

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0901169-2 A2**

(22) Data de Depósito: 27/03/2009
(43) Data da Publicação: 16/11/2010
(RPI 2080)



* B R P I 0 9 0 1 1 6 9 A 2 *

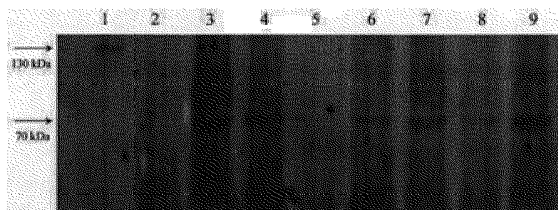
(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/09
C12N 15/82
A01H 5/00

(54) Título: **CONSTRUÇÃO GÊNICA, MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA, PROCESSO PARA PRODUZIR PRAGUICIDA, PROCESSO DE CONTROLE DE PRAGAS**

(73) Titular(es): Universidade Federal do Rio Grande do Sul

(72) Inventor(es): Jorge Fernando Pereira, José Roberto Salvadori, Luciane Maria Pereira Passaglia, Maria Helena Bodanese Zanettini, Milena Schenkel Homrich, Paulo Fernando Bartagnolli

(57) Resumo: CONSTRUÇÃO GÊNICA, MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA, PROCESSO PARA PRODUZIR PRAGUICIDA, PROCESSO DE CONTROLE DE PRAGAS. A presente invenção proporciona uma construção gênica que compreende o gene cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* funcionalmente ligado a um promotor funcional em plantas. Em uma concretização preferencial, plantas transformadas com a construção gênica da invenção, expressam o gene cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* e apresentam adequado desempenho agrônomo/produtividade e proporcionam completa eficácia contra *A. gemmatalis*, oferecendo um efetivo potencial para resistência a insetos em soja.





Relatório Descritivo de Patente de Invenção

CONSTRUÇÃO GÊNICA, MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA,
PROCESSO PARA PRODUZIR PRAGUICIDA, PROCESSO DE CONTROLE DE
PRAGAS

5

Campo da Invenção

A presente invenção está no campo de Biotecnologia e Biologia Molecular. Mais especificamente, a presente invenção proporciona uma construção gênica que compreende o gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* funcionalmente ligado a um promotor funcional em plantas. Em uma concretização preferencial, plantas transformadas com a construção gênica da invenção, expressam o gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* e apresentam adequado desempenho agrônomo/produtividade e proporcionam completa eficácia contra *A. gemmatilis*, oferecendo um efetivo potencial para resistência a insetos em soja.

10
15

Antecedentes da Invenção

A soja

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

20
25
30

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

Transformação genética vegetal

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

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

Os avanços na utilização da transgênese vegetal têm sido relatados em um grande número de espécies de plantas, utilizando-se diferentes métodos de transformação genética. Estes métodos incluem a transformação genética mediada por polietilenoglicol (PEG) e lipossomos (métodos químicos), a
25 microinjeção, a eletroporação e o bombardeamento de partículas (métodos físicos), o uso de vetores virais e/ou bacterianos, como a agroinfecção e o sistema *Agrobacterium* (métodos biológicos).
30

O método de transformação genética por bombardeamento de partículas (Sanford, 1988), também denominado de aceleração de partículas ou projéteis, biolística ou biobalística, é caracterizado pela introdução de moléculas de DNA em células e tecidos intactos, por meio de microprojéteis acelerados em alta
5 velocidade, capazes de atravessarem a parede e as membranas celular e nuclear, liberando no núcleo os fragmentos de DNA. Nesta organela, por processos de recombinação ilegítima ou homóloga, e dependentes exclusivamente de componentes celulares, o DNA exógeno eventualmente pode integrar-se ao DNA cromossômico (Sanford, 1990).

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

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

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

O gene repórter mais utilizado na avaliação da condição transgênica de células e tecidos é o *uidA* ou *gusA*, isolado da bactéria *Escherichia coli* e que codifica a enzima β -glucuronidase (GUS). As células transformadas com este gene podem ser visualizadas por meio da coloração azul decorrente da conversão do substrato ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glicurônico em um precipitado indólico azul, na presença de oxigênio.

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

Embriogênese somática e transformação genética de soja

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

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

Vários trabalhos posteriores relataram a obtenção de embriões somáticos, por via direta ou indireta, a partir de cotilédones de embriões imaturos (Lippmann e Lippmann, 1984; Lazzeri *et al.*, 1985; Barwale *et al.*, 1986; entre outros). Contudo, a maioria dos protocolos se mostrava pouco

eficiente para a transformação. Em parte, essa limitação provinha da incapacidade de produzir um grande número de embriões, obstáculo superado com a descoberta do uso de altas concentrações do regulador de crescimento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nas etapas de indução e proliferação dos embriões somáticos. Por outro lado, a transformação dos embriões somáticos originava plantas quiméricas (Parrott *et al.*, 1989) devido à origem multicelular dos embriões somáticos primários, a partir de células superficiais da epiderme dos explantes (Finer, 1988). Entretanto, este último autor mostrou que a proliferação dos embriões somáticos secundários ocorria a partir de células únicas da superfície dos embriões primários, e que a embriogênese secundária poderia ser obtida com a manutenção do tecido em meio com alta concentração de 2,4-D. A origem unicelular dos embriões secundários faz deste tecido o principal alvo para a transformação genética, afastando o problema do quimerismo.

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

Um procedimento simples para o estabelecimento e proliferação de embriões somáticos de cotilédones imaturos, mais rápido e menos laborioso do que as culturas embriogênicas em suspensão, foi desenvolvido por Santarém *et al.* (1997), utilizando um meio semi-sólido descrito por Wright *et al.* (1991). Seguindo este procedimento, Santarém e Finer (1999) e Droste *et al.* (2002) produziram plantas transgênicas de soja das cultivares "Jack" e "IAS 5", respectivamente, expressando o gene repórter *gusA*. As plantas transgênicas

obtidas em ambos os trabalhos eram férteis, indicando que esta estratégia é bastante promissora para a recuperação de plantas transgênicas de soja.

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

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

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

Co-transformação

A co-transformação caracteriza-se pela utilização de dois cassetes de transformação (ou plasmídeos) independentes, um dos quais portando os genes repórter/marcador de seleção e o outro, o gene de interesse. O sistema de co-transformação permite a segregação do gene de interesse e dos genes repórter/marcador de seleção na progênie das plantas transformadas, desde

que tais genes tenham sido inseridos em *loci* não ligados (Ebinuma *et al.*, 2001). Desta maneira, a co-transformação pode ser vista como uma estratégia promissora para a obtenção de plantas transgênicas livres de genes marcadores de seleção.

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

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

Bacillus thuringiensis* e *Anticarsia gemmatalis

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva,
25 entomopatogênica, aeróbica (ou facultativamente anaeróbica) e amplamente utilizada como biopesticida para o controle de insetos-praga de culturas agronomicamente importantes. À semelhança de outras bactérias, esta espécie pode manter-se em latência na forma de endósporos, sob condições adversas. Durante a fase de esporulação, as bactérias sintetizam proteínas que se
30 acumulam na periferia dos esporos sob a forma de cristais (Peferöen, 1997). Estes cristais são compostos de várias proteínas Cry, também chamadas de δ -

endotoxinas ou *Insecticidal Crystal Proteins* (ICPs). Estas proteínas têm uma atividade tóxica específica, principalmente, contra larvas de lepidópteros, dípteros e coleópteros (Hongyu *et al.*, 2000).

5 Alguns modelos têm sido propostos na tentativa de elucidar o mecanismo de ação das proteínas Cry. Atualmente, o modelo “guarda-chuva” é o mais aceito na comunidade científica. De acordo com este modelo, as δ -endotoxinas constituintes dos cristais são protoxinas solubilizadas e proteoliticamente convertidas em pequenos polipeptídios no trato digestivo dos insetos suscetíveis. Nesse processo, ocorre a remoção de um peptídeo amino-
10 terminal, composto de 25 a 30 aminoácidos e de, aproximadamente, metade da proteína restante, correspondente à porção C-terminal. Estes pequenos polipeptídios associam-se a sítios específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células do intestino dos insetos, causando lise osmótica por meio da formação de poros na membrana celular (Schnepf *et al.*, 1998; Bravo *et al.*,
15 2004).

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

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

A lagarta *Anticarsia gemmatalis* Hübner é a principal praga da soja e ocorre, principalmente, nas Américas do Norte e Sul (Panizzi e Corrêa-Ferreira, 1997; Macrae *et al.*, 2005). Esta lagarta causa danos ao reduzir
30 substancialmente a área foliar, promovendo uma significativa redução na produção de grãos. Uma única larva pode consumir mais de 110 cm² da

folhagem da soja (Walker *et al.*, 2000). Para o controle deste inseto têm sido utilizados, predominantemente, inseticidas químicos, com até três aplicações por safra, ocasionando enormes prejuízos ambientais e custos elevados aos produtores. Além disso, os inseticidas químicos provocam a mortalidade de outros insetos, até mesmo de inimigos naturais, que contribuem para o controle de pragas. A busca por métodos alternativos de controle de insetos-praga tem sido realizada por vários laboratórios ao redor do mundo devido, principalmente, à necessidade de preservação do meio ambiente. Os inseticidas biológicos têm sido a alternativa encontrada para a chamada "agricultura orgânica" e para o controle mais seletivo de insetos. Bioinseticidas contra *A. gemmatalis* baseados em formulações de esporos de *B. thuringensis* demonstraram várias vantagens sobre o uso de agentes químicos de controle, no que diz respeito à alta especificidade e toxicidade desta bactéria a determinados insetos-praga, enquanto é atóxica a outros insetos, plantas e vertebrados (Hongyu *et al.*, 2000). Estes bioinseticidas, mesmo utilizados há mais de 50 anos e com claras indicações de serem menos impactantes ao meio ambiente do que os agroquímicos, nunca ocuparam um lugar de destaque no mercado de inseticidas, principalmente, por problemas relacionados à perda de estabilidade, à ausência de translocação nas plantas, ao espectro limitado de ação e à rápida degradação pela ação da luz ultravioleta (Navon, 2000).

Recentemente, a possibilidade de gerar plantas transgênicas resistentes a insetos, através da introdução nestas de genes codificadores de δ -endotoxinas, tem sido explorada em diferentes culturas. Em 1981, o primeiro gene *cry* foi clonado e expresso em *Escherichia coli* (Schnepf e Whiteley, 1981). Poucos anos depois, foi produzida a primeira planta de tomate com genes de *Bt* (Fischhoff *et al.*, 1987). O milho Maximizer™ da Novartis, o algodão Bollgard™ e a batata Newleaf™ da Monsanto foram introduzidos no mercado norte-americano em 1995, sendo genericamente conhecidos como plantas-*Bt* (Jouanin *et al.*, 1998). Em 2006, 19% e 13% da área global de transgênicos (102 milhões de hectares) foi ocupada por culturas *Bt* e por

culturas *Bt*/tolerantes a herbicida, respectivamente (James, 2006). Além do milho, do algodão e da canola, que já se encontram em comercialização, outras plantas cultivadas expressando uma ou várias proteínas Cry para o controle de lepidópteros e coleópteros estão em fase de desenvolvimento em laboratórios ou em testes a campo.

Apesar de plantas de soja-*Bt* ainda não terem sido liberadas para cultivo, várias linhagens transgênicas já foram obtidas. A atividade inseticida de δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* no controle de larvas de *A. gemmatilis* foi demonstrada através de bioensaios com plantas de soja-*Bt* por Stewart *et al.* (1996), Walker *et al.* (2000), Macrae *et al.* (2005) e, mais recentemente, por Miklos *et al.* (2007) e Homrich *et al.* (2008).

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

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

Referências que circunscrevem a invenção, sem, contudo, antecipar ou sequer sugerir qualquer de seus objetos:

Barwale UB, Kerns HR e Widholm JM (1986) Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167:473-481.

Bennett PM, Livesey CT, Nathwani D, Reeves DS, Saunders JR e Wise R (2004) Na assessment of the risks associated with the use of antibiotic resistance genes in the genetically modified plants: report of the working

party of the British Society for Antimicrobial Chemoterapy. J Antimicrob Chemother 53:418-431.

5 Bettany AJE, Dalton SJ, Timms E, Dhanoa MS e Morri P (2002) Effect of selectable gene to reporter gene ratio on the frequency of co-transformation and co-expression of *uidA* and *hpt* transgenes in protoplast-derived plants of tall fescue. Plant Cell Tissue Organ Cult 68:177-186.

Betz FS, Hammond BG e Funchs RL (2000) Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests. Regul Toxicol Pharmacol 32:156-173.

10 Beversdorf WD e Bingham ET (1977) Degrees of differentiation obtained in tissue cultures of *Glycine* species. Crop Sci 17:307-311.

Bishop AH, Johnson C e Perani M (1999) The safety of *Bacillus thuringiensis* to mammals investigated by oral and subcutaneous dosage. World J Microbiol Biotechnol 15:375-380.

15 Bodanese-Zanettini MH e Pasquali G (2004) Plantas transgênicas. In: Mir L (eds) Genômica. 1st edition. Atheneu, São Paulo, pp 721-736.

Bravo A, Sánchez J, Kouskoura T e Crickmore N (2002) N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *B. thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. J Biol Chem 277:23985-23987.

20 Bravo A, Gomez I, Conde J, Munoz-Garay C, Sánchez J, Zhuang M, Gill SS e Soberón M (2004) Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. Biochim Biophys Acta 1667:38-46.

25 Broderick NA, Raffa KF e Handelsman J (2006) Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. Proc Natl Acad Sci USA 103:15196-15199.

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

30 Christianson ML, Warnick DA e Carlson PS (1983) A morphogenetically competent soybean suspension culture. Science 222:632-634.

- Christou P, Swain WF, Yang NS e McCabe DE (1989) Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Genetics* 88:7500-7504.
- Christou P e Swain WF (1990) Co-transformation frequencies of foreign genes
5 in soybean cell cultures. *Theor Appl Genet* 79:337-341.
- Christou P, McCabe DE, Martinell BJ e Swain WF (1990) Soybean genetic engineering-commercial products of transgenic plants. *Trends Biotechnol* 18:145-151.
- De Maagd RA, Bosch D e Stiekema W (1999) *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sci* 14:9-13.
10
- Donaldson PA e Simmonds DH (2000) Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. *Plant Cell Rep* 19:478-484.
- Droste A, Leite PCP, Pasquali G, Mundstock EC e Bodanese-Zanettini MH
15 (2001) Regeneration of soybean via embryogenic suspension culture. *Scientia Agrícola* 58:753-758.
- Droste A, Pasquali G e Bodanese-Zanettini MH (2002) Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. *Euphytica* 127:367-376.
- 20 Dunwell JM (1999) Transgenic crops: The next generation, or an example of 2020 vision. *Ann Bot* 84:269-277.
- Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Endo S, Yamada K e Komamine A (2001) Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker. *Plant Cell Rep* 20:383-392.
- 25 ERS-USDA, Soybeans and Oil Crops,
<http://www.ers.usda.gov/Briefing/SoybeansOilCrops> (January 18, 2008).
- Finer JJ (1988) Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Rep* 7:238-241.
- Finer JJ e McMullen MD (1991) Transformation of soybean via particle
30 bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 27:175-182.

- Finer JJ, Vain P, Jones MW e McMullen MD (1992) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep* 11:323-328.
- Fischhoff DA, Bowdish KS, Perlak FJ, Marrone PG, McCormick SM, Niedermeier JG, Dean DA, Kusano-Kretzmer K, Mayer EJ, Rochester DE, Rogers SG e Fraley RT (1987) Insect tolerant transgenic tomato plants. *Biotechnology* 5:807-813.
- Gelvin SB (1998) The introduction and expression of transgenes in plants. *Curr Opin Biotechnol* 9:227-232.
- Grover A, Sahi C, Sanan N e Grover A (1999) Taming abiotic stresses in plants through genetic engineering: current strategies and perspective. *Plant Sci* 143:101-111.
- Hadi MZ, McMullen MD e Finer JJ (1996) Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Rep* 15:500-505.
- Herbers K e Sonnewald U (1999) Production of new/modified proteins in transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol* 10:163-168.
- Hinchee MA, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, Fischhoff DA, Re DB, Fraley RT e Horsch RB (1988) Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Biotechnology* 6:915-922.
- Hofmann N, Nelson RL e Korban SS (2004) Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 77:157-163.
- Homrich, M. S.; Passaglia, L. M. P.; Pererira, J. F.; Bertagnolli, P. F.; Pasquali, G.; Zaidi, M. A; Altosaar, I.; Bodanese-Zanetrini, M. H. Resistance to *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, p. 522-531, 2008.
- Homrich, m. S.; Passaglia, l. M. P.; pereira, J. F.; Bertagnolli, P. F.; Salvadori, J. R.; Nicolau, M.; Kaltchuk-Santos, E.; Alves, I. B.; Bodanese-Zanettini, M. H.

Agronomic performance, chromosomal stability and resistance to velvetbean caterpillar of transgenic soybean expressing cry1Ac gene. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, p. 10-15, 2008.

- 5 Hongyu Z, Ziniu Y e Wangxi D (2000) Composition and ecological distribution of Cry protein and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. *J Invertebr Pathol.* 76:191-197.
- Hu CY e Bodanese-Zanettini MH (1995) Embryo culture and embryo rescue for wide cross hybrids. In: Gamborg OL e Phillips (eds) *Plant Cell, Tissue and Organ Cultures: Fundamental Methods*. Springer, Berlin, pp. 129-141.
- 10 James C (2006) Global status of commercialized biotech/GM crops: 2006. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/35/executivesummary/default.html>
- Jouanin L, Bodané-Botino M, Girard C, Morrot G e Giband M (1998) Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci* 131:1-11.
- 15 Ko TS, Nelson RL e Korban SS (2004) Screening multiple soybean cultivars (MG 00 to MG VIII) for somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons. *Crop Sci* 44:1825-1831.
- Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E e Christou P (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol Biol*
- 20 52:247-258.
- Lazzeri PA, Hildebrand DF e Collins GB (1985) A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Mol Biol Rep* 3:160-167.
- Li HY, Zhu YM, Chen Q, Conner RL, Ding XD, Li J e Zhang BB (2004)
- 25 Production of transgenic soybean plants with two anti-fungal protein genes via *Agrobacterium* and particle bombardment. *Biol Plant* 48:367-374.
- Lippmann B e Lippmann G (1984) Introduction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. Merr. *Plant Cell Rep* 3:215-218.
- 30 Macrae TC, Baur ME, Boethel DJ, Fitzpatrick BJ, Gao AG, Gamundi JC, Harrison LA, Kabuye VT, Mcpherson RM, Miklos JA, Paradise MS,

Toedebusch AS e Viegas A (2005) Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1A* gene for control of Lepidoptera. J Econ Entomol 98:577-587.

5 McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ e Christou P (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. Biotechnology 6:923-926.

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

Miki B e McHugh S (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. J Biotechnol 107:193-232.

15 Miklos JA, Alibhai MF, Bledig SA, Connor-Ward DC, Gao AG, Holmes BA, Kolacz KH, Kabuye VT, MacRae TC, Paradise MS, Toedebusch AS e Harrison LA (2007) Characterization of soybean exhibiting high expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1A* transgene that confers a high degree of resistance to Lepidopteran pests. Crop Sci 47:148-157

20 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/37AA904436961F63E040A8C07502416D> (October 15, 2007).

Munkvold GP e Hellmich RL (1999a) Comparison of fumosin concentrations in kernel of transgenic Bt maize hybrids and non-transgenic hybrids. Plant Dis 83:130-138.

25 Munkvold GP e Hellmich RL (1999b) Genetically modified insect resistant corn: implications for disease management. <http://www.apsnet.org/online/feature/BtCorn/Top.html>

Navon A (2000) *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection-reality and prospects. Crop Prot 19:669-676.

- Olhott PM, Flagel LE, Donovan CM e Somers DA (2003) Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 216:723-735.
- 5 Panizzi AR e Corrêa-Ferreira BS (1997) Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. *Trends Entomol* 1:71-88.
- Park J, Lee YK, Kang BK e Chung WI (2004) Co-transformation using a negative selectable marker gene for the production of selectable marker gene-free transgenic plants. *Theor Appl Genet* 109:1562-1567.
- 10 Parrott WA, Hoffman LM, Hildebrand DF, Williams EG e Collins GB (1989) Recovery of primary transformants of soybean. *Plant Cell Rep* 7:615-617.
- Paz MM, Martinez JC, Kalvig AB, Fonger TM e Wang K (2006) Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep* 25:206-213.
- 15 Peferöen M (1997) Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. *Trends Biotechnol* 15:173-177.
- Perlak FJ, Deaton RW, Armstrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT e Fischhoff DA (1990) Insect resistant cotton plants. *Nat Biotechnol* 8:939-943.
- 20 Sanford JC (1988) The biolistic process. *Trends Biotechnol* 6:299-302.
- Sanford JC (1990) Biolistic plant transformation. *Plant Physiol* 79:206-209.
- Santarém ER, Pelissier B e Finer JJ (1997) Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. In *Vitro Cell Dev Biol Plant* 33:13-19.
- 25 Santarém ER e Finer JJ (1999) Transformation of soybean [*Glycine Max* (L.)Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. In *Vitro Cell Dev Biol Plant* 35: 451-455.
- Santos KGB, Mundstock E e Bodanese-Zanettini MH (1997) Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. *Plant Cell Rep* 16:859-864.
- 30

- Sardana R, Dukiandjiev S, Giband M, Cheng X, Cowan K, Sauder C e Altosaar I (1996) Construction and rapid testing of synthetic and modified toxin gene sequences CryIA (b & c) by expression in maize endosperm culture. *Plant Cell Rep* 15:677-681.
- 5 Schnepf E e Whiteley HR (1981) Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2893-2897.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR e Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:775-806.
- 10 Siegel JP (2001) The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *J Invertebr Pathol* 77:13-21.
- Singh RJ, Klein TM, Mauvais CJ, Knowlton S, Hymowitz T e Kostow CM (1998) Cytological characterization of transgenic soybean. *Theor Appl Genet* 15 96:319-324.
- Sobek EA e Munkvold GP (1999) European corn borer (Lepidoptera:Pyralidae) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. *J Econ Entomol* 92:503-509.
- Steward FC (1958) Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of growth from free cell to carrot plant. *Am J Bot* 45:709-713.
- 20 Stewart CN, Adang MJ, All JN, Boerma HR, Cardineau G, Tucker D e Parrott WA (1996) Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene. *Plant Physiol* 112:121-129.
- 25 Trick HN, Dinkings RD, Santarém ER, Samoylov V, Meurer CA, Walker DR, Parrott WA, Finer JJ e Collins GB (1997) Recent advances in soybean transformation. *Plant Tissue Cult Biotechnol* 3:9-24.
- Trick HN e Finer JJ (1998) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Rep* 17:482-488.
- 30

- Van Den Elzen PJM, Townsend J, Lee KY e Bedbrook JRA (1985) Chimeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Mol Biol* 5:299-305.
- 5 Walden R e Wingender R (1995) Gene-transfer and plant regeneration techniques. *Trends Biotechnol* 13:324-331.
- Walker DR, All JN, McPherson RM, Boerma HR e Parrott WA (2000) Field evaluation of soybean engineered with a synthetic *cry1Ac* transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera : Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera : Pyralidae). *J Econ Entomol* 93:613-622.
- 10 Williams ES e Maheswaran B (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann Bot* 57:443-462.
- Wraight CL, Zangerl AR, Carroll MJ e Berenbaum MR (2000) Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7700-7703.
- 15 Wright MS, Launis KL, Novitzky R, Duesiing JH e Harms CT (1991) A simple method for the recovery of multiple fertile plants from individual somatic embryos of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 27:153-157.
- 20 Xia JY, Cui JJ, Ma LH, Dong SX e Cui XF (1999) The role of transgenic *Bt* cotton in integrated insect pest management. *Acta Gossypii Sim* 11:57-64.
- Yan B, Reddy MSS, Collins GB e Dinkins RD (2000) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants. *Plant Cell Rep* 19:1090-1097.
- 25 Yin Z, Plader W e Malepszy S (2004) Transgene inheritance in plants. *J Appl Genet* 45:127-144.
- Yuan L e Knauf VC (1997) Modification of plants components. *Curr Opin Biotechnol* 8:227-233.
- 30 Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção,

de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

5 É um dos objetos da invenção proporcionar uma construção gênica que compreende o promotor 35S funcionalmente ligado a um gene de interesse agrônômico. Em uma concretização preferencial, plantas transformadas com a construção gênica da invenção, na qual o referido gene de interesse agrônômico é o gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*, apresentam adequado
10 desempenho agrônômico/produktividade e proporcionam completa eficácia contra *A. gemmatalis*, oferecendo um efetivo potencial para resistência a insetos em soja.

 É um outro objeto da invenção proporcionar um método de transformação de soja que compreende a co-transformação via
15 bombardeamento de tecido embriogênico.

 É ainda outro objeto da invenção proporcionar um processo de produção de substâncias de interesse econômico em plantas. Em uma concretização preferencial, a substância de interesse econômico é um praguicida.

 É um outro objeto da invenção proporcionar um processo de controle de pragas que compreende a expressão de praguicidas em plantas transformadas
20 geneticamente.

 Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

25

Breve Descrição das Figuras

 A Figura 1 mostra a detecção da proteína recombinante *cry1Ac* em plantas de soja por hibridização western blot. Amostras de plantas T_0 *cry1Ac/gusA*-positiva são mostrados nas linhas 3, 4, 6, 7, 8, 9 do blot,
30 juntamente com um protoxina *cry1Ac* de Bt como controle positivo (linha 1), e da planta não transformada (linha 2). A linha 5 foi apresenta um extrato de

proteína de uma planta *cry1Ac*-negativa/*gusA*-positiva. As setas indicam a posição da toxina *cry1Ac* em ~70 kDa e da protoxina *cry1Ac* a ~130 kDa.

A Figura 2 mostra a amplificação por PCR dos genes *cry1Ac* (A) e *gusA* (B) de uma amostra da progenia 18a4 T₂. Linhas: 1, controle positivo (plasmídios pGEM4Z/pGusHyg); 2, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15, 18, 19, plantas CRY1AC/GUSA-positiva, 3, 4, 5, 8, 9, 13, 16, 17, plantas CRY1AC/GUSA-negativa; 20, controle negativo (planta não-transformada).

A Figura 3 mostra a análise por hybridização Southern blot da progenia T₁ de plantas T₀ 18a1 e 18a4. Dez µg de DNA genômico foi digerido com *Bam*HI e separado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, aplicado em nitrocelulose e hibridizado com uma sonda *cry1Ac* de 1,8 kb. Linhas: 1, controle positivo (pGEM4Z), 2, 3, CRY1AC/GUSA-positiva plantas de 18a1 família, 4, 5, 6, 7, 8, plantas da família 18a4 CRY1AC/GUSA-positiva, 9, 10, plantas *cry1Ac/gusA*-negativa; 11, controle negativo (planta não-transformada).

A Figura 4 mostra o bioensaio com insetos. Desfoliação do controle (A) e folhas transgênica (B) após 24 horas de infestação por larvas de *Anticarsia gemmatalis*. (C) Larva alimentada com folha transgênica mostrando escurecimento e retardo severo do crescimento (t) em comparação com larvas alimentadas com folhas do controle (c).

A Figura 5 mostra a amplificação por PCR dos genes *cry1Ac* e *gusA* de uma amostra de progênie T₂ 18a1. Linhas: 1, padrão de 1 Kb; 2, controle positivo (plasmídios pGEM4Z/pGusHyg), 3, 4, 6, 7, 8, 10, plantas CRY1AC/GUSA-positiva, 5, 9, plantas CRY1AC-negativa/GUSA-positiva; 11, controle negativo (planta não-transformada);

A Figura 6 mostra ensaio de alimentação com folha solta. Desfoliação dos controles (IAS 5 não-transgênicas, isolinha b-*gusA*) e folhas transgênicos *cry1Ac* (isolinha c-162; isolinha d-438) após 24 horas de infestação por larvas de *Anticarsia gemmatalis*.

A Figura 7 mostra o ensaio de alimentação com planta inteira. Desfoliação dos controles (IAS 5 não-transgênicas, isolinha b-*gusA*) e plantas

transgênicas cry1Ac (isolinha c-162; isolinha d-438), 14 dias após a infestação por larvas de *Anticarsia gemmatalis*.

Descrição Detalhada da Invenção

5 A presente invenção proporciona uma construção gênica que compreende o promotor 35S funcionalmente ligado a um gene de interesse agrônômico. Em uma concretização preferencial, plantas transformadas com a construção gênica da invenção, na qual o referido gene de interesse agrônômico é o gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*, apresentam adequado
10 desempenho agrônômico/produktividade e proporcionam completa eficácia contra *A. gemmatalis*, oferecendo um efetivo potencial para resistência a insetos em soja.

A presente invenção proporciona também um método de transformação de soja que compreende a co-transformação via bombardeamento de tecido
15 embriogênico.

A presente invenção proporciona também um processo de produção de substâncias de interesse econômico em plantas. Em uma concretização preferencial, a substância de interesse econômico é um praguicida.

20 A presente invenção proporciona também um processo de controle de pragas que compreende a expressão de praguicidas em plantas transformadas geneticamente.

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

A cultivar IAS 5, utilizada como modelo preferencial na presente invenção, destaca-se por apresentar alto potencial embriogênico e alta capacidade de regeneração *in vitro* (Santos *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2001).
30 Droste *et al.* (2002) produziram plantas férteis e totalmente transgênicas desta mesma cultivar expressando o gene repórter *gusA*. No entanto, até então, a

experiência dos inventores havia sido demonstrada apenas na transformação de plantas com genes repórteres/marcadores de seleção.

A presente invenção demonstra a eficiência de um gene sintético de *Bacillus thuringiensis* (*cry1Ac*) em soja. Além disso, é pioneira na transformação de uma cultivar recomendada para uso comercial no Brasil, utilizando embriões somáticos como alvo para a transformação via biolística. A importância econômica da cultivar comercial IAS 5, aliada aos enormes prejuízos causados por larvas de *Anticarsia gemmatalis* (lagarta-da-soja) que afetam a cultura da soja, motivaram o desenvolvimento de uma linha resistente a tal praga. O sucesso na obtenção de plantas geneticamente transformadas com o gene *cry1Ac*, que mostraram alta resistência à lagarta-da-soja, abre a perspectiva da utilização deste mesmo protocolo para a obtenção de outros produtos transgênicos de soja, resultantes da integração do próprio gene sintético *cry1Ac*, bem como de outros genes de interesse agrônomico

Os efeitos técnicos da presente invenção incluem, mas não se limitam a:

1. Diminuição dos efeitos ambientais sobre as toxinas: As plantas-*Bt* têm demonstrado vantagens sobre os biopesticidas, pois a eficiência da produção de proteínas Cry por estas plantas não é afetada por fatores ambientais, como: chuva após a aplicação, radiação solar e altas temperaturas (Betz *et al.*, 2000). Adicionalmente, as proteínas Cry recombinantes se acumulam nos tecidos vegetais de forma homogênea, tornando mais eficiente o efeito tóxico aos insetos do que a aplicação (pulverização) de esporos de *Bt*.

2. Maior segurança na utilização: Várias características inerentes às plantas-*Bt* proporcionam a estes produtos um grau de segurança que, dificilmente, pode ser obtido por meio de inseticidas químicos como, por exemplo, o fato destas proteínas não serem tóxicas para humanos e animais domésticos, nem se acumularem nos tecidos adiposos ou persistirem no ambiente (Siegel, 2001). Outra característica importante é que as proteínas Cry exibem um alto grau de especificidade aos insetos-alvo, e devem ser ingeridas para exercerem seus efeitos, já que não possuem atividade por contato (Betz

et al., 2000). Ainda, a exposição de humanos e outros animais a estas proteínas é muito menor do que aos inseticidas normalmente utilizados. Isto porque os inseticidas químicos e biológicos são, normalmente, aplicados em grandes quantidades, enquanto que as proteínas Cry, em plantas-*Bt*, são produzidas em pequenas quantidades no interior da planta (mesmo com o uso de seqüências promotoras fortes) (Bishop *et al.*, 1999).

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

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

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

químicos, resultando em um aumento de 24% na população de inimigos naturais dos insetos-praga.

6. Diminuição do surgimento de doenças fúngicas como consequência da redução dos danos: As lesões causadas por insetos em vários órgãos das plantas promovem redução na produção de grãos e oportunizam a infecção por fungos, principalmente, dos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus* (Munkvold e Hellmich, 1999a). A germinação dos esporos e a proliferação de fungos do gênero *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. proliferatum* ou *F. subglutinans*), normalmente estão associadas a lesões causadas pela larva *Ostrinia nubilalis* (Sobek e Munkvold, 1999). A importância primária destas doenças está associada às micotoxinas, particularmente fumosinas e aflatoxinas, produzidas por fungos destes gêneros (Munkvold e Hellmich, 1999b). As fumosinas podem ser fatais para cavalos e suínos, porém sua relevância para a saúde humana ainda está em debate. A aflatoxina é, reconhecidamente, uma micotoxina extremamente tóxica a animais e humanos. As plantas-Bt, por permitirem considerável controle do ataque de insetos, levaram à redução da possibilidade de infecção por *Fusarium* e *Aspergillus* (Betz *et al.*, 2000).

7. Estabilidade cromossômica das plantas geneticamente transformadas

É bem conhecido que células vegetais propagadas *in vitro* podem sofrer várias alterações genéticas e cromossômicas. Segundo Finer e McMullen (1991), algumas plantas transgênicas produzidas pelo bombardeamento de suspensões embriogênicas eram estéreis e apresentavam várias alterações morfológicas. As análises citológicas de células de cultura em suspensão, de raízes de embriões germinados e de plantas T₀ e T₁, realizadas na tentativa de determinar a causa da variação morfológica, revelaram várias aberrações cromossômicas, tais como deleções, duplicações, trissomias e tetraploidia. Foi mostrado, também, que os genótipos de soja diferem em sua suscetibilidade à instabilidade cromossômica induzida pela cultura de tecidos (Singh *et al.*, 1998). Portanto, a análise cromossômica de plantas regeneradas *in vitro* pode

ajudar a eliminar material genético e cromossomicamente anormal obtido em experimentos de transferência de genes.

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Exemplo 1 – Obtenção de plantas transgênicas de soja resistentes à lagarta da soja

A configuração preferencial da presente invenção provê uma soja transgênica com resistência a larva *A. gemmatalis*. Embriões somáticos do cultivar IAS5 proliferados em meio semi-sólido foram transformados com um gene sintético *cry1Ac* através do bombardeamento de partículas. O padrão de inserção do transgene *cry1Ac* nas plantas transgênicas foram analisadas no transformantes primários.

Além disso, a transmissão e a expressão dos transgenes foram caracterizados nas gerações T₁, T₂ e T₃. Ensaíos de alimentação de insetos indicaram que as plantas transgênicas foram altamente tóxicos as larvas *A. gemmatalis*.

Plasmídios utilizados na transformação da soja

Os vetores de transformação de plantas utilizados nesta configuração preferencial são: 1) pGusHyg, um plasmídio derivado de pUC18 carregando o gene repórter *gusA* e um gene de resistência a higromicina (*hpt*), ambos controlados pelo promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e terminador da nopalina sintase (*nos*) e 2) pGEM4Z*cry1Ac*, um plasmídio derivado de pGEM4Z contendo o gene sintético truncado *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* sob o controle do promotor de ubiquitina de milho (Ubi-1) e terminador da nopalina sintase. Em termos de "codon usage", o gene *cry1Ac* foi desenhado para a expressão em dicotiledôneas e tem um conteúdo G + C de 47,7% (o gene bacteriano original tem conteúdo G + C de 37%).

A modificações em geral, resultaram em maiores níveis de expressão de CRY1AC em plantas transgênicas (Sardana *et al.*, 1996). Ambos os plasmídios

foram usados numa concentração final $1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$. Uma relação de 4:1 molar de DNA plasmidial pGEM4Zcry1Ac e pGusHyg foi precipitada em partículas de tungstênio (M10, Dupont, Wilmington, DE).

Processo de Transformação

5 Bombardeamento de partículas, utilizando uma "Particle Inflow Gun" -
PIG (Finer *et al.*, 1992), a seleção de tecidos transformados e regeneração de
plantas foram seguidas como descrito anteriormente por Droste *et al.* (2002).
Vinte clusters embriogênicos (cerca de 70 mg de tecido), foram colocadas em
cada placa contendo meio D20. Quinze placas foram preparadas. Cada placa
10 foi bombardeada uma vez. A seleção dos tecidos transformados foi feita em
meio D20 com $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ de higromicina-B por 14 dias, seguidos por três
meses em cultura no mesmo meio contendo 25 mg L^{-1} higromicina-B. Após a
seleção, com pedaços de tecido verde foram feitas subculturas para a criação e
multiplicação de tecidos embriogênicos em placas contendo médio D20 fresco
15 sem antibiótico durante dois meses adicionais. As subculturas foram realizadas
a cada 14 dias.

Para estimular a histodiferenciação, clusters de embriões resistentes a
higromicina foram transferidos para meio de maturação MSM6 (Finer e
McMullen, 1991). Os embriões histodiferenciados foram posteriormente
20 colocadas em meio de conversão MSO, contendo sais MS, vitaminas B5, 3%
de sacarose, 0,3% do PhytigelTM e pH 6.4. Os embriões germinados foram
transferidos individualmente das placas de Petri para frascos de 100 ml (com o
mesmo meio) para continuar a suportar a regeneração das plântulas. As
plântulas regeneradas foram transferidas para copos plásticos contendo
25 vermiculita e cobertas com filme plástico PVC. Elas foram expostas à umidade
ambiente de forma gradual e depois transferidas para vasos de 1 kg com solo
orgânico e mantidos em uma câmara de crescimento com fotoperíodo de 14h,
intensidade luminosa de 13.500 lux e temperatura de $26 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$.

Análise da progenia

30 Regenerantes primários (T_0) referem-se às plantas transgênicas
recuperados a partir do explante inicialmente submetido ao bombardeamento

de partícula. T₁, T₂ e T₃ são plantas derivadas de sementes obtidas a partir de auto-polinização de plantas T₀, T₁ e T₂, respectivamente, e foram cultivadas em estufas com luz natural a 25 ± 1 °C. O teste qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para confirmar a probabilidade das proporções conforme o esperado pelos padrões de segregação mendeliana de 3:1 ou 2:1, onde a significância foi determinada para os valores com um valor *P* maior que 0,01. Na fase de florescimento, algumas plantas transgênicas T₃ foram mutuamente cruzadas com plantas não-transformadas. Dez plantas da família 18a1 foram usadas como doadoras de pólen e 10 como progenitor materno. Vinte e cinco plantas da família 18^a4 foram cruzadas com a progenitora feminina. Dez flores foram polinizadas por planta.

Ensaio Histoquímico GUS

Folhas destacadas ou mudas foram analisadas para atividade GUS utilizando o protocolo melhorado de colorações histoquímicas (Jefferson, 1987).

Análise de PCR

Reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizados utilizando DNA genômico extraído de amostras de embriões histodiferenciados e tecidos foliares de todas as plantas regeneradas de acordo com o procedimento CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987) com algumas modificações. A primers da PCR utilizados para detectar o gene *cry1Ac* foram o *cryFOR* 5' GGGGATCCATGGATAACAATCCGAAC 3' e *cryREV* 5' CAGTCGACATTCAGCCTCGAGTGTTG 3'. Esses primers propiciam a amplificação de uma região de 1845 pb do gene *cry1Ac*. Mistura para a reação (25 µl) consiste de 200 µM dNTPs, 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, 5 U ml⁻¹), tampão para reação 1X com 2 mM de MgCl₂, 100 nM de cada primer e 100 ng de cada amostra de DNA. As reações de amplificação foram realizadas com pré-ciclagem a 94 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, com um passo de extensão final de 5 min a 72 °C. Os primers da PCR utilizados para detectar o gene *gusA* foram o *gusAFOR* 5' GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG 3' e *gusARev* 5'

GGATTCCGGCATAGTTAAAGG 3', e para detectar o gene *hpt* foram *hptFor* 5' GCGATTGCTGATCCCCATGTGTAT 3' e *hptRev* 5' GGTTTCCACTATCGGCGAGTACTT 3'. Estes primers propiciam a amplificação de fragmentos de 622 pb e 512 pb, respectivamente. A misturas para reação de ambos os genes foram preparados como descrito acima. As condições para amplificações foram: pré-ciclagem a 94 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 45 s; 52 °C por 45 s, e 72 °C por 45 s, com uma etapa de extensão final de 2 min a 72 °C. Todas as reações de amplificação foram realizadas em um termociclador Thermo Hybaid.

Para confirmar os resultados da PCR, o produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel 1% de agarose e transferido durante a noite em membranas Hybond N+ (GE Healthcare) por Southern blot seguindo os protocolos padrões, como descrito por Sambrook e Russel (2001). Tratamento com a sonda, hibridação, banhos de estringência e detecção foram realizadas conforme especificado pelo kit ECLTM (GE Healthcare). As manchas de DNA foram analisadas com um fragmento de PCR de 1,8 kb contendo a seqüência codificante do gene *cry1Ac* purificadas do gel de agarose utilizando o kit GFX (GE Healthcare). As bandas hibridizadas foram detectadas por exposição a filmes de autoradiografia Kodak X-Omat por 2 horas.

Hibridação por Southern blot do DNA Genômico

O DNA genômico total (20 µg) dos possíveis transformados e plantas controle não-transformados foram digeridos durante a noite com enzimas de restrição *Bam*HI, *Kpn*I e *Sal*I a 37 °C. O DNA genômico digerido de cada planta foi separada através de uma eletroforese em gel de agarose 0,8% e transferidos do gel para uma membrana de nylon Hybond N+. Tratamento com a sonda, hibridação, banhos e detecção foram realizadas conforme especificado acima.

Análise da Expressão de Proteínas

Tecido foliar fresco (0,2 g) de plantas T₀ foi homogeneizado em 500 µl de tampão de extração [50 mM de 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 1% β-mercaptoetanol, 0,2% PVP-40]. As amostras foram agitadas durante 30 minutos a 4 °C e, em

seguida, centrifugadas a 10.000 g. A concentração protéica foi determinada utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976) com albumina sérica bovina como proteína padrão. Cinquenta microgramas de proteína bruta extraída de cada planta foram separadas em gel SDS-PAGE 10% e transferido para membrana de nitrocelulose. A presença da proteína CRY1AC foi detectada utilizando um anticorpo policlonal específico para δ -endotoxina CRY1AC de *Bacillus thuringiensis*. As bandas protéicas foram visualizadas utilizando o Sistema de Detecção e Análise ECL Western Blot (GE Healthcare). A detecção da proteína CRY1AC produzida pelas plantas T₁, T₂ e T₃ foi monitorada por um ensaio de ELISA tipo "duplo sanduíche", utilizando kits Trait Check Bt 1Ac Cotton Leaf/Seed de Strategic Diagnostics Inc. (Newark, DE, E.U.A.).

Bioensaios com Insetos

A atividade inseticida das plantas T₂ transgênicas para larvas *A. gemmatalis* foi avaliada usando um ensaio de alimentação com folha destacada. As plantas foram heterozigotas para o gene *cry1Ac* tal como determinado pela análise de segregação e foram CRY1AC-positivas como determinado pelo ensaio de ELISA tipo "duplo sanduíche". Folhetos de grandes folhas trifolioladas foram colocados em placas de Petri 100 mm x 20 mm contendo papel de filtro de 90 mm Whatman N° 1 (Whatman International, Maidstone, Reino Unido), saturado com água destilada para manter uma alta umidade ambiente. A quantidade de tecido foliar foi mantida tão uniforme quanto possível de uma placa para outra. As amostras foliares foram infestados com 20 larvas neonatas *A. gemmatalis* por placa. Dez e 30 plantas transgênicas das famílias 18a1 e 18a4, respectivamente, com quatro repetições por planta, foram incluídas no bioensaio. Três plantas não-transformadas IAS5 da mesma idade que os transgênicos, com quatro repetições por planta, foram utilizadas como controle. Após 24 h, o percentual do consumo foliar foi estimado; as folhas remanescentes (se restantes) foram removidas e substituídas por um grão de 1 cm³ de dieta sólida artificial (Greene *et al.*, 1976). Os percentuais do consumo foliar foram convertidos em valores como segue: Zero (sem consumo), 1 (menos de 50%), 2 (mais de 50%) e 3

(100% de consumo). O número de larvas vivas e mortas foi determinada 24, 48, 72 e 96 h após a infestação.

Resultados e Discussão

Transformação e regeneração de plantas transgênicas

5 Três meses após o bombardeamento, os tecidos embriogênicos de soja resistentes a higromicina foram selecionadas visualmente, contados, e cultivadas separadamente para a criação e proliferação das linhagens, correspondendo a eventos putativos de transformação independente. Nove
10 linhagens proliferativa dos 60 pedaços independentes de tecidos resistente a higromicina foram estabelecidos. Um total de 613 embriões somáticos histodiferenciados foram obtidos. Os embriões histodiferenciados foram transferidos para o meio de conversão. Trinta plântulas bem desenvolvidas foram transplantadas *ex vitro*. Vinte dessas plantas atingiram a maturidade e
15 floresceram. Quatorze plantas lançaram sementes. Todos os embriões/plantas derivadas de um pedaço independente do tecido resistente a higromicina, foram apontados como sendo embriões/plantas clonais.

Integração e Expressão Transgene

Setenta e dois embriões histodiferenciados e as 20 plantas recuperadas foram rastreados para a presença dos genes *gusA*, *hpt* e *cry1Ac* por PCR.
20 Duas (2/9 = 22%) linhagens, que não mostraram produtos de PCR para qualquer gene testado, foram considerados "ruídos" e descartados. A análise molecular revelou também que um pedaço de tecido resistente a higromicina pode conter dois eventos de transformação independentes. Assim, as linhagens numeradas de 18 e 43 foram subdivididos (a e b).

25 A caracterização molecular das linhagens transformadas é apresentada na Tabela 1. Todos os 64 embriões e 11 plantas das nove linhagens independentes apresentou os fragmentos esperados de 622 e 512 pb dos genes *gusA* e *hpt*, respectivamente. A presença do fragmento esperado de 1845 pb de *cry1Ac* foi observada em 23 embriões e sete plantas derivadas de
30 quatro linhagens (18, 26, 41 e 43a). Ocorrência simultânea de genes *gusA/hpt* e *cry1Ac* nessas quatro linhagens permitiram o cálculo da eficiência de co-

transformação (4/9 = 44%). A eficiência registrada na presente invenção está de acordo com relatos anteriores para a soja. Em situações em que dois genes em plasmídios independentes são introduzidos por bombardeamento de partículas, as taxas de co-transformação demonstram variações de 18 a 50% (Christou e Swain, 1990, Li et al., 2004).

A hibridização Western blot foi utilizado para avaliar a expressão do gene *cry1Ac* em nível protéico. Quando as proteínas foram separadas em eletroforeticamente em gel SDS, uma banda de ~ 70 kDa correspondente à toxina *Bt* foi detectada em plantas positivas para *cry1Ac/gusA* (Figura 1). Nenhuma proteína reativa aos anticorpos foi encontrada tanto em plantas *cry1Ac*-negativo/*gusA*-positivo ou em plantas não-transformadas.

Segregação Transgênica

Apenas duas (18a1 e 18a4) das sete plantas T₀ co-transformadas produziram sementes e foram analisadas para os padrões de integração e herança até a geração T₃. As plantas 18a1 e 18a4 derivaram do mesmo (linhagem 18) evento de transformação (Tabela 1). A expressão dos genes *cry1Ac* em plantas T₁ e T₂ foi primeiramente determinada usando o procedimento com anticorpo do tipo "duplo sanduíche". A expressão de GUS foi determinada, histoquimicamente, por ensaios com discos de folhas jovens. Para validar os resultados dos ensaios preliminares, a presença de transgenes foi confirmada pela análise da PCR em todas as plantas T₁ e T₂ CRY1AC/GUSA-positiva (Figura 2). A PCR também foi realizada para plantas CRY1AC/GUSA-negativa e à ausência de bandas sugeriu que não foram detectados transgenes a partir dessas plantas. A correlação entre a presença do DNA transgene e sua expressão foi perfeita.

Com base nas 48 plantas T₁ avaliadas, verificou-se que *gusA/hpt* e *cry1Ac* estavam ligados a um sítio de integração nas plantas T₀ iniciais (Tabela 2). A progenia T₁ de ambas as plantas T₀ segregaram para um menor número de plantas *cry1Ac/gusA*-positiva do que previsto pelos princípios mendelianos para um único dominante locus (3:1). As famílias T₂ e T₃ continuaram a segregar de uma forma excepcional, com uma grande deficiência de plantas

transgênicas (Tabela 3). Além disso, as proporções de segregação indicaram que as plantas T₂ foram uniformemente heterozigóticas para os traços transformantes.

Os transgenes são geralmente esperados com comportamento de genes dominantes e segregam-se numa proporção de 3:1 na progenia de transgênicos para não-transgênicos, quando a planta é auto-polinizada, porque o locus transgene é considerado como hemizigótico nos transformantes primários (T₀) (Campbell et al., 2000). No entanto, os loci transgênicos introduzidos na maioria das espécies vegetais freqüentemente exibem padrões imprevisíveis de herança e de expressão, o que tem ocorrido é uma frequência entre 10% e 50% de algumas das linhagens transgênicos (Yin et al., 2004).

Taxas de segregação excepcionais poderiam resultar de uma série de fatores, incluindo inativação da expressão do transgene, inserção conduzindo a uma mutação letal e baixa transmissão de transgene à progenia. A inativação da expressão é freqüentemente observada quando transgenes estão presentes em múltiplas cópias e é responsável por causar segregação anormal (Yin et al., 2004). No entanto, amplificações por PCR realizadas em plantas T₁ e T₂ CRY1AC/GUSA-negativa confirmaram a ausência do DNA transgene nestas plantas. Portanto, a inativação da expressão do transgene não pode ser considerada para explicar a segregação não-mendeliana observada nesta invenção.

A integração de DNA exógeno em genoma de plantas pode produzir uma mutação por inserção em um gene essencial. Uma mutação letal refletida pela falta de homozigotos, pode levar a uma segregação 2:1 para transgênicos e traços não-transgênicas na progenia de uma planta transgênica. A segregação 2:1 observada na progenia T₂ de uma linhagem transformada de *Asparagus officinalis* foi explicada pela ausência de homozigotos (Limanton-Grevet e Jullien, 2001). No entanto, os resultados obtidos na presente invenção não se enquadraram nesta segregação 2:1 (Tabelas 2 e 3), sugerindo que outros fatores podem estar atuando.

Além disso, a segregação não-mendeliana dos transgenes poderia ser contabilizada pela falta de transmissão através de um dos gametas. Christou et al. (1989) creditou a proporção de segregação 1:1 observada a progenia resultante da autopolinização de uma planta de soja transgênica ao fracasso de passar um transgene à próxima geração através do pólen. Retrocruzamentos recíprocos com plantas *Arabidopsis* não-transformadas mostram transmissão desigual da característica de resistência a canamicina através do gametas em sete linhagens excepcionais para até seis gerações sucessivas (Feldmann et al., 1997). Duas destas linhagens não conseguiram transmitir a característica de resistência a canamicina através do sexo feminino, enquanto a extrema carência de mudas Kan^R nas outras cinco linhagens foi principalmente devido ao pólen.

Para investigar a transmissão do transgene através dos gametas, várias de nossas plantas transgênicas foram cruzadas com plantas não-transformadas. A segregação dos genes *gusA* e *cry1Ac* em plantas BCF₁ foi determinada por ensaios histoquímicos GUS e procedimento anticorpo do tipo "duplo sanduíche", respectivamente. Os resultados mostraram a transmissão do transgene através de gametas masculinos e femininos, mas a uma taxa significativamente reduzida (Tabela 4). Na família 18a1, a transmissão dos transgenes através do pólen e do ovo foi reduzida para 60-75% e 33-49%, respectivamente, do que o esperada para um heterozigoto. A família 18a4 exibiu uma taxa de transmissão semelhante (30-47%), através do lado feminino; não foram realizados cruzamentos em que os transformantes serviram como o doadores de pólen. O baixo número de cruzamentos em que os transformantes serviram como o doadores de pólen não permitem concluir inequivocamente que a transmissão através do sexo masculino foi afetada menos severamente do que a transmissão através do sexo feminino.

Plantas CRY1AC/GUSA-positiva Homozigóticas

Uma planta transformada T₃ da família 18a4 que serviu como mãe no retrocruzamento para quatro sementes, que deu origem a quatro plantas CRY1AC/GUSA-positivo. Este resultado indicou que a planta transformada T₃

seria homozigótica. Para verificar essa hipótese, foram testadas 20 sementes de autofecundação obtidas a partir dessa planta transformada T₃. As sementes foram germinadas em papel de filtro molhado e as mudas foram analisadas para atividade GUS e expressão *cry1Ac*. Os resultados confirmaram a
5 condição homozigótica. Baseado neste fato, foi decidido investigar os possíveis estados homozigóticos de outras plantas transgênicas T₃. Vinte sementes de autofecundação de 253 das 309 plantas CRY1AC/GUSA-positiva T₃ foram germinadas e as mudas analisados conforme descrito acima. Além da planta já referida, a análise detectou 12 plantas CRY1AC/GUSA-positiva T₃
10 homozigóticas. Portanto, a possibilidade de uma mutação letal por inserção, que seria refletida pela falta de homozigotos também foi excluída para explicar a segregação não-mendeliana observada. Por outro lado, foi assumido que a dificuldade de se obter plantas homozigotas na geração T₂ pode ser atribuída a baixa transmissão dos transgenes através do sexo masculino, em especial
15 através dos gametas femininos.

Análise por Southern das plantas transformadas

O DNA genômico de plantas CRY1AC/GUSA-positiva T₁, T₂ e T₃ foi digerido com *KpnI*, uma enzima que corta o plasmídeo pGEM4Z apenas uma vez, com *Sall* que não cliva o plasmídeo de transformação, e com *BamHI*, que
20 liberta o cassete *cry1Ac* de 2,1 kb (região codificadora do gene e terminador nos). A Figura 3 mostra uma Southern blot representativa de sete plantas CRY1AC/GUSA-positiva T₁ derivadas de plantas T₀ 18a1 e 18a4. A detecção da banda de 2,1 kb do DNA digerido com *BamHI* em todas as plantas indicou a presença de pelo menos uma cópia intacta do gene. A presença de bandas
25 maiores que 2,1 kb é evidência de rearranjos do DNA transgene. Análise do produto digerido com *KpnI* revelou três fragmentos *cry1Ac* em todas as plantas. A análise com *Sall* confirmou a presença de três cópias para o dado gene (dados não mostrados). A Southern blot foi também realizado em plantas CRY1AC/GUSA-negativa, a fim de determinar se os transgenes estavam
30 presentes. A ausência de qualquer sinal de hibridização indicaria que tais plantas provavelmente não tinham o transgene inserido. Todas as plantas

transgênicas das progenias T₁, T₂ e T₃ analisadas, apresentaram o mesmo padrão de hibridização como as duas plantas parentais T₀ (dados não mostrados) e, conseqüentemente, o mesmo número de cópias. Estes resultados indicam que todas as cópias do gene são herdadas como uma unidade e que o padrão original de integração do transgene observado nas plantas regeneradas primárias foi estável, passando-a para todas as plantas descendentes.

Atividade inseticida

Para confirmar que a proteína CRY1AC produzidas na planta transgênica foi funcional, folhas isoladas de plantas transgênicas e plantas controle não-transformadas foram infestadas com larvas neonatas de *A. gemmatalis*. Após 24h, todas as folhas controle foram completamente desfolhadas (Figura 4a). Em contrapartida, o consumo foi significativamente reduzido nas folhas transgênicas (Tabela 5, Figura 4b). As larvas alimentadas com folhas transgênicas mostraram escurecimento e grave retardo do crescimento em comparação com larvas alimentadas com folhas controle (Figura 4c). Após o período de 24 h em que as larvas ficaram se alimentando com as folhas soltas, os restos foliares foram removidos e substituídos por uma dieta artificial. As larvas foram monitoradas por mais três dias. Para a sobrevivência dos inseto após 96 h de infestação, mais de 19 das 20 larvas tratadas com as folhas controle sobreviveram, em comparação com menos de duas larvas sobreviventes quando alimentadas com as folhas das plantas transgênicas. As larvas das folhas transgênicas pararam a alimentação e a maioria delas morreram dentro de 48 h. A mortalidade de *A. gemmatalis* afetadas pela expressão de *cry1Ac* em folhas de transgênicos das famílias 18a1 e 18a4, foi semelhante. Estes dados poderão ser contabilizados para o fato de ambas as famílias terem derivado do mesmo evento de transformação.

Cultivares de soja *Bt* ainda não foram comercializados, embora linhagens experimentais terem sido desenvolvidas. Parrott et al. (1994) relataram que a expressão de um gene *cry1Ab* nativo impediu a alimentação e crescimento da larva *A. gemmatalis*. Uma linhagem transgênica de soja cultivar "Jack" expressando altos níveis de um gene sintético *cry1Ac* causou

mortalidade completa nas larvas *A. gemmatalis* e reduziu significativamente a sobrevivência e alimentação das larvas *Pseudoplusia includens* e *Helicoverpa zea* em bioensaios em laboratório (Stewart et al., 1996) e em gaiolas de campo infestadas artificialmente (Walker et al., 2000). Mais recentemente, linhagens de soja transgênica ('A5547') expressando um gene sintético *cry1A* foram avaliados para a resistência contra vários lepidópteros em viveiro-telado e ensaios convencionais de campo, realizados nos Estados Unidos e Argentina. As linhagens Bt apresentaram praticamente eficácia completa contra todas as pragas testadas (Macrae et al., 2005).

10 **Recombinação Intralocus**

A co-transformação, é uma das melhores estratégias para se obter plantas transgênicas livres de marcadores, uma vez que é baseada no princípio de que uma proporção de plantas transformadas carregando o gene marcador selecionável também terá integrado o transgene de interesse em um segundo, sítio de inserção desvinculado e os genes poderão ser posteriormente removidos de tais plantas, por segregação genética (Bettany et al., 2002; Ebinuma et al., 2001, Park et al., 2004). A estratégia da co-transformação foi eleita para a introdução do gene *cry1Ac* em soja com a expectativa de obter plantas transgênicas livres de marcadores. No entanto, como os genes co-transformados *cry1Ac* e *gusAlhpt* se integram em um único locus eles são segregado juntos. Uma alta incidência de ligações foi demonstrada usando biobalística quando mediada por co-transformação (Miki e McHugh, 2004). No entanto, três plantas transgênicas CRY1AC-negativa/GUSA-positiva foram obtidas (Tabela 3, Figura 5). Uma explicação provável para este resultado, pode ser que a recombinação intercromossomial dividiu os transgenes. É possível que o locus transgene contenha DNA genômico interespaçado dentro dele (Kohli et al., 2003).

25 **Conclusões**

Este exemplo fornece plantas de soja transgênicas IAS5 resistentes a *A. gemmatalis* com um gene sintético *cry1Ac* sob o controle do promotor da ubiquitina-1 de milho. Embora a segregação não seja mendeliana nas primeiras

5 gerações, este exemplo demonstra claramente, que os transgenes são transmitidos de maneira estável e expressos nas progenias. Plantas transgênicas homozigótica foram obtidas na geração T₃. O desempenho agrônômico e da resposta destas plantas em relação as populações campestres de *A. gemmatalis* ainda estão sob análise.

Tabela 1. Caracterização molecular de embriões de soja histodiferenciada e plantas recuperadas derivadas de eventos independentes de transformação (linhagens) determinado por análise de PCR.

| Linhagens | Número de analisados | | análise de PCR | |
|-----------|----------------------|---------|----------------|-----------------|
| | embriões | plantas | <i>cry1Ac</i> | <i>gusA/hpt</i> |
| 4 | 11 | 0 | - | + |
| 5 | 10 | 0 | - | + |
| 18a | 2 | 4 | + | + |
| 18b | 6 | 1 | - | + |
| 19 | 11 | 3 | - | + |
| 26 | 9 | 1 | + | + |
| 41 | 4 | 2 | + | + |
| 43a | 8 | 0 | + | + |
| 43b | 3 | 0 | - | + |
| 9 | 64 | 11 | 4 | 9 |

Tabela 2. Segregação da geração T₁ obtida a partir de plantas T₀ *cry1Ac/gusA*-positiva.

| planta T ₀ | <i>cry⁺gus⁺</i> | <i>cry⁻gus⁻</i> | <i>cry⁺gus⁺/cry⁻gus⁻</i> | proporção testada | $\chi^{2(1)}$ |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|-------------------|---------------|
| 18a1 | 2 | 8 | 0.25 | 3:1 | 16.13 |
| | | | | 2:1 | 10.00 |
| 18a4 | 5 | 33 | 0.15 | 3:1 | 77.51 |
| | | | | 2:1 | 48.94 |

 $\chi^{2(1)}$: Qui-quadrado**Tabela 3.** Segregação da geração T₂ e T₃ obtida a partir de famílias T₁ e T₂ *cry1Ac/gusA*-positiva, respectivamente.

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

 $\chi^{2(1)}$: Qui-quadrado

Tabela 4. Segregação em BCF₁ de cruzamentos de plantas *cry1Ac/gusA*-positiva com plantas (de tipo selvagem) não-transformadas.

| Famílias | Segregação observada | | | | | |
|----------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| | To WT ⁽¹⁾ | | By WT ⁽²⁾ | | Percentual esperado para | |
| | <i>cry⁺gus⁺</i> | <i>Cry⁻gus⁻</i> | <i>cry⁺gus⁺</i> | <i>cry⁻gus⁻</i> | pólen (%) ⁽³⁾ | ovo (%) ⁽⁴⁾ |
| 18a1 | 9 | 15 | 15 | 46 | 60-75 | 33-49 |
| 18a4 | | | 41 | 135 | | 30-47 |

WT: tipo selvagem. ⁽¹⁾ Progenia são aqueles resultantes de um cruzamento, em que os transformantes servem como doadores de pólen. ⁽²⁾ Progenia são aqueles resultantes de um cruzamento, em que os transformantes servem como o progenitor do sexo feminino. ⁽³⁾ plantas *cry1Ac/gusA*-positiva esperadas quando um heterozigoto *cry1Ac/gusA* é usado como pólen numa planta do tipo selvagem, em por cento. Na família 18a4, 41 plantas *cry1Ac/gusA*-positiva foram observadas, mas de 88 (41+135/2) a 135 eram esperadas (41/135 - 41/88 = 30.37-46.59). ⁽⁴⁾ plantas *cry1Ac/gusA*-positiva esperadas quando um heterozigota *cry1Ac/gusA* é usado como fêmea em um cruzamento com uma planta do tipo selvagem, em por cento. O percentual esperado foi calculado de acordo com Feldmann et al. (1997).

Tabela 5. Ensaio alimentar de larvas neonatas de *Anticarsia gemmatalis* em folhas soltas de plantas transgênicas T₂.

| Famílias | consumo foliar (média) | | |
|----------|------------------------|-------|-------|
| | 24 h | 48 h | 96 h |
| 18a1 | 1.25 | 3.68 | 1.75 |
| 18a4 | 1.40 | 4.02 | 1.95 |
| Controle | 3.00 | 19.92 | 19.33 |

Vinte larvas foram colocadas nas folhas soltas. Consumo foliar foi estimado após 24 h da infestação. Restos de folha (quando restaram) foram removidos e substituídos por um pedaço de uma dieta artificial sólida. A sobrevivência larvar foi registrada 48 e 96 h após a infestação.

Exemplo 2 – Análise do desempenho agrônômico de soja transgênica resistente à lagarta da soja

Isolinhas transgênicas homozigotas da cultivar comercial IAS 5 [*Glycine max* (L.)] expressando um gene sintético truncado *cry1Ac* foram avaliadas em relação aos possíveis efeitos do transgene na performance agrônômica. Levando em conta todos os caracteres agrônômicos analisados, a presença do transgene *cry1Ac* não afetou o desenvolvimento e a produtividade das plantas transgênicas. A análise citogenética mostrou que as plantas transgênicas apresentaram cariótipo normal ($2n=40$). Tais plantas também foram avaliadas em ensaios *in vitro* e *in vivo* para resistência à *Anticarsia gemmatalis* (lagarta-da-soja). Dois controles negativos (IAS 5 não transgênica e isolinha homozigota *gusA*) foram utilizados. Em um bioensaio com folhas destacadas, as plantas *cry1Ac* exibiram completa eficácia contra *A. gemmatalis*, enquanto os controles negativos sofreram dano significativo. Dados do ensaio com plantas inteiras confirmaram uma elevada proteção das plantas *cry1Ac* contra a lagarta-da-soja, enquanto a planta não transgênica e a isolinha homozigota *gusA* exibiram 56,5 e 71,5% de desfolhação, respectivamente. Os resultados dos bioensaios *in vitro* e *in vivo* confirmam a resistência das plantas à *Anticarsia gemmatalis*.

O objetivo deste exemplo é o de analisar o desempenho agrônômico das linhagens transgênicas homozigóticas, e para confirmar a resistência dessas plantas contra larvas *A. gemmatalis* através de bioensaios de alimentação com folhas soltas ou da planta inteira.

Materiais e Métodos

As isolinhagens transgênicas do cultivar IAS 5 utilizado na presente invenção foram desenvolvidas pelos presentes inventores, e carregam pelo menos, uma cópia gênica intacta da construção sintética *cry1Ac*, onde a sequência codificante de 1,8-kb é orientada pelo promotor 35S e terminador da nopalina sintase. Em termos de "codon usage", o gene *cry1Ac* foi concebido para a expressão em dicotiledôneas e tem um conteúdo G+C de 47,7%. A

maioria das alterações, resultaram em maiores níveis de expressão de Cry1Ac em plantas transgênicas (Sardana et al., 1996).

Desempenho agrônômico

5 Progenias (= isolinhagens) foram obtidos por auto-polinização de 11 plantas transgênicas T₃ homozigóticas (44, 46, 162, 169, 438, 497, 507, 520, 551, 937, 1274). Sementes IAS 5 não-transgênicas foram utilizadas como controle. As sementes foram individualmente plantadas em vasos plásticos de 30 cm contendo solo orgânico, que foram mantidas em casa de vegetação com luz natural, a 25 ± 1 °C. Os vasos foram dispostos aleatoriamente em blocos
10 alinhados com seis repetições por linha.

Os seguintes caracteres foram analisados: data de emergência, desenvolvimento inicial, cor do hipocótilo da plântula, cor da flor, cor da pubescência, hábito de crescimento, altura de planta, número de nós, data de floração, data de maturidade, cor do tegumento das sementes, cor do hilo das
15 sementes, peso de 100 sementes, número de sementes e peso total do grão. O desenvolvimento inicial foi avaliado 15 dias após o plantio utilizando uma escala de 1 (baixo desenvolvimento da primeira folha trifoliada) a 5 (total desenvolvimento da primeira folha trifoliada).

As análises de variância foram realizadas nos dados, utilizando o
20 procedimento GLM do SAS (SAS Institute, Cary, NC). Quando os pressupostos para este teste, foram variáveis desconhecidas transformações foram selecionados de acordo com Box & Cox (1964). As transformações foram realizadas nos dados de data de florescimento, altura de planta, número de nós e peso total grão. Comparações múltiplas foram feitas utilizando o teste
25 Tukey's HSD.

Análise Citogenética

O número de cromossomos foi determinado em cinco isolinhagens transgênicas (44, 169, 438, 937 e 1274) e plantas controle não-transgênicas, com três repetições (plantas) por genótipo. Dez células foram analisadas por
30 planta.

Pontas de raiz com 1 cm de comprimento foram retiradas das mudas, pré-tratadas com uma solução saturada de paradiclorobenzeno por 18-20 horas a 4 °C, fixadas em etanol-ácido acético 3:1 por 12-24 h e armazenados em etanol 70% a -18 °C. As lâminas foram preparadas apenas com uma ponta de raiz por lâmina, cada plântula foi considerada como uma planta. As pontas de raiz foram hidrolisadas em HCl 1N a 60 °C por 8 min e coradas com Feulgen. A contagem cromossômica foi feita durante a metáfase das células intactas, diretamente com o microscópio.

Bioensaios com Insetos

Duas isolinhagens transgênicas cry1Ac homozigóticas (162, 438) foram avaliadas por ensaios *in vitro* e *in vivo* de resistência à *Anticarsia gemmatalis*. Uma isolinhagem *gusA* homozigótica (732) e plantas não-transgênicas IAS 5 foram utilizadas como controles negativos. plantadas em vasos plásticos de 30 cm contendo solo orgânico, que foram mantidas em casa de vegetação com luz natural, a 25 ± 1 °C. Os vasos foram dispostos aleatoriamente em blocos alinhados com seis repetições (plantas) por genótipo. Cerca de 2.000 ovos de *A. gemmatalis* foram utilizados.

A atividade inseticida de plantas transgênicas e controle *in vitro* para larvas *A. gemmatalis* foi avaliada usando um ensaio de alimentação com folha solta. Folíolos de folhas trifoliadas grandes foram colocadas em placas de Petri 100 mm x 20 mm contendo um pedaço de papel de filtro umedecido e foram incubadas por 72 horas a 25°C (com fotoperíodo de 12h). A quantidade de tecido foliar foi mantida tão uniforme quanto possível de uma placa para outra, com as folhas sendo substituídas conforme necessário. Amostras de folhas foram infestados com 20 larvas neonatas de *A. gemmatalis* por placa. Após 24h, o consumo percentual de folhas foi estimado. Os percentuais do consumo de folhas foram convertidos em pontuações como segue: 1 (consumo muito baixo), 2 (menos de 50%), 3 (cerca de 50%) e 4 (~ 100% consumo). O número de larvas vivas e mortas foi determinado após 24, 48 e 72h de infestação. Ao fim do experimento, as larvas sobreviventes tiveram seu desenvolvimento e peso avaliados.

5 Todo o ensaio de alimentação com planta foi realizado em uma casa de vegetação. Cada planta foi infestada com 50 larvas de lagarta de soja, quando as plantas estavam nas fases V3 a V4 de desenvolvimento. A resistência foi avaliada através de estimativas visuais de defoliação percentual e sobrevivência do inseto em sete e quatorze dias após a infestação. A defoliação percentual refere-se à porcentagem de folhas consumidas com área superior a 50%.

Resultados e discussão

Desempenho agrônômico

10 Para as seguintes características agrônômicas, não foram observadas variações dentro e entre as isolinhagens transgênicas e o controle não-transgênico IAS 5: data de emergência (6-7 dias), cor do hipocótilo da plântula (verde claro), cor da flor (branca), cor de pubescência (cinzento), hábito de crescimento (determinado), maturidade (155 dias), cor do tegumento das
15 sementes (amarelo), cor do hilo das sementes (marrom claro). Esses características estão em conformidade com descrição do IAS 5.

Foram observadas diferenças significativas para o desenvolvimento inicial, data de floração, altura de planta, número de nós, número de sementes, peso de 100 sementes e peso total do grão (Tabela 6). Dez dias após o plantio
20 os controles não-transgênicos IAS 5 estavam em um estágio mais avançado de desenvolvimento (pontuação = 4,67) do que as das isolinhagens transgênicas (escores variando de 2,33 a 3,83; Tabela 7). Curiosamente, apenas duas isolinhagens transgênicas (937, 520) mostraram um florescimento tardio, enquanto as outros isolinhagens não diferiram dos controle não-transgênicos
25 IAS 5. Do mesmo modo, o número de nós e altura de planta na maturidade da maioria das isolinhagens transgênicas não diferiram do controle. No que diz respeito a avaliação de rendimento, cinco isolinhagens transgênicas (169, 438, 497, 520, 1274) tiveram uma baixa significativa do peso de 100 sementes, enquanto as outras isolinhagens não diferiram do controle. No entanto, para o
30 número de sementes e peso total dos grãos não foram detectadas diferenças significativas entre as isolinhagens transgênicas e do controle. Tendo em conta

todas as características analisadas, a presença do transgene *cry1Ac* não afetou o desenvolvimento e produtividade das plantas. O desempenho agrônômico das isolinhagens transgênicas foi similar ao controle. Do mesmo modo, Miklos *et al.* (2007) apresentaram diferenças insignificantes no desempenho agrônômico (emergência, floração, altura da planta, acamamento, maturidade e produtividade) de plantas transgênicas de soja contendo um gene *cry1A* altamente expresso.

Análise Citogenética

Um total de 180 células da ponta da raiz de cinco isolinhagens transgênicas e plantas controle não-transgênicos foram analisadas. O exame citológico (cromossomos de pró-metáfase mitótica a metáfase) das células demonstrou que as plantas transgênicas e controles apresentam cariótipo normal ($2n = 40$) sem anomalias cromossômicas aparentes.

Bioensaios com Insetos

Cultivares de soja *Bt* ainda não foram comercializados, embora linhagens experimentais tenham sido desenvolvidas. Uma linhagem de soja transgênica, cultivar "Jack" expressando altos níveis de um gene sintético *cry1Ac* causou mortalidade completa da larvas *A. gemmatalis* em bioensaios laboratoriais (Stewart *et al.*, 1996) e em gaiolas de campo infestadas artificialmente (Walker *et al.*, 2000). Mais recentemente, linhagens transgênicas de soja ("A5547") expressando um gene sintético *cry1A* foram avaliadas para a resistência contra vários lepidópteros com experimentos em viveiro-telado e convencional em terreno. Linhagens *Bt* apresentaram praticamente completa eficácia contra todas as pragas testadas (Macrae *et al.*, 2005). Além disso, Miklos *et al.* (2007) relataram a produção de três linhagens transgênicas de soja através de transferência gênica mediada por *Agrobacterium* do gene *cry1A* (*tic107*), que exibiram um alto grau de resistência contra lepidópteros (*Pseudoplusia includens*, *Helicoverpa zea*, e *A. gemmatalis*) em bioensaios com disco foliar e com toda a folha. Nos bioensaios com disco foliar todas as três linhagens transgênicas *Bt* causaram 100% de mortalidade no período de ensaio 4-d, enquanto a mortalidade nas isolinhagens isogênicas variou de 25 a

42%: No ensaio com toda a folha, tanto larvas de terceira e quarta fase nas linhagens transgênicas *Bt* tiveram 100% de mortalidade após ensaio 4d, comparado com 6,7 e 0% de mortalidade, respectivamente, nos controles.

Na presente configuração preferencial duas isolinhagens homozigóticas transgênicas *cry1Ac* (162, 438), uma isolinhagem homozigótica *gusA* (732) e plantas não-transgênicas IAS 5 foram avaliadas em ensaios *in vitro* e *in vivo* de resistência a *A. gemmatalis*. Para os ensaios de folhas soltas *in vitro*, as folhas isoladas foram infestadas com larvas neonatas de *A. gemmatalis*. Após 24 h, as folhas da isolinhagem homozigótica *gusA* e das plantas não-transgênicas foram completamente desfolhadas (Figura 6a e b). Em contrapartida, o consumo foi significativamente reduzido nas folhas transgênicas homozigóticas *cry1Ac* (Tabela 8, fig. 6c e d). Lagartas alimentadas com folhas transgênicas *cry1Ac* mostraram escurecimento e grave retardo do crescimento em comparação com lagartas alimentadas com folhas do controle. Considerando o peso larvar nas folhas não-transgênicas como 100%, as larvas alimentadas em folhas *cry1Ac* tiveram seu peso muito reduzido (64 e 66% para isolinhagens 162 e 438, respectivamente). O desenvolvimento das larvas foi monitorado por mais dois dias. Setenta e duas horas após a infestação, as larvas alimentadas com folhas *cry1Ac* apresentaram 100% de mortalidade, em comparação com 1,65% de larvas alimentadas com folhas de ambas as plantas não-transgênicas e *gusA*.

Os danos pelos insetos nos ensaios de alimentação com planta inteira foram semelhantes aos ensaios de alimentação com folha solta, como as plantas controle, sofreram uma maior quantidade de danos nas folhas do que as plantas transgênicas (Tabela 9; Fig. 7). A porcentagem de desfolhação da isolinhagem homozigótica *gusA* (732) e plantas não-transgênicas IAS 5 quatorze dias após a infestação foi em média 56,5 e 71,5%, respectivamente. Por outro lado, quase nenhum dano foi observado nas isolinhagens transgênicas *cry1Ac* (162, 438).

Os resultados obtidos na presente configuração preferencial mostraram que o alto nível de resistência contra a larva de soja é semelhante ou até maior do que o relatado por Miklos et al. (2007).

5 Conclusão dos resultados deste exemplo

1. Esta configuração preferencial relata o desempenho agrônômico de soja transgênica das isolinhagens IAS 5. Tendo em conta todas as características agrônômicas analisadas, a presença do transgene *cry1Ac* não afetou o desenvolvimento e produtividade das plantas.

10 2. Análises citogenéticas mostram que as plantas transgênicas apresentam cariótipo normal ($2n = 40$) sem aparentes anomalias cromossômicas.

3. Os resultados dos bioensaios *in vitro* e *in vivo* confirmaram a resistência de plantas transgênicas para *Anticarsia gemmatalis*.

Tabela 6. Média quadrada, coeficiente de variação e Valor-P da análise de variância para o desenvolvimento inicial (ID), data da floração (DF), altura de planta (PH), número de nós (NN), número de sementes (NS), peso de 100 sementes (10-PB) e peso total do grão (TGW).

| Fontes de variação | Graus de liberdade | ID | FD | PH | NN | NS | 100-SW | TGW |
|--------------------|--------------------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Linhagens | 11 | 24,839647 | 7,63E-16 | 0,4217443 | 0,0003615 | 3205,226 | 5,2933177 | 104,74739 |
| Blocos | 5 | 2,1888889 | 1,07E-16 | 0,0546206 | 5,65E-05 | 1275,3806 | 1,4334856 | 26,09431 |
| Erro | 55 | 3,0358586 | 1,24E-16 | 0,0589997 | 5,89E-05 | 1475,6109 | 1,0902522 | 36,906352 |
| C.V. | - | 34,37007 | 4,45E-06 | 5,616527 | 0,829181 | 26,30824 | 6,564811 | 26,62165 |
| p ⁽¹⁾ | - | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0296 | 0,0001 | 0,0052 |

⁽¹⁾Valor-P relacionado a comparação entre as linhagens.

Tabela 7. Desempenho agrônomo das plantas transgênicas para T⁴ inicial desenvolvimento (ID), data floração (DF), altura de planta (PH), número de nó (NN), número de sementes (NS), peso de 100 sementes (100-PB) e peso total grão (TGW).

| linhagem | ID | linhagem | FD | linhagem | PH | linhagem | NN | linhagem | NS | linhagem | 100-SW | linhagem | TGW |
|-------------------|---------|-------------------|-----------|-------------------|----------|-------------------|------------|-------------------|-----------|-------------------|-----------|-------------------|----------|
| NT ⁽¹⁾ | 4,67 a | 937 | 59,33 a | 551 | 107,00 a | 551 | 15,83 a | 162 | 204,33 a | NT ⁽¹⁾ | 17,66 a | 162 | 32,00 a |
| 1274 | 3,83 b | 520 | 58,50 a | 520 | 105,50 a | 520 | 15,33 ab | 507 | 164,33 ab | 44 | 16,67 ab | NT ⁽¹⁾ | 29,05 ab |
| 551 | 3,50 bc | 551 | 57,00 ab | 937 | 103,67 a | NT ⁽¹⁾ | 15,33 ab | NT ⁽¹⁾ | 162,33 ab | 507 | 16,65 ab | 507 | 26,69 ab |
| 937 | 3,33 bc | 438 | 56,17 abc | 507 | 97,67 a | 507 | 15,33 abc | 937 | 153,17 ab | 162 | 16,22 ab | 937 | 22,96 ab |
| 438 | 3,17 bc | 507 | 53,00 abc | NT ⁽¹⁾ | 96,00 a | 937 | 15,00 abc | 169 | 145,00 ab | 937 | 16,21 ab | 551 | 21,74 ab |
| 169 | 3,17 bc | 44 | 51,17 abc | 162 | 74,33 ab | 162 | 13,33 abcd | 438 | 141,83 ab | 551 | 16,20 ab | 438 | 21,44 ab |
| 162 | 3,17 bc | 1274 | 50,83 abc | 438 | 71,83 ab | 438 | 12,83 abcd | 520 | 140,50 ab | 46 | 15,93 abc | 169 | 21,23 ab |
| 507 | 3,17 bc | NT ⁽¹⁾ | 49,17 bc | 1274 | 68,00 ab | 1274 | 12,83 bcd | 551 | 137,33 ab | 497 | 15,59 bc | 497 | 20,28 ab |
| 497 | 3,00 bc | 497 | 49,00 bc | 497 | 67,67 ab | 497 | 12,67 bcd | 497 | 132,33 ab | 1274 | 15,56 bc | 44 | 20,10 ab |
| 520 | 3,00 bc | 162 | 47,17 c | 44 | 56,83 b | 46 | 12,33 cd | 46 | 125,50 b | 438 | 15,24 bc | 46 | 20,01b |
| 46 | 2,67 c | 46 | 47,17 c | 169 | 56,33 b | 44 | 12,33 cd | 1274 | 124,67 b | 169 | 14,92 bc | 520 | 19,29 b |
| 44 | 2,33 c | 169 | 47,00 c | 46 | 53,67 b | 169 | 11,83 d | 44 | 120,83 b | 520 | 14,01 c | 1274 | 19,05 b |

Meios seguidos pela mesma letra não são estatisticamente significantes no nível 0,05. ⁽¹⁾ NT não-transgênicas IAS 5 controle.

Tabela 8. Ensaio de alimentação de larvas neonatas de *A. gemmatalis* em folhas soltas.

| Genótipo | Cons. Foliar (média) | Peso Larvar (média) (mg) | % Mortalidade (média) | | |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|------|------|
| | 24 h | 24 h | 24 h | 48 h | 72 h |
| 162 | 1 | 0.40 | 90.8 | 98.3 | 100 |
| 438 | 1 | 0.39 | 85 | 95 | 100 |
| 732 | 3.67 | 1.56 | 0.85 | 1.65 | 1.65 |
| NT ⁽¹⁾ | 3.83 | 1.12 | 1.65 | 1.65 | 1.65 |

⁽¹⁾Plantas não-transgênicas IAS 5. Vinte larvas colocadas nas folhas soltas. Pontuação para o consumo foliar: 1 (Consumo muito baixo), 2 (menor que 50%), 3 (em torno de 50%) e 4 (~100% de consumo).

5

Tabela 9. Ensaio de alimentação com planta inteira em larvas neonatas de *A. gemmatalis*.

| Genótipo | % desfolhação | |
|-------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| | 7 dias após a infestação (média) | 14 dias após a infestação (média) |
| 162 | 0 | 0 |
| 438 | 0 | 0 |
| 732 | 60 | 71.5 |
| NT ⁽¹⁾ | 37.5 | 56.5 |

⁽¹⁾Plantas não-transgênicas IAS 5. Cada planta foi infestada com 50 larvas de soja. O percentual de desfolhação refere-se a porcentagem de folha com area consumida maior que 50%.

10

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja e o Estado do Rio Grande do Sul é o terceiro maior produtor de soja do Brasil. Sendo assim, o grande interesse econômico desta espécie torna-a um importante alvo para o melhoramento genético. Como a maioria das espécies de plantas cultivadas que fazem parte do sistema agrícola atual, a soja possui uma baixa variabilidade genética, o que tem dificultado o seu melhoramento através de técnicas clássicas de cruzamento. Neste sentido, técnicas de cultura de tecidos e de transferência de genes apresentam-se como importantes ferramentas

15

auxiliares, permitindo que genes derivados de plantas relacionadas ou não e, até mesmo, de outros organismos possam ser utilizados em programas de melhoramento. Entretanto, o sucesso com estas abordagens tem sido limitado, devido à falta de sistemas eficientes de regeneração e de transformação. A maior vantagem da utilização de técnicas de engenharia genética para a transferência de genes específicos é a redução no tempo necessário para a obtenção de cultivares comercialmente úteis, com um mínimo de rompimento da integridade genética de genomas já selecionados.

Considerando que um sistema eficiente de regeneração *in vitro* é pré-requisito para o sucesso na transformação genética, a partir de 1991, temos testado, em nossos laboratórios, a regeneração via embriogênese somática de mais de vinte cultivares de soja recomendadas para o cultivo no Brasil. A cultivar IAS 5, utilizada na presente invenção, destacou-se por apresentar alto potencial embriogênico e alta capacidade de regeneração *in vitro* (Santos *et al.*, 1997; Droste *et al.*, 2001). Em relação ao método de transformação, foi estabelecido um protocolo de transferência direta de DNA, via bombardeamento de partículas, utilizando o tecido embriogênico como alvo. Através deste protocolo, foram geradas plantas férteis e totalmente transgênicas da cultivar IAS 5 expressando o gene repórter *gusA* (Droste *et al.*, 2002).

A importância econômica da cultivar comercial IAS 5, aliada aos enormes prejuízos causados por lagartas de *Anticarsia gemmatalis* que afetam a cultura da soja, motivaram o desenvolvimento de uma linha resistente a tal praga. Desta maneira, um dos objetivos da invenção é proporcionar meios para introduzir, na cultivar comercial IAS 5, o gene sintético *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*, visando à obtenção de plantas resistentes à lagarta-da-soja (*A. gemmatalis*).

O gene sintético *cry1Ac* codifica apenas as regiões amino e central da δ -endotoxina Cry1Ac, as quais são as regiões importantes para a toxicidade desta proteína à lagarta-da-soja (Bravo *et al.*, 2002). Este gene modificado apresenta uma alteração de códons com o objetivo de otimizar sua expressão

em plantas e foi sintetizado a partir da união de oligonucleotídeos com o conteúdo de bases G + C alterado (47,7%) em relação ao gene original (37%) (Sardana *et al.*, 1996). O controle da expressão do gene *cry1Ac* é realizado através do promotor 35S e do terminador da nopalina sintase (*nos*).

5 O mesmo gene *cry1Ac* sintético, utilizado na presente invenção, foi primeiramente testado sob controle do promotor CaMV 35S, em algodão (Perlak *et al.*, 1990). Posteriormente, este gene, sob controle do promotor da ubiquitina, foi testado em milho (Sardana *et al.*, 1996). Nossos resultados mostram a eficiência do promotor 35S em soja..

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

Aliada às limitações acima, a preocupação pública com a disseminação de transgenes de resistência a antibióticos tem incentivado o desenvolvimento
30 de tecnologias para a obtenção de plantas transgênicas livres de genes marcadores. Embora nenhum efeito deletério da liberação destes genes de

resistência seja conhecido, a percepção pública de possíveis riscos tem limitado a aceitação de produtos transgênicos. Tal preocupação encontra fundamento na possibilidade da transferência horizontal do transgene marcador do vegetal para bactérias patogênicas do trato intestinal humano. Embora o
5 risco da transferência de genes de resistência das plantas transgênicas para bactérias patogênicas seja essencialmente hipotético e remoto, este não pode ser totalmente afastado (Bennett *et al.*, 2004).

Na presente invenção, com a expectativa de se obter plantas transgênicas *cry1Ac* livres de genes marcadores, a estratégia de co-
10 transformação foi escolhida. Na co-transformação os genes repórteres/marcadores de seleção e o gene de interesse são introduzidos em cassetes de transformação ou plasmídeos diferentes. Esse sistema permite a segregação do gene de interesse e do gene repórter/marcador de seleção na progênie de plantas transformadas, desde que tais genes tenham sido
15 inseridos em *loci* não ligados (Ebinuma *et al.*, 2001, Park *et al.*, 2004). A eficiência de co-transformação obtida neste trabalho (44%) está de acordo com publicações anteriores para soja. Em situações em que dois genes, em plasmídeos separados, são introduzidos por bombardeamento de partículas, a taxa de co-transformação tem variado de 18 a 50% (Christou e Swain, 1990; Li
20 *et al.*, 2004).

A co-transformação pode resultar na ligação dos genes em um único loco, o que freqüentemente ocorre, quando é utilizado o método de biolística (Miki e McHugh, 2004). Confirmando esta tendência, as análises moleculares das progênes T₁, T₂ e T₃ mostraram que os transgenes repórter/marcador de
25 seleção (*gusAl/hpt*) co-segregaram com o gene de interesse (*cry1Ac*), indicando sua integração em um único loco. Resultados semelhantes foram obtidos em soja por Hadi *et al.* (1996).

A integração dos genes repórter/marcador de seleção (*gusAl/hpt*) e do gene de interesse no mesmo loco, teoricamente, impediria a segregação dos
30 mesmos nas progênes e, portanto, a obtenção de plantas livres de marcador de seleção. Entretanto, no presente trabalho, a identificação de plantas *cry1Ac*-

negativas/*gusA*-positivas na descendência de plantas *cry1Ac*-positivas/*gusA*-positivas indicou a ocorrência de recombinação, o que é possível se os genes não estiverem completamente ligados, ou seja, se houver DNA genômico intercalado entre os transgenes. Se isto for confirmado, pode-se manter a expectativa de buscar plantas livres de genes marcadores.. A estrutura do loco pode variar de simples cópias intactas até configurações complexas, compreendendo cópias intactas, repetições *in tandem* ou invertidas, concatâmeros, seqüências truncadas e/ou rearranjadas e presença de DNA genômico intercalado entre os genes (Kohli *et al.*, 2003).

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

Na presente invenção, as progênes T_1 apresentaram um número significativamente menor de plantas transgênicas (*cry1Ac*-positivas/*gusA*-positivas) do que o predito pelos princípios Mendelianos de herança para um único loco. As famílias T_2 e T_3 continuaram a segregar de forma excepcional, com uma grande deficiência de plantas transformadas.

A segregação excepcional pode resultar de um grande número de fatores que incluem, principalmente: a inativação da expressão do transgene, a inserção do transgene levando a uma mutação letal, e a baixa transmissão do transgene para a progênie (Yin *et al.*, 2004). A inativação da expressão é freqüentemente observada quando o transgene está presente em múltiplas cópias e é responsável pela segregação anormal. Na presente invenção, a inativação da expressão não pode ser considerada como alternativa para

explicar a segregação não-Mendeliana, uma vez que foi confirmada a ausência do DNA exógeno nas plantas descendentes que não expressavam os transgenes.

5 Por outro lado, a integração do transgene no genoma da planta poderia ter provocado uma mutação letal em um gene essencial. Esta mutação seria refletida pela ausência de homozigotos na progênie das plantas transformadas. No entanto, a identificação de plantas homozigotas na geração T₃ afastou a possibilidade de ocorrência de mutação letal devida à inserção do transgene.

10 Desta forma, diante do número reduzido de plantas transgênicas em relação ao esperado, foi levantada, então, a hipótese de bloqueio na transmissão dos transgenes por um ou ambos os gametas. Para testar esta hipótese, foram realizados cruzamentos recíprocos de algumas plantas transgênicas T₃ com plantas não transformadas. Os resultados destes cruzamentos mostraram que os transgenes são transmitidos tanto pelo gameta
15 masculino como pelo feminino, embora em uma frequência reduzida. A redução na taxa de transmissão dos gametas portando os transgenes pode explicar a dificuldade de obtenção de plantas homozigotas nas primeiras gerações segregantes. Entretanto, a homozigose foi atingida na terceira geração e 11 isolinhas transgênicas foram estabelecidas.

20 Como a transmissão reduzida dos transgenes por ambos os gametas poderia comprometer a produtividade das plantas transgênicas, decidiu-se investigar, de forma detalhada, a performance agrônômica das isolinhas homozigotas T₄. Apenas cinco das 11 isolinhas testadas apresentaram o peso de 100 sementes mais baixo do que o controle (plantas de IAS 5 não transformadas). No entanto, para as características número total de sementes
25 e peso total de grãos, nenhuma diferença significativa foi detectada entre as isolinhas e o controle. De um modo geral, considerando-se todos os caracteres agrônômicos analisados, a presença do transgene *cry1Ac* não afetou o desenvolvimento e a produtividade das plantas transgênicas.

30 Os bioensaios realizados mostraram que tanto as plantas heterozigotas da geração T₂ (Exemplo 1) como as isolinhas homozigotas T₄ (Exemplo 2)

apresentaram uma alta resistência quando desafiadas com larvas de *A. gemmatalis*. O nível de resistência observado nos resultados da presente invenção é equivalente e, até mesmo, mais elevado do que o descrito por Miklos *et al.* (2007). Estes autores demonstraram a completa proteção das plantas transgênicas de soja quando desafiadas por lagartas de *A. gemmatalis*. Um aspecto relevante a ser considerado é o fato de que a expressão do gene *cry1A* descrita por Miklos *et al.* (2007) é classificada como de “alta dose” e um período de quatro dias de teste foi necessário para causar a total mortalidade das lagartas quando em contato com as folhas transgênicas. No bioensaio com folhas destacadas, realizado no presente estudo, um período de 24 horas foi suficiente para matar a grande maioria das lagartas em contato com as folhas transgênicas, tendo sido registrada 100% de mortalidade três dias após a inoculação das larvas (Exemplo 2). Os resultados obtidos no bioensaio com plantas inteiras confirmaram a alta proteção das mesmas contra a lagarta-da-soja. A quantificação da expressão da proteína Cry1Ac será uma das próximas etapas na caracterização das plantas transgênicas.

O produto apresentado na presente invenção é o resultado do primeiro trabalho desenvolvido pela equipe na obtenção de plantas transformadas com um gene de interesse agrônômico. Este é, também, o primeiro produto transgênico de soja obtido no Brasil por co-transformação genética via biolística, utilizando embriões somáticos como alvo. Os resultados altamente promissores, que demonstram expressiva resistência das plantas transgênicas à lagarta-da-soja, abrem a perspectiva de uso comercial deste produto. A presente invenção tem o mérito de mostrar a eficiência do gene sintético *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* em soja. Além disto, o protocolo de transformação utilizado proporciona a obtenção de outros produtos transgênicos de soja, resultantes da integração do próprio gene sintético *cry1Ac*, bem como de outros genes de interesse agrônômico.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações**CONSTRUÇÃO GÊNICA, MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE
SOJA, PROCESSO PARA PRODUIR PRAGUICIDA, PROCESSO DE
CONTROLE DE PRAGAS**

5

1. Construção gênica para a transformação de células vegetais caracterizada por compreender pelo menos parte do promotor 35S funcionalmente ligado a pelo menos parte da sequência codificante do gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*.

10

2. Processo de produção agrícola, caracterizado por compreender o cultivo de soja contendo uma construção gênica compreendendo pelo menos parte do promotor 35S funcionalmente ligado a pelo menos parte da sequência codificante do gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*.

15

3. Método de transformação de soja caracterizado por compreender a co-transformação via bombardeamento de tecido embriogênico.

20

4. Método, conforme reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a referida co-transformação é conduzida com uma construção gênica compreendendo pelo menos parte do promotor 35S funcionalmente ligado a pelo menos parte da sequência codificante do gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*.

25

5. Processo de produção de praguicida, caracterizado pelo fato de compreender o cultivo de soja contendo uma construção gênica compreendendo pelo menos parte do promotor 35S funcionalmente ligado a pelo menos parte da sequência codificante do gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*.

6. Processo de controle de pragas agrícolas, caracterizado pelo fato de compreender a expressão, em soja transformada geneticamente, de pelo menos parte da sequência protéica de *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*.

FIGURAS

Figura 1

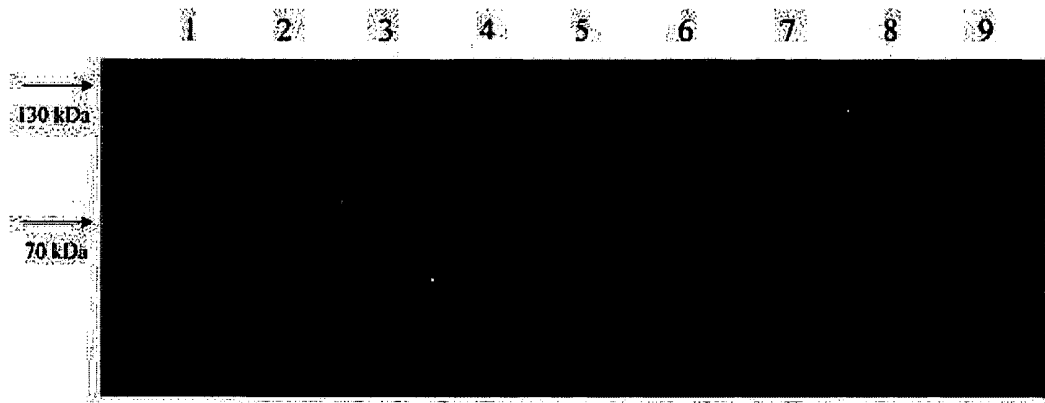


Figura 2

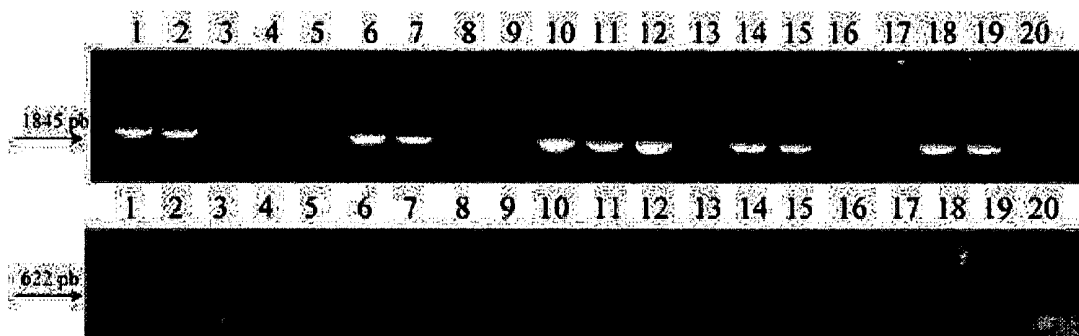


Figura 3

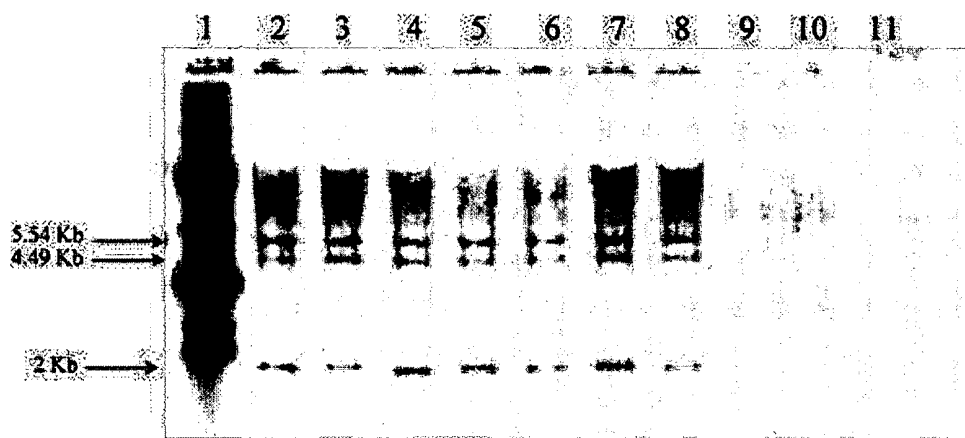


Figura 4

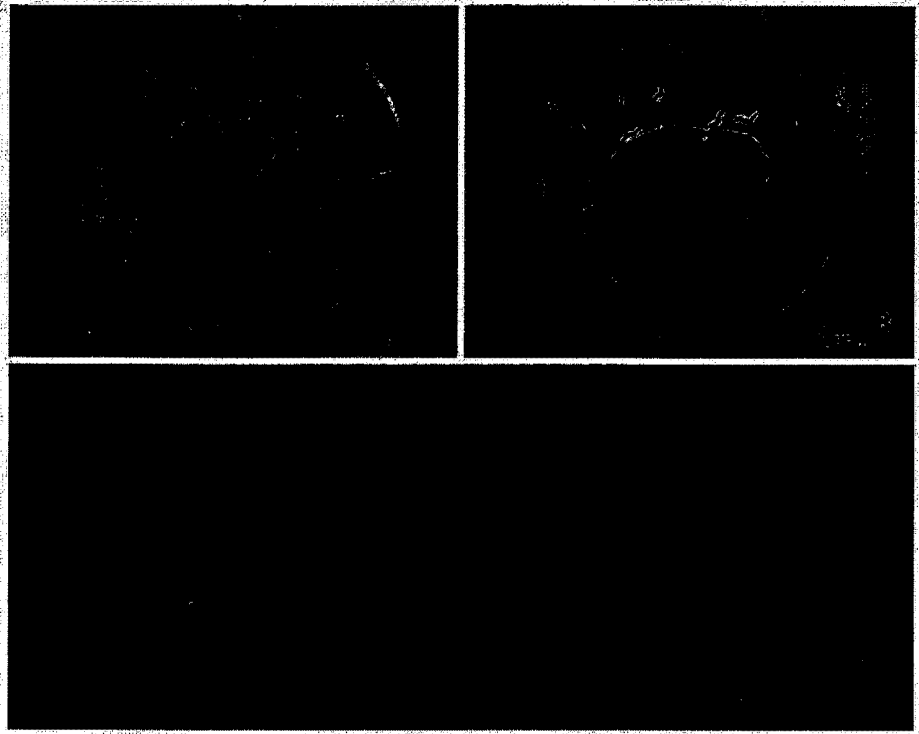


Figura 5

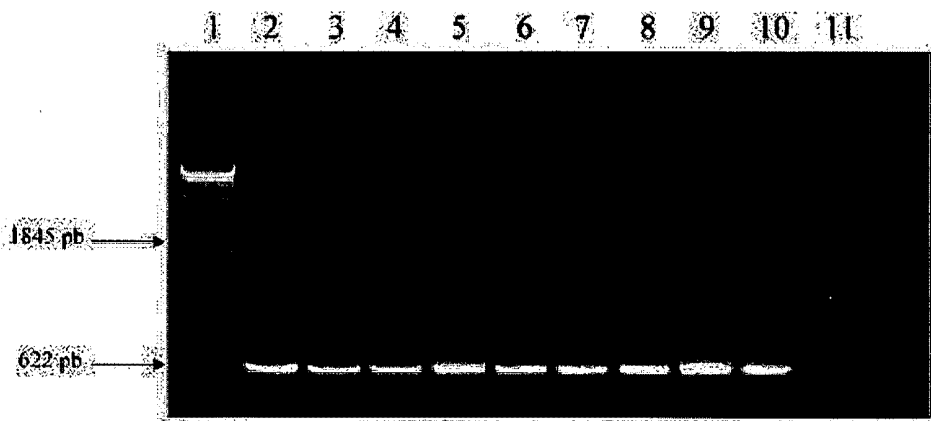


Figura 6

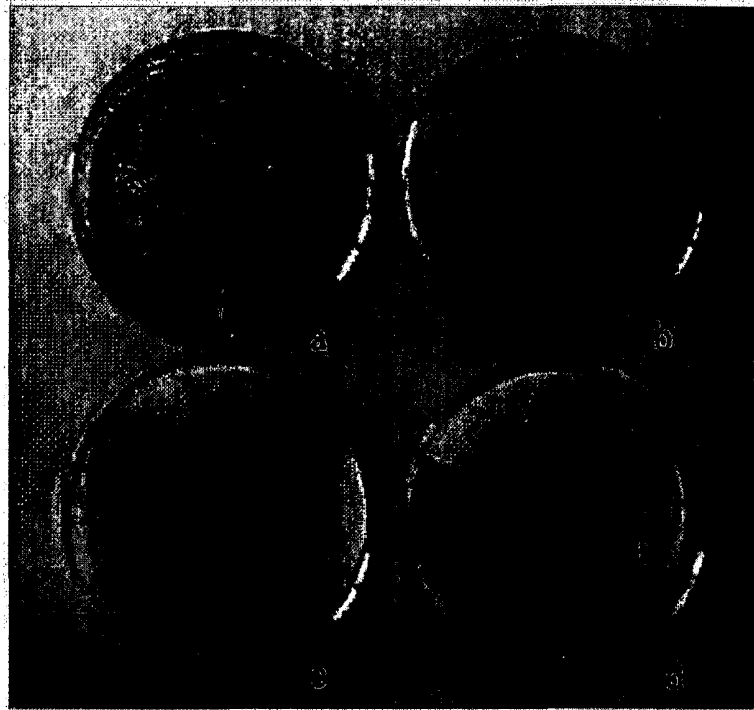
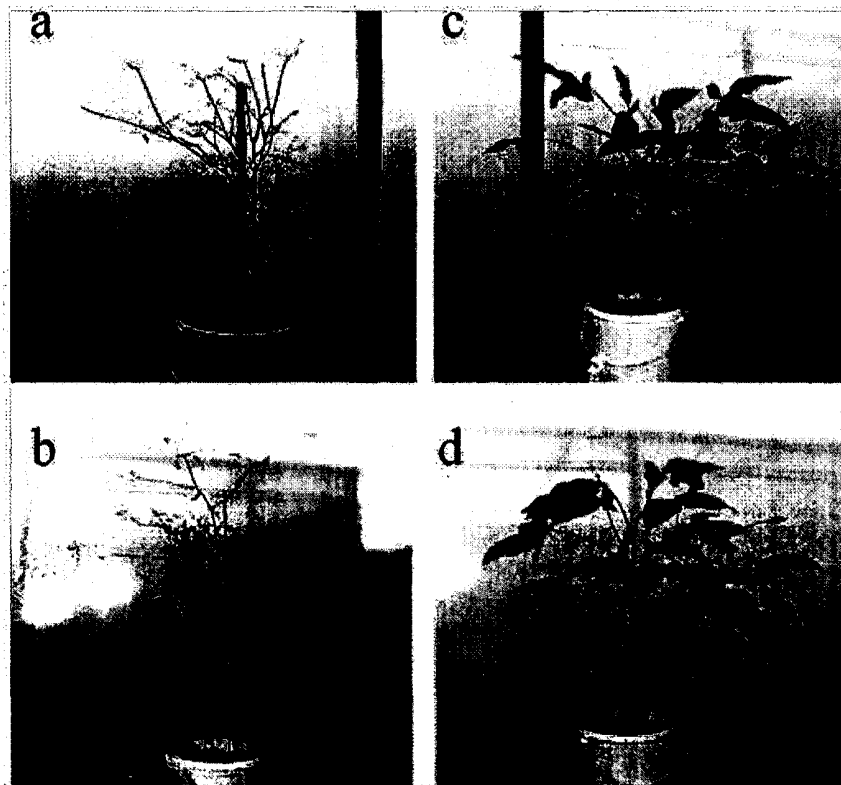


Figura 7



PI 0901169-2

Resumo**CONSTRUÇÃO GÊNICA, MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA,
PROCESSO PARA PRODUZIR PRAGUICIDA, PROCESSO DE CONTROLE DE
PRAGAS**

5

A presente invenção proporciona uma construção gênica que compreende o gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* funcionalmente ligado a um promotor funcional em plantas. Em uma concretização preferencial, plantas transformadas com a construção gênica da invenção, expressam o gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* e apresentam adequado desempenho agrônomo/produtividade e proporcionam completa eficácia contra *A. gemmatilis*, oferecendo um efetivo potencial para resistência a insetos em soja.

15