após sua lavagem.

4.8. Transformação do *Agrobacterium*

Após proceder o ensaio de transformação, foi avaliado o crescimento bacteriano em quatro placas de Petri. Assim, foram obtidas 24, 10, 26 e 409 colônias, respectivamente. A placa contendo 409 colônias foi desprezada em virtude deste número de colônias ser muito elevado se comparado com a média das demais placas (16,66 colônias), podendo ter ocorrido crescimento de colônias não transformadas. Na placa utilizada como controle, não houve crescimento de colônias.

4.9. Infecção da linhagem GV2260 de *Agrobacterium* em explantes derivados de nós cotiledonares do genótipo BR 80-14853

A taxa de germinação do genótipo BR 80-14853 foi de 80% neste experimento. A bactéria, juntamente com os nós-cotiledonares, foi colocada em meio MS/2 para o cocultivo em meio líquido. O meio MS/2 foi utilizado visando causar um estresse para a bactéria, forçando, desta forma, a infecção dos nós

cotiledonares. No entanto, houve um grande crescimento da bactéria, após as 16 horas de cocultivo. Nos dois erlenmeyers utilizados como controle, sem a presença da bactéria, não se observou qualquer crescimento ou turbidez no meio.

O uso do cocultivo em meio líquido por 16 horas e a ineficiência na desinfecção dos nós, causou uma contaminação em cerca de 40% dos nós. Em virtude da morfologia do explante, foi difícil a retirada da bactéria de sua superfície. Posteriormente, o restante dos explantes foi colocado em meio MS/2 + 2,5 μ M + sacarose 30 g/l + ágar 0,7% (p/v) + claforan 300 μ g/ml. Após a retirada do antibiótico claforan houve total contaminação, demonstrando ser imprescindível a presença deste antibiótico em todo o decorrer do ensaio.

4.10. Infecção da linhagem GV2260 de *Agrobacterium* em explantes derivados de nós cotiledonares do genótipo PI 123439

Neste experimento, a taxa de germinação das sementes do genótipo foi de 70%.

Foi observada uma maior eficiência de desinfecção dos explantes após a sua lavagem em 0,2% de água sanitária, por um período de tempo maior que o empregado para a desinfecção dos explantes do genótipo BR 80-14853 (item 4.9).

Após quatro meses da inoculação com o *Agrobacterium*, pode-se constatar que apenas 8% dos explantes apresentaram uma pequena regeneração (de um total de 458 explantes, apenas 35 deles apresentaram regeneração), esta ocorrendo somente após a diminuição e a posterior retirada total do antibiótico kanamicina. Neste experimento, também, pode-se verificar que os explantes apresentaram uma grande necrose em seus tecidos em decorrência do cocultivo em meio líquido.

Além disso, houve uma contaminação de 60% dos explantes, indicando que o período de tempo usado para o cocultivo em meio líquido é inadequado, pois favorece o crescimento da bactéria.

4.11. Alterações no método de infecção, utilizando o genótipo BR 80-14853

Neste experimento a taxa de germinação das sementes foi de 65%.

Neste ensaio, quando o cocultivo em meio líquido foi substituído pelo cocultivo em meio sólido, os resultados encontrados revelaram que 96% dos explantes apresentaram regeneração (de um total de 410 nós cotilédones, 395 deles apresentaram regeneração), mostrando o quanto é eficiente este protocolo. Além disso, pode-se observar que a ausência do antibiótico kanamicina ocasionou uma melhor regeneração em comparação àquela verificada no item 4.10, quando este antibiótico foi colocado desde o início do experimento (Figura 12).

A excisão dos explantes no primeiro dia e a sua inoculação após 24 horas não afetaram a resposta do explante à infecção; Lee & Komatsuda (1995) descreveram que cotilédones retirados um dia antes da inoculação mostraram-se mais aptos à transformação, se comparados aqueles que foram excisados e infectados no mesmo dia.

A infecção efetuada diretamente na região onde ocorre a regeneração, eliminou drasticamente a contaminação pelo *Agrobacterium*. Neste processo, utilizando seringa, (também utilizado por Rech et al., 1989; Chee et al., 1989 e Kumar et al., 1991), observou-se uma contaminação por *Agrobacterium* de 20% e pela bactéria rosa, de 50%.

4.12. Avaliação da atividade do gene da β -glucuronidase na expressão transitória

Foi observada a expressão transitória nos dois genótipos, PI 123439 e BR 80-14853, demonstrando que o gene GUS foi transferido para o citoplasma das células da planta, em virtude do tecido infectado ter se mostrado azul. Entretanto, como o gene GUS utilizado neste trabalho não possui *intron*, o aparecimento da cor azul pode também ser devido à contaminação pelo *Agrobacterium*.

Os explantes utilizados como controle, ou seja, aqueles que não foram infectados pelo *Agrobacterium*, não demonstraram qualquer tipo de atividade do gene GUS. A Figura 14 revela que somente onde o explante foi ferido pela seringa e a bactéria infectada, é que ocorreu a atividade do gene GUS. Esta região corresponde ao local onde ocorre regeneração. Isto não foi observado quando o nó cotiledonar foi cocultivado com a bactéria em meio líquido (Figura 13).

Pelo fato da regeneração de brotos de soja estar condicionada a não exposição dos explantes ao cocultivo em meio líquido e pelos resultados obtidos referentes à expressão transitória do gene GUS, recomenda-se o uso de uma seringa contendo uma cultura líquida de *Agrobacterium* para a infecção dos nós cotiledonares de soja.

Este protocolo, associado à infecção de um número elevado de explantes (> 2000), deve garantir a obtenção de brotos transformados de soja.

Figura 2. Formação de gemas no genótipo PI 123439, após 14 dias de cultura em meio MS/2 suplementado com frutose e concentrações variadas de BA (em μM): a) 0,0; b) 0,1; c) 0,5; d) 2,5; e) 5,0 e f) 7,5 (barra = 1,0 mm).

Figura 3. Formação de gemas no genótipo PI 123439, após 14 dias de cultura em meio MS/2 suplementado com sacarose e concentrações variadas de BA (em μM): a) 0,0; b) 0,1; c) 0,5; d) 2,5; e) 5,0 e f) 7,5 (barra = 1,0 mm).

Figura 4. Formação de brotos no genótipo BR 80-14853, após 44 dias de cultura em meio MS/2 suplementado com sacarose e duas concentrações de BA (em μM): a) 2,5 e b) 5,0 (barra = 1,0 cm).

Figura 5. Formação de brotos no genótipo BR 80-14853, após 44 dias de cultura em meio MS/2 suplementado com frutose e duas concentrações de BA (em μM): a) 2,5 e b) 5,0 (barra = 1,0 cm).

Figura 6. Formação de brotos no genótipo IAC-Foscarim, após 44 dias em cultura em meio MS/2 suplementado com frutose e duas concentrações de BA (em μM): a) 2,5 e b) 5,0 (barra = 1,0 cm).

Figura 7. Brotos do genótipo BR 80-14853 excisados e enraizados (barra = 1cm).

Figura 8. a) Aclimação em casa de vegetação de planta regenerada do genótipo BR 80-14853; b) Planta desenvolvida.

Figura 9. Teste de tolerância a kanamicina para o genótipo PI 123439, após 35 dias de cultura (barra = 1,0 cm).

Figura 10. Teste de tolerância a kanamicina para o genótipo BR 80-14853, após 35 dias de cultura (barra = 1,0 cm).

Figura 11. Efeito do antibiótico kanamicina (50 µg/ml) em nós cotiledonares do genótipo BR 80-14853, após 35 dias (barra branca = 1cm).

Figura 12. Nó cotiledonar do genótipo BR 80-14853 infectado com a linhagem GV2260 de *Agrobacterium*, duas semanas após a inoculação (barra = 1cm).

Figura 13. a) Expressão transiente do gene GUS observada no genótipo PI 123439; b) Explante controle (barra = 1mm).

Figura 14. a) Expressão transiente do gene GUS observada no genótipo BR 80-14853; b) Explante controle (barra = 1mm).

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A regeneração da parte aérea, a partir de explantes cotiledonares de soja, colocados adaxial e abaxialmente em meio B5 + 5 μ M de BA (6-benzilaminopurina), não é eficiente nos genótipos PI 123439, BR 80-14853 e IAC-Foscarim;
- O explante nó cotiledonar sofre regeneração de brotos dos genótipos de soja PI 123439, BR 80-14853 e IAC-Foscarim, quando este é obtido de sementes que germinaram em meio MS/2 + 2,5 μ M de BA + sacarose (30g/l) + ágar 0,7% (p/v) e é mantido em meio de cultura na presença de hormônio BA, por 35 dias;
- O hormônio BA nas concentrações de 2,5 e 5,0 μ M promove igualmente a formação de gemas e brotos nos nós cotiledonares dos genótipos BR 80-14853 e IAC-Foscarim porém, a formação de gemas nos nós cotiledonares do genótipo PI 123439 é favorecida na presença de 5,0 μ M;

- A frutose e a sacarose, fontes de carbono adicionadas ao meio de cultura, induzem igualmente a formação de gemas e brotos nos nós cotiledonares dos genótipos PI 123439 e BR 80-14853 porém, a formação de brotos nos nós cotiledonares do genótipo IAC-Foscarim é favorecida na presença de frutose;
- O antibiótico kanamicina, mesmo sendo utilizado em baixa concentração (50 µg/ml) prejudica a regeneração de gemas e brotos a partir dos nós cotiledonares dos genótipos PI 123439 e BR 80-14853, confirmando o seu aspecto seletivo;
- O antibiótico claforan deve ser mantido no meio de cultura com uma concentração de, no mínimo, 100 mg/l durante todo o processo de regeneração, para que não ocorra contaminação pelo *Agrobacterium*;
- A linhagem selvagem B6S3 de *Agrobacterium tumefaciens* é infectiva em discos foliares de Petúnia, mas não é em nós cotiledonares dos genótipos de soja PI 123439 e BR 80-14853;
- A utilização do *Agrobacterium* como vetor de transformação de soja independe do método de infecção (cocultivo em meio líquido ou sólido) porém, a regeneração de gemas e brotos está condicionada a não exposição dos explantes ao cocultivo em meio líquido;
- O método de infecção utilizando seringa elimina drasticamente a contaminação dos explantes e do meio de cultura pelo *Agrobacterium*;
- A expressão transitória do gene GUS ocorre na região de regeneração dos nós cotiledonares de soja, quando estes são infectados com uma seringa contendo uma cultura líquida da linhagem GV2260 de *Agrobacterium*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALT-MOERBE, J.; NEDDERMANN, P.; VON LINTIG, J.; WEILER, E.W.; SCHRODER, J. Temperature - sensitive step in Ti plasmid vir-region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacterium*. **Molecular and General Genetics**, v. 213, p. 1-8, 1988.
- AN, G.; EBERT, P.; MITRA, A.; HA, S. Binary vectors. In: GELVIN, S.B.; SCHILPEROORT, R.A., ed. **Plant molecular biology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. A3/1-A3/19.
- ANKENBAUER, R.G.; NESTER, E.W. Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: structural specificity and activities of monosaccharides. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 6442-6, 1990.
- ARRUDA, P. Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade. In: BULL, L.T.; CANTARELLA, H. ed. **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo (POTAFOS)**. Piracicaba, 1993. cap. 3, p. 45-61.
- BALDES, R.; MOSS, M.; GEIDER, K. Transformation of soybean protoplasts from permanent suspension cultures by co-cultivation with cells of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, v. 9, p. 135-45, 1987.

- BARWALE, U.B.; KERNS, H.R.; WIDHOLM, J.M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. **Planta**, v. 167, p. 473-81, 1986a.
- BARWALE, U.B.; MEYER, M.M.; WIDHOLM, J.M. Screening of *G. max* (L.) Merr. and *G. soja* Sieb. and Zucc. genotypes for multiple shoot formation at the cotyledonary node. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 72, p. 423-8, 1986b.
- BOLTON, F.W.; NESTER, E.W.; GORDON, M.P. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. **Science**, v. 232, p. 983-5, 1986.
- BOND, J.E.; GRESSHOFF, P.M. Soybean transformation to study molecular physiology. In: GRESSHOFF, P.M., ed. **Plant responses to the environment**. Florida: CRC Press, 1993. cap. 3, p. 25-44.
- ◊BRASILEIRO, A.C.M. Biologia de *Agrobacterium* sp. **Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas (ABCTP) Notícias**, v. 20, p. 2-6, jul. 1993.
- BYRNE, M. C.; MC DONNELL, R.E.; WRIGHT, M.S.; CARNES, M.G. Strain and genótipo specificity in the *Agrobacterium* - soybean interaction. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.8, p. 3-15, 1987.
- CHANG, H.H.; CHAN, M.T. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformations of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) is promoted by the inclusion of potato suspension culture. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 32, p. 171-8, 1991.

- CHEE, P.P.; FOBER, K.A.; SLIGHTOM, J.L. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, v. 9, p. 1212-8, 1989.
- CHENG, T.Y.; SAKA, Y.; VOQUI-DIHN, T.H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. **Plant Science Letters**, v. 19, n. 2, p. 91-9, 1980.
- CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A.; CARLSON, P.S. A morphologically competent soybean suspension culture. **Science**, v. 222, p. 632-4, 1983.
- CHRISTOU, P. Soybean transformation by electric discharge particle acceleration. **Physiologia Plantarum**, v. 79, p. 210-12, 1990a.
- CHRISTOU, P. Morphological description of transgenic soybean chimeras created by the delivery, integration and expression of foreign DNA using electric discharge particle acceleration. **Annals of Botany**, v. 66, p. 379-86, 1990b.
- CHRISTOU, P. From crown gall to field testing: historical review of soybean transformation. **Soybean Genetics Newsletter**, v. 18, p. 201-9, 1991.
- CHRISTOU, P.; MC CABE, D.E.; MARTINELL, B.J.; SWAIN, W.F. Soybean genetic engineering - commercial production of transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, v. 8, p. 145-51, 1990.
- CHRISTOU, P.; MURPHY, J.E.; SWAIN, W.F. Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed callus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, p. 3962-6, 1987.

- CHU, C.C. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: PROCEEDINGS OF SYMPOSIUM OF PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978. **Proceedings**. Peking, 1978. p. 43-50.
- CORPE, W.A. A method for detecting methylotrophic bacteria on solid surfaces. **Journal of Microbiological Methods**, v. 3, p. 215-21, 1985.
- DAVEY, M.R.; HAMMATT, N.; JONES, B. Somatic cell techniques in soybean improvement: problems, progress and potencial. **Soybean Genetics Newsletter**, v. 15, p. 41-8, 1988.
- DE CLEENE, M.; DE LEY, M. The host range of crown gall. **Botanical Review**, v. 42, p. 389-486, 1976.
- DEBLAERE, R.; BYTEBIER, B.; DE GREVE, H.; DEBOECK, F.; SCHELL, J.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium* - mediated gene transfer to plants. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 13, p. 4777-88, 1985.
- DELZER, B.W.; SOMERS, D.A.; ORF, J.H. *Agrobacterium tumefaciens* susceptibility and plant regeneration of 10 soybean genotypes in maturity groups 00 to II. **Crop Science**, v. 30, p. 320-2, 1990.
- DESSAUX, Y.; PETIT, A.; TEMPÉ, J. Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism. **Phytochemistry**, v. 34, p. 31-8, 1993.
- DHIR, S.K.; DHIR, S.; WIDHOLM, J.M. Plantlet regeneration from immature cotyledon protoplasts of soybean (*Glycine max* L.). **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 39-43, 1991.

- ENDO, H.; AOYAMA, T.; OKA, A. Transcription *in vitro* promoted by the *Agrobacterium* VirG protein. **FEBS Letters**, v. 334, p. 277-80, 1993.
- FACCIOTI, D.; O'NEAL, J.K.; LEE, S.; SHEWMAKER, C.K. Light-inducible expression of a chimeric gene in soybean tissue transformed with *Agrobacterium*. **Bio/Technology**, v. 3, p. 241-6, 1985.
- FINER, J.J. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 238-41, 1988.
- FINER, J.J.; CHENG, T.-S.; VERMA, D.P.S. Soybean transformation: technologies and progress. In: VERMA, D.P.S.; SHOEMAKER, R.C., ed. **Soybean: genetics, molecular biology and biotechnology**. Wallingford: CAB International, 1996. cap. 11, p. 249-62. (Biotechnology in Agriculture, 14).
- FINER, J.J.; MC MULLEN, M.D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. **In Vitro Cellular and Development Biology**, v. 27P, p. 175-82, 1991.
- FINER, J.J.; NAGASAWA, A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 15, p. 125-36, 1988.
- FISK, H.J.; DANDEKAR, A.M. The introduction and expression of transgenes in plants. **Scientia Horticulturae**, v. 55, p. 5-36, 1993.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p. 152-8, 1968.

- GANDER, E.S.; HOLMSTROEM, K.O.; DE PAIVA, G.R.; DE CASTRO, L.A.B.; CARNEIRO, M.; GROSS DE SÁ, M.F. Isolation, characterization and expression of a gene coding for a 2S albumin from *Bertholletia excelsa* (Brazil nut). **Plant Molecular Biology**, v. 16, p. 437-48, 1991.
- GHAI, J.; DAS, A. The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid encodes a DNA-relaxing enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 3109-13, 1989.
- GODWIN, I.; TODD, G.; FORD-LLOYD, B.; NEWBURY, H.J. The effects of acetosiringone and pH on *Agrobacterium* - mediated transformation vary according to plant species. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 671-5, 1991.
- GOODMAN, R.M.; KISER, J. Biothecnology and its impact on the future developments in soybean production and use. In: SHIBLES, R., ed. WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3., Ames, 1985. **Proceedings**. Boulder, 1985. p. 261-71.
- GRAYBOSCH, R.A.; EDGE, M.E.; DELANNAY, X. Somaclonal variation in soybean plants regenerated from the cotyledonary node tissue culture system. **Crop Science**, v.27, p.803-6, 1987.
- HAMMATT, N.; DAVEY, M.R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured zygotic embryos of soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Journal of Plant Physiology**, v. 128, p. 219-26, 1987.
- HAMMATT, N.; DAVEY, M.R.; NELSON, R.S. Plant regeneration from seedling cotyledons, leaves and petioles of *Glycine clandestina*. **Physiologia Plantarum**, v. 68, p. 125-8, 1986.

- HAMMATT, N.; KIM, H.-I.; DAVEY, M.R.; NELSON, R.S.; COCKING, E.C.
Plant regeneration from cotyledon protoplasts of *Glycine canescens* and
Glycine clandestina. **Plant Science**, v. 48, p. 129-35, 1987.
- HANSEN, G.; DAS, A.; CHILTON, M.D. Constitutive expression of the
virulence genes improves the efficiency of plant transformation by
Agrobacterium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United
States of America**, v. 91, p. 7603-7, 1994.
- HARTWECK, L.M.; LAZZERI, P.A.; CUI, D.; COLLINS, G.B.; WILLIAMS,
E.G. Auxin orientation effects on somatic embryogenesis from immature
soybean cotyledons. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 24, p.
821-8, 1988.
- HINCHEE, M.A.W.; CONNOR-WARD, D.V.; NEWELL, C.A.; MC
DONNELL, R.E.; SATO, J.J.; GASER, C.S.; FISCHHOFF, D.A.; RE, D.B.;
FRALEY, R.T.; HORSCH, R.B. Production of transgenic soybean plants
using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Bio/Technology**, v. 6, p. 915-
22, 1988.
- HOEKEMA, A.; HIRSCH, P.R.; HOOYKAAS, P.J.J.; SCHILPEROOT, R.A. A
binary vector strategy based on separation of vir and T region of the
Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid. **Nature**, v. 303, p. 179-80, 1983.
- HOLLAND, M.A.; POLACCO, J.C. Urease-null and hydrogenase-null
phenotypes of a phylloplane bacterium reveal altered nickel metabolism in two
soybean mutants. **Plant Physiology**, v. 98, p. 942-8, 1992.

- HOOD, E.E.; FRALEY, R.T.; CHILTON, M.D. Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain A281 on legumes. **Plant Physiology**, v. 8 p. 529-34, 1987.
- HOOYKAAS, P.J.J.; BEIJERSBERGEN, A.G.M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 157-79, 1994.
- HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMANN, N.L.; EICHHOLT, Z.D.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, v. 227, p. 1229-31, 1985.
- HYMOWITZ, T. ; CHALMERS, N.L.; COSTANZA, S.H.; SAAM, M.M. Plant regeneration from leaf explants of *Glycine clandestina* Wendl. **Plant Cell Reports**, v.3, p.192-4, 1986.
- ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Bio/Technology**, v. 14, p. 745-50, 1996.
- JL, J.M.; MARTINEZ, A.; DABROWSKI, M.; VELUTHAMBI, K.; GELVIN, S.B.; REAM, W. The overdrive enhancer sequence stimulates production of T-strands from the *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid. In: STASKAWICZ, B.; AHLQUIST, P.; YODER, P., ed. **Molecular biology of plant-pathogen interactions**. New York: Liss, 1988, p. 19-31.
- JIANG, X.C.; SHAO, Q.Q.; CARLSON, P.S. Callus induction and plant regeneration of wild soybean (*G. soja*) tissue culture. In: CONFERENCE ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY OF THE SOYBEAN, Iowa, 1986. **Abstract**. Ames: Iowa State University, 1986. p. 29-31.

- JIN, S.; KOMARI, T.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 4417-25, 1987.
- JIN, S.; ROITSCH, T.; ANKENBAUER, R.G.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. The VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* is auto-phosphorylated and is essential for *vir* gene regulation. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 525-30, 1990a.
- JIN, S.; PRUSTI, R.K.; ROITSCH, T.; ANKENBAUER, R.G.; NESTER, E.W. Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 4945-50, 1990b.
- JONES, B.; HAMMATT, N.; DAVEY, M.R. Screening of perennial *Glycine* species for shoot regeneration. **Soybean Genetics Newsletter**, v.15, p.51-3, 1988.
- JONES, B.; KUMAR, V.; HAMMATT, N.; DAVEY, M.R. Plant regeneration from tissues of *Glycine argyrea* Tind. transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. **Soybean Genetics Newsletters**, v. 18, p. 176-82, 1991.
- JORGENSEN, R.A.; SNYDER, C.; JONES, J.D.G. T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed in *A. tumefaciens* C58 derivatives. **Molecular and General Genetics**, v. 207, p. 471-7, 1987.
- KAMEYA, K.; WIDHOLM, J. Plant regeneration from hypocotyl sections of *Glycine* species. **Plant Science Letters**, v. 21, n. 3, p. 289-94, 1981.

- KAO, K.N.; KELLER, W.A.; MILLER, R.A. Cell divisions in newly formed protoplasts of soybean. **Experimental Cell Research**, v. 62, p. 338-40, 1970.
- KERNS, H.R.; BARWALE, U.B.; MEYER JUNIOR, M.M.; WIDHOLM, J.M. Correlation of cotyledonary node shoot proliferation and somatic embryoid development in suspension cultures of soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 140-3, 1986.
- KIMBALL, S.L.; BINGHAM, E.T. Adventitious bud development of soybean hypocotyl sections in culture. **Crop Science**, v. 13, n. 6, p. 758-60, 1973.
- KLEE, H.J.; HORSCH, R.B.; ROGERS, S.G. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, p. 467-86, 1987.
- KUMAR, V.; JONES, B.; DAVEY, M.R. Transformation by *Agrobacterium rhizogenes* and regeneration of transgenic shoots of the wild soybean *Glycine argyrea*. **Plant Cell Reports**, v.10, p. 135-8, 1991.
- LACORTE, C.; MANSUR, E. Transferência de genes através da *Agrobacterium tumefaciens*: avaliação da compatibilidade patógeno - hospedeiro. **Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas (ABCTP) Notícias**, v. 21, p. 2-7, dez. 1993.
- LARKIN, P.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p. 197-214, 1981.
- LAZZERI, P.A.; HILDEBRANDT, D.F.; COLLINS, G.B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 3, p. 160-7, 1985.

- LAZZERI, P.A.; HILDEBRANDT, D.F.; COLLINS, G.B. Plant regeneration from *Glycine* tissue cultures - embryogenic and organogenic systems. . In: CONFERENCE ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY OF THE SOYBEAN, Iowa, 1986. **Abstract**. Ames: Iowa State University, 1986. p. 29-31.
- LAZZERI, P.A.; HILDEBRANDT, D.F.; COLLINS, G.B. Soybean somatic embryogenesis: effects of hormones and culture manipulations. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 10, p. 197-208, 1987a.
- LAZZERI, P.A.; HILDEBRANDT, D.F.; COLLINS, G.B. Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional, physical and chemical factors. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 10, p. 209-20, 1987b.
- LEE, W.; KOMATSUDA, T. Binary vector mediated transformation of soybean. **Soybean Genetics Newsletter**, v. 21, p. 82-6, 1994.
- LEE, W.; KOMATSUDA, T. Impact of several factors related to inoculum, explants, compound and growth medium on tumorigenesis in vitro culture of soybean (*Glycine gracilis* and *Glycine max*). **Soybean Genetics Newsletter**, v. 22, p. 93-8, 1995.
- LEEMANS, J.; DEBLAERE, R.; WILLMITZER, L.; DE GREVE, H.; HERNALSTEENS, J.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. **EMBO Journal**, v. 1, p. 147-52, 1982.
- LI, B.J.; LANGRIDGE, W.H.R.; SZALAY, A.A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the soybean *Glycine max*. **Plant Cell Reports**, v. 4, p. 344-7, 1985.

- LIANZHENG, W.; GUANGCHU, Y.; JIAOFEN, L.; BOJIN, L.; JIAN, W.; ZHENCHUN, Y.; XIULAN, L.; OIQUAN, S.; XINGCUN, J.; ZEQU, Z. A study on tumor formation of soybean and gene transfer. **Scientia Sinica. Serie B**, v. 27, p. 391-7, 1984.
- LIN, W.; ODELL, J.T.; SCHREINER, R.M. Soybean protoplast culture and direct gene uptake and expression by cultured soybean protoplasts. **Plant Physiology**, v. 84, p. 856-61, 1987.
- LIPPMAN, B.; LIPPMAN, G. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. Merr. **Plant Cell Reports**, v. 3, p. 215-8, 1984.
- LUO, X.; ZHAO, G.; JIAN, Y. Plant regeneration from protoplast of soybean (*Glycine max* L.). **Acta Botanica Sinica**, v. 32, p. 616-21, 1990.
- MARSCHALEK, R. Correlações genéticas e fenotípicas entre produção de grãos, teor de proteína e teor de óleo em soja, em vários ambientes. Piracicaba, 1995. 103 p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MATTHYSSE, A.G. Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 313-23, 1987.
- MATTHYSSE, A.G.; GURLITZ, R.H.G. Plant cell range for attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to tissue culture. **Physiology Plant Pathology**, v. 21, p. 381-7, 1982.
- MATTHYSSE, A.G.; HOLMES, K.V.; GURLITZ, R.H.G. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. **Journal of Bacteriology**, v. 145, p. 583-95, 1981.

- MC BRIDE, K.E.; KNAUF, V.C. Genetic analysis of the VirE operon of the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 1430-7, 1988.

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

- MELCHERS, L.S. & HOOYKAAS, P.J.J. Virulence of *Agrobacterium*. **Oxford Survey of Plant Molecular and Cell Biology**, v. 4, p. 167-220, 1987.

- MELCHERS, L.S.; REGENSBURG-TUÏNK, A.J.G.; BOURRET, R.B. Membrane topology and functional analysis of the sensory protein VirA of *Agrobacterium tumefaciens*. **EMBO Journal**, v. 8, p. 1919-25, 1989.

- MILLER, R.A.; GAMBORG, O.L.; KELLER, W.A.; KAO, K.N. Fusion and division of nucleic in multinucleated soybean protoplasts. **Canadian Journal of Genetic and Cytology**, v. 13, p. 347-53, 1971.

- MROGINSKI, L.A.; KARTHA, K.K. Tissue culture of legumes for crop improvement. **Plant Breeding Review**, v. 2, p. 215-64, 1985.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-97, 1962.

- NESTER, E.W.; GORDON, M.P.; AMASINO, R.M.; YANOFSKY, M.F. Crown gall: a molecular and physiological analysis. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p. 387-413, 1984.

NEWELL, C.A.; LUU, H.T. Protoplast culture and plant regeneration in *Glycine canescens* F.J. Herm. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 4, p. 145-9, 1985.

° OTTEN, L.; CANADAY, J.; GÉRARD, J.-C.; FOURNIER, P.; CROUZET, P.; PAULUS, F. Evolution of agrobacteria and their Ti plasmids - a review. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 5, p. 279-87, 1992.

OWENS, L.D.; CRESS, D.E. Genotypic variability of soybean response to *Agrobacterium* strains harboring the Ti or Ri plasmids. **Plant Physiology**, v. 77, p. 87-94, 1985.

OWENS, L.D.; SMIGOCKI, A.C. Transformation of soybean cells using mixed strains of *Agrobacterium tumefaciens* and phenolic compounds. **Plant Physiology**, v. 88, p. 570-3, 1988.

PARROTT, W.A.; ALL, J.N.; ADANG, M.J.; BAILEY, M.A.; BOERMA, H.R. Recovery and evaluation of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* insecticidal gene. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 30, p. 144-9, 1994.

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

PEDERSEN, H.C.; CHRISTIANSEN, J.; WYNDAELE, R. Induction and in vitro culture of soybean crown gall tumors. **Plant Cell Reports**, v. 2, p. 201-4, 1983.

- PERALTA, E.G.; HELLMISS, R.; REAM, L.W. Overdrive a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumor - inducing plasmid. **EMBO Journal**, v. 5, p. 1137-42, 1986.
- RANCH, J.P.; OGLESBY, L.; ZIELINSKI, A.C. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybeans. **In Vitro Cellular and Development Biology**, v. 21, p. 653-8, 1985.
- RECH, E.L.; GOLDS, T.J.; DAVEY, M.R.; HAMMATT, N. Hairy root induction in perennial *Glycine* species, with regeneration of transformed plantlets in *G. canescens*. **Soybean Genetics Newsletters**, v. 15, p. 53-5, 1988.
- RECH, E.L.; GOLDS, T.J.; HUSNAIN, T.; VAINSTEIN, M.H.; JONES, B.; HAMMATT, N.; MULLIGAN, B.J.; DAVEY, M.R. Expression of a chimaeric kanamycin resistance gene introduced into the wild soybean *Glycine canescens* using a cointegrate Ri plasmid vector. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 33-6, 1989.
- RIKER, A.J. Studies on infections hairy root of nursery apple trees. **Journal of Agriculture Research**, v. 41, p. 507-40, 1930.
- ROTH, E.J.; LARK, K.G.; PALMER, R.G. Use of tissue culture as a tool in soybean improvement. In: SHIBLES, R., ed. **WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE**, 3., Ames, 1985. **Proceedings**. Boulder, Westview, 1985. p. 237-80.
- SAKA, H.; VOQUI-DIHN, T.H.; CHENG, T.Y. Stimulation of multiple shoot formation on soybean stem nodes in culture. **Plant Science Letters**, v.19, n. 3, 193-201, 1980.

- SANFORD, J.C. The biolistic process. **Trends in Biotechnology**, v. 6, p. 299-302, 1988.
- SATO, S.; NEWELL, C.; KOLACZ, K.; TREDO, L.; FINER, J.; HINCHEE, M. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 408-13, 1993.
- SCHENK, R.V.; HILDEBRANDT, A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, v. 50, p. 199-204, 1972.
- ◉ SHIMODA, N.; TOYODA-YAMAMOTO, A.; AOKI, S.; MACHIDA, Y. Genetic evidence for an interaction between the VirA sensor protein and the chvE sugar-binding protein of *Agrobacterium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 268, p. 26552-8, 1993.
- SPECHT, J.E.; GRAEF, G.L. Limitations and potentials of genetic manipulation of soybean. In: VERMA, D.P.S.; SHOEMAKER, R.C., ed. **Soybean: genetics, molecular biology and biotechnology**. Wallingford: CAB International, 1996. cap. 5, p. 91-106.
- STACHEL, S.E.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, v. 318, p. 624-9, 1985.
- ◉ STACHEL, S.E.; NESTER, E.W. The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. **EMBO Journal**, v. 5, p. 1445-54, 1986.

- STACHEL, S.E.; S.E.; TIMMERMAN, B.; ZAMBRYSKI, P. Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. **Nature**, v. 322, p. 706-12, 1986.
- STOMP, A.-M. Histochemical localization of β -glucuronidase. In: GALLAGHER S.R., ed. **GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression**. San Diego: Academic Press, 1992. cap. 7, p. 103-13.
- TEPFER, D. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. **Physiologia Plantarum**, v. 79, p. 140-6, 1990.
- TEPFER, M.; CASSE-DELBART, F. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. **Microbiology of Science**, v. 4, p. 24-8, 1987.
- *THORSTENSON, Y.R.; KULDAU, G.A.; ZAMBRYSKI, P.C. Subcellular localization of seven VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*: implications for the formation of a T-DNA transport structure. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 5233-41, 1993.
- VAN WORDRAGEN, M.F.; DONS, H.J.M. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of recalcitrant crops. **Plant Molecular Biology Report**, v. 10, p. 12-36, 1992.
- WARD, E.R.; BARNES, W.M. VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of T-strand DNA. **Science**, v. 242, p. 927-30, 1988.
- WEI, Z.M.; XU, Z.H. Plant regeneration from protoplast of soybean (*Glycine max* L.). **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 348-51, 1988.

WIDHOLM, J.M. Is soybean transformation finally here? **Trends in Biotechnology**, v. 6, p. 265-6, 1988.

WIDHOLM, J.M. *In vitro* selection and culture - induced variation in soybean. In: VERMA, D.P.S.; SHOEMAKER, R.C., ed. **Soybean: genetics, molecular biology and biotechnology**. Wallingford: CAB International, 1996. cap. 6, p. 107-26.

WIDHOLM, J.M.; DHIR, S.K.; DHIR, S. Production of transformed soybean plants by eletroporation of protoplasts. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 357-61, 1992.

WIDHOLM, J.M.; RICK, S. Shoot regeneration from *Glycine canescens* tissue cultures. **Plant Cell Reports**, v. 2, n. 1, p. 19-20, 1983.

WILCOX, J.R. Soybean protein and oil quality. In: CONFERÊNCIA MUNDIAL DE INVESTIGATION EN SOJA, 4., Buenos Aires, 1989. **Proceedings**. Buenos Aires, 1989. p. 29-39.

WRIGHT, M.S.; KOEHLER, S.M.; HINCHEE, M.A.; CARNES, M.G. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 150-4, 1986.

WRIGHT, M.S.; WARD, D.V.; HINCHEE, M.A.; CARNES, M.G.; KAUFMAN, R.J. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merr.) from cultured primary leaf tissue. **Plant Cell Reports**, v.6, p. 83-9, 1987b.

WRIGHT, M.S.; WILLIAMS, M.H.; PIERSON, P.E.; CARNES, M.G. Initiation and propagation of *Glycine max* L. Merr.: Plants from tissue-cultured epicotyls. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.8, p. 83-90, 1987a.

WYNDAELE, R.; VAN ONCKELEN, H.; CHRISTIANSEN, J.; RUDELSHEIM, P.; HERMANS, R.; DE GREEF, J. Dynamics of endogenous IAA and cytokinins during the growth cycle of soybean crown gall and untransformed callus. **Plant Cell Physiology**, v. 26, p. 1147-57, 1985.

XU, Z.-H.; DAVEY, M.R.; COCKING, E.C. Callus formation from root protoplasts of *Glycine max* (soybean). **Plant Science Letters**, v. 24, p. 111-5, 1982.

• ZAMBRYSKI, P.C. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 43, p. 465-90, 1992.

ZAMBRYSKI, P.C.; HOOS, H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **EMBO Journal**, v. 2, p. 2143-50, 1983.

• ZAMBRYSKI, P.C.; TEMPÉ, J.; SCHELL, J. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids into plants. **Cell**, v. 56, p. 193-201, 1989.