

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Ferramentas biotecnológicas com potencial aplicação na  
obtenção de plantas transgênicas de soja com maior  
resistência a estresses abióticos e bióticos**

**Ricardo Luís Mayer Weber**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Bodanese Zanettini**

**Co-orientador: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali**

**Porto Alegre, Maio de 2011**

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética e Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia desta Universidade, e nas casas de vegetação do Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, EMBRAPA TRIGO, Passo Fundo, RS. O projeto foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Projeto BIOTECSUR e Centro do Agronegócio-Casa Rural.

**A todos que tornaram este trabalho possível, agradeço;**

**A minha família, dedico.**

**“Se tudo tivesse funcionado, não teria aprendido tanto.”**

**Ricardo Weber**

**“E lá vamos nós!!!”**

**(Bruxa do desenho Pica-Pau)**

**“Sou brasileiro, e não desisto nunca!”**

**(Autor desconhecido)**

## Agradecimentos

---

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria Helena Bodanese-Zanettini, muitas vezes mãe, agradeço pela orientação durante toda minha vida acadêmica, pela dedicação e extrema competência, pelo caráter firme e seguro dos seus ensinamentos. Um exemplo a ser seguido de pessoa e de profissional.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Giancarlo Pasquali por me receber muito bem no seu grupo de pesquisa, a todos os ensinamentos transmitidos, pelo incentivo, pelas contribuições valiosas e pela paciência em esclarecer minhas dúvidas. Agradeço também por ter me dito: “O quê? Vai trabalhar com *Agrobacterium rhizogenes*?”;

À Profa. Dra. Márcia Margis, co-orientadora do meu mestrado e que atuou como uma terceira orientadora durante meu doutorado, por todas as vezes que me acolheu, pelos inúmeros conselhos, pelo incentivo e pela confiança;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Vegetal, em especial a trupe da salinha dos computadores – Ane, Mi e Samantinha. Obrigado por estarem presentes, por me aturarem e tornar o trabalho, tantas vezes árduo e frustrante, em algo agradável e divertido;

A Silvinha, pela amizade, apoio técnico e suporte emocional;

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia, em especial à Rochele Kirch, pela amizade e pela acolhida;

Ao Pesquisador da EMBRAPA-TRIGO, Dr. Paulo Fernando Bertagnolli, por todo auxílio e ensinamentos durante a execução do projeto da osmotina;

Ao pessoal da EMBRAPA-CENARGEN por todo apoio na realização do experimento da seca;

A minha amiga Beatriz Wiebke-Strohm, por ter abraçado comigo o trabalho da osmotina e por todo incentivo - tua ajuda foi essencial, muito obrigado mesmo!

A minha grande amiga Adriana Ambrosini, por tudo! Obrigado por me ensinar, por me aconselhar, por me ouvir, por puxar minha orelha... Tu sabes o quanto importante é tua participação na minha vida;

A minha grande amiga Mary (Marícia Fantinel), por me ajudar a “segurar a Berenice” tantas vezes. Obrigado pelo carinho, conselhos e por dividir o cérebro comigo (rsss). Eu te amo guria, “tâmo sempre junto”!

Aos meus pais Ricardo e Jane e minha irmã Maria Eduarda, por entender a minha ausência, terem paciência e dado apoio em todos os momentos. Obrigado por apoiarem as minhas escolhas e sonharem junto comigo. Minha base é graças a vocês!

A Vó Suely por todo apoio durante a minha vida acadêmica, pelas palavras de incentivo e por acreditar tanto em mim;

Ao Marcos, peça fundamental na minha vida, sempre presente e que tanto me ajudou nessa caminhada acadêmica. Obrigado pelo apoio, pelos momentos de descontração, companheirismo, dedicação, paciência, puxões de orelha e, sobretudo, por sonhar junto, acreditando no meu potencial... Não tenho palavras para te agradecer!

Ao Elmo e a Helen pela constante atenção e dedicação, sempre dispostos a resolver qualquer problema!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio da bolsa de mestrado e doutorado, inclusive o financiamento de projetos de pesquisa, garantiram o suporte financeiro desse período.

## Sumário

---

<b>Resumo</b> .....	15
<b>Abstract</b> .....	17
<b>1. Introdução Geral</b> .....	19
1.1 Soja .....	19
1.2 Transformação genética da soja .....	21
1.3 Transformação mediada por <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	22
1.4 Busca por promotores raiz-específicos .....	23
1.5 Moléstias fúngicas, seca e a proteína osmotina.....	25
<b>2. Objetivos</b> .....	29
2.1 Objetivo Geral .....	29
2.2 Objetivos Específicos .....	29
<b>Capítulo I - Isolamento e caracterização de promotores raiz-específicos de soja</b> <b>[<i>Glycine max</i> (L.) Merrill]</b> .....	31
1. Introdução .....	32
1.1 Promotores gênicos.....	32
1.2 Promotores constitutivos, induzíveis e tecido-específicos.....	35
1.3 Promotores raiz-específicos .....	38
1.4 Expressão gênica em vegetais homólogos e heterólogos.....	41



2	Objetivos .....	42
2.1	Objetivo Geral .....	42
2.2	Objetivos Específicos .....	42
3.	Materias e Métodos .....	43
3.1	Busca por sequências gênicas com expressão raiz-específica.....	43
3.2	Isolamento e caracterização <i>in silico</i> de sequências promotoras.....	44
3.3	Clonagem dos promotores em vetor de expressão contendo o gene-repórter <i>gusA</i> .....	47
3.4	Ensaio de expressão transiente em folhas e raízes de soja.....	48
3.5	Adaptação dos cassetes de expressão promotor:: <i>gusA</i> a vetores plasmidiais binários .....	49
3.6	Transformação genética de soja por <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	51
3.7	Transformação genética de tabaco como modelo de vegetal heterólogo.....	51
3.8	Análise de deleção de uma região 5' do promotor de <i>GmRB7</i> em sistema de transformação por <i>A. rhizogenes</i> .....	52
3.9	Ensaio histoquímico de GUS.....	53
4.	Resultados e Discussão .....	54
4.1	Isolamento e caracterização <i>in silico</i> de potenciais promotores gênicos raiz- específicos de soja.....	54

4.2 Avaliação da atividade promotora pela expressão transiente em folhas e raízes de soja .....	58
4.3 Avaliação da atividade promotora em soja pela transformação genética mediada por <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	59
4.4 Avaliação da atividade promotora de <i>GmRB7</i> pela transformação genética de tabaco (modelo vegetal heterólogo) .....	61
4.5 Análise da deleção de uma região 5' do promotor <i>GmRB7</i> .....	65
5. Referências Bibliográficas .....	70
<b>Capítulo II</b> - Screening of Brazilian soybean genotypes for transgenic hairy-roots production by <i>Agrobacterium rhizogenes</i> -mediated transformation .....	80
<b>Capítulo III</b> - Resistance to fungal in transgenic soybean cultivars expressing an osmotin-like protein (SnOLP) from <i>Solanum nigrum</i> var. <i>americanum</i> ): an alternative to achieve fungal resistance and drought tolerance .....	100
<b>Conclusões e perspectivas</b> .....	127
<b>Referências Bibliográficas da Introdução Geral e Conclusões e Perspectivas</b> ....	131

## Lista de abreviaturas

---

aa: aminoácidos

BLAST: do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*

bp: pares de bases do DNA

CaMV: do inglês *Cauliflower mosaic virus*, vírus do mosaico da couve-flor

cDNA: DNA complementar

CTAB: do inglês *Cetyl Trimethylammonium Bromide*, brometo de cetiltrimetilamônio

cv: cultivar

DAI: do inglês *Days for hairy-root emergence After bacterial Infection* – dias para a emergência de raízes em cabeleira após a infecção pela bactéria.

DNA: do inglês *deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucléico

dNTP: do inglês *deoxyribonucleotide*, desorribonucleotídeo trifosfatado

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GFP: do inglês *green fluorescent protein*, proteína fluorescente verde

GFP<sup>+</sup>: expressão de GFP

*Gm*: *Glycine max*

GUS:  $\beta$ -glicuronidase

GUS<sup>+</sup>: expressão do gene *gusA*

*gusA*: gene repórter que codifica a  $\beta$ -glicuronidase

*hptII*: gene marcador que codifica a higromicina fosfotransferase

HR: do inglês *hairy-roots*, raízes em cabeleira

K599: linhagem de *Agrobacterium rhizogenes*

kb: quilobases

kDa: kiloDaltons

LB: do inglês *left border*, borda esquerda do T-DNA

LB: meio de cultura Luria Broth

LSD: do inglês *Least Significant Difference*

Mb: megabase

MS: meio de cultura Murashige e Skoog

NCBI: do inglês *National Center for Biotechnology Information*

NCS: Nematóide-de-cisto-da-soja

*npII*: gene marcador que codifica neomicina fosfotransferase II

NT: não transformada

OLP: do inglês *Osmotin-like proteins*

ORF: do inglês *open reading frame*

P35S: promotor do gene 35S do CaMV

pb: pares de base

PCR: do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PDB: meio de cultura *Potato Dextrose Broth*

pH: potencial de hidrogênio

PIG: do inglês *Particle Inflow Gun*

*Pnos*: promotor do gene da nopalina sintase

PR-5: do inglês, *Pathogenesis-Related-5*

*ProD*: promotor raiz-específica de *Agrobacterium rhizogenes*

RB: do inglês *right border*, borda direita do T-DNA

Ri: plasmídeo de virulência de *A. rhizogenes*

RNAi: RNA de interferência

RT-qPCR: transcrição reversa associada a PCR quantitativa em tempo real

SnOLP: Osmotina de *Solanun nigrum*

T<sub>0</sub>: plantas transgênicas recuperadas da cultura *in vitro*

T<sub>1</sub>: progênie das plantas transgênicas recuperadas da cultura *in vitro*

T35S: terminador do gene 35S do CaMV

T-DNA: DNA de transferência de *Agrobacterium*

TF: do inglês *Transformation Frequency* – frequência de transformação

*Tnos*: terminador do gene da nopalina sintase

UBQ3: promotor da ubiquitina de *Arabidopsis thaliana*

USPTO: do inglês, *United States Patent and Trademark Office*

UTR: do inglês *untranslated region*, região não-traduzida das bordas do mRNA

V2: estágio fenológico da planta de soja caracterizado pela presença da primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida

V4: estágio fenológico da planta da planta de soja correspondente ao desenvolvimento vegetativo com quatro nós foliares

X-Gluc: do inglês *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide*

## Resumo

---

A transformação genética é uma ferramenta importante para o estudo funcional de genes e obtenção de plantas com novas características agronômicas. A introdução de genes pela engenharia genética requer, para sua expressão otimizada, além de genes de interesse, a utilização de seqüências reguladoras da transcrição (promotores) eficazes. A obtenção de seqüências promotoras raiz-específicas seria de grande valia para trabalhos de transformação genética de soja com vista à obtenção de resistência a nematóides e fungos, uma vez que permitiria o direcionamento da expressão de proteínas capazes de combater estes patógenos e outras pragas apenas nos órgãos-alvo do ataque, ou seja, raízes. O presente trabalho relata a caracterização inicial de quatro promotores de soja potencialmente raiz-específicos - *GmAQP*, *GmAS2*, *GmEXT* e *GmRB7*.

A obtenção de raízes transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* é uma ferramenta bastante útil para testar promotores e novos genes de interesse. Para a implementação do método de transformação mediada por *A. rhizogenes* em nosso laboratório, foram necessárias algumas etapas fundamentais, como a escolha de cultivares mais propícias para a transformação. Neste trabalho, foi identificada a cultivar MG/BR 46 Conquista como a que apresenta maior eficiência de transformação e menor tempo para a produção de raízes transgênicas, dois parâmetros fundamentais para tornar a técnica mais eficiente. A metodologia simples, pouco laboriosa e de rápida obtenção de resultados é essencial para atender as demandas da genômica funcional. O método já está bem estabelecido no laboratório e, além da aplicação na análise de promotores, vem sendo utilizado para testar novos genes candidatos para a transformação da soja e para a localização subcelular de proteínas codificadas pelos genes em estudo.

Diversos fatores limitam a maior produtividade da soja, sendo as doenças os mais importantes e difíceis de controlar. Entre os fatores abióticos, a falta de água é responsável pela diminuição da produtividade agrícola, além de restringir as latitudes e os solos onde espécies comercialmente importantes podem ser

cultivadas. Com o objetivo de aumentar a resistência a estresses abióticos e bióticos foi introduzido em soja o gene SnOLP, que codifica uma osmotina de *Solanum nigrum*. Foram obtidas três linhagens transgênicas, todas com uma única cópia do transgene. As análises de gerações segregantes confirmaram a integração estável do transgene. A linhagem B1, proveniente da transformação da cultivar Bragg, apresenta melhores resultados, tanto na resposta a estresses bióticos (fungos) quanto abióticos (seca). Os resultados obtidos no presente estudo mostram que existe potencial para a aplicação do gene *SnOLP* em estratégias de melhoramento da soja.



## Abstract

---

Genetic transformation is an important tool for functional studies of genes and generation of plants with new traits. The introduction of genes by genetic engineering requires for its optimal expression, effective transcription regulatory sequences (promoters). Root-specific promoter sequences would be valuable for studies on soybean genetic transformation to obtain nematode and fungal resistance, since they allow the expression of the interest protein in organs usually attacked by diseases - the roots. This thesis reports the initial characterization of four putative root-specific soybean promoters - *GmAQP*, *GmAS2*, *GmEXT* and *GmRB7*.

Transgenic roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* are useful tool for screening of new promoters and genes of interest. To implement the transformation method mediated by *A. rhizogenes* in our lab, it was necessary some previous key steps, such as the choice of cultivars more susceptible to the bacterium infection. MG/BR 46 Conquista cultivar was found to be the most susceptible and can be recommended for *A. rhizogenes*-mediated transformation experiments. The methodology is simple and fast, essential characteristics to meet the demands of functional genomics. The method is well established in the laboratory and, in addition to analysis of promoters, it has been used to test new genes for soybean transformation and subcellular localization of proteins encoded by the genes under study.

Among the many factors that limit soybean yield, diseases are among the most important and difficult to control. Furthermore, the water deficit constrains agricultural productivity, restricting the latitudes and soils where commercially important species can be cultivated. Aiming to obtain increased resistance to abiotic and biotic stresses the osmotin encoding gene (*SnOLP*) from *Solanum nigrum* was introduced into soybean cultivars. Three transgenic lines with one transgene copy were obtained. The segregation analysis confirmed the stable integration of *SnOLP*. In vitro bioassays indicate that B1 transgenic line, derived from Bragg cultivar, was more resistant against economically important pathogenic

fungi as well as more tolerant to drought. The results of this study show potential application of *SnOLP* in strategies for soybean breeding.

## 1. Introdução Geral

---

### 1.1 A Soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma espécie da família Fabaceae (leguminosas), anual, diplóide ( $2n=40$ ), de autofecundação, nativa da China e explorada no Oriente há mais de cinco mil anos (Hymowitz, 1976; EMBRAPA Soja, 2010). Cerca de 200 milhões de toneladas deste grão são produzidas anualmente em todo o mundo, sendo a maior parte destas moída e utilizada para a produção de farinha e óleo, destinados ao consumo humano e animal.

No Brasil, a cultura da soja foi estabelecida a partir da década de 1960, sendo uma das espécies vegetais mais importantes para a economia do país. Atualmente, a produção de soja nos países da América do Sul ultrapassa a dos Estados Unidos da América (EUA). Os três maiores produtores sul-americanos são o Brasil, responsável por aproximadamente um quarto de toda produção, seguido pela Argentina e pelo Paraguai (ERS-USDA, 2010).

Devido à sua importância no cenário mundial, a comunidade científica internacional que trabalha com leguminosas, recomendou que a soja fosse considerada uma planta modelo para estudos genéticos e moleculares (Gepts *et al.*, 2005). Além disto, o grande interesse econômico torna-a um importante alvo para o melhoramento genético.

A recente publicação do genoma da soja (Schmutz *et al.*, 2010) vem permitindo grandes avanços nas pesquisas que visam contribuir para o melhoramento desta espécie. Segundo os autores, o genoma da soja apresenta 57% do seu total em regiões de heterocromatina, e 46,430 genes codificadores de proteínas preditos.

Na previsão feita por Chakraborty & Newton (2011), a produção mundial de alimentos deve aumentar 50% até 2050 para atender a demanda de consumo da população. Segundo os autores, o manejo de pestes e doenças foi responsável

pela duplicação na produção de alimentos nos últimos 40 anos, porém os patógenos são ainda responsáveis por prejuízos em torno de dez a 16% nas colheitas.

Entre os diversos fatores que limitam a maior produtividade da soja, as doenças estão entre os mais importantes e difíceis de controlar. A expansão das culturas para novas áreas, a monocultura e a utilização de práticas inadequadas de manejo têm aumentado o número de doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides, além de outras anormalidades desconhecidas (Suzuki & Yuyama, 2005).

Além dos fatores supracitados, a seca merece bastante atenção. A falta de água é considerada o principal fator para a diminuição da produtividade agrícola além de restringir as latitudes e os solos onde espécies comercialmente importantes podem ser cultivadas (Chaves & Oliveira, 2004). O desenvolvimento de cultivares mais tolerantes a períodos de déficit hídrico, bem como o desenvolvimento de tecnologias que auxiliem as plantas a tolerar períodos prolongados de estiagem, serão essenciais na manutenção da produção agrícola brasileira e mundial em níveis que possam alimentar uma população em constante crescimento (Nepomuceno *et al.*, 2001). Períodos prolongados de seca podem afetar diretamente a produtividade da soja, pela redução do tamanho das plantas, atraso no desenvolvimento e diminuição da área foliar (Confalone *et al.*, 1998; Desclaux *et al.*, 2000).

Entretanto, estudos com cultivares brasileiras de soja demonstram uma estreita base genética em seu germoplasma (Priolli *et al.*, 2002). Além disto, a fonte de recursos genéticos, representada por espécies afins, também é inacessível para a soja, devido à incompatibilidade sexual dos cruzamentos interespecíficos e intergenéricos (Hu & Bodanese-Zanettini, 1995). Neste sentido, a prospecção de genes capazes de conferir resistência a diferentes tipos de estresses, aliada às ferramentas de engenharia genética e transgenia, surgiram como importantes alternativas para a manutenção e/ou o aumento da produtividade das culturas agrícolas. A introdução de genes pela engenharia

genética requer, para sua expressão otimizada, além de genes com função eficaz no combate aos diferentes estresses, a utilização de seqüências reguladoras da transcrição (promotores) eficazes.

## 1.2 Transformação genética da soja

Dois principais métodos de transferência de genes têm sido utilizados na transformação de diferentes tecidos de soja. Estes incluem o bombardeamento de partículas ou biobalística, utilizando como alvo meristemas de brotos (McCabe *et al.*, 1988; Christou *et al.*, 1989; Aragão *et al.*, 2000), ou culturas embriogênicas em suspensão (Finer & McMullen, 1991; Stewart *et al.*, 1996; Donaldson & Simmonds 2000; Schmidt *et al.*, 2008); e a transformação mediada pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando-se como alvo explantes cotiledonares derivados de plântulas de 5-7 dias (Hinchee *et al.*, 1988; Olhoft *et al.*, 2003), sementes maduras (Paz *et al.*, 2006), cotilédones imaturos (Parrot *et al.*, 1989; Yan *et al.*, 2000), e culturas embriogênicas em suspensão (Trick & Finer, 1998).

Em nosso laboratório (Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas, do Departamento de Genética da UFRGS) foi estabelecido um protocolo de transferência de genes para soja, via bombardeamento, utilizando como alvo o tecido embriogênico mantido em meio semi-sólido (Droste *et al.* 2002). Utilizando este protocolo, foram obtidas plantas transgênicas da cultivar IAS-5, que expressam um gene *cry1Ac* modificado de *Bacillus thuringiensis* (Homrich *et al.* 2008) dentre outras (dados ainda não publicados). Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu um novo método de transformação genética para a soja que combina o bombardeamento com o sistema *A. tumefaciens* (Wiebke-Strohm *et al.*, 2011).

Todos os métodos acima citados apresentam limitações, tais como o prolongado período de cultura de tecidos, trabalho intenso, altos custos e, ademais, não são protocolos eficientes para análises em larga-escala, limitando seus potenciais como ferramenta para genômica funcional. Segundo Olhoft e colaboradores (2003), estima-se que cada pesquisador teria de gerar ao menos 300 linhagens transgênicas de soja por ano para atingir as metas dos consórcios

de estudos genômicos. Os métodos referidos estão longe de permitir tal quantidade de eventos transgênicos para a soja. O método de transformação genética mediado por *Agrobacterium rhizogenes* é uma alternativa a ser considerada frente a esta grande demanda.

### **1.3 Transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes***

*Agrobacterium rhizogenes* é uma bactéria fitopatogênica, Gram-negativa, que causa a formação de raízes adventícias (raízes em cabeleira) nos locais de infecção. As raízes em cabeleira (do inglês *hairy roots*) apresentam crescimento rápido, plagiotrópico e, em cultura de tecidos, são capazes de ramificar e crescer rapidamente na ausência de adição de reguladores de crescimento (Collier *et al.* 2005).

*A. rhizogenes* é capaz de co-transferir vetores plasmidiais binários para as células hospedeiras, permitindo, assim, integrar construções gênicas de interesse de forma estável no genoma vegetal (Christey, 2001; Broothaerts *et al.*, 2005). Diversos exemplos de espécies vegetais transformadas pela infecção por *A. rhizogenes* são encontrados na literatura científica (para revisão: Veena & Taylor, 2007). O método é aplicado com sucesso em leguminosas como *Medicago truncatula* (Crane *et al.*, 2006), *Phaseolus spp.* (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006), *Sesbania rostrata* (Van de Velde *et al.*, 2003) e *Lotus corniculatus* (Jian *et al.*, 2009).

Em soja, os pesquisadores vêm utilizando as vantagens do método de transformação com *A. rhizogenes* para diversos objetivos. Entre as aplicações pode-se destacar a caracterização de promotores (Presizner *et al.*, 2001; Govindarajulu *et al.*, 2008; Hernandez-Garcia *et al.*, 2010); a propagação de nematóides em condições assépticas (Cho *et al.*, 2000); o estudo de interações simbióticas (Hayashi *et al.*, 2008); interações patogênicas (Lozovaya *et al.*, 2004; Marra *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010) e o silenciamento gênico (Subramanian *et al.*, 2005).

Apesar da regeneração de plantas completas a partir de raízes em cabeleira não ser possível até o momento, o método é uma ferramenta vantajosa em relação aos métodos tradicionais de transformação de soja. A maior vantagem é a rápida obtenção de resultados (cerca de seis a oito semanas), útil para testar diferentes genes candidatos e promotores antes de partir para a transformação da planta inteira (Cho *et al.*, 2000). A implementação desta técnica em nosso laboratório resultou no artigo apresentado no Capítulo 2 desta Tese, já submetido para publicação.

#### **1.4 Busca por promotores raiz-específicos**

As raízes são órgãos fundamentais ao desenvolvimento vegetal pleno, responsáveis pela captação de nutrientes, interação com microrganismos do solo, secreção de compostos que defendem a planta de diversos patógenos e proteção dos demais tecidos contra metais pesados, falta de água e alterações de pH do solo. Segundo Koyama e colaboradores (2005), a expressão de genes de resistência a estresses abióticos e de aumento na absorção de nutrientes, especialmente na epiderme da raiz, por meio da engenharia genética, pode permitir o desenvolvimento da planta em condições adversas. Adicionalmente, a expressão em raízes de genes de resistência a estresses bióticos, tais como nematóides e fungos, é também uma alternativa para o controle destes patógenos em soja.

Cerca de 2.500 espécies de nematóides fitoparasitas causam prejuízos anuais de aproximadamente 100 bilhões de dólares em diferentes culturas na agricultura mundial (Atkinson *et al.*, 1995; Vishnudasán *et al.*, 2005). Nas áreas onde ocorrem, observam-se manchas em reboleiras nas lavouras, onde as plantas de soja apresentam-se pequenas e amareladas. Durante o florescimento, nota-se intenso abortamento de vagens e amadurecimento prematuro das plantas atacadas, o que leva a uma perda considerável na produtividade (Embrapa Soja, 2010).

O nematóide-de-cisto-da-soja (NCS) é uma das principais pragas da cultura pelos prejuízos que pode causar e pela facilidade de disseminação. Este verme penetra nas raízes da planta e dificulta a absorção de água e nutrientes, condicionando um reduzido número de vagens, clorose e conseqüente baixa produtividade (Embrapa Soja, 2010). As estratégias atuais de controle dos nematóides incluem a rotação de culturas, o manejo do solo e a utilização de cultivares resistentes de soja, sendo ideal a combinação dos três métodos. O uso de cultivares resistentes é o método mais econômico e mais eficiente. Porém, seu uso exclusivo pode provocar pressão de seleção de raças, devido à grande variabilidade genética do parasita (COODETEC, 2002, Embrapa Soja, 2010).

Existem diversos nematicidas no mercado que são recomendados para o uso no controle do parasita. Porém, além de caros, são extremamente prejudiciais ao ambiente, tóxicos e não totalmente eficazes no controle da praga (Jeyaratnam *et al.*, 1990; Urwin *et al.*, 2000; COODETEC, 2002; Embrapa Soja, 2010).

Uma das estratégias propostas para o controle dos nematóides é a transformação de plantas com fatores anti-nutricionais (Atkinson *et al.*, 1995, 2001; Silva *et al.*, 2004). A expressão em plantas de anticorpos que se ligam à secreção do nematóide, essenciais para a manutenção dos sítios de alimentação, é uma das alternativas (Schots *et al.*, 1992). Contudo, a estratégia mais promissora é baseada na utilização de inibidores de proteinases, que são proteínas relacionadas com a defesa natural das plantas ao ataque por herbívoros. Alguns trabalhos mostram a eficácia desta abordagem na produção de plantas transgênicas. Plantas transgênicas de batata expressando o inibidor de tripsina de feijão-de-vaca são capazes de reduzir a fecundidade do verme *Meloidogyne* spp. (Hepher & Atkinson, 1992). Plantas de trigo transformadas com um inibidor de serino-proteinase apresentaram resistência satisfatória em relação a duas espécies de nematóides (Vishnudasan *et al.*, 2005). Plantas de *Arabidopsis thaliana* expressando um inibidor de uma proteinase cisteínica de arroz são resistentes ao verme *Meloidogyne incognita* (Urwin *et al.*, 1998).



A identificação de genes diferencialmente expressos em soja parasitada pelo nematóide, e que possam ser utilizados em estratégias de melhoramento genético e biotecnologia, é desejável para o aprimoramento e a obtenção de cultivares resistentes (Morales *et al.*, 2009). Tanto quanto é do nosso conhecimento, até o momento, não foi registrada nenhuma cultivar comercial de soja transgênica com resistência a nematóides.

A obtenção de sequências promotoras raiz-específicas seria de grande valia para trabalhos de transformação genética de soja com vista à obtenção de resistência a nematóides, uma vez que permitiria o direcionamento da expressão de proteínas capazes de combater estes patógenos e outras pragas apenas nos órgãos-alvo do ataque, ou seja, raízes. Adicionalmente, a disponibilização de promotores raiz-específicos permitiria a regulação da expressão transgênica relacionada a vários outros fenótipos de interesse como, por exemplo, a síntese de alcalóides e outros metabólitos secundários, a tolerância à seca e a metais tóxicos, etc. No Capítulo 1 desta Tese, estão relatados o isolamento e a caracterização inicial de promotores putativamente raiz-específicos.

### **1.5 Moléstias fúngicas, seca e a proteína osmotina**

Uma ampla diversidade de fungos patogênicos atacam diferentes estruturas das plantas em diversos estádios de seu desenvolvimento. A importância econômica de cada doença fúngica varia de ano para ano e de região para região, dependendo, principalmente, das condições climáticas de cada safra (Vidor *et al.*, 2004; Barros & Borges, 2007; Barros, 2009). A forma mais eficaz e econômica de controlar as doenças é através do uso de cultivares resistentes. Entretanto, para a maioria das doenças da soja, ainda não foram obtidas fontes de resistência (Camargo & Yuyama 2001). Atualmente, a maior ameaça é a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, responsável por grandes prejuízos na produção de grãos e que tem preocupado tanto pesquisadores como produtores (Barros & Borges 2007; Goellner *et al.* 2010).

Diversos fungos atacam lavouras de soja. Os patógenos mais comumente envolvidos com podridão de sementes e morte de plântulas são: *Pythium* sp., *Phytophthora sojae*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* f.sp. *glycines*. Esses dois últimos, juntamente com *Macrophomina phaseoli*, *Sclerotium rolfsii* e *S. sclerotiorum*, são também responsáveis por podridões radiculares, do colo e da haste (Bonato, 2000; COODETEC, 2002; Reis & Casa, 2002). Os autores salientam que, em soja, não há fonte de resistência a esses fungos, sendo este um grande desafio para os programas de melhoramento.

As plantas podem ser infectadas por inúmeros patógenos com diferentes características de desenvolvimento. Os patógenos biotróficos obtêm sua nutrição a partir de tecidos vivos e, por isso, são altamente especializados e desenvolvem forte relação de dependência com seus hospedeiros. Os patógenos necrotróficos crescem em tecidos vegetais feridos, desnutridos ou senescentes e, frequentemente, produzem toxinas para matar o tecido hospedeiro e, posteriormente, colonizá-lo. Este tipo de patógeno é menos especializado e pode desenvolver hábito saprofítico (Wit 2007). Entre os fungos necrotróficos que atacam a soja, *Rhizoctonia solani* e *Phomopsis* sp., merecem uma breve descrição de sua importância, pois foram utilizados no presente estudo.

O fungo *Rhizoctonia solani*, agente causador da podridão de raiz e da base da haste que leva ao tombamento, é um basidiomiceto encontrado no solo, onde pode sobreviver por anos mesmo na ausência do hospedeiro. Além da soja, ataca culturas de batata, feijão, milho e fumo. Possui esporos pesados que podem ser transportados a longas distâncias apenas através da água ou de material contaminado. O patógeno causa grandes epidemias em condições favoráveis de excesso de umidade e temperaturas elevadas, sendo responsável por quedas estimadas de 31 a 60% na produção de soja (Fenille *et al.*, 2003). Medidas de manejo cultural são consideradas alternativas importantes para o controle, antes do estabelecimento da doença (Camargo & Yuyama 2001; Vidor *et al.* 2004).

*Phomopsis* sp. é um ascomiceto, responsável por uma das doenças mais tradicionais da soja (Seca da haste e da vagem da soja) e, anualmente,

juntamente com a antracnose, leva ao descarte de grande número de lotes de sementes. O armazenamento das sementes em temperatura ambiente reduz a viabilidade dos esporos, mas em temperaturas amenas ela é mantida. A germinação de sementes infectadas é prejudicada, contudo o tratamento com fungicida geralmente resolve o problema (Vidor *et al.* 2004).

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

As enzimas hidrolíticas quitinases e  $\beta$ -1,3-glicanases estão entre as proteínas antifúngicas mais exploradas para a geração de plantas transgênicas resistentes, por serem capazes de degradar os principais componentes da parede celular de fungos, as quitinas e os glicanos, respectivamente (Fritig & Legrand, 1998; Salmeron & Vernooij, 1998; Kern *et al.*, 2010). Além disso, as quitinases fazem parte do sistema de defesa das plantas, não sendo tóxicas para as mesmas e para os animais (Lorito *et al.*, 1998).

As osmotinas (*osmotin-like proteins* ou OLPs) são proteínas pertencentes à família PR-5 (do inglês, *Pathogenesis-Related*), que apresentam um alto grau de homologia com a proteína taumatina (Yun *et al.*, 1997). O mecanismo de ação antifúngica dessas proteínas ainda não é completamente elucidado, mas acredita-se que as osmotinas possam atuar permeabilizando as membranas celulares dos fungos, o que impede a manutenção do gradiente de pH, resultando em prejuízo para o desenvolvimento do patógeno (Yun *et al.*, 1997).

Estudos com a superexpressão de osmotinas conferindo tolerância a moléstias fúngicas e doenças causadas por oomicetos foram registrados por Liu e colaboradores (1994), Zhu e colaboradores (1995), Ouyang e colaboradores

(2005) e Das e colaboradores (2011). Esses trabalhos apontam a osmotina como uma proteína com potencial elevado para o controle de moléstias fúngicas.

Além da atividade antifúngica e anti-oomicetos, a osmotina pode aumentar a tolerância a estresses abióticos, principalmente à seca (Barthakur *et al.* 2001; Noori & Sokhansanj, 2008; Husaini & Abdin 2008; Parkhi *et al.* 2009; Goel *et al.*, 2010; Subramanyam *et al.*, 2010), e promover a crioproteção de tecidos (D'Angeli & Altamura, 2007). A utilização da osmotina para a obtenção de plantas transgênicas mais tolerantes à seca é tema de diversos estudos realizados principalmente nos últimos cinco anos.

A osmotina de *Solanum nigrum* (SnOLP) apresenta comprovada ação antifúngica e anti-oomicetos *in vitro* (Campos *et al.*, 2008). O gene codificador desta proteína foi utilizado para a transformação de soja e os resultados são apresentados no Capítulo 3 desta Tese. O capítulo está escrito em formato de artigo a ser submetido para a publicação.

## 2. Objetivos

---

### 2.1 Objetivo geral

Os objetivos principais que nortearam o desenvolvimento do presente trabalho foram (1) disponibilizar sequências promotoras nativas (isto é, da própria soja), capazes de direcionar a expressão gênica para raízes, com possível aplicação no melhoramento genético da soja e (2) caracterizar plantas de soja transformadas com o gene da osmotina (*SnOLP*) de *Solanum nigrum* var. *americanum*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Isolar e caracterizar seqüências de DNA de soja com potencial atividade promotora raiz-específica;
- b) Construir vetores de transformação contendo os promotores candidatos fusionados ao gene repórter;
- c) Implementar um protocolo de transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, com a identificação de cultivar brasileira propícia para o método;
- d) Validar os promotores quanto à capacidade de direcionar a expressão gênica por ensaios de expressão estável em vegetal homólogo (soja);
- e) Validar os promotores quanto à capacidade de direcionar a expressão gênica por ensaios de expressão estável em vegetal heterólogo (tabaco);
- f) Caracterizar molecularmente as plantas transgênicas com o gene da osmotina de *S. nigrum* e obter plantas homozigóticas;
- g) Conduzir bioensaios *in vitro* visando avaliar o potencial aumento da resistência das plantas transgênicas a fungos economicamente importantes;
- h) Conduzir bioensaio visando testar a resposta das plantas transgênicas a estresse hídrico.

Os objetivos específicos **a**, **b**, **d** e **e** fazem parte do **Capítulo I** desta Tese, o item **c** está apresentado no **Capítulo II**, sob forma de artigo submetido para publicação, e os itens **f**, **g** e **h** compõem o **Capítulo III**, sob forma de artigo que será em breve submetido para publicação.

**Isolamento e caracterização de promotores raiz-  
específicos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**

## 1 Introdução

---

### 1.1 Promotores gênicos

A transcrição de um gene eucariótico é precedida por vários eventos que incluem a descondensação local da cromatina, a remodelação da estrutura de nucleossomos, modificações de histonas, a ligação de ativadores transcricionais e coativadores em *enhancers* e promotores, e o recrutamento da maquinaria de transcrição basal ao promotor (Smale & Kadonga, 2003). O promotor é a sequência de DNA que atua como processador central da regulação de um gene, uma vez que contém os sítios de ligação (*cis*-elementos) para os fatores de transcrição (FTs ou TFs, do inglês, *Transcription Factors*) e para a RNA polimerase, responsável pela transcrição gênica. Em geral, os promotores de genes transcritos pela RNA polimerase II de eucariotos, codificadores de mRNAs e, por conseguinte, da maioria dos peptídeos, localizam-se a montante (região 5' ou, em inglês, *upstream*) da sequência a ser transcrita, podendo se estender por algumas centenas de pares de bases (pb; Griffiths *et al.*, 2000; Butler & Kadonaga, 2002). Segundo Wray e colaboradores (2003), o promotor é tão importante para a função de um gene quanto a sua região codificadora.

O promotor é a unidade de DNA fundamental para regular a expressão gênica em nível da transcrição, direcionando-a a um determinado tecido, a um determinado estágio de desenvolvimento e/ou a uma resposta a estresses ambientais ou a outros sinais (Yoshida & Shinmyo, 2000). Promotores podem ser divididos em duas regiões: a região proximal, comumente conhecida como núcleo ou *core*, e uma região distal. A região proximal é a responsável pelo acoplamento da RNA polimerase II e pelo direcionamento de um nível basal de transcrição, enquanto a região distal do promotor pode conter os elementos reguladores capazes de definir a expressão espaço-temporal (Rombauts *et al.*, 2003).

O promotor-núcleo (*core*) localiza-se em uma região que se estende por aproximadamente 35 nucleotídeos, tanto na direção a montante quanto a jusante



ao sítio de início de transcrição. Entre os *cis*-elementos conservados no promotor-núcleo podemos destacar o *TATA-box*, o iniciador (Inr), o elemento de reconhecimento ao TFIIB (BRE, do inglês, *TFIIB recognition element*) e o elemento do promotor posterior (DPE, do inglês, *Downstream Promoter Element*). A conservação destas regiões em sequências promotoras não é muito consistente, de modo que, aparentemente, não existem *cis*-elementos universais no promotor-núcleo. Uma revisão mais detalhada sobre os *cis*-elementos e TFs que constituem e atuam no promotor-núcleo e a regulação do início da transcrição é encontrada nos trabalhos de Butler & Kadonaga (2002) e Smale & Kadonaga (2003).

Embora o início da transcrição de genes codificadores de mRNAs seja dependente das sequências encontradas no núcleo da região promotora, muitos outros *cis*-elementos estão envolvidos na regulação da expressão gênica. Embora a presença do promotor-núcleo seja essencial, sem a presença de sítios de ligação para TFs acessórios, a transcrição de um gene seria insignificante ou inespecífica (Wray *et al.*, 2003; Potenza *et al.*, 2004).

De fato, grande parte do ajuste fino da expressão dos genes é decorrente da presença de sequências-alvo para TFs localizadas fora do promotor-núcleo. Assim como no promotor-núcleo, estas proteínas ativadoras ou repressoras ligam-se aos motivos *cis* de DNA distais.

Os *cis*-elementos de DNA são também chamados de elementos reguladores da transcrição, elementos potencializadores ou *enhancers* e, também, elementos repressores, silenciadores, operadores ou inibidores. Os *cis*-elementos podem ser definidos como módulos de DNA pouco conservados; de orientação-independente; presentes a jusante ou a montante da região codificadora e até mesmo em íntrons; variando em tamanho e com degenerações na sequência que podem dificultar as análises comparativas (Potenza *et al.*, 2004). Na literatura, os *cis*-elementos são frequentemente denominados “elementos reguladores *cis*-atuantes” (do inglês, *Cis-Acting Regulatory Elements* ou CAREs) ou simplesmente “motivos de ligação” (do inglês, *binding motifs*).

Análises de eliminação (deleção) de sequências de promotores, *DNA footprinting* e mutações sítio-específicas permitiram a identificação de centenas de *cis*-elementos e a caracterização funcional dos mesmos (Matsushita *et al.*, 2009). Alguns *cis*-elementos já foram identificados e associados com a expressão tecido-específica e em resposta a estresses bióticos e abióticos, bem como a sinais hormonais e a diversos outros estímulos. Embora a maioria esteja relacionada a um aumento da atividade transcricional (regulação positiva), alguns levam à repressão da transcrição (regulação negativa), atuando como silenciadores (Singh, 1998).

O tamanho de uma região promotora pode variar muito, e seus limites a montante e a jusante não são fáceis de determinar. No entanto, estima-se que as regiões promotoras variem de 1 a 4 kbp (Rombauts *et al.*, 2003; Shahmuradov *et al.*, 2005). A arquitetura de sítios de ligação a TFs demonstra que os *cis*-elementos podem estar localizados em uma região próxima ao sítio de início de transcrição de um gene, ou então dispersos em vários grupos distintos, com uma distância física dos elementos variando de algumas centenas de pb a até mais que 100 kbp (Wray *et al.*, 2003). Em soja existem evidências de que os motivos específicos de um promotor estão contidos em 2 kbp (Strömvik *et al.*, 1999). Surpreendentemente, há relatos de sequências muito mais curtas como, por exemplo, uma região de 190 pb que é suficiente para determinar a expressão semente-específica (Lindstrom *et al.*, 1990).

Os promotores afetam a expressão gênica tanto quantitativa como qualitativamente, dependendo da combinação de *cis*-elementos nele presentes. Segundo Singh e colaboradores (1998), o padrão de expressão é, em grande parte, resultado da combinação de fatores *trans*-atuantes (TFs) interagindo com *cis*-elementos de um promotor. A caracterização de promotores órgão/tecido-específicos representa, portanto, um tema relevante de pesquisa visando disponibilizar novas ferramentas para a manipulação gênica.

Segundo Venter (2007), um dos maiores desafios da engenharia genética é a concepção de cassetes gênicos para a transformação genética que permitam o

controle preciso da atividade dos transgenes. Por cassetes gênicos entende-se a combinação de sequências gênicas promotoras, codificadoras e terminadoras, isto é, de genes “artificiais” completos. Os promotores mais comumente utilizados nos experimentos de transformação genética de plantas são protegidos por propriedade intelectual, o que restringe seu uso no desenvolvimento de eventos para a liberação comercial. A identificação de novos promotores, ainda não protegidos, ou o aperfeiçoamento de promotores já conhecidos e que tenham mais alta eficiência na regulação da expressão gênica poderá facilitar a obtenção de novos eventos transgênicos em plantas e outros organismos. Estes novos promotores permitiriam uma maior racionalização da expressão gênica conforme a função e a utilidade das proteínas recombinantes de interesse e, também, diminuiria a dependência dos grupos de pesquisa em relação às sequências promotoras de uso restrito a determinados grupos de pesquisa e empresas.

## **1.2 Promotores constitutivos, induzíveis e tecido-específicos**

A escolha das sequências promotoras para a modulação da expressão de genes em plantas é um fator essencial na determinação da especificidade de tecido, da regulação temporal e do nível de acúmulo de proteínas recombinantes em uma planta (Maizel & Weigel, 2004). Na maioria das plantas transgênicas disponíveis atualmente no mercado, o transgene é expresso sob a regulação de promotores fortes que induzem uma expressão constitutiva, isto é, a todas as partes do vegetal e ao longo de todas as etapas do desenvolvimento, o que causa gastos energéticos desnecessários, dificulta a recuperação (regeneração) de maior número de indivíduos transgênicos e aumenta as exigências com relação às comprovações de biossegurança.

O promotor constitutivo mais utilizado em biotecnologia vegetal é o regulador da transcrição do RNA 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV, do inglês, *Cauliflower Mosaic Virus*) ou CaMV 35S, altamente ativo nas células da maioria das plantas testadas (Odell *et al.*, 1985). Nos últimos anos, o uso do promotor CaMV 35S tem sido bastante discutido (Ho *et al.*, 1999). Embora sem

fundamentação científica, existe uma forte resistência popular ao uso de promotores ou outras sequências gênicas de origem viral para a produção de alimentos transgênicos. Este fato também reforça a iniciativa de se realizar a prospecção de novos promotores de origem não viral.

Exemplos de promotores constitutivos de origem vegetal estão disponíveis. Um promotor vegetal constitutivo comumente utilizado é o do gene da ubiquitina (*ubi*) de milho e *Arabidopsis* (Cornejo *et al.*, 1993). Estudos mostraram que este promotor é capaz de conferir expressão mais alta do gene-repórter *gusA*, codificador da  $\beta$ -glicuronidase de *Escherichia coli*, em plantas de milho e arroz quando comparado a outros promotores constitutivos (Cornejo *et al.*, 1993, Xu *et al.*, 2002). O promotor do gene *MtHP* de *Medicago trunculata*, codificador de uma proteína da família PR-10, é capaz de conferir expressão constitutiva em níveis comparáveis ao CaMV 35S em *M. trunculata* e *Trifolium repens* (Xiao *et al.*, 2005).

Chiera e colaboradores (2007) apresentaram o promotor derivado do gene da poliubiquitina de soja (*Gmubi*) como capaz de promover a expressão constitutiva de genes em níveis até cinco vezes mais altos do que o tradicional promotor CaMV 35S. O promotor GmHSP90L, de um gene de proteína de choque térmico (do inglês, *Heat Shock Protein*), é quatro vezes mais potente que o promotor CaMV 35S. Ambos promotores, altamente ativos, foram testados em experimentos de expressão transiente em cotilédones de soja. Posteriormente, o mesmo grupo mostrou que o promotor *Gmubi* é capaz de promover a expressão do gene repórter *gfp*, codificador da proteína de fluorescência verde (do inglês, *green fluorescent protein*) originalmente de *Aequorea victoria*, com a mesma intensidade em experimentos com transformação estável em plantas de soja (Hernandez-Garcia *et al.*, 2009). O potente promotor *Gmubi* é uma promissora alternativa ao promotor viral CaMV 35S para a transformação de soja.

No entanto, em alguns casos, altos níveis de expressão de uma proteína recombinante podem ser prejudiciais à planta, devido à natureza tóxica das mesmas. Em algumas situações, não existe a necessidade da proteína

recombinante estar presente em alguns tecidos ou em alguma etapa do desenvolvimento da planta. Portanto, seria recomendável a regulação do transgene por promotores tecido-específicos ou induzíveis por sinais bióticos ou abióticos, permitindo maior racionalização da produção de proteínas recombinantes (Strömvik *et al.*, 1999; Preiszner *et al.*, 2001; Qinggele *et al.*, 2007).

Promotores induzíveis, que ativam ou desativam a expressão gênica em plantas, têm muitas aplicações na produção de proteínas recombinantes (Tang & Newton, 2004). Por exemplo, promotores induzíveis podem permitir a expressão de genes na presença ou na ausência de fatores como estímulos físicos e químicos, ferimentos ou invasão por patógenos e, de preferência, não permitir a expressão em etapas que podem interferir no crescimento, na regeneração ou na reprodução da planta transgênica (Boetti *et al.*, 1999).

O promotor do gene da enzima álcool desidrogenase (*Adh2*) de soja é um exemplo de promotor induzível, sendo capaz de promover a expressão de genes repórter em raízes de soja submetidas à anóxia (Preiszner *et al.*, 2001). O sistema de transformação mediado por *A. rhizogenes* foi utilizado neste trabalho. O promotor *Adh2* é útil para experimentos onde a expressão induzida dos transgenes é necessária para melhorar a tolerância da planta ao estresse de inundação ou em situações de hipóxia.

Promotores tecido-específicos têm o potencial de direcionar a expressão gênica apenas a algumas partes da planta como, por exemplo, folhas, raízes, sementes, etc., onde o acúmulo de proteínas recombinantes seja necessário (Ma *et al.*, 2003). Subramanian e colaboradores (2004) isolaram os promotores de duas isoflavona sintases (*IFS1* e *IFS2*) de soja, que respondem ao ataque de patógenos e são também expressas em resposta à interação com bactérias fixadoras de nitrogênio. O promotor de *IFS1* fusionado ao gene *gusA* apresentou um padrão de expressão interessante, com atividade de GUS detectada apenas nas cascas das sementes, em embriões e raízes, sendo promissor para a transformação visando resistência a fungos. O promotor do gene *Msg* da soja,

codificador de uma proteína relacionada com o acúmulo de lipídeos em sementes de soja, é altamente expresso em legumes, e é outro exemplo de promotor tecido-específico. A expressão transiente observada nas vagens de soja e não detectada nas folhas é consistente com o resultado obtido em *Northern blots* realizados para a caracterização deste gene (Strömvik *et al.*, 1999). Cho e colaboradores (1995) observaram que o promotor do gene da lectina de soja tem um padrão de expressão embrião-específico, sendo útil para modificar, por exemplo, a quantidade de proteínas nas sementes.

### 1.3 Promotores raiz-específicos

Em biotecnologia vegetal, os promotores específicos de raiz descritos foram utilizados para conferir resistência a diferentes patógenos e para aumentar a tolerância das plantas a condições ambientais estressantes como déficit hídrico, excesso de sais e metais pesados (Barone *et al.*, 2008, Huang *et al.*, 2006, Kobayashi *et al.*, 2007). Visando aumentar a resistência a *Orobanche spp.*, uma planta parasita às culturas de tomateiros e outros vegetais, o promotor específico de raiz *tob*, derivado do gene codificador de uma proteína intrínseca de membrana de tabaco (Yamamoto *et al.*, 1990), foi usado para direcionar a expressão do gene codificador da sarcotoxina IA da mosca *Sarcophaga peregrina* (Radi *et al.*, 2006). Os resultados deste estudo indicaram que a proteína recombinante sarcotoxina IA especificamente produzida em raízes de tomateiros transgênicos foi tóxica apenas às plantas parasitas, e sem efeitos tóxicos aos tomateiros.

Outra aplicação útil para os promotores raiz-específicos é a de melhorar a produtividade das plantas, expressando genes que aumentem a capacidade de utilizar de forma mais eficaz os nutrientes do solo. O promotor do gene raiz-específico *ro1D*, codificador de proteínas responsáveis pelo desenvolvimento de raízes adventícias e derivado de *Agrobacterium rhizogenes*, foi usado para expressar o gene da glutamina sintetase citosólica de soja (GS15) em plantas de ervilha, aumentando a capacidade de absorção do nitrogênio pelas raízes (Fei *et*

*al.*, 2006). Além disto, os promotores raiz-específicos Pht1 (gene codificador de uma proteína responsável pelo transporte de fosfato de *Arabidopsis thaliana*) e MtPT1 (gene codificador de uma proteína responsável pela captação de fosfato de *Medicago truncatula*) foram utilizados para expressar fitases em raízes de *Arabidopsis thaliana*, aumentando a absorção de fosfato (Mudge *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2005).

A contaminação do solo por metais pesados é um problema ambiental global que tem atraído a atenção dos pesquisadores durante a última década (Che *et al.*, 2006). Altos níveis destes metais, como o níquel e cobre, são prejudiciais para o crescimento e o desenvolvimento das plantas e, para tal, a busca por culturas transgênicas que possam superar estes efeitos tóxicos têm sido constantes. Plantas transgênicas de canola expressando o gene codificador da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, controlado pelo promotor raiz-específico *roD*, demonstraram uma maior tolerância ao excesso de níquel, quando comparadas a plantas não transformadas (Stearns *et al.*, 2005).

Em solos ácidos, o alumínio torna-se solúvel e, em níveis elevados, pode ser tóxico às plantas, sendo um dos fatores mais limitantes da produtividade de culturas em todo o mundo (De la Fuente *et al.*, 1997). Recentemente, plantas transgênicas de alfafa capazes de expressar o gene codificador da enzima citrato sintase sob o controle do promotor raiz-específico TobRB7 de tabaco foram significativamente mais tolerantes aos altos níveis de alumínio do que plantas não transgênicas. TobRB7 é a sequência promotora de um gene potencialmente codificador de aquaporinas (Barone *et al.*, 2008).

Alguns outros exemplos de promotores que conferem expressão raiz-específica são PR10 de *Pinus monticola*, derivado do gene codificador de uma proteína relacionada com ataque de patógenos (PR-10) (Liu & Ekramoddoullah, 2003), o promotor IDS2 de cevada, derivado do gene codificador de uma proteína induzida na deficiência de ferro (Kobayashi *et al.*, 2003), o promotor MsPRP2 de alfafa, derivado do gene codificador da proteína rica em prolina 2 de *Medicago sativa* (Winicov *et al.*, 2004) e os promotores Pyk10 e NIP2 de *Arabidopsis*

*thaliana*, respectivamente derivados dos genes codificadores das proteínas mirosinase e aquaporina (Nitz *et al.*, 2001; Mizutani *et al.*, 2006, respectivamente).

As sequências *cis*-atuantes que conferem expressão raiz-específica foram caracterizadas em um número limitado de promotores. Análises de deleção realizadas no promotor raiz-específico *pyk10* (promotor do gene da enzima mirosinase de *Arabidopsis thaliana*), por exemplo, permitiu identificar duas regiões, contendo os elementos ACGT-, CANNTG- e GATA, capazes de conferir a expressão raiz-específica de genes repórter em plantas transgênicas (Nitz *et al.*, 2001). Estudos semelhantes revelaram que uma região de 305 pb localizada no promotor *IDS3*, derivado do gene codificador de uma enzima envolvida na captação de ferro de cevada, e de 218 pb do promotor do gene codificador da glicosiltransferase de *A. thaliana*, contêm todos os motivos necessários para conferir a expressão raiz-específica do gene repórter *gusA* em *A. thaliana* (Kobayashi *et al.*, 2003; Vijaybhaskar *et al.*, 2008). Além destes trabalhos, *cis*-elementos conferindo expressão raiz-específica em deficiência de ferro foram identificados no promotor do gene codificador de uma enzima expressa na deficiência de ferro (*IDS2*) de cevada (Kobayashi *et al.*, 2003). O promotor de *HAHB4* de girassol, derivado do gene codificador do fator de transcrição induzido por estresses abióticos, apresenta alguns *cis*-elementos relacionados com a expressão em raízes, incluindo dois elementos de resposta ao ácido abscísico, dois elementos raiz-específicos e um elemento do tipo *W-box* (Manavella *et al.*, 2008).

Existem promotores com padrões de expressão raiz-específicos bem caracterizados em soja, porém patenteados, o que impede o livre acesso para uso em estudos e produção de novas linhagens transgênicas. São exemplos o promotor do gene da expansina de soja com padrão de expressão raiz-específico (código no USPTO – *United States Patent and Trademark Office* - US 20050246795) e o promotor de um gene de soja, com expressão raiz-específica e induzida pela infecção por nematóides (US 20070192897). Em soja, até o momento, não existe um promotor nativo, disponível, que direcione a expressão de forma totalmente raiz-específica.



#### 1.4 Expressão gênica em vegetais homólogos e heterólogos

De acordo com Potenza e colaboradores (2004), a complexidade da regulação gênica em nível da transcrição é dependente de pelo menos dois fatores distintos. O primeiro envolve o tipo, o número, a posição e a combinação de *cis*-elementos presentes em torno da sequência de codificação de um determinado gene. O segundo é a ativação destes *cis*-elementos, que é dependente da presença ou da ausência de suas proteínas ligantes, isto é, dos TFs.

Em trabalho publicado por Hernandez-Garcia e colaboradores (2009), os autores ressaltam a importância em se utilizar o que denominam “promotores nativos” ou endógenos, ou seja, oriundos da planta que se deseja transformar. Os autores salientam também que, apesar de promotores heterólogos serem frequentemente utilizados para a expressão de transgenes, alguns fatores que regulam a atividade destes promotores podem não estar presentes no vegetal heterólogo e prejudicar a interpretação dos dados de expressão gênica obtidos. Um exemplo disto é o trabalho com plantas transgênicas de arroz contendo o transgene *gfp* regulado pelos promotores de genes codificadores das proteínas hordeína de cevada e da gluteína do trigo, conhecidos por induzir expressão semente-específica nestes vegetais (Furtado *et al.*, 2008). Embora contenham os motivos necessários para direcionar a expressão de forma semente-específica, os promotores específicos de semente de cevada e trigo não são espacialmente regulados em arroz da mesma maneira como eles estão em suas espécies nativas, apresentando expressão em outros tecidos como raízes e estames. Vaughan e colaboradores (2006), trabalhando com o promotor do gene *FaRB7* de morango, derivado do gene codificador de uma proteína intrínseca de tonoplasto, relatam que a expressão do gene repórter controlada por esse promotor foi muito próxima a um padrão raiz-específico em vegetal homólogo, enquanto que no vegetal heterólogo utilizado (no caso o tabaco), o padrão foi praticamente o mesmo de um promotor constitutivo.

## **2 Objetivos**

---

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo principal que norteou o desenvolvimento do presente trabalho é disponibilizar sequências promotoras nativas (isto é, da própria soja), capazes de direcionar a expressão gênica para raízes, com possível aplicação em estratégias de engenharia genética para o melhoramento genético da soja.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Identificar, em publicações e bancos de dados de sequências de DNA de soja, promotores potencialmente raiz-específicos.
- Isolar e caracterizar as sequências de DNA com potencial atividade promotora.
- Validar os promotores quanto à capacidade de direcionar a expressão gênica por ensaios de expressão estável em tabaco (vegetal heterólogo) e em raízes de soja (vegetal homólogo).

### 3 Materiais e Métodos

---

#### 3.1 Busca por sequências gênicas com expressão raiz-específica

Na Tabela 1 estão apresentados alguns dos genes de soja descritos na literatura como detentores de padrões de expressão raiz-específicos. Utilizando-se as sequências nucleotídicas destes genes como iscas, o genoma da soja, disponível no banco de dados Phytozome (<http://www.phytozome.net/soybean>), foi perscrutado pelas sequências gênicas com o emprego da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para a obtenção das sequências promotoras.

**Tabela 1** – Genes de soja descritos junto à literatura científica como possuidores de expressão raiz-específica, selecionados como iscas para a obtenção das sequências promotoras. Os códigos de acesso junto ao GenBank, Phytozome e referências bibliográficas estão apresentados.

Gene <sup>1</sup>	Código de acesso GenBank	Código de acesso Phytozome	Descrição <sup>2</sup>	Referência
<b>GmAQP</b>	AI440686.1	Glyma12g29510.1	Aquaporina - MIPC	Maguire <i>et al.</i> , 2002
<b>GmAS2</b>	AI441137.1	Glyma02g39320.1	Asparagina sintase II	Maguire <i>et al.</i> , 2002
<b>GmEXT</b>	AF520576.1	Glyma17g14850.1	Extensina - Inibidor de proteases	*
<b>GmRB7</b>	AI440702.1	Glyma11g03690.1	Semelhante a RB7 18C de tabaco	*

<sup>1</sup> Nome proposto para facilitar a descrição ao longo do trabalho

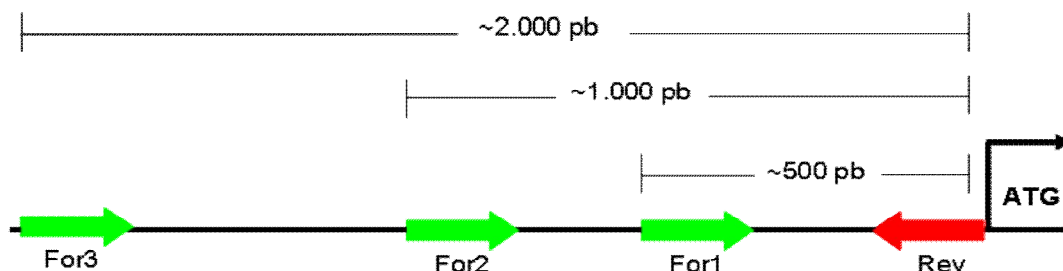
<sup>2</sup> Descrição prevista, obtida através da ferramenta BLAST

\* Dados não publicados, disponíveis apenas no GenBank

### 3.2 Isolamento e caracterização *in silico* de sequências promotoras

A extração de DNA genômico de soja, cultivar IAS-5, foi realizada utilizando-se o método CTAB descrito por Doyle & Doyle (1987), com algumas modificações descritas por Homrich e colaboradores (2008). Os promotores foram amplificados por meio da reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR).

Para cada promotor candidato foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para amplificar segmentos de aproximadamente 500 pb, 1.000 pb e 2.000 pb a montante do sítio de início da tradução (Figura 1).



**Figura 1** – Esquema da localização dos *primers* projetados para o isolamento das regiões promotoras.

Para a projeção dos *primers*, as sequências gênicas resultantes das buscas por BLASTn junto ao banco de dados Phytozome e as ferramentas de projeção de *primers* disponibilizadas à página da empresa *Integrated DNA Technologies* (<http://www.idtdna.com/scitools/scitools.aspx>) na internet foram utilizados. Na Tabela 2 estão apresentados os *primers* utilizados para a amplificação dos promotores via PCR.

**Tabela 2** – Lista e sequências dos *primers* construídos para o isolamento das regiões promotoras de genes de soja via PCR.

<b>Gene</b>	<b>Primers</b>	<b>Sequências (5'-3')</b>
<b>GmAQP</b>	AQPRev1	TATTAGAAAATTCTAGCTGATTCCG
	AQPFor1	CGGGTAATAATTGTTGGTTAG
	AQPFor2	CCCAAATCCGTGGAG
	AQPFor3	GTTGGATTATCAAAGCAGATG
<b>GmAS2</b>	AS2Rev1	TGTGATAATATATGTTAATGGAATC
	AS2For1	GGAGACGAAGCAAGTTC
	AS2For2	CATCATGCTTGAACCTGAGA
	AS2For3	ACCTAGTTCATTGGGTCTA
<b>GmEXT</b>	EXTRRev1	CTTAAACTTTTTAGGGTTTTTGT
	EXTFor1	TTAGAGAGGTTAAGGCTATG
	EXTFor2	AAATCAGTACATTGAACCGT
	EXTFor3	TACTAGAAGACTTCCATGTG
<b>GmRB7</b>	RB7Rev1	TTTGGCACCTCACCT
	RB7For1	CTCTCTGTCGGCTGT
	RB7For2	TTGTTGATCCCATCTCG
	RB7For3	TCTCAGGTCCGACAAG

Os componentes básicos utilizados nas reações de amplificação das sequências promotoras foram: 200 µM de solução de desoxirribonucleotídeos (dNTPs), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, 5 U/µl), tampão de reação a uma concentração final de 1X com 15 µM de cloreto de magnésio, 100 nM de cada *primer* e cerca de 100 ng de DNA de soja. Todas as reações foram realizadas em volumes finais de 25 µL. As condições para a amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, e extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Os fragmentos amplificados foram purificados dos géis de agarose com o emprego do *kit* GFX (GE Healthcare) e ligados ao vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega) conforme instruções do fabricante. O vetor foi utilizado para transformação, por choque térmico, de *E. coli* JM109 termocompetentes (Sambrook & Russel, 2001). Os plasmídeos foram extraídos de acordo com Sambrook & Russel (2001) e digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* (Fermentas), seguindo as instruções do fabricante, para confirmar a ligação do produto da PCR.

Os plasmídeos positivos foram submetidos ao sequenciamento, realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol dos primers utilizados na amplificação dos mesmos por PCR, individualmente, e 2 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida, desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set “Z”; Mobility File “DT3100POP6{BDv3}v1.mob”; BioLIMS Project “3100\_Project1”; Run Module 1 “StdSeq50\_POP6\_50cm\_cfv\_100”; e Analysis Module 1 “BC-3100SR\_Seq\_FASTA.saz”. As sequências resultantes foram analisadas pelo alinhamento às sequências gênicas de soja disponíveis no Phytozome e pela busca e caracterização de cis-elementos junto aos bancos de dados PLACE (Higo *et al.*, 1999), PlantCARE (Lescot *et al.*, 2002) e PlantPAN (Chang *et al.*, 2008).

### **3.3 Clonagem dos promotores em vetor de expressão contendo o gene-repórter *gusA***

Após a confirmação da identidade dos promotores, os mesmos foram adaptados a montante do gene repórter *gusA*, codificador da  $\beta$ -glicuronidase de *E. coli*, e ao terminador do gene codificador da pequena subunidade 3C da ribulose bifosfato carboxilase ( $T_{rbcS-3C}$ ) de ervilhas, disponíveis no vetor de expressão pGusXX, descrito por Pasquali e colaboradores (1994). Os fragmentos dos promotores foram removidos do vetor pGEM-T Easy pela digestão com a enzima *EcoRI* e ligados ao vetor pGusXX, digerido com a mesma enzima e, logo após, defosforilado com fosfatase alcalina (Invitrogen). A reação de ligação, utilizando-se a enzima T4 DNA Ligase (Fermentas), foi realizada com 3:1 de excesso molar de fragmento:vetor, seguindo as recomendações do fabricante. Devido à natureza deste tipo de ligação, foram obtidos vetores com as sequências promotoras tanto na orientação direta quanto reversa. Os produtos das reações de ligação foram transformados, por choque térmico, em *E. coli* JM109 termocompetentes. A confirmação do sucesso da clonagem foi feita pela digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. As amostras foram novamente sequenciadas para confirmar a orientação dos promotores em relação ao gene repórter *gusA*. Na Tabela 3 está apresentada a lista das construções obtidas nesta etapa do trabalho. Os vetores foram utilizados para os ensaios de expressão transiente e construção dos vetores de transformação de plantas.

**Tabela 3** – Relação de construções gênicas contendo potenciais promotores raiz-específicos de soja fusionados a *gusA* no vetor de expressão pGusXX.

Gene	Versão de pGusXX	Tamanho do promotor (pb)	Orientação
<b><i>GmAQP</i></b>	Q1d-6	425	direta
	Q1d-7	425	reversa
	Q2-22 topo	857	direta
	Q2-22	857	reversa
<b><i>GmAS2</i></b>	A1A-15	503	direta
	A16	503	reversa
	A28	1.228	direta
	A2B6	1.228	reversa
<b><i>GmEXT</i></b>	E1A-5	490	direta
	E1A-4	490	reversa
	E21	1.241	direta
	E22	1.241	reversa
<b><i>GmRB7</i></b>	R19	589	direta
	R1A-34	589	reversa
	R2E	1.035	direta
	R23	1.035	reversa

### 3.4 Ensaios de expressão transiente em folhas e raízes de soja

Para obtenção dos diferentes órgãos utilizados nos ensaios de expressão transiente, sementes da cultivar de soja IAS-5 foram germinadas em vermiculita em casa de vegetação até o estágio V2, caracterizado pela presença da primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida (Fehr e Caviness, 1977). Os fragmentos de folhas e raízes foram submetidos à assepsia superficial pela lavagem com água e detergente, rápida imersão em álcool a 70%, imersão durante 15 min em hipoclorito de sódio a 4% com Tween-80 (uma gota para cada



100 mL da solução) e três lavagens com água destilada e autoclavada. Os órgãos foram colocados em meio de cultura contendo sais do meio básico de Murashige & Skoog (MS; 1962), vitaminas do meio B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 0,3% de Phytigel e pH 5,8. O material vegetal foi colocado de forma a cobrir o centro de placas de Petri correspondendo à área de um círculo de aproximadamente 2 cm.

A transformação transiente foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Droste e colaboradores (2002), utilizando-se um aparelho de biobalística de baixa pressão de gás hélio, denominado *Particle Inflow Gun* (PIG; Finer *et al.*, 1991). Os órgãos foram bombardeados com os plasmídeos descritos no item 3.3.

Dois dias após os bombardeamento, foi realizada a contagem de pontos azuis resultantes de ensaios histoquímicos de GUS (item 3.9, adiante). Foi realizada comparação das médias obtidas entre diferentes promotores com um controle positivo, representado pelo plasmídeo pGusSH-35S, contendo o promotor CaMV 35S a montante do gene *gusA*. O controle negativo, caracterizado pelo vetor pGusXX inalterado, sem promotor para o gene repórter, foi utilizado para comprovar que os pontos azuis observados foram resultantes da atividade dos promotores.

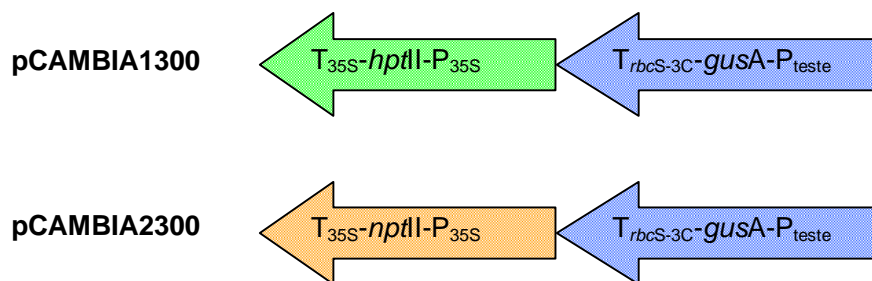
### **3.5 Adaptação dos cassetes de expressão promotor::*gusA* a vetores plasmidiais binários**

Para ensaios de expressão estável, em vegetal homólogo (raízes de soja) e heterólogo (tabaco), foram utilizados apenas os cassetes de expressão contendo as sequências promotores fusionadas a *gusA* e a  $T_{rbcS-3C}$  com região promotoras de aproximadamente 1.000 pb e na orientação direta, provenientes das clonagens descritas no item 3.3. Estas foram transferidas para os vetores pCAMBIA1300 (*Centre for the Application of Molecular Biology to International Agriculture*, CAMBIA), para a transformação de soja, e pCAMBIA2300, para a transformação de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1). Os cassetes de expressão foram removidos com as enzimas de restrição *Pst*I e *Xho*I (Fermentas),

purificados de géis de agarose após eletroforese e ligados aos vetores binários previamente digeridos com as enzimas de restrição *Pst*I e *Sal*I (Promega). Todas as digestões de plasmídeos foram realizadas de acordo com as instruções dos fabricantes. A reação de ligação foi idêntica à descrita no item anterior. Os vetores binários sem a presença do promotor sob teste (“sem promotor” ou “*promoterless*”) foram construídos com a mesma estratégia a partir do plasmídeo pGusXX diretamente, de forma a permitir a geração de plantas transgênicas que sirvam de controles negativos à expressão de *gusA*. Os vetores pCAMBIA2301 e pCAMBIA1301, contendo o gene *gusA* sob controle do promotor CaMV 35S foram utilizados como controles positivos nos experimentos de transformação. A orientação dos cassetes de expressão foi determinada pelo padrão de bandas dos plasmídeos digeridos com a enzima de restrição *Eco*RI após eletroforese. Na Tabela 4 estão apresentadas as versões finais dos vetores construídos e utilizados nos experimentos de transformação estável em vegetal homólogo e heterólogo, e na Figura 2 está representado o esquema de orientação dos cassetes de expressão nos vetores binários.

**Tabela 4** – Versões finais dos vetores binários construídos para a etapa de transformação genética de vegetais homólogos e heterólogos.

<b>Versão do Promotor</b>	<b>Origem do cassete de expressão</b>	<b>Fragmento do promotor (pb)</b>	<b>Versão de pCAMBIA1300</b>	<b>Versão de pCAMBIA2300</b>
<b><i>GmAQP</i></b>	Q2-22 topo	857	p1300-Q2T	p2300-Q2T
<b><i>GmAS2</i></b>	A28	1228	p1300-A28	p2300-A28
<b><i>GmEXT</i></b>	E21	1241	p1300-E21	p2300-E21
<b><i>GmRB7</i></b>	R2E	1035	p1300-R2E	p2300-R2E
<b><i>sem promotor</i></b>	pGusXX	-	p1300-XX	p2300-XX



**Figura 2** – Esquema simplificado da orientação dos cassetes de expressão inseridos nos vetores de transformação binários pCAMBIA1300 e pCAMBIA2300, em relação ao cassete de expressão dos genes de seleção *hpt* e *nptII*, respectivamente codificadores das enzimas higromicina e neomicina fosfotransferases.

### 3.6 Transformação genética de soja por *Agrobacterium rhizogenes*

Os protocolos seguidos para obtenção de raízes transformadas de soja pela infecção com *A. rhizogenes*, confirmação da integração dos transgenes e análise histoquímica estão descritos no Capítulo 2 desta Tese. Foram transformadas raízes de soja com as construções provenientes da clonagem dos cassetes de expressão em pCAMBIA1300, utilizando-se como controle positivo o plasmídeo pCAMBIA1301, que apresenta o gene *gusA* ao controle do promotor CaMV 35S.

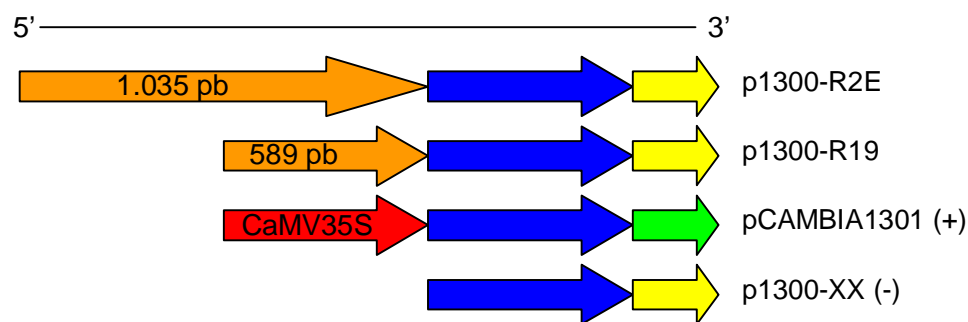
### 3.7 Transformação genética de tabaco como modelo de vegetal heterólogo

Os cassetes de expressão descritos no item 3.5 acima foram introduzidos em tabaco (*Nicotiana tabacum*), genótipo SR1, pela metodologia de Horsch e

colaboradores (1985) utilizando-se a linhagem *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. As plantas transformadas resultantes foram analisadas quanto à expressão do gene repórter *gusA*, segundo metodologia descrita no item 3.9. A extração do DNA genômico de tabaco foi realizada utilizando-se o método CTAB descrito por Doyle & Doyle (1987). A confirmação da integração dos cassetes de expressão nas plantas foi realizada por PCR, utilizando-se *primers* específicos para o gene de resistência à canamicina codificador da neomicina fosfotransferase (*nptII*) (5'-TGAATGAACTGCAGGACGAG-3' e 5'-AGCCAACGTATGTCCTGAT-3'). O produto da amplificação com estes *primers* tem um tamanho esperado de 503 pb. As PCRs e análises dos amplicons foram conduzidas essencialmente como descrito no item 3.2 acima.

### **3.8 Análise de um fragmento menor do promotor de *GmRB7* em sistema de transformação por *A. rhizogenes***

Uma região de 589 pb do promotor RB7 foi utilizada para avaliar o efeito na expressão do gene *gusA* sob controle de um fragmento menor do promotor. O vetor utilizado neste experimento foi feito conforme descrito no item 3.4, a partir do vetor pGuXX R19 obtido na metodologia descrita no item 3.3, gerando o vetor chamado p1300-R19. Os cassetes de expressão dos vetores utilizados neste experimento estão ilustrados na Figura 3. O protocolo seguido para obtenção de raízes de soja transformadas, confirmação da integração dos transgenes e análise histoquímica está descrito no Capítulo 2 desta Tese.



**Figura 3** – Esquema dos cassetes de expressão dos vetores utilizados no experimento de avaliação da expressão do gene repóster de um fragmento do promotor do gene *GmRB7* em raízes de soja transformadas por *A. rhizogenes*. Setas em cor laranja, fragmentos promotores de *GmRB7*; seta em vermelho, CaMV 35S; setas em azul, gene *gusA*; setas em amarelo, terminador  $T_{rbcS-3C}$ ; seta em verde, terminador do gene codificador da nopalina sintase ( $T_{nos}$ ) de *A. tumefaciens*; (+), controle positivo; (-), controle negativo.

### 3.9 Ensaio histoquímico de GUS

As análises de expressão do gene *gusA* foram realizadas por meio da avaliação histoquímica da atividade da proteína recombinante GUS codificada, em ensaios de expressão transiente e nas plantas transformadas (tabaco e soja). A metodologia empregada foi adaptada de Jefferson e colaboradores (1987). Após o ensaio histoquímico, os órgãos foram lavados com etanol 70% para remoção de clorofila e observados em estereomicroscópio binocular. As raízes foram observadas diretamente após o ensaio histoquímico.

## 4 Resultados e Discussão

---

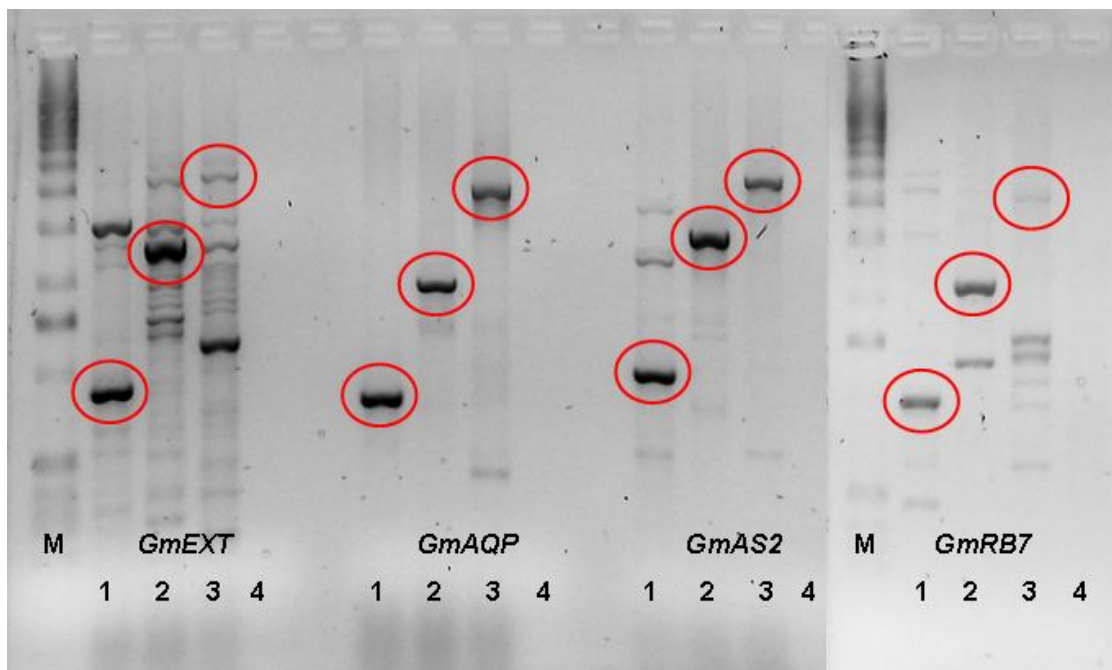
### 4.1 Isolamento e caracterização *in silico* de potenciais promotores gênicos raiz-específicos de soja

Para a prospecção de promotores gênicos de soja capazes de direcionar a expressão de genes às raízes, uma revisão da bibliografia científica existente foi realizada, e as sequências de alguns dos genes identificados com expressão mais específica às raízes em soja foram utilizadas como iscas para a busca das sequências promotoras junto ao genoma da soja, disponível no Phytozome.

Conforme apresentados na Tabela 1, os seguintes genes foram selecionados como iscas para as buscas. Primeiramente, a sequência promotora derivada do gene predito como raiz-específico que codifica uma extensina de soja (código de acesso do GenBank AF520576) foi uma das escolhidas para o presente estudo (*GmEXT*). A segunda sequência candidata (derivada do EST - do inglês, *Expressed Sequence Tags* - depositado no GenBank com o código de acesso AI440702) deriva do gene *GmRB7*, assim chamado por apresentar similaridade com a proteína RB7-18C de tabaco, cujo promotor foi já caracterizado como apresentando expressão raiz-específica em tabaco (Yamamoto *et al.*, 1990). Outras duas sequências, *GmAQP* e *GmAS2*, descritas por apresentarem expressão exclusiva em raízes, foram escolhidas com base em artigo publicado por Maguire e colaboradores (2002), no qual estão descritas marcas de sequências expressas em soja (ESTs), em diferentes tecidos. O gene *GmEXT* foi o único candidato cuja sequência promotora estava disponível no GenBank. Cabe ressaltar que nenhum dos candidatos escolhidos para o estudo teve seu gene ou promotor previamente caracterizados.

A estratégia utilizada para o isolamento das sequências dos promotores putativos raiz-específicos foi a amplificação direta das mesmas por meio de PCRs utilizando-se DNA genômico de soja (*Glycine max* L. Merrill), cultivar IAS-5, como molde. De posse destas sequências, o passo seguinte foi elaborar *primers* que

permitissem a amplificação dos promotores e posterior clonagem. A lista com os *primers* elaborados para esta etapa está disponível na Tabela 1. Conforme descrito na seção Materiais & Métodos, com vistas a garantir a especificidade das amplificações, três *primers* diretos (*forward*) e um *primer* reverso (*reverse*) foram concebidos (Figura 1). A visualização de bandas resultantes das três amplificações em um padrão escalonado confirmaria a especificidade dos produtos. Os resultados das amplificações dos fragmentos dos potenciais promotores podem ser vistos na Figura 4.



**Figura 4** - Imagem de gel de agarose a 1% submetido à eletroforese representando o resultado das amplificações dos fragmentos correspondentes aos promotores dos genes *GmEXT*, *GmAQP*, *GmAS2* e *GmRB7* de soja com diferentes combinações de *primers*. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA (1 kb DNA Ladder, Promega); 1, *Primers* Rev1 x For1; 2, *Primers* Rev1 x For2; 3, *Primers* Rev1 x For3; 4, controle negativo da PCR. Elipses vermelhas: fragmentos dos potenciais promotores seguindo o padrão escalonado esperado.

Após o conjunto de PCRs, produtos de amplificação dos promotores foram observados nos tamanhos esperados. Os amplicons foram purificados dos géis de agarose, clonados no vetor pGEM-T Easy (Invitrogen) e sequenciados para confirmação de suas identidades. Para comparações com as informações dos bancos de dados, utilizamos as sequências de aproximadamente 1.000 pb, completamente sequenciadas neste trabalho. As sequências resultantes apresentaram identidades superiores a 99%. No caso do promotor do gene *GmEXT*, a identidade encontrada foi de 100%. Isto demonstrou que as sequências obtidas estão extremamente bem conservadas em soja, mesmo em cultivares diferentes, como IAS-5 e Williams 82, utilizada para o sequenciamento do genoma da soja (Schmutz *et al.*, 2010). A estratégia adotada para a obtenção de promotores mostrou-se, portanto, perfeitamente eficaz para as sequências de soja.

As potenciais sequências promotoras foram analisadas quanto à presença de *cis*-elementos por meio de análises *in silico* utilizando-se de forma combinada os bancos de dados PLACE (Higo *et al.*, 1999), PlantCARE (Lescot *et al.*, 2002) e PlantPAN (Chang *et al.*, 2008). As análises revelaram a presença de grande número de motivos comumente encontrados em regiões promotoras de plantas, além dos bem conservados *TATA-box*, *CCAAT-box* e *GC-box* (Smale & Kadonga, 2003). Foram também encontrados diversos elementos presentes em regiões promotoras de genes induzidos por fatores bióticos e abióticos. Na potencial região promotora do gene *GmAQP* foram identificados 330 prováveis sítios de ligação de TFs. Os potenciais promotores dos genes *GmAS2* e *GmEXT* apresentam, cada, 421 sítios, e o promotor de *GmRB7*, 324 sítios.

O potencial promotor de *GmEXT* apresentou uma repetição em *tandem* do elemento AGGAACGTGAGGTGGGAAACGTACATGTATGGAAGGA. Estudos prévios mostraram que a presença de repetições em *tandem* nas regiões promotoras pode estar relacionada com aumento da expressão dos genes que as possuem (Tatematsu *et al.*, 2005; Espley *et al.*, 2009). Conforme os parâmetros que nortearam a nossa busca, espera-se que os promotores escolhidos para o estudo possuam *cis*-elementos capazes de direcionar a expressão de forma raiz-



específica. Quatro elementos, nominalmente OSE1 (ATCTTT), OSE2 (AAGAG), RAV1AAT (TGTTG) e SURE (NNGAGACNN) foram encontrados nas sequências obtidas, descritos como associados à expressão em raízes. OSE1 e OSE2 são elementos encontrados em genes ativadas em células infectadas de nódulos radiculares (Fehlberg *et al.*, 2005). O fator de transcrição RAV1 liga-se especificamente ao motivo RAV1AAT. Elevados níveis de expressão de RAV1 foram observados em raízes de *A. thaliana* (Kagaya *et al.*, 1999). A sequência GAGAC forma o núcleo do elemento responsivo ao enxofre (SURE), encontrado no promotor de um gene envolvido com o mecanismo de transporte de enxofre em raízes de *A. thaliana* (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2005).

Além dos quatro *cis*-elementos encontrados em todas as quatro potenciais sequências promotoras, outros elementos conhecidos por suas ligações à expressão em raízes foram identificados em alguns dos potenciais promotores. O promotor de *GmAQP* possui o motivo ARFAT (TGTCTC), encontrado em genes envolvidos na resposta primária à auxina em *A. thaliana* (Inukai *et al.*, 2005). O motivo TELO (AAACCCTAA), observado apenas no promotor de *GmEXT*, foi também encontrado em regiões promotoras de alguns genes que codificam componentes do aparato de tradução e que estão envolvidos na ativação da expressão gênica em meristemas radiculares (Tremousaygue *et al.*, 1999). Com exceção do promotor de *GmRB7*, todos apresentam a sequência CATATG, encontrada no promotor do gene *SAUR 15A* de soja, cuja expressão é regulada por auxina (Xu *et al.*, 1997). Como conclusão, o conjunto de sequências amplificadas a partir do genoma da soja, além da alta homologia esperada às sequências de origem, apresenta características típicas de promotores vegetais, com *cis*-elementos básicos e uma variedade de *cis*-elementos específicos, incluindo aqueles reconhecidos em promotores de genes raiz-específicos.

## 4.2 Avaliação da atividade promotora pela expressão transiente em folhas e raízes de soja

Os fragmentos de DNA amplificados e ligados a pGEM-T Easy foram transferidos para plasmídeos de expressão da série pGusXX (Pasquali *et al.*, 1994), em fusão com o gene repórter *gusA* e o terminador  $T_{rbcS-3C}$ . As versões dos plasmídeos pGusXX obtidos (Tabela 3) foram utilizadas para ensaios de expressão transiente pelo bombardeamento dos vetores em dois diferentes tipos de órgãos de soja – folhas e raízes jovens. O equipamento PIG (Finer *et al.*, 1991) e o protocolo baseado em biobalística de baixa pressão de gás hélio para soja foram utilizados (Droste *et al.*, 2002). Devido a dificuldades com o processo de clonagem em pGEM-T Easy, não obtivemos sucesso na ligação das maiores regiões promotoras (fragmentos com aproximadamente 2.000 pb), amplificadas pela combinação de *primers* Rev1 x For3, para nenhum dos promotores estudados. Ao todo, foram construídos 16 vetores de expressão, contendo diferentes fragmentos dos promotores, todos em orientação direta e reversa, além de versões controle sem promotor (*promoterless*) e com o promotor CaMV 35S (Tabela 3).

O bombardeamento dos órgãos vegetais com o plasmídeo pGusXX-*promoterless* não apresentou expressão transiente do gene *gusA*, resultado esperado para o vetor com ausência de promotor. O plasmídeo pGusSH-35S, utilizado como controle positivo, gerou pontos e setores azuis tanto em raízes quanto em folhas. Todos os cassetes de expressão com os promotores potenciais estudados foram capazes de gerar ao menos um ponto com expressão transiente, porém sem especificidade clara às raízes (dados não apresentados).

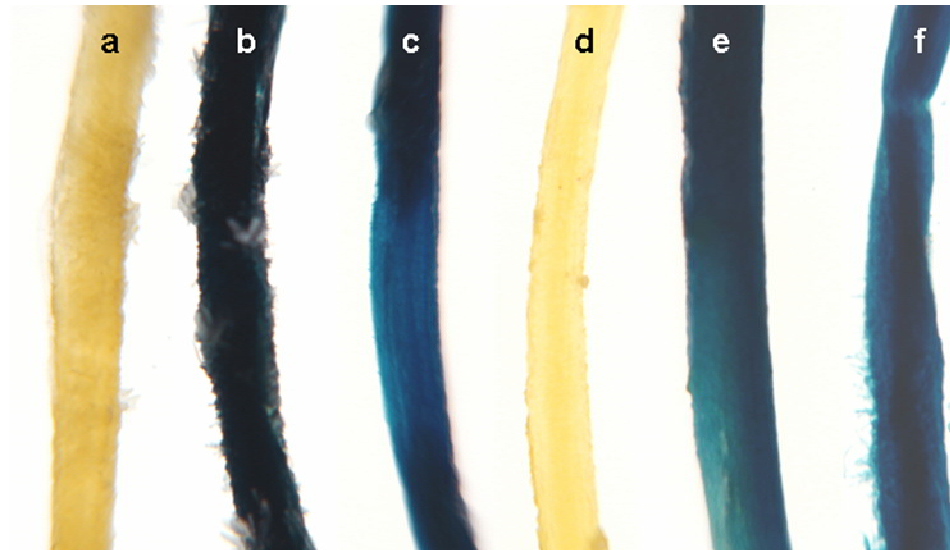
O ensaio de expressão transiente, embora utilizado com bastante sucesso na análise de promotores em soja (Chiera *et al.*, 2007; Hernandez-Garcia *et al.*, 2010), não correspondeu às expectativas. A baixa reprodutibilidade dos dados não permitiu uma avaliação eficaz da expressão transiente. A maior dificuldade encontrada foi com as raízes, onde o número de pontos azuis ficou muito abaixo do esperado, provavelmente devido à baixa pressão utilizada no

bombardeamento, não sendo capaz de permitir a entrada dos plasmídeos nas células da epiderme da raiz. Por esta razão, ensaios de transformação genética estável foram realizados tanto em soja como em um modelo vegetal heterólogo, o tabaco.

#### **4.3 Avaliação da atividade promotora em soja pela transformação genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes***

Para testar a capacidade dos promotores obtidos de regular a expressão do gene repórter *gusA* em raízes de soja de forma estável, foi empregado o método de transformação genética mediado por *A. rhizogenes* (descrito no Capítulo 2 desta Tese). Cotilédones de soja foram infectados com *A. rhizogenes* contendo os vetores com os cassetes de expressão dos promotores, inseridos no vetor binário pCAMBIA1300 (CAMBIA) conforme descrito no item 3.5. Para tanto, os cassetes de expressão presentes nas diferentes versões dos vetores pGusXX com promotores de tamanhos de ~1.000 pb em orientação direta foram transferidos para pCAMBIA1300. As versões resultantes obtidas estão relacionadas na Tabela 4.

Foram obtidas raízes transgênicas para todas as construções testadas: p1300-Q2T (*GmAQP*), p1300-A28 (*GmAS2*), p1300-EXT (*GmEXT*), p1300-R2E (*GmRB7*), p1300-XX e pCAMBIA1301 (Tabela 4). As raízes transgênicas de soja foram obtidas conforme protocolo *in vitro* descrito no Capítulo 2 desta Tese. Após aproximadamente 30 dias em cultura, DNA foi extraído das raízes de diferentes eventos de transformação para confirmação da integração do transgênico por PCR. Todas as raízes avaliadas confirmaram o estado transgênico pela amplificação positiva de um fragmento do gene *hpt* por PCR (dados não apresentados). Cinco raízes transformadas com cada uma das construções testadas foram submetidas ao ensaio histoquímico de GUS. Na Figura 5 estão apresentadas as raízes que melhor representaram o perfil de expressão observado para cada evento de transformação.



**Figura 5** – Análise histoquímica da atividade da enzima recombinante GUS em raízes de soja transformadas por *A. rhizogenes*. a, p1300-XX; b, pCAMBIA1301; c, p1300-A28 (*GmAS2*); d, p1300-Q2T (*GmAQP*); e, p1300-E21 (*GmEXT*); f, p1300-R2E (*GmRB7*). Escala: 10:1.

Os padrões de expressão esperados para o cassete de expressão sem promotor (p1300-XX, Figura 5, raiz a) e para o promotor CaMV 35S, presente no plasmídeo pCAMBIA1301 (Figura 5, raiz b) foram observados. Todos promotores isolados neste estudo, com exceção de *GmAQP*, foram capazes de promover a expressão do gene *gusA* em raízes transformadas de soja (Figura 5, raízes c, d, e e f).

Apesar de *GmAQP* ter sido descrito como altamente expresso em raízes (Maguire *et al.*, 2002), o fragmento de 857 pb de sua sequência a montante não foi capaz de modular a expressão do gene repórter *gusA* em raízes transformadas de soja. Promotores de aquaporinas já foram caracterizados em outras espécies vegetais e apresentaram expressão elevada em tecidos vasculares de raízes (Li *et al.*, 2009; Yamada & Bohnert, 2000). De acordo com Potenza e colaboradores (2004), os elementos que conferem expressão em raízes podem estar localizados

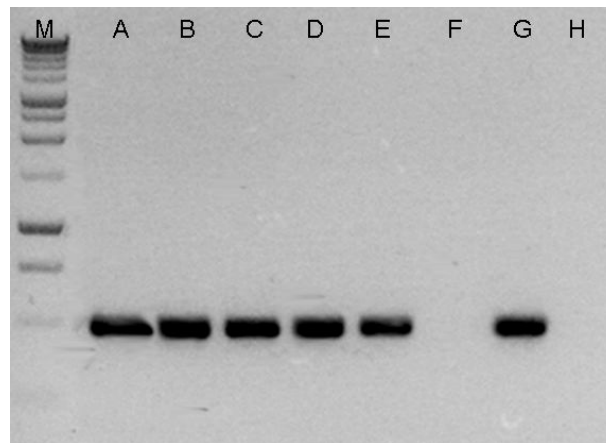
a jusante do início de transcrição e até mesmo em íntrons do gene. Outra explicação para a ausência de expressão é que elementos que direcionam a expressão deste gene não estão presentes na região promotora utilizada no experimento. Estes elementos poderiam estar em uma região mais a montante do que isolamos para a construção do cassete de expressão. Os dados de Yu e colaboradores (2003) corroboram esta hipótese. O fragmento de 1,6 kb do promotor de aquaporina de *Brassica napus* teve sua expressão drasticamente reduzida quando uma deleção de aproximadamente 600 pb foi realizada na região 5' comprovando que esta região é fundamental para o correto funcionamento do promotor.

O experimento mostrou-se perfeitamente satisfatório para a caracterização inicial de sequências promotoras, com a vantagem de ser de fácil realização. Porém, será necessário analisar a expressão na planta como um todo para se ter certeza de que o padrão da expressão seja realmente raiz-específico. Uma discussão mais aprofundada sobre as limitações, as vantagens e as desvantagens do método de transformação mediado por *A. rhizogenes* é realizada no Capítulo 2 desta Tese. Finalmente, uma análise quantitativa da expressão de GUS deve ser conduzida para uma melhor caracterização comparativa dos promotores.

#### **4.4 Avaliação da atividade promotora de *GmRB7* pela transformação genética de tabaco (modelo vegetal heterólogo)**

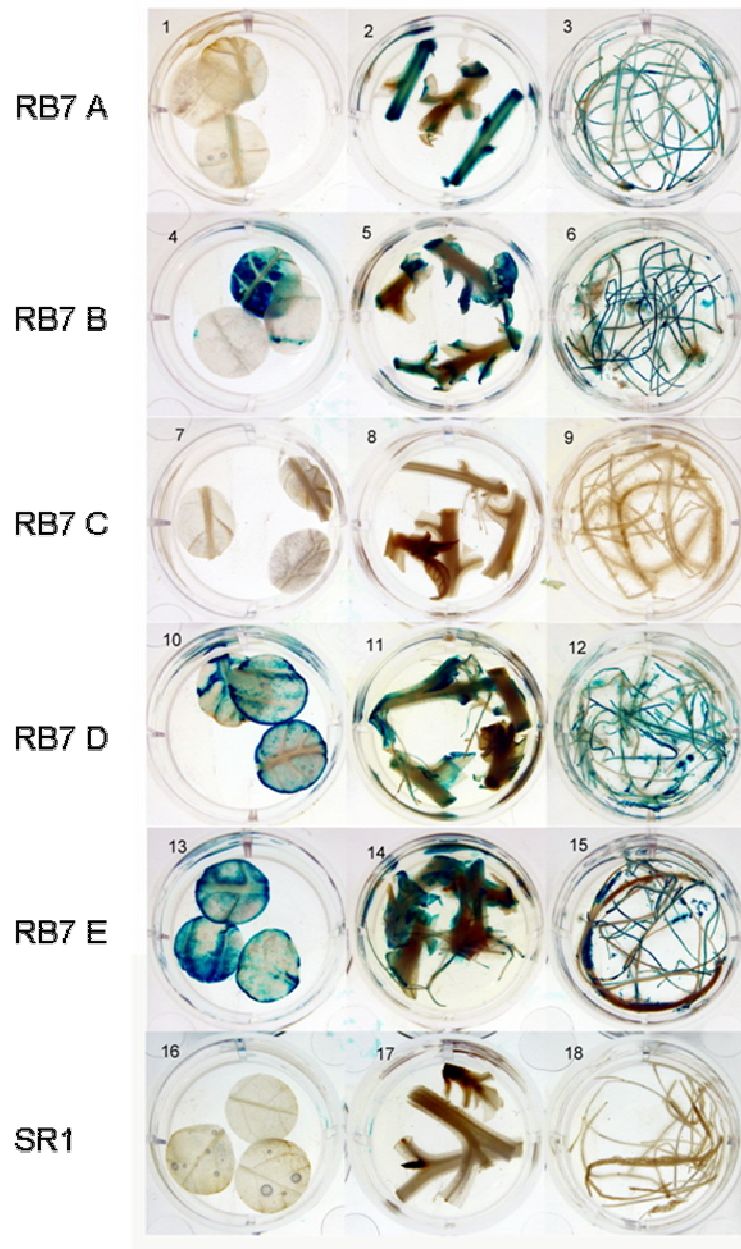
Para avaliar o perfil e expressão dos promotores obtidos em plantas completas e de forma estável, foi empregado o método de transformação genética mediado por *A. tumefaciens* (Horsch *et al.*, 1985). Foram transformadas plantas de tabaco com o vetor p2300-R2E, contendo a região promotora de 1.035 pb do gene *GmRB7* (Tabela 4). Como controle negativo, foram utilizadas plantas não transformadas do genótipo SR1.

Um total de cinco plantas transgênicas de origem independente foi obtido após os ensaios de transformação. As plantas foram mantidas em cultura *in vitro* sob pressão de seleção permanente com o antibiótico canamicina. Análises de PCR para um fragmento derivado do gene de seleção *nptII* (responsável pela resistência à canamicina) foram realizadas com DNA extraído das folhas das plantas, confirmando o estado transgênico das mesmas, conforme ilustrado pela Figura 6.



**Figura 6** – Imagem de gel de agarose a 1% submetido à eletroforese demonstrando o resultado da amplificação de um fragmento de 503 pb do gene de seleção *nptII* em plantas de tabaco transformadas com a construção de 1.035 pb do promotor de *GmRB7*. M, marcador de tamanho de fragmentos de DNA (1 kb DNA Ladder, Promega); A-E, plantas de tabaco RB7 A-E; F, controle negativo (planta não transformada – SR1); G, controle positivo (vetor pCAMBIA2300); H, controle negativo de PCR.

Ensaio histoquímico de GUS foram realizados com diferentes órgãos isolados das cinco plantas transgênicas, transformadas com a construção p2300-R2E, nomeadas RB7 A-E e de uma planta não transformada (SR1; Figura 7).



**Figura 7** - Ensaios histoquímicos de GUS em órgãos de plantas de tabaco transformadas com cassete de expressão contendo o promotor de *GmRB7*. RB7 A-E, diferentes plantas transformadas com o plasmídeo p2300-R2E; SR1, planta não transformada (controle negativo); 1-4-7-10-13-16, discos foliares; 2-5-8-11-14-17, fragmentos de caules; 3-6-9-12-15-18, raízes.

Das cinco plantas transgênicas, quatro (Figura 6, RB7-A, -B, -D e -E) exibiram intensa expressão de GUS em raízes e caules. A expressão em folhas foi observada em três plantas (Figura 7, RB7-B, -D e -E). Uma das plantas não demonstrou qualquer atividade de GUS (Figura 7, RB7-C), assim como o controle negativo (SR1). A planta RB7-C, apesar de ser resistente à canamicina e permitir a amplificação da banda correspondente ao gene *nptII* (Figura 6), não apresenta atividade alguma de GUS. É provável que não tenha ocorrido a integração de uma cópia intacta do T-DNA (Mazarei *et al.*, 1998).

Uma observação importante a ser feita é que as folhas da planta RB7-A utilizadas para os ensaios histoquímicos eram mais jovens, o que permite levantar a hipótese de que este promotor pode responder à senescência. Outro fato que merece atenção foi a forte expressão de GUS nas bordas dos discos foliares das plantas RB7-D e -E, e nas extremidades dos caules em RB7-A, -B, -D e -E. Em um ensaio histoquímico feito em plantas jovens, ainda na fase de seleção do material estavelmente transformado, também foi possível notar este padrão de expressão (dados não apresentados). Estas duas observações estão de acordo com a análise dos *cis*-elementos feita *in silico*, que apontou a presença de motivos que estão envolvidos na resposta a ferimentos e a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos. Até o momento, não existem trabalhos que relatem as observações acima para promotores de genes *RB7*. Segundo nosso entendimento, este experimento deverá ser repetido com plantas mais jovens, incluindo-se diversos tratamentos, tais como ferimentos nos tecidos, estresse salino, adição de soluções de ácido salicílico, citocinina, auxina, polietilenoglicol, etileno, ácido abscísico, ácido jasmônico e luz ultravioleta. Isto permitiria não só a confirmação do direcionamento da expressão aos tecidos mais vascularizados (caules e raízes), mas também o comportamento da sequência promotora frente aos diferentes sinais. Uma vez mais, a análise quantitativa da expressão de GUS deverá ser realizada para uma melhor caracterização comparativa da resposta deste promotor aos diferentes estímulos.

A expressão de genes *RB7* é descrita como predominantemente raiz-específica para espécies como morango (Vaughan *et al.*, 2006), tabaco (Conkling



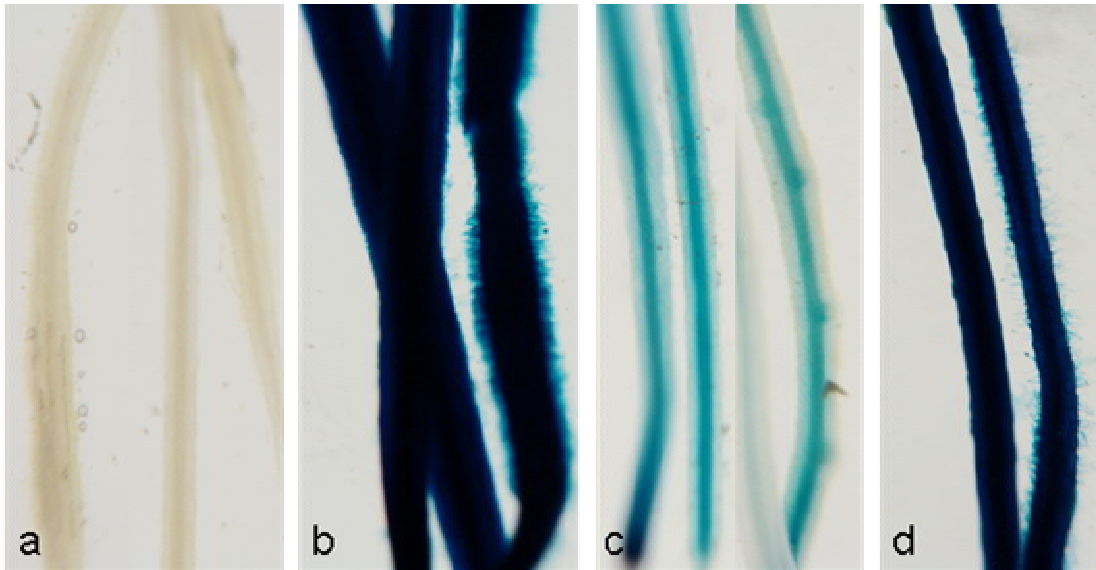
*et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1990), salsa (Roussel *et al.*, 1997) e girassol (Sarda *et al.*, 1999). O promotor do gene *FaRB7*, um ortólogo do gene *GmRB7* em morangos foi utilizado em experimentos de transformação em vegetais homólogo e heterólogo (tabaco), e os resultados mostraram diferenças no padrão de expressão de GUS nas diferentes espécies (Vaughan *et al.*, 2006). Enquanto no vegetal homólogo o promotor conferiu um padrão de expressão raiz-específico, no modelo heterólogo este padrão foi muito próximo ao constitutivo. Em ambos os casos, o promotor levou à expressão mais elevada do que a obtida com o promotor CaMV 35S. Observações semelhantes foram feitas com o promotor de tabaco *TobRB7*, que promoveu uma expressão raiz-específica em modelo homólogo e expressão constitutiva em tomate (Chan *et al.*, 2005).

Portanto, uma relação bastante forte existe entre a sequência promotora e o “ambiente” em que ela se encontra. Apenas nos vegetais de origem (modelo homólogo) estariam presentes todos os fatores necessários ao promotor para o correto direcionamento da expressão gênica. Os dados obtidos em modelos heterólogos de transformação devem ser interpretados com ressalvas. A alteração do padrão de expressão não foi observada apenas para promotores de *RB7*, mas também em promotores de cevada e trigo (Furtado *et al.*, 2008). Isto ressalta a importância de se testar os promotores, sempre que possível, em seus vegetais de origem.

#### **4.5 Análise de um fragmento do promotor de *GmRB7***

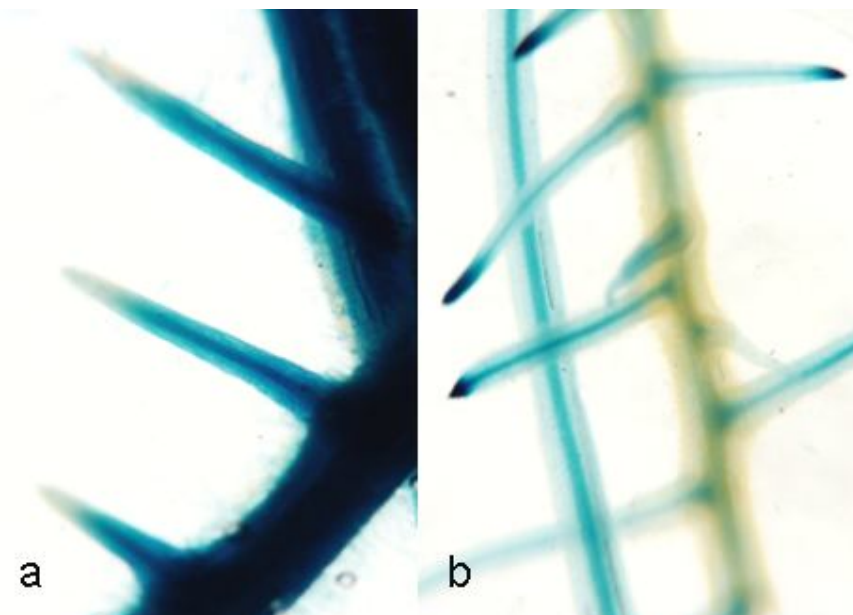
Para uma melhor caracterização do promotor *GmRB7*, foi realizado um ensaio preliminar da expressão direcionada por um fragmento menor da região promotora isolada inicialmente. Os vetores utilizados neste experimento estão ilustrados na Figura 3. Foram obtidas seis culturas de raízes independentemente transformadas para a construção p1300-R19 e p1300-R2E, três para p1300-XX e duas para pCAMBIA1301. Na Figura 8 estão representados os resultados da atividade histoquímica de GUS de raízes de plantas compostas de soja,

representativas de cada evento de transformação com *A. rhizogenes* junto a este experimento.



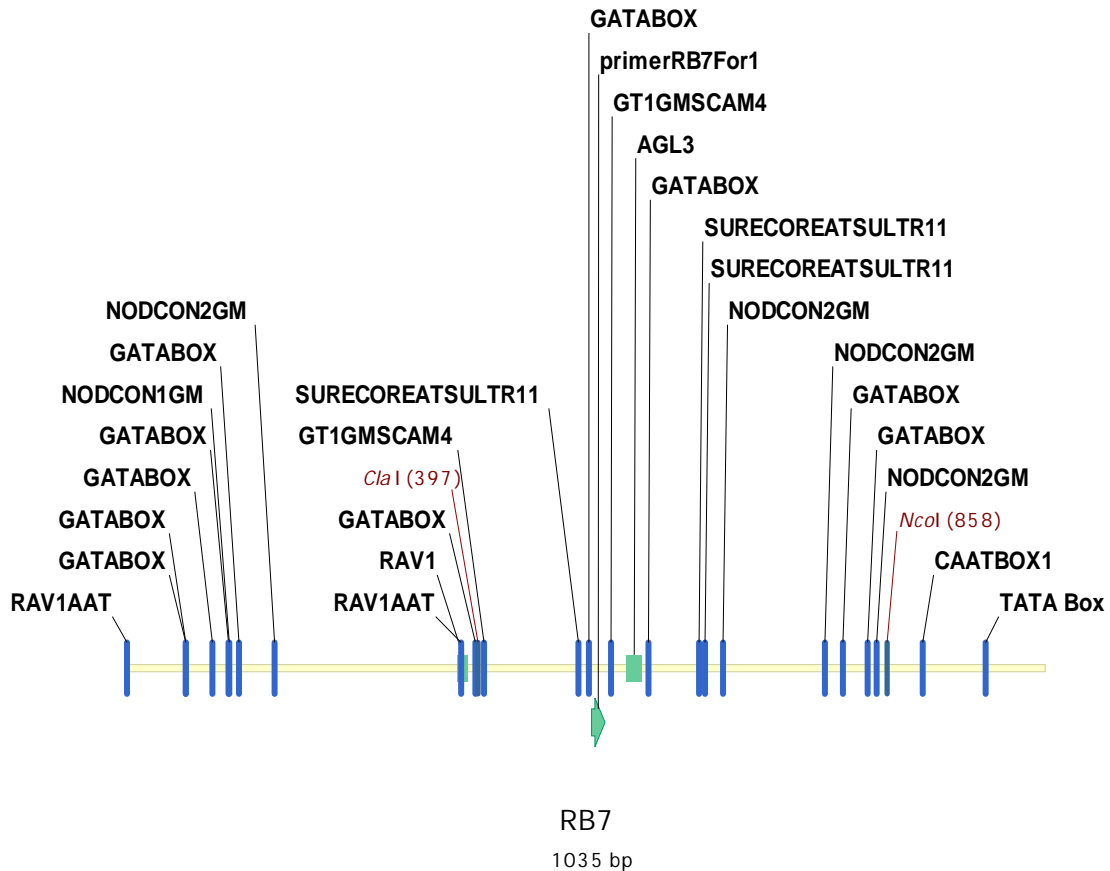
**Figura 8** – Análise histoquímica da atividade de GUS em raízes de plantas compostas de soja transformadas com versões do promotor *GmRB7*, incluindo uma versão contendo apenas 589 pb da região 5' da sequência. A, controle negativo (p1300-XX); b, controle positivo (pCAMBIA1301); c, p1300-R19 (fragmento menor do promotor); d, p1300-R23 (promotor inteiro).

Os controles negativo e positivo (Figura 8, a e b) apresentaram os padrões de expressão esperados, assegurando a correta interpretação dos dados obtidos. A construção p1300-R2E, com o fragmento de 1.035 pb do promotor *GmRB7*, conferiu uma expressão comparável à observada com o promotor CaMV 35S. Com a remoção do fragmento de 446 pb da região 5', a expressão foi bastante reduzida, ficando mais concentrada no feixe vascular das raízes. Comparando-se o padrão de expressão das raízes transformadas com os dois fragmentos do promotor, podemos observar uma diferença marcante na expressão de GUS nos ápices radiculares (Figura 9). A construção com 1.035 pb levou à uma expressão pouco significativa de GUS nos ápices radiculares, enquanto que a construção de 589 pb demonstrou uma expressão bastante acentuada.



**Figura 9** – Ensaio histoquímico da atividade de GUS de raízes transgênicas de soja transformada com versões do promotor *GmRB7*. Detalhe da expressão em ápices radiculares. A, p1300-R2E (1.035 pb do promotor); b, p1300-R19 (589 pb do promotor).

Uma análise dos *cis*-elementos, mostrou que foram removidos alguns motivos já caracterizados como envolvidos com a expressão em raízes (Figura 10).



**Figura 10** – Esquema do promotor de *GmRB7* com a localização dos principais *cis*-elementos. Seta verde, posição do *primer* RB7For1 a partir do qual foi amplificado o fragmento de 589 pb.

Entre os elementos que foram removidos estão RAV1AAT e SURECOREATSULTR11 (SURE), já descritos como associados à expressão em raízes. O fator de transcrição RAV1 liga-se especificamente ao motivo RAV1AAT. Elevados níveis de expressão de RAV1 foram observados em raízes de *A. thaliana* e acredita-se que ele é responsável por elevar a expressão gênica quando ligado ao *cis*-elemento RAV1AAT em promotores raiz-específicos (Kagaya *et al.*, 1999). A sequência GAGAC forma o núcleo do elemento responsivo ao enxofre (SURE), encontrado no promotor de um gene envolvido com o mecanismo de transporte de enxofre em raízes de *A. thaliana* e presente em diversos promotores com elevada expressão em raízes (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2005). Os *cis*-elementos NODCON1GM e NODCON2GM são descritos por

Sandal e colaboradores (1987) e estão presentes em genes envolvidos com a nodulação da soja. A remoção do elemento NODCON1GM pode ser responsável pela redução da expressão do gene repórter observada na construção com a deleção, observação corroborada pelos resultados de Stougaard e colaboradores (1990) que mostra a interdependência dos cis-elementos NODCON1GM e NODCON2GM na expressão de genes durante a formação de nódulos para a fixação de nitrogênio. O elemento GT1GMSCAM4 foi descrito como presente em promotores de genes envolvidos na resposta ao estresse hídrico e salino em raízes (Park *et al.*, 2004). Isto permite concluir que a porção removida do promotor tem elementos que são necessários para garantir altos níveis de expressão do gene repórter pelo promotor.

O resultado ilustrado pela Figura 9 pode ter relação com algum *cis*-elemento removido da região a montante que poderia funcionar como repressor da expressão em ápices radiculares. Porém, com base nos dados disponíveis na literatura, nenhum dos *cis*-elementos caracterizados pela análise *in silico* é suficiente e satisfatório para responder à questão. Análises de deleções internas em diferentes regiões do promotor poderão permitir a identificação da porção responsável por este padrão de expressão, podendo, até mesmo, permitir a caracterização de um novo *cis*-elemento e o fator *trans* associado.

Os resultados deste experimento preliminar de deleção abrem perspectivas adicionais. Com base no observado, novas deleções serão realizadas com o intuito de melhor caracterizar o funcionamento deste promotor. Uma análise microscópica de cortes histológicos poderá permitir um resultado mais detalhado de quais tecidos radiculares estão expressando GUS e, assim, aumentar a compreensão de como a deleção afeta a expressão. A interpolação de todos os resultados poderá permitir uma ideia mais clara de como funciona a arquitetura de *cis*-elementos neste promotor.

## 5 Referências Bibliográficas

---

Barone P, Rosellini D, Lafayette P, Bouton J, Veronesi F, Parrott W (2008) Bacterial citrate synthase expression and soil aluminum tolerance in transgenic alfalfa. *Plant Cell Rep* 27: 893-901.

Boetti H, Chevalier L, Denmat LA, Thomas D, Thomasset B (1999). Efficiency of physical (light) or chemical (ABA, tetracycline, CuSO<sub>4</sub> or 2-CBSU) - stimulus-dependent *gus* gene expression in tobacco cell suspensions. *Biotechnol Bioeng*: 64, 1-13.

Butler JEF, Kadonga JT (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & Development*, 6: 2583–2592.

Chan YL, Prasad V, Sanjaya, Chen KH, Liu PC, Chan MT, Cheng CP (2005) Transgenic tomato expressing an Arabidopsis thionin (Thi2.1) driven by fruit-inactive promoter battles against phytopathogenic attack. *Planta* 221: 386–393

Chang WC, Lee TY, Huang HD, Huang HY, Pan RL (2008) "PlantPAN: Plant Promoter Analysis Navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene group", *BMC Genomics*, 9: 561.

Che D, Richard BM, Clayton LR, Tehryung K, Heaton ACP, Merkle SA (2006) Expression of organomercurial lyase in eastern cottonwood enhances organomercury resistance. *In vitro cellular and developmental biology - Plant* 42(3): 228-234

Chiera JM, Bouchard RA, Dorsey SL, Park EH, Buenrostro-Nava MT, Ling PP, Finer JJ (2007) Isolation of two highly active soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) promoters and their characterization using a new automated image collection and analysis system. *Plant Cell Rep* 26:1501–1509.

Cho MJ, Widholm JM, Vodkin LO (1995) Cassettes for seed-specific expression tested in transformed embryogenic cultures of soybean. *Plant Mol Biol Rep* 13: 255–269.

Conkling MA, Cheng CL, Yamamoto YT, and Goodman HM (1990). Isolation of transcriptionally regulated root-specific genes from tobacco. *Plant Physiol.* 93: 1203-1211.

Cornejo M-J, Luth D, Blankenship KM, Anderson OD, Blechl AE (1993) Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Mol Biol* 23:567–581

De la Fuente JM, Ramirez-Rodriguez V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L (1997) Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276: 1566-1568.

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

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

Espley RV, Brendolise C, Chagné D, Kutty-Amma S, Green S, Volz R, Putterill J, Schouten HJ, Gardiner SE, Hellens RP, Allan AC (2009) Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples. *Plant Cell* 21(1): 168-83.

Fehlberg V, Vieweg M F, Dohmann E M, Hohnjec N, Puhler A, Perlick A M and Kuster H (2005) The promoter of the leghaemoglobin gene *VfLb29*: functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots; *J. Exp. Bot.* 56: 799–806.

Fehr WR, Caviness CE Stages of soybean development. Ames: State University of Science and Technology, 1977. 11 p. (Special report, 80).

Fei H, Chaillou S, Hirel B, Polowick P, Mahon JD, Vessey JK (2006) Effects of the overexpression of a soybean cytosolic glutamine synthetase gene (GS15) linked to organ-specific promoters on growth and nitrogen accumulation of pea plants supplied with ammonium. *Plant Physiol Biochem* 44: 543-550.

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

Furtado A, Henry RJ, Takaiwa F (2008) Comparison of promoters in transgenic rice. *Plant Biotechnol J* 6: 679-693.

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

Griffiths AJF *Introdução à genética*. Editora Guanabara Koogan SA, 8 ed, 2006.

Hernandez-Garcia C M, Bouchard R A, Rushton P J, Jones M L, Chen X, Timko M P, Finer JJ (2010) High level transgenic expression of soybean (*Glycine max*) *GmERF* and *Gmubi* gene promoters isolated by a novel promoter analysis pipeline. *BMC Plant Biology* 10: 237.

Hernandez-Garcia CM, Martinelli AP, Bouchard RA, Finer JJ (2009) A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives strong constitutive expression in transgenic soybean. *Plant Cell Reports* 28: 837-849.

Higo K, Ugawa Y, M. Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research* Vol.27 No.1 pp. 297-300.

Ho M-W, Ryan A, Cummins J (1999) Cauliflower mosaic viral promoter: a recipe for disaster? *Microbial Ecology in Health and Disease* 11: 194–197.



Horsch RB, Fraley RT, Rogers SG, Sanders PR, Lloyd A (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.

Huang G, Allen R, Davis EL, Baum TJ, Hussey RS (2006) Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14302-14306.

Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, Shibata Y, Gomi K, Umemura I, Hasegawa Y, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M (2005) Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling; *Plant Cell* 17: 1387–1396.

Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387-405.

Kagaya Y, Ohmiya K, Hattori T (1999) RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res.* 27: 470–478.

Kobayashi T, Nakayama Y, Itai RN, Nakanishi H, Yoshihara T, Mori S, Nishizawa NK (2003) Identification of novel cis-acting elements, IDE1 and IDE2, of the barley IDS2 gene promoter conferring iron-deficiency-inducible, root-specific expression in heterogeneous tobacco plants. *Plant J* 36: 780-793.

Kobayashi T, Yoshihara T, Itai RN, Nakanishi H, Takahashi M, Mori S, Nishizawa NK (2007) Promoter analysis of iron-deficiency-inducible barley IDS3 gene in *Arabidopsis* and tobacco plants. *Plant Physiol Biochem* 45: 262-269.

Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S (2002) PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 30:325–327.

Lindstrom JT, Vodkin LO, Harding RW, Goeken RM (1990) Expression of soybean lectin gene deletions in tobacco, *Developmental Genetics* 11: 160–167.

Liu JJ and Ekramoddoullah AK (2003) Root-specific expression of a western white pine PR10 gene is mediated by different promoter regions in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* 52: 103-120.

Ma JK, Drake PM, Christou P (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 4: 794-805.

Maguire TL, Grimmond S, Forrest A, Iturbe-Ormaetxe I, Meksem K, Gresshoff P (2002) Tissue-specific gene expression in soybean (*Glycine max*) detected by cDNA microarray analysis. *Journal of Plant Physiology* Volume 159, Issue 12, 1361-1374.

Maizel A and Weigel D (2004) Temporally and spatially controlled induction of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 38: 164-171.

Manavella PA, Dezar CA, Ariel FD, Chan RL (2008) Two ABREs, two redundant root-specific and one W-box cis-acting elements are functional in the sunflower HAHB4 promoter. *Plant Physiol Biochem* 46: 860-867.

Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Watanabe-Takahashi A, Inoue E, Yamaya T, Takahashi H (2005) Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots; *Plant J.* 42: 305–314.

Matsushita M, Tada S, Suzuki S, Kusumoto KI, Kashiwagi Y (2009) Deletion analysis of the promoter of *Aspergillus oryzae* gene encoding heat shock protein 30 *J Biosci Bioeng* 107(4): 345-51.

Mazarei M, Ying Z, Houtz RL (1998) Functional analysis of the Rubisco large subunit AN-methyltransferase promoter from tobacco and its regulation by light in soybean hairy roots. *Plant Cell Reports* 17: 907– 12.

Mizutani M, Watanabe S, Nakagawa T, Maeshima M (2006) Aquaporin NIP2;1 is mainly localized to the ER membrane and shows root-specific accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47: 1420-1426.

Mudge SR, Smith FW, Richardson AE (2003) Root-specific and phosphate-regulated expression of phytase under the control of a phosphate transporter promoter enables *Arabidopsis* to grow on phytate as a sole P source. *Plant Science* 165: 871-878.

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

Nitz I, Berkefeld H, Puzio OS, Grundler FM (2001) Pyk10, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 161: 337- 346.

Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810- 812.

Park HC (2004) Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol.* 135: 2150–2161.

Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeong JC, Cheong MS, Choi W, Lee SY, Cho MJ, Kim MC, Chung WS, Yun DJ. (2009) Functional analysis of the stress-inducible soybean calmodulin isoform-4 (GmCaM-4) promoter in transgenic tobacco plants. *Mol Cells.*27 (4): 475-80.

Pasquali G, Pieter B.F. Ouwkerk PBF, Memelink J (1994) Versatile transformation vectors to assay the promoter activity of DNA elements in plants *Gene* 149 (2): 373-374.

Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan C (2004) Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant*, 40 (1): 1-22.

Preisznner J, Van Toait T, Huynh L, Bolla RI, Yen HH (2001) Structure and activity of a soybean Adh promoter in transgenic hairy roots. *Plant Cell Reports* 20 (8): 763-769.

Qinggele C, Mingchun L, Dongsheng W, Yi C, Laijun X (2007) Isolation and sequencing analysis on the seed-specific promoter from soybean. *Frontiers of Agriculture in China* Volume 1, Number 1.

Radi A, Dina P, Guy A (2006) Expression of sarcotoxin IA gene via a root-specific tob promoter enhanced host resistance against parasitic weeds in tomato plants. *Plant Cell Rep* 25: 297-303.

Rombauts S, Florquin K, Lescot M, Marchal K, Rouze P, Van De Peer Y (2003) Computational approaches to identify promoters and cis-regulatory elements in plant genomes. *Plant Physiol.*, 132 (3): 1162-1176.

Roussel H, Bruns S, Gianinazzi-Pearson V, Hahlbrock K, Franken P (1997) Induction of a membrane intrinsic protein-encoding mRNA in arbuscular mycorrhiza and elicitor-stimulated cell suspension cultures of parsley. *Plant Science* 126: 203–210.

Sambrook J and Russel DW (2001) (eds) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, v1.

Sandal NN, Bojsen K, Marcker KA (1987) A small family of nodule specific genes from soybean. *Nucleic Acids Res.* 15: 1507-1519.

Sarda X, Tusch D, Ferrare K, Cellier F, Alcon C, Dupuis JM, Casse F, Lamaze T (1999) Characterization of closely related delta-TIP genes encoding aquaporins which are differentially expressed in sunflower roots upon water deprivation through exposure to air. *Plant Molecular Biology* 40: 179–191.

Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463: 178-183.

Shahmuradov IA, Solovyev VV, Gammerman AJ (2005) Plant promoter prediction with confidence estimation. *Nucleic Acids Research*, 33, 1069-1076.

Singh KH (1998). Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiol*. 118: 1111–1120.

Smale ST and Kadonga JT (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem* 72: 449-479.

Stearns JC, Shah S, Greenberg BM, Dixon DG, Glick BR (2005) Tolerance of transgenic canola expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase to growth inhibition by nickel. *Plant Physiol Biochem* 43: 701-708.

Stougaard J, Jorgensen JE, Christensen T, Khule A, Marcker KA (1990) Interdependence and nodule specificity of cisacting regulatory elements in the soybean leghemoglobinlbc3 and N23 gene promoters. *Mol Gen Genet* 220:353–360.

Stromvik MV, Sundararaman VP, Vodkin LO (1999) A novel promoter from soybean that is active in a complex developmental pattern with and without its proximal 650 base pairs. *Plant Mol Biol* 41: 217–231.

Subramanian S, Hu X, Lu G, Odelland JT, Yu O (2004) The promoters of two isoflavone synthase genes respond differentially to nodulation and defense signals in transgenic soybean roots. *Plant Mol Biol* 54: 623-639.

Tang W and Newton RJ (2004) Regulated gene expression by glucocorticoids in cultured Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) cells. *J Exp Bot* 55: 1499-1508.

Tatematsu K, Ward S, Leyser O, Kamiya Y, Nambara E (2005) Identification of cis-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in Arabidopsis. *Plant Physiol* 138: 757–766.

Tremousaygue D, Manevski A, Bardet C, Lescure N, Lescure B (1999) Plant interstitial telomere motifs participate in the control of gene expression in root meristems; *Plant J.* 20: 553–561.

Vaughan SP, James DJ, Lindsey K, Massiah AJ (2006) Characterization of FaRB7, a near root-specific gene from strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) and promoter activity analysis in homologous and heterologous hosts; *J. Exp. Bot.* 57: 3901–3910.

Venter M (2007) Synthetic promoters: genetic control through cis engineering. *Trends Plant Sci.*, 12 (3): 118-124.

Vijaybhaskar V, Subbiah V, Kaur J, Vijayakumari P, Siddiqi I (2008) Identification of a root-specific glycosyltransferase from *Arabidopsis* and characterization of its promoter. *J Biosci* 33: 185-193.

Winicov I, Valliyodan B, Xue L, Hooper JK (2004) The MsPRP2 promoter enables strong heterologous gene expression in a root-specific manner and is enhanced by overexpression of Alfin 1. *Planta* 219: 925-935.

Wray GA (2003) The evolution of transcriptional regulation in Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.*, 20 (9): 1377-1419.

Xiao K, Zhang C, Harrison M, Wang Z-Y (2005) Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants. *Molecular Breeding* 15: 221–231.

Xu N, Hagen G, Guilfoyle T (1997) Multiple auxin response modules in the soybean SAUR 15A promoter. *Plant Science*, 126: 193-201.

Xu SX, Wang LJ, Qiu ZP, Ye YJ, Yu XH (2002) Actin visualization in living immature pollen of rice using a GFP-mouse talin fusion protein. *Acta Bot. Sin.* 44: 642–648.

Yamada S, Bohnert HJ (2000) Expression of the PIP aquaporin promoter-MipA from the common ice plant in tobacco. *Plant Cell Physiol.* 41(6): 719-25.

Yamamoto YT, Cheng CL, Conkling MA (1990) Root-specific genes from tobacco and *Arabidopsis* homologous to an evolutionarily conserved gene family of membrane channel proteins. *Nucl. Acids Res.* 18: 7449.

Yoshida K, Shinmyo A (2000) Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* Volume 90, Issue 4, 353-362.

Yu Q, Du L, Hu Y, Lin Z (2003) Cloning of the promoter region of plasma membrane aquaporin BnPIP1 from *Brassica napus* and its functional analysis. *SCIENCE IN CHINA SERIES C: LIFE SCIENCES* 46 (4): 348-358.

**Screening of Brazilian soybean genotypes for transgenic hairy-roots production by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation**

Manuscrito submetido à revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB)



## **Screening of Brazilian soybean genotypes for transgenic hairy-roots production by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation**

Ricardo Luís Mayer Weber<sup>(1)</sup> and Maria Helena Bodanese-Zanettini<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Caixa Postal 15.053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. rlmweber@yahoo.com.br, maria.zanettini@ufrgs.br

**Abstract** - *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation is a powerful tool for functional studies of genes and promoters. Transformation of soybean via *A. rhizogenes* is affected by the susceptibility of genotypes to the bacteria. Six Brazilian genotypes were screened for their capacity to respond to *A. rhizogenes* in protocols for *in vitro* hairy-root culture and *ex vitro* production of composite plants. The transformation frequency and the number of days for hairy root emergence after bacterial infection (DAI) varied among genotypes. MG/BR 46 Conquista and BRSMG 68 Vencedora cultivars were found to be the most susceptible and can be recommended for *A. rhizogenes*-mediated transformation experiments.

**Index terms:** K599, *Glycine max*, genetic engineering.

**Seleção de genótipos brasileiros de soja na produção de raízes em cabeleira transgênicas através da transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes***

**Resumo** - Transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes* é uma poderosa ferramenta para estudos funcionais de genes e promotores. A

transformação de soja via *A. rhizogenes* é influenciada pela sensibilidade dos genótipos às bactérias. Seis genótipos brasileiros foram testados quanto a sua capacidade de responder a *A. rhizogenes* em protocolos de indução de *hairy-roots in vitro* e produção *ex vitro* de plantas compostas. A frequência de transformação e o número de dias para emergência de *hairy-roots* após a infecção bacteriana (DAI) variou entre os genótipos. MG / BR 46 Conquista e BRSMG 68 Vencedora foram os genótipos mais suscetíveis e podem ser recomendados para experimentos de transformação mediada por *A. rhizogenes*.

**Termos para indexação:** K599, *Glycine max*, engenharia genética.

## Introduction

*Agrobacterium tumefaciens*-mediated plant transformation and particle bombardment are the two major extensively employed methods for soybean transformation. (Hinchee *et al.* 1988; Stewart *et al.* 1996; Homrich *et al.*, 2008; Schimdt *et al.*, 2008). Recovery of the first soybean transgenic fertile plants obtained from somatic embryogenic tissues transformed by the system that combines DNA-free particle bombardment and *Agrobacterium tumefaciens* was recently reported by Wiebke-Strohm *et al.* (2011). Those systems have limitations such as a prolonged tissue culture period and intensive labor, besides being quite expensive and not entirely suitable for high-throughput analyses which limit their potential as objects for gene functional studies.

*Agrobacterium rhizogenes*, a Gram-negative phytopathogenic bacterium, causes the production of adventitious hairy roots at the wounding sites. The *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation leads to the development of the hairy-root phenotype, consisting of roots that grow rapidly, show plagiotropic growth and are highly branched in the absence of exogenous plant growth regulators (Collier *et al.* 2005). The bacteria can transfer T-DNA from de Ri plasmid into the plant genome and also T-DNA of the binary vector when co-transferred (Broothaerts *et al.*, 2005; Christey, 2001). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation has become a powerful tool for gene function and root biology studies due to its quick and simple methodology (Cao *et al.*, 2009). The production of axenic hairy-root cultures is an interesting tool because the transgenic root explants can be clonally propagated for studies of, for example, endomycorrhizal colonization (Chabaud *et al.*, 2002). Unfortunately such clonal explants cannot be used for nodulation studies as the *Rhizobium*/legume interaction requires aerial organs (Chabaud *et al.*, 2006). The “composite plants”, consisting of wild-type shoots with transgenic roots which represent a significant advance as they allow transgene root testing in a complete plant and can be used in various studies (Collier *et al.*, 2005). These composite plants can be obtained by both protocols, *in vitro* or *ex vitro*, depending on the work conditions available and objective of the study.

*Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation system was found to be very useful in genetic manipulation of plants from Fabaceae family such as *Medicago truncatula* (Crane *et al.*, 2006) and *Phaseolus spp.* (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006). In soybean, the method has been used to characterize promoters (e.g. Hernandez-Garcia *et al.*, 2010); propagation of nematodes (Cho *et al.*, 2000), studies of symbiotic interactions (Hayashi *et al.*, 2008), pathogenic interactions (Lozovaya *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010), RNAi silencing of genes (Subramanian *et al.*, 2005). Although regeneration of whole soybean plants from these cultures has not been reported, the major advantages of this method is a relative short period (about 6-8 weeks) to screen potential genes and promoters useful to genetic improvement in stably-transformed tissues (Cho *et al.*, 2000). As every transgenic root represents an independent transformation event, high numbers of transformants can be obtained and analyzed in a relatively short period of time (Kereszt *et al.*, 2007).

The efficiency of hairy-roots induction can vary considerably among genotypes (Mazarei *et al.*, 1998; Savka *et al.*, 1990; Cho *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2009). The genotype-dependence justifies the screening of soybean cultivars that are more responsive to the induction of hairy-roots by *A. rhizogenes*. However, there is no information about the capacity of Brazilian soybean genotypes to respond to *A. rhizogenes*.

The objective of this study is to evaluate Brazilian soybean genotypes for their capacity to respond to *A. rhizogenes* in protocols for *in vitro* hairy-root culture and *ex vitro* production of composite plants.

## Materials and Methods

Six soybean genotypes including IAS-5, Bragg, BRSMG 68 Vencedora, BRS 137, Embrapa 48 and MG/BR 46 Conquista, have been tested to evaluate the effect of plant genotypes in the *A. rhizogenes*-mediated transformation. Bragg and IAS-5 are North American-adapted cultivars, commonly used in genetic improvement programs, while the others are Brazilian cultivars developed and released by Brazilian breeding programs, and recommended for commercial growth in different states of Brazil (Brasil, 2009). Soybean seeds were surface desinfested for 30 sec in 70% ethanol and 15 min in 4% sodium hypochlorite containing Tween-20. After desinfestation the seeds were rinsed four times in sterile distilled water. The sterilized seeds were germinated in plastic pots with vermiculite and covered with transparent plastic film to keep high humidity and then kept in greenhouse.

The vector pCAMBIA1301 (Cambia.com) and a pDE1001, with GFP expression cassette from the pPK100, hereby named p35S-GFP (vector constructed by Mangeon *et al.*, 2009; and kindly supplied by Dr. Gilberto Sachetto-Martins) were introduced into *A. rhizogenes* strain K599 (kindly supplied by Dr. Eliane Santarém, PUCRS, RS, Brazil) by electrotransformation. *A. rhizogenes* without the binary vector was grown in LB medium lacking antibiotics. Then single isolated colonies were incubated for 48 h at 28 °C in 5 ml liquid LB media, with the adequate antibiotics and the culture being shaken at 180 rpm.

To assess the ability of different cultivars for the induction of hairy-roots in *ex vitro* condition, uniform 4 day-old seedlings were injected with *A. rhizogenes* harboring the plasmid p35S-GFP by stabbing at the cotyledonary node with a syringe as described by Kereszt *et al.* (2007). Thirty plants were inoculated for each genotype. The plants were maintained covered with transparent plastic film in the greenhouse at 25±1 °C under fluorescence light with 16 hour light photoperiod. The seedlings expressing the GFP protein in at least one hairy-root were analyzed in order to estimate transformation frequency. GFP expression was detected under blue light using a fluorescence stereomicroscope Olympus<sup>®</sup>,

equipped with a BP filter set containing a 488 nm excitation filter and a 505–530 nm emission filter. Hairy-roots from seedlings transformed with K599 without any plasmid were used as negative control. Images were captured using the software QCapture Pro™ 6 (QImaging®).

Axenic *in vitro* transgenic hairy-root cultures were obtained following the procedure described by Hernandez-Garcia *et al.* (2010) with modifications. Briefly, 50 cotyledons from 4-day-old plants from each genotype were excised, surface-sterilized - as described for seeds - and placed in Petry dishes with sterile distilled water moistened paper filter. After that, the cotyledons were uniformly wounded three times on the abaxial side with a sterile scalpel dipped in the overnight bacterial culture harboring the plasmid pCAMBIA1301. Three days after incubating, the cotyledons were transferred onto the medium containing MS salts (Murashige & Skoog, 1962), B5 vitamins (Gamborg *et al.* 1968), 3% sucrose, 0.3% Phytigel®, pH 6.4 (prior to autoclaving) and 500 mg L<sup>-1</sup> carbenicillin to inhibit bacterial growth. The DAI (days for hairy-root emergence after bacterial infection – Cao *et al.*, 2009) was recorded. After root emergence, 2 cm long root tips were transferred to the same medium with 25 mg.L<sup>-1</sup> hygromycin B to selection of transformed hairy-roots. To guarantee the identity of independent transformation events, only one vigorous root from each cotyledon was transferred to the selection medium. About 1 week later, only roots that showed growth in the medium with the antibiotics were used to establish new root cultures. Two centimeter long root tips were used as explants and were subcultured every week to a fresh medium with antibiotics. For negative control, roots induced by wild-type K599 were maintained in the same medium but lacking the selective antibiotic. Transformation frequency (TF) was calculated by the number of GUS<sup>+</sup> roots (after third subculture in selection medium) divided by the total number of inoculated cotyledons.

GUS expression was assayed by histochemical staining using Jefferson (1987) method. Both wild-type (negative control) and putative transformed roots were incubated in a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide (X-Gluc) solution at

37°C in the dark. GUS expression was visualized after the roots had been washed in 70% ethanol and rehydrated with distilled water.

Genomic DNA was extracted from untransformed and *in vitro* putative transformed hairy-root cultures according to the CTAB procedure described by Doyle and Doyle (1987) with some modifications. Purified DNA samples from roots transformed by plasmid pCAMBIA1301 were PCR-screened by using specific primers for *hptII* gene (5'-GCGATTGCTGATCCCCATGTGTAT-3' and 5'-GGTTTCCACTATCGGCGAGTACTT-3'). The PCR reaction mixture consisted of 100ng of template DNA, 0.2 mM of dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X Taq Buffer, 2 units of Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase (Invitrogen), 0.5 μM of each primer. Reactions were hot-started (5 min at 94 °C) and subjected to 30 cycles as follows: 45 s at 94 °C; 45 s at 52 °C and 45s at 72 °C with a final extension of 72 °C for 5 min. The 1% agarose gel was stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

Data from DAI were analyzed with SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago IL) using LSD (Least Significant Difference) Multiple Comparison Test. Means were separated at  $\alpha = 0.05$ .

## Results and Discussion

In order to verify the capacity for transgenic hairy-root induction, six soybean genotypes were transformed by *A. rhizogenes* harboring the p35S-GFP vector using the *ex vitro* protocol. Transgenic hairy-roots were induced in all genotypes (Table 1). When observed under blue light, transgenic hairy-roots were fluorescent green, confirming the transgene stable integration and expression (Figure 1). Although not all hairy-roots were transgenic, a plant is considered to be transgenic if it presents at least one root expressing GFP (Cao *et al.*, 2009). It was found that the transformation frequency varied among genotypes, being MG/BR 46 Conquista and BRSMG 68 Vencedora those with higher transformation frequency (83.3% and 73.3%, respectively). Intermediary transformation frequency (66.7%) was observed for IAS-5, while transformation frequencies below 50% were obtained for Bragg, BRS 137 (both with 36.7%) and Embrapa 48 (13.3%) (Table 1). This experiment was chosen as the starting point to assess the transformation frequency as the protocol is faster and inexpensive.

In the second experiment the genotype-effect on transformation frequency was evaluated under *in vitro* conditions (Table 2). Similarly to experiment one, all analyzed cultivars were able to produce transgenic hairy-roots using that protocol. Once again, the genotypes MG/BR 46 Conquista and BRSMG 68 Vencedora showed the highest transformation frequencies (52% and 40%, respectively). These cultivars were also the most precocious for root emergency after bacterial inoculation (DAI =  $10.6 \pm 0.8$  and  $11.1 \pm 0.7$  days, respectively).

Hairy-roots cultures can be routinely maintained by subculturing. In order to confirm that cultures were free of *A. rhizogenes*, after the 3<sup>rd</sup> subculture a sample of roots on the selective medium were plated on LB agar medium. Plates were incubated for 2 days at 28 °C and the absence of bacterial growth assured that *A. rhizogenes* was completely eliminated from the tissues. After 3 subcultures, the hairy-roots could be maintained in medium without antibiotics.

GUS activity was detected in all transformed roots that had survived after 3 subcultures on selective medium with hygromycin B, however it was not observed



in roots induced by the wild-type K599 (negative control), indicating that the staining was due to the insertion of the *gusA* gene into the plant genome (Figure 2). The use of a *gusA*-intron gene, present in the T-DNA of pCAMBIA1301 vector guaranteed a reliable result, since this gene can only be fully expressed in eukaryotic cells (Hiei *et al.* 1994). All GUS<sup>+</sup> hairy-roots were PCR-screened for *hptII* presence. Analysis confirmed that no *hptII* amplification was detected in the negative controls, whereas transformed materials presented the expected 512 bp *hptII* fragment (data not shown).

The T-DNA from the virulence Ri plasmid and the genes it encodes cause the stimulation of hairy-roots formation. *A. rhizogenes* can also transfer binary vector T-DNA (Christey *et al.*, 2001). Integration of *rol* genes and T-DNA from the binary vector is independent (Shahin *et al.*, 1986). Karimi *et al.* (1999) reported that the co-transformation results in complex T-DNA integration patterns and some of the hairy-roots may not contain the T-DNA from the binary vector. This helps to explain the high number of cotyledons that produced hairy-root but not all these roots survived in the selective medium (Table 2).

The efficiency of hairy-root induction can vary considerably among genotypes. Mazarei *et al.* (1998) reported hairy-root induction efficiency ranging from 5–90% in nine soybean genotypes. Similar data - efficiency ranging from 5 – 85%- were obtained by Savka *et al.* (1990) in a study comprising 10 North America genotypes. In both studies the genotype capacity to induce hairy-roots was evaluated using the cotyledons as the explant (*in vitro* protocol) and wild-type bacteria.

Using the *ex vitro* protocol Cao *et al.* (2009) recorded a range from 30 – 93.3% in transformation frequency among seven Chinese genotypes. Cho *et al.* (2000) showed transformation frequencies ranging from 54 – 95% in a *in vitro* experiment. The values obtained in the present study are within the range described in those studies. In both experiments (*ex vitro* and *in vitro*) the genotypes MG/BR 46 Conquista and BRSMG 68 Vencedora were those with the highest transformation frequencies.

Cao *et al.* (2009) pointed out that in the hairy-root transformation system, it is desirable for a soybean genotype to have short DAI, a large number of hairy-roots and a high transformation frequency. In this study, the genotypic effect on DAI was assayed in the second experiment (axenic protocol). MG/BR 46 Conquista and BRSMG 68 Vencedora were shown to be the top two candidates for hairy-root transformation when the DAI and transformation frequency were jointly considered. Although the absence of statistic difference between the two top candidates in DAI, the genotype MG/BR 46 Conquista was the choice for hairy-root transformation in the laboratory as it shows a slight superior transformation frequency (Table 2).

As every transgenic root represents an independent transformation event, a high number of transformants can be obtained and analyzed in a relatively short period of time (Kereszt *et al.*, 2007). To ensure that hairy-root lines used in all *in vitro* assays derived from independent transformation events, only one vigorous root from each cotyledon was transferred to selection medium.

The hygromycin B selection was done with 25 mg L<sup>-1</sup>, the usual concentration used to select transformed somatic embryos in the laboratory (Droste *et al.*, 2002, Homrich *et al.*, 2008; Wiebke-Strhom *et al.*, 2011). Stable soybean hairy-root cultures have been obtained using kanamycin as selective antibiotic (Cho *et al.*, 2000; Presizner *et al.*, 2001). However, results obtained in the present study showed that false positives (escapes) were not detected under hygromycin B selection. Li *et al.* (2010) indicated that 200 mg L<sup>-1</sup> kanamycin, or 20 mg L<sup>-1</sup> hygromycin B can be used for the selection of soybean hairy-root cultures.

Olhoft *et al.* (2003) stressed that an ideal transformation method for soybean should be (i) simple, inexpensive and rapid; (ii) provide efficient selection without production of non-transformed or chimeric plants and (iii) be successful with a range of cultivars. The *Agrobacterium rizhogenes*-mediated transformation system covered all of requirements.

The *Agrobacterium rizhogenes*-mediated transformation presents limitations since unlike other plants; there are no reports up to date on successful

plant regeneration from soybean hairy-roots. However this system provides a powerful tool for functional studies of genes and promoters (e.g. Hernandez-Garcia *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). Only seven weeks are needed to produce stable hairy-root cultures for transgene analysis. Using this system, root specific promoters have been analyzed in our laboratory.

### **Conclusions**

1. Some Brazilian soybean genotypes can be used in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation experiments;
2. MG/BR 46 Conquista and BRSMG 68 Vencedora cultivars were found to be superior for *in vitro* and *ex vitro* genetic transformation mediated by *A. rhizogenes*.

### **Acknowledgements**

To Dr. Eliane Santarém, PUCRS, for providing *Agrobacterium rhizogenes* K599; to Dr. Gilberto Sachetto-Martins, for providing the vector p35S-GFP; to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Centro do Agronegócio - Casa Rural for financial support.

## References

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Zoneamento agrícola de risco climático: cultivares de soja ano-safra 2008/2009. Available at: <www.agricultura.gov.br>. Accessed on: 04 Nov. 2009.

BROOthaerts, W.; MITCHELL, H.J.; WEIR, B.; KAINES, S.; SMITH, L.M.A.; YANG, W.; MAYER, J.E.; ROA-RODRIGUEZ, C.; JEFFERSON, R.A. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. **Nature**, v.433, p. 629– 633, 2005.

CAO, D.; HOU, W.; SONG, S.; SUN, H.; WU, C.; GAO, Y.; HAN, T. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.96, p.45–52, 2009.

CHABAUD, M.; BOISSON-DERNIER, A.; ZHANG, J.; **TAYLOR, C.G.**; YU, O.; BARKER, D.G. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. In: MATHESIUS, U.; JOURNET, E.P.; SUMNER, L.W. **Medicago truncatula handbook**, ed.1, v.1. St. Louis, MO, USA: Samuel Roberts Noble Foundation, 2006.

CHABAUD, M.; VENARD, C.; DEFAUX-PETRAS, A.; BECARD, G.; BARKER, D.G. Targeted inoculation of *Medicago truncatula in vitro* root cultures reveals *MtENOD11* expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.156, p.265-273, 2002.

CHO, H.J.; FARRAND, S.K.; NOEL, G.R. High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. **Planta**, v.210, p.195– 204, 2000.

CHRISTEY, M.C. Use of Ri mediated transformation for production of transgenic plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.37, p. 687– 700, 2001.

COLLIER, R.; FUCHS, B.; WALTER, N.; KEVIN, L.W.; TAYLOR, C.G. Ex vitro composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. **The Plant Journal**, v. 43, p.449–457, 2005.

CRANE, C.; WRIGHT, E.; DIXON, R.A.; WANG, Z.Y. Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens* transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. **Planta**, v.223, p.1344-54, 2006.

ESTRADA-NAVARRETE, G.; ALVARADO-AFFANTRANGER, X.; OLIVARES, J.E.; GUILLEN, G.; DIAZ-CAMINO, C.; CAMPOS, F.; QUINTO, C.; GRESSHOFF, P.M.; SANCHEZ, F. Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. **Nature Protocols** v.2, p.1819–1824, 2007.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.

HAYASHI, S.; GRESSHOFF, P.M.; KINKEMA, M. Molecular analysis of lipoxygenases associated with nodule development in soybean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.21, p. 843–853, 2008.

HERNANDEZ-GARCIA, C. M.; BOUCHARD, R. A.; RUSHTON, P. J.; JONES, M. L.; CHEN, X.; TIMKO, M. P.; FINER, J.J. High level transgenic expression of soybean (*Glycine max*) *GmERF* and *Gmubi* gene promoters isolated by a novel promoter analysis pipeline. **BMC Plant Biology**, v.10, p.237, 2010.

HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal**, v.6, p.271–282, 1994.

HINCHEE, M.A; CONNOR-WARD, D.V.; NEWELL, C.A.; MCDONELL, R.E.; SATO, S.J.; GASSER, C.S.; FISHHOFF, D.A.; RE, D.B.; FRALEY, R.T.;

HORSCH, R.B. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Bio/Technology**, v.6, p.915-922, 1988.

HOMRICH, M.S.; PASSAGLIA, L.M.P.; PEREIRA, J.F.; BERTAGNOLLI, P.F.; PASQUALI, G.; ZAIDI, M.A.; ALTOSAAR, I.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill, Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. **Genetic and Molecular Biology** v.31, p. 522-531, 2008.

JEFFERSON, R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reports**, v.5, p.387–405, 1987.

KARIMI, M.; VAN MONTAGU, M.; GHEYSEN, G. Hairy root production in *Arabidopsis thaliana*: co-transformation with a promoter-trap vector results in complex T-DNA integration patterns. **Plant Cell Reports**, v.19, p.133–142, 1999.

KERESZT, A.; LI, D.; INDRASUMUNAR, A.; NGUYEN, C.D.; NONTACHAIYAPOOM, S.; KINKEMA, M.; GRESSHOFF, P.M. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. **Nature Protocols**, v.2, p.948–952, 2007.

LI, J.; TODD, T.C.; TRICK, H.N. Rapid *in planta* evaluation of root expressed transgenes in chimeric soybean plants. **Plant Cell Reports**, v.29, p.113–123, 2010.

MANGEON, A.; MAGIOLI, C.; MENEZES-SALGUEIRO, A.D.; CARDEAL, V., DE OLIVEIRA, C.; GALVÃO, V.C.; MARGIS, R.; ENGLER, G.; SACHETTO-MARTINS, G. AtGRP5, a vacuole-located glycine-rich protein involved in cell elongation. **Planta**, v.230, p.253–265, 2009.

MAZAREI, M.; YING, Z.; HOUTZ, R.L. Functional analysis of the Rubisco large subunit AN-methyltransferase promoter from tobacco and its regulation by light in soybean hairy roots. **Plant Cell Reports**, v.17, p.907– 12, 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

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

PREISZNER, J.; VAN TOAIT, T.; HUYNH, L.; BOLLA, R.I.; YEN, H.H. Structure and activity of a soybean *Adh* promoter in transgenic hairy roots. **Plant Cell Reports**, v.20, p. 763-769, 2001.

SAVKA, M.A.; RAVILLION, B.; NOEL, G.R.; FARRAND, S. Induction of hairy roots on cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode. **Phytopathology**, v.80, p.503–508, 1990.

SCHMIDT, M.A.; LAFAYETTE, P.R.; ARTELT, B.A.; PARROTT, W.A. A comparison of strategies for transformation with multiple genes via microprojectile-mediated bombardment. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant** v.44 n.3, p.162-168, 2008.

SHAHIN, E.A.; SUKHAINDA, K.; SIMPSON, R.B.; SPIVEY, R. Transformation of cultivated tomato by a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*: Transgenic plants with normal phenotypes harbor binary vector T-DNA, but no Ri-plasmid T-DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, v.72, p.770–7, 1986.

SUBRAMANIAN, S.; GRAHAM, M.Y.; YU, O.; GRAHAM, T.L. RNA interference of soybean isoflavone synthase genes leads to silencing in tissues distal to the transformation site and to enhanced susceptibility to *Phytophthora sojae*. **Plant Physiology**, v.137, p.1–9, 2005.

WIEBKE-STROHM, B.; BÜCKER-NETO, L.; DROSTE, A.; HOMRICH, M.S.; PASQUALI, G.; PASSAGLIA, L.M.P.; MARGIS-PINHEIRO, M.; OSORIO, M.B.; BENCKE, M.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Transgenic fertile soybean plants derived from somatic embryos transformed via the combined DNA-free particle bombardment and *Agrobacterium* system. **Euphytica**, v. 177, p. 343–354, 2011.

**Table 1.** *Ex vitro* *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of six brazilian soybean genotypes.

<b>Genotype</b>	<b>Number of seedlings inoculated</b>	<b>Number of plants with HR GFP<sup>+</sup></b>	<b>TF (%)<sup>1</sup></b>
Bragg	30	11	36.7
BRS 137	30	11	36.7
BRSMG 68	30	22	73.3
Vencedora	30	04	13.3
Embrapa 48	30	17	66.7
IAS-5	30	25	83.3
MG/BR 46	30		
Conquista			

HR – hairy-root; TF – Transformation Frequency

<sup>1</sup> Transformation frequency = Number of seedlings expressing GFP protein in at least one hairy-root / total number of seedlings inoculated



**Table 2.** *In vitro* *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of six brazilian soybean genotypes with pCAMBIA1301

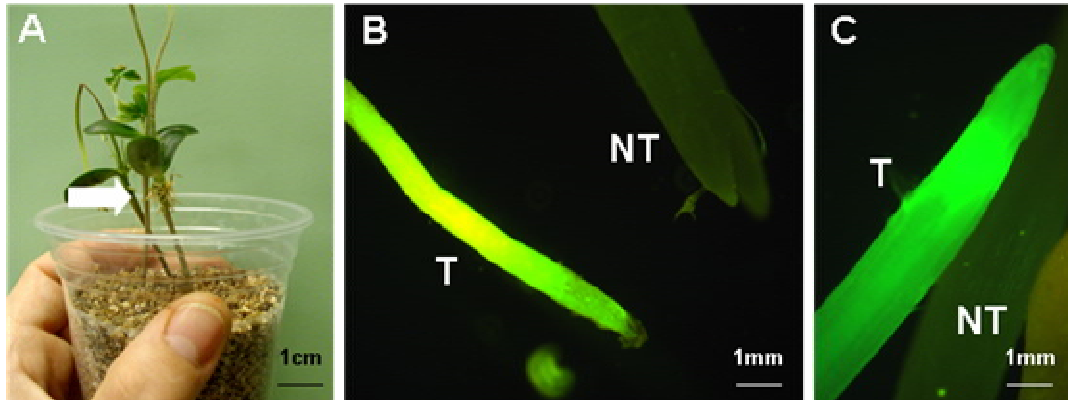
<b>Genotype</b>	<b>Number of cotyledons inoculated</b>	<b>Number of cotyledons with HR</b>	<b>DAI<sup>(1)</sup></b>	<b>HR GUS<sup>+(2)</sup></b>	<b>TF (%)<sup>(3)</sup></b>
Bragg	50	30	13.1 ± 0.9 a	07	14
BRS 137	50	21	14.8 ± 1.4 a	09	18
BRSMG 68	50	40	11.1 ± 0.7 b	20	40
Vencedora	50	24	14.5 ± 2.1 a	09	18
Embrapa 48	50	31	14.6 ± 1.1 a	12	24
MG/BR 46 Conquista	50	41	10.6 ± 0.8 b	26	52

HR – hairy-root; TF – Transformation Frequency; DAI - Days for hairy-root emergence after bacterial infection

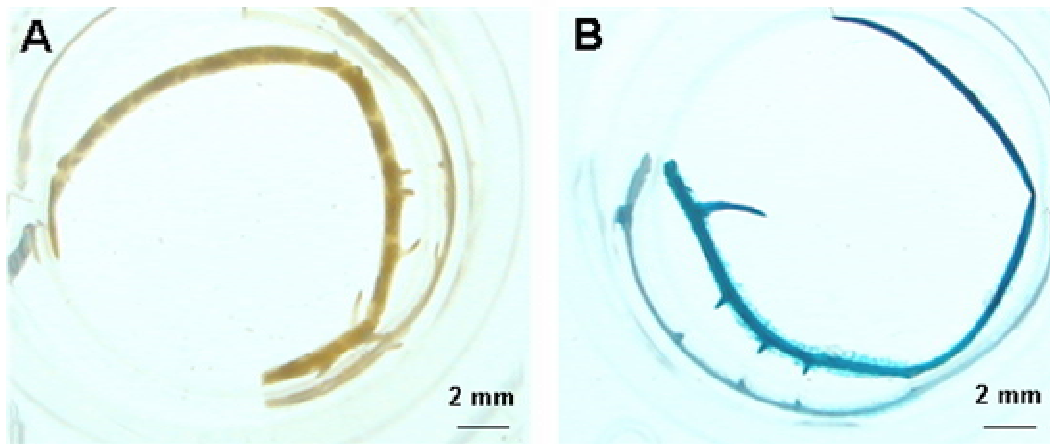
<sup>1</sup> Means ± SE followed with the same letters were not significantly different at 5% confidence level as detected by LSD tests

<sup>2</sup> Data from histochemical assay for GUS expression

<sup>3</sup> Transformation frequency = number of GUS<sup>+</sup> hairy-root / total number of cotyledons inoculated



**Figure 1.** GFP expression in transgenic hairy-roots obtained from the *ex vitro* *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. A: hairy-roots induced from inoculated seedlings; B and C: GFP expression of transgenic hairy-roots (T) and non-transgenic (NT) plants were observed using a fluorescence microscope.



**Figure 2.** GUS expression in hairy-roots from *in vitro* protocol. A: hairy-root induced by wild-type K599; B: hairy-root induced by K599 with pCAMBIA1301 vector.

**Transgenic soybean expressing an osmotin-like protein  
from *Solanum nigrum* var. *americanum* (SnOLP): an  
alternative to achieve fungal resistance and drought  
tolerance**

Manuscrito em preparação

O conteúdo deste trabalho faz parte de um encaminhamento de pedido de patente

**Transgenic soybean expressing an osmotin-like protein from *Solanum nigrum* var. *americanum* (SnOLP): an alternative to achieve fungal resistance and drought tolerance**

Ricardo Luís Mayer Weber<sup>1\*</sup>, Beatriz Wiebke-Strohm<sup>1\*</sup>, Márcia Margis-Pinheiro<sup>1</sup>, Rogério Margis<sup>2</sup>, Paulo Bertagnolli<sup>3</sup>, Maria Fátima Grossi de Sá<sup>4</sup>, Magnólia Campos<sup>4</sup>, Fernanda Spier<sup>1</sup>, Lauro Bucker-Neto<sup>1</sup>, Maria Eugênia Lisei de Sá<sup>4</sup>, Regina Maria Santos de Amorim<sup>4</sup>, André Vinícius Júlio Ferreira<sup>4</sup>, Giancarlo Pasquali<sup>2</sup>, Maria Helena Bodanese-Zanettini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Brazil; <sup>3</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Trigo, Passo Fundo, Brazil; <sup>4</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Cenargen, Brasília, Brazil.

Corresponding author: Maria Helena Bodanese-Zanettini, e-mail: maria.zanettini@ufrgs.br, current address: Departamento de Genética, Instituto de Biociências, CP 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

\* These authors contributed equally to the work.

**Key words:** Genetic transformation, *Glycine max*, osmotin, plant resistance, biotic stress, abiotic stress.

## Abstract

The present study was carried out with the objective of overexpress in soybean plants an osmotin-like protein from *Solanum nigrum* var. *americanum* (SnOLP) to enhance resistance to fungal pathogens and drought tolerance. Adult and fertile plants representing three independent transformation events were obtained. Protein extracts from transgenic plants impaired the hyphal growth of *Rhizoctonia solani* and *Phomopsis* sp. In addition transgenic plants were observed to better tolerate seven days of drought stress when compared with wild-type plants. The results obtained indicate the usefulness of *SnOLP* in developing soybean transgenic plants with enhanced tolerance against abiotic and biotic stresses.

## Introduction

Soybean, one of the most important cultivated species, is a valuable source of oil and protein. Many abiotic and biotic stresses limit the high yield of soybean. Drought is one of the major constraints for soybean production in Brazil (Oya *et al.*, 2004). Besides, the expansion of cultivation into new areas, monoculture and the use of inappropriate practices have increased the number of diseases caused by fungi, bacteria, viruses and nematodes, and other unknown abnormalities (Suzuki & Yuyama, 2005). More than 30 soybean fungal diseases, including those caused by oomycetes, have been reported in the United States (Li & Yang, 2009). Generation of resistant cultivars is the most efficient measure to control diseases, but there are no resistant germplasm for some pathogens (Miles *et al.* 2007). Therefore, development of alternatives that contribute to control soybean fungal diseases is of great interest, especially the exploration of new antifungal compounds and generation of transgenic plants exhibiting higher resistance against these pathogens.

The PR-5 (Pathogenesis-Related proteins-5) protein family (Van Loon & Van Strien, 1999) comprises plant proteins involved in diverse biological

processes such as plant development (Neale *et al.*, 1990), protection against osmotic stress (LaRosa *et al.*, 1992), freezing tolerance (Newton & Duman, 2000) and, defense against plant pathogens (Midoro-Horiuti *et al.*, 2001).

Osmotins (osmotin-like proteins or OLPs), members of PR-5 family, display size of approximately 26 kDa and show high homology to thaumatin protein (Yun *et al.*, 1997). Osmotins are produced in plants under different abiotic and biotic stresses (Singh *et al.*, 1987, Zhu *et al.*, 1995, Gimeno *et al.*, 2009, Harada *et al.*, 2010, Mukherjee *et al.*, 2010, Tada & Kashimura, 2010; Margaria & Palmano, 2011). These proteins were identified in several plants such as strawberry (Zhang & Shih, 2006), *Atriplex nummularia*, a halophyte plant (Casas *et al.*, 1992), *Arabidopsis thaliana* (Capelli *et al.*, 1997), a lactiferous *Calotropis procera* (Teixeira de Freitas *et al.*, 2011), petunia (Kim *et al.*, 2002) and soybean (Onishi *et al.*, 2006, Tachi *et al.*, 2009). It was suggested the possible use of osmotin in human diseases treatment, as it mimics the activity of a hormone associated to weight loss, heart diseases, diabetes and some types of tumors (Narasimhan *et al.*, 2005).

The mechanism of antifungal action of osmotin-like proteins is not yet completely understood. It is known, however, that osmotin can permeabilize the cell membranes of fungi, which prevents the maintenance of the pH gradient and result impaired pathogen development (Yun *et al.*, 1997). This probably explains the *in vitro* growth inhibition of various pathogens when treated with purified osmotin. Abad *et al.* (1996) showed that hyphal growth and spore germination of *Bipolaris*, *Fusarium* and *Phytophthora* (economically important fungal plant pathogens) is inhibited by tobacco osmotin. An osmotin-like protein of *Calotropis procera* presented antifungal activity against *Fusarium solani*, *Neurospora* sp. and *Colletotrichum gloeosporioides* (Teixeira de Freitas *et al.*, 2011). Monteiro *et al.* (2003) reported that osmotin and thaumatin-like proteins from grape exhibited strong antifungal activities, blocking the growth of *Phomopsis viticola* and *Botrytis cinerea* mycelia.

Overexpression of osmotin encoding genes in transgenic plants has been reported in previous studies. Liu *et al.* (1994) and Zhu *et al.* (1995) showed that leaves of transgenic potato expressing tobacco osmotin exhibited a decrease in symptoms caused by the oomycete *Phytophthora infestans*, indicating that osmotin can be used as a source of resistance to diseases. Resistance to *Fusarium wilt* was obtained by Ouyang *et al.* (2005) in tomato expressing tobacco osmotin.

Beyond the antifungal activity the osmotin overexpression can also confer tolerance to abiotic stresses, especially salinity and drought. This property was shown in transgenic plants of tobacco (Barthakur *et al.* 2001), wheat (Noori & Sokhansanj, 2008), strawberry (Husaini & Abdin 2008), cotton (Parkhi *et al.* 2009), chilli pepper (Subramanyam *et al.*, 2010) and tomato (Goel *et al.*, 2010). Das *et al.* (2011) showed that transgenic mulberry expressing tobacco osmotin was more tolerant to salinity and drought stress, as well as more resistant to three fungi species, known to cause serious losses to mulberry cultures. Additionally, the cryoprotective function of osmotin was reported by D'Angeli & Altamura (2007) in transgenic olive trees. Numerous studies have been developed to determine physiological role of osmotin in stress tolerance, but the mechanism of its action is still unknown. Osmotin can act in osmotolerance by facilitating the compartmentation of solutes (Barthakur *et al.* 2001) or by metabolic/structural alterations during osmotic adjustment (Singh *et al.*, 1987, 1989; Zhu *et al.*, 1995).

The genus *Solanum* has a broad set of genes with potential to confer pathogen resistance (Vleeshouwers *et al.*, 2000). *Solanum nigrum* var. *americanum*, a weed of Solanaceae family, is a highly fungal resistant plant. It was assumed that PR-5 encoding genes were involved in the *S. nigrum* resistance potential (reviewed in Zhu *et al.*, 1995).

Campos *et al.* (2002) characterized two genes that encode PR-5 proteins from *S. nigrum* var. *americanum*. Both predicted gene products showed a high homology with tobacco osmotin. The protein molecular modelings indicate an antifungal activity. To validate the putative toxicity against fungi, Campos *et al.*



(2008) overexpressed SnOLP (*Solanum nigrum* Osmotin-like Protein) in *Escherichia coli* and showed the *in vitro* antifungal action of the purified protein against some plant pathogenic fungi (*Fusarium solani* f. sp. *glycines*, *Colletotrichum* spp., *Macrophomina phaseolina*) and oomycete (*Phytophthora nicotiana* var. *parasitica*). The present study was carried out with the objective of overexpress SnOLP in soybean as a possible strategy to enhance fungal resistance and drought tolerance.

## **Material and Methods**

### Plant material and plasmid used for soybean transformation

Three soybean cultivars were used in this study. Bragg and IAS-5 are North American adapted cultivars and BRSMG 68 Vencedora was developed and released by Brazilian breeding programs (Brasil, 2009). These cultivars were selected due to their sensitivity to *Agrobacterium tumefaciens* (Droste *et al.* 1994, Wiebke-Strohm *et al.*, 2011), as well as their responsiveness to *in vitro* culture conditions (Droste *et al.* 2001, 2010).

The plant transformation vector was pCL1390-UBQ3-SnOLP, a pCAMBIA1390 derivative (Cambia.org). The T-DNA region contains (i) the complete ORF (Open Reading Frame) sequence encoding the SnOLP (GenBank accession AF450276) under control of UBQ3 promoter (UBQ3-P) from *Arabidopsis thaliana* (Callis *et al.*, 1995) and the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S terminator (T35S), and (ii) the hygromycin resistance gene *hptII*, driven by the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter (P35S) with a nopaline synthase gene (*nos*) terminator (Tnos). The scheme of T-DNA from pCL1390-UBQ3-SnOLP is shown in Figure 1.

### Transformation and regeneration of transgenic plants

Embryogenic tissue induced from immature cotyledons of IAS-5 and Bragg cultivars were transformed by particle bombardment using the Particle Inflow Gun

(PIG; *Finer et al.*, 1992) as described by *Droste et al.* (2002). Embryogenic tissues from BRSMG 68 Vencedora cultivar were transformed by the combined DNA-free particle bombardment and *A. tumefaciens* system as described by *Wiebke-Stroh et al.* (2011). Conditions for selection of transgenic material, embryo histodifferentiation, maturation and regeneration of transgenic plants are described in previous studies (*Droste et al.*, 2002; *Wiebke-Stroh et al.*, 2011).

Plants regenerated from the transformed embryogenic tissues were considered the primary transgenic generation (T<sub>0</sub>). Plants derived from an isolated piece of hygromycin-resistant tissue were noted as cloned plants (one transformation event).

Plants regenerated from untransformed embryos were used as control. The somatic embryos were subjected to both transformation system without plasmid, but were not submitted to selection with hygromycin.

#### PCR analysis

Genomic DNA was extracted from transformed and untransformed soybean plants using a CTAB method procedure described by *Doyle and Doyle* (1987) with modifications (*Homrich et al.*, 2008). PCR analyses were performed with specific primers for *SnOLP* gene (PPS1-forward 5'-CGCGGATCCATGGGCTACTTGAGATCT-3' and PCPT-reverse 5'-CCCAAGCTTTTACTTGGCCACTTCATC-3'), which amplify a 744 bp DNA fragment, or *hptII* gene (forward 5'-GCGATTGCTGATCCCCATGTGTAT-3' and reverse 5'-GGTTTCCACTATCGGCGAGTACTT-3'), which amplify a 512 bp DNA fragment. The PCR reaction mixture consisted of 100 ng of template DNA, 0.2 mM of dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X Taq Buffer, 2 units of Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase (Invitrogen), 0.5 μM of each primer. Reactions were hot-started (3 min at 94 °C) and subjected to 25 cycles as follows: 1 min at 94 °C; 1 min at 50 °C and 2 min at 72 °C with a final extension of 72 °C for 5 min. All amplifications reactions were carried out in a PCR Express Thermal Cycler (Thermo Hybaid, UK). PCR-amplified products were analyzed in 1% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

Reverse transcription, quantitative (real-time) PCR (RT-qPCR) for RNA expression analysis and transgene copy number estimation

Total RNA was extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) and further treated with DNase I (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNAs were obtained by using approximately 2 µg of RNA, M-MLV Reverse Transcriptase System™ (Invitrogen, Carlsbad, USA) and 24-polyVT primer.

RT-qPCR was conducted in a StepOne Applied Biosystem Real-time Cycler™. PCR-cycling conditions were implemented as follows: 5 min at 94 °C, followed by 40 repetitions of 10 s at 94 °C, 15 s at 60 °C and 15 s at 72 °C, by the end 2 min at 40 °C. A melting curve analysis was performed at the end of PCR run, over the range 55-99 °C, increasing the temperature stepwise by 0.1 °C every 1 s. Each 25 µL reaction comprised 12.5 µL diluted DNA template, 1x PCR buffer (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 2.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.024 mM dNTP, 0.1 µM each primer, 2.5 µL SYBR-Green (1:100.000, Molecular Probes Inc., Eugene, USA) and 0.3 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil). Two different templates were evaluated: first-strand cDNA-reaction product (1:100) in relative expression analyzes and genomic DNA (1:100, 1:1.000 e 1: 10.000) for gene copy number estimation. All PCRs were carried out in technical quadruplicates. No-template reactions were used as negative controls.

Primer pairs with a T<sub>m</sub> at 60 °C were designed to amplify sequences corresponding to SnOLP (forward 5'-TCAAAGCGTATTCGGCTAGG-3' and reverse 5'-CAACTTCGATGGTGCTGGTA-3'), an F-Box protein (forward 5'-AGATAGGGAAATGTTGCAGGT-3' and reverse 5'-CTAATGGCAATTGCAGCTCTC-3') a Metalloprotease (forward 5'-ATGAATGACGGTCCCATGTA-3' and reverse 5'-GGCATTAAAGGCAGCTCACTCT-3') and a Lectin (forward 5'-TACCTATGATGCCTCCACCA-3' and reverse 5'-GAGAACCCTATCCTCACCCA-3'). FBox and Metalloprotease were used as internal controls to normalize the amount of mRNA present in each sample (Jian *et al.*, 2008; Libault *et al.*, 2008).

All expression data analyses were performed after comparative quantification of amplified products using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak & Schmittgen, 2001). The Lectin gene was used as reference to normalize the amount of DNA present in each sample (Schmidt & Parrott, 2001). Transgene copy number was estimated using the relative quantification by standard curve analysis (Shou *et al.*, 2004).

#### Protein expression analysis

For protein expression analysis 0.2 g of fresh leaf tissue was excised from transgenic T<sub>0</sub> plants and non-transgenic plants, and homogenized in 500 µL of extraction buffer [containing 50 mM of 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.2% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP-40) and 1% (v/v) β-mercaptoethanol]. Samples were stirred for 30 min at 4 °C and then clarified by centrifugation at 10,000g. The protein content in crude extract was determined by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard. For each plant, approximately 50 µg of crude protein extract was subjected to 12% (w/v) sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a nitrocellulose membrane. The presence of the SnOLP protein was detected using polyclonal antibody specific for tobacco osmotin (kindly supplied by Dr. Bernard Fritig and Dr. Pierrette Geoffroy - Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du C.N.R.S - France). The protein bands were visualized using the ECL *Western Blot* Detection and Analysis System (GE Healthcare).

#### Progeny analysis

T<sub>1</sub> seeds, obtained from self-pollination of T<sub>0</sub> plants, were planted in pots containing soil and maintained in a greenhouse. All plants were screened for *SnOLP* and *hptII* genes presence by PCR. A chi-square ( $\chi^2$ ) test was used to confirm the expected Mendelian segregation patterns of 3:1 (transgenic: non-transgenic). Seeds from T<sub>1</sub> PCR positive plants were saved to produce the T<sub>2</sub> generation (by self-pollination) and so on up to T<sub>7</sub> generation.

#### Fungal bioassay

The growth of soybean fungal pathogens *Rhizoctonia solani* and *Phomopsis sp.*, as well as the soybean non pathogens *Curvularia lunata* and *Penicillium herquei* was evaluated turbidimetrically according to Becker-Ritt *et al.* (2007). Briefly, 10  $\mu\text{L}$  spores suspension (100 spores/ $\mu\text{L}$ ) were inoculated onto 96-well plates containing 110  $\mu\text{L}$  of Potato Dextrose Broth (PDB, Becton Dickenson Co.) pH 7.0 and incubated at 28 °C. After 16 h, 15  $\mu\text{g}$  of protein crude extract diluted in 50  $\mu\text{L}$  protein extraction buffer were added to the fungal suspension (0 h). Plates were incubated at 28 °C and the absorbance (430 nm) was determined on a plate reader (Spectramax, Molecular Devices) every 12 h after protein addition. Fungal growth at 60 h was calculated proportionally to the 0 h absorbance, which was considered one. Protein extraction buffer and 9.5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  were used as experimental controls. Three sample/plant/fungus were tested.

#### Drought bioassay

Eight wild-type plants/cultivar (IAS-5 and Bragg) and eight homozygous plants from each transgenic line (I4 and B1) were grown under optimal conditions for 26 days in plastic pots containing 6 L of soil under greenhouse conditions. Care was taken to ensure that all the pots contained equal amount of soil. Plants were assessed for tolerance to water deficit stress by withholding irrigation along 10 days. Plants were monitored daily for wilting.

### **Results and Discussion**

Transgenic plants were obtained from both transformation systems. Hygromycin-resistant embryogenic clusters corresponding to five, 12 and one independent transformation events were rescued from cultivars Bragg, IAS-5 and BRSMG 68 Vencedora, respectively. Eight, 30 and five plants were recovered from IAS-5, Bragg and BRSMG 68 Vencedora transformed tissues, respectively. Plants were gradually exposed to environmental conditions for acclimation and later transferred into a greenhouse for further development. Two IAS-5 plants, proceeding from independent transformation events, 12 Bragg plants from a single

transformation event, and two BRSMG 68 Vencedora plants, from a single transformation event, were successfully established and achieved the maturity.

The transgenic and non-transgenic plants did not exhibit any visible phenotype difference, both flowered and set seeds. A low number of seeds (data not shown) was obtained for most transgenic and non-transgenic plants and may reflect the deleterious effect of *in vitro* culture conditions (Trick *et al.* 1997, Wiebke-Strohm *et al.*, 2011).

The stable integration of *SnOLP* and *hptII* transgenes into the genomes of hygromycin-resistant soybean plants was confirmed by PCR. Fragments with the expected size (512 bp for *hptII* and 744 bp for *SnOLP*) were detected in PCR products from transgenic plants, whereas no amplification was observed in untransformed plants (Figure 2A, B). Data confirmed that all Bragg and BRSMG 68 Vencedora plants, as well as one IAS-5 plant, were stable transformed. No PCR products for both tested genes were detected for the other IAS-5 plant; which was considered an "escape". Regeneration of "escapes" was previously reported (Olhoft *et al.*, 2003; Homrich *et al.*, 2008, Wiebke-Strohm *et al.*, 2011).

Subsequent experiments were carried out with transgenic plants regenerated from three independent events (one from Bragg, one from IAS-5 and one from BRS MG 68 Vencedora), since they exhibited stable transgene integration and led progeny. The expression of *SnOLP* was first evaluated by RT-qPCR (Figure 2C). Similar expression levels were observed in non-transformed plants (WT) from the three soybean cultivars. As expected, increased transcript levels were detected in all transgenic events. The expression of *SnOLP* was confirmed by *Western blot* in plants of IAS-5 and Bragg cultivars. BRSMG 68 Vencedora was not included in this analysis. Using a polyclonal antibody against tobacco osmotin, a single band of approximately 27 kDa, corresponding to *SnOLP* protein was detected only in PCR positive plants (Figure 2D). Altogether, these data confirmed the successful obtainment of soybean transgenic plants overexpressing the *SnOLP* gene.

T<sub>1</sub> progenies were used for *hptII/SnOLP* transgenes segregation analysis by PCR. Twenty to 30 seeds harvested from each T<sub>0</sub> PCR-positive plant (IAS-5 - event I4, BRSMG 68 Vencedora - event V5, and a sample of three Bragg plants - B1, B7 and B12) were sowed and the T<sub>1</sub> plants analyzed. As shown in Table 1, in I4 progeny from IAS-5, B1 from Bragg and V5 from BRSMG 68 Vencedora cultivars the transgenes segregated as a single dominant locus as predicted by Mendelian principles. In B7 and B12 transgenic Bragg progenies the transgenes segregated in an exceptional manner, with deficiency of PCR positive plants. The transgene locus is considered to be hemizygous in the primary (T<sub>0</sub>) transformant. Therefore, transgenes are generally expected to behave as dominant single gene and segregate in a 3:1 proportion when the plant is self-pollinated (Campbell *et al.*, 2000). The unusual segregation ratios result from a number of factors, including inactivation of transgene expression, insertion leading to a lethal mutation and poor transgene transmission to the progeny (Homrich *et al.*, 2008).

Heterozygous and homozygous plants may have different phenotypes due to a transgene dosage effect (Beaujean *et al.*, 1998). Therefore, it is necessary to identify homozygous plants among the descendants. The transgene segregation observed in the present work fits the expected 3:1 segregation ratio for three progenies (I4, B1 and V5). The T<sub>2</sub> generations of this progenies were used to obtain homozygous plants. Null segregants were discarded and the positive ones were sowed. About 20 T<sub>3</sub> plants from each progeny were sowed, in line. Plants were individually PCR screened. Lines with all PCR-positive plants were considered homozygous and saved to produce seeds for other experiments. Homozygous lines of IAS-5 and Bragg (events I4 and B1, respectively) were propagated for seven generations without loss of the transgenes (data not shown). BRSMG 68 Vencedora is in the third generation and no homozygous line was identified so far.

In order to determine the number of SnOLP transgene integrated into plant genome, one T<sub>1</sub> heterozygous plant from each independent transformation event was assayed by qPCR (Shou *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2007). Lectin was used as reference gene to eliminate variations in template amount among samples

(Schmidt & Parrott, 2001). Two lectin-encoding genes are present in soybean, what means four alleles in the diploid genome. Similar efficiencies in PCR reactions allowed the comparison between *SnOLP* and lectin genes. The copy number of transgene was calculated proportionally to the endogenous gene. Interestingly, a single insertion of *SnOLP* was detected in the three evaluated events, two of them derived from bombardment and one from the bombardment/*A. tumefaciens* system. A high number of transgene insertions are expected from bombardment-derived plants, while low transgene copies are usually observed in *A. tumefaciens*-derived lines (Kohli *et al.* 2003). The insertion of one transgene copy into the plant genome by particle bombardment is rare, but was previously observed in soybean (Christou, 1992; Hadi *et al.*, 1996).

The SnOLP effect on fungal vegetative growth was demonstrated by a turbidimetric assay. Two soybean fungal pathogens (*R. solani* and *Phomopsis sp.*), one banana pathogen (*C. lunata*), and one maize pathogen (*P. hergueli*) were included in the test due to their response to the experimental conditions (Becker-Ritt *et al.*, 2007). Rice transgenic plants overexpressing tobacco osmotin displayed high level of resistance against *R. solani* (Rao *et al.*, 2011). On the other hand, Abad *et al.* (1996) showed that *R. solani* was completely insensitive to purified tobacco osmotin in *in vitro* assay. A grape osmotin-like protein exhibited strong antifungal activity *in vitro*, blocking the growth of *Phomopsis viticola* (Monteiro *et al.*, 2003).

As result of hyphal development an increased turbidity of the medium was observed over the time (Figure 3). To evaluate the effect of SnOLP overexpression on fungal growth capacity, results obtained from transgenic and non-transgenic plants of the same cultivar must be compared. *C. lunata* growth was significantly lower in the presence of protein extracts from the three transgenic events when compared to extracts from non-transgenic plants. On the other hand, the growth of *P. hergueli*, *Phomopsis sp.* and *R. solani* was significantly reduced in presence of protein extracts from two transgenic events (B1 and V5).



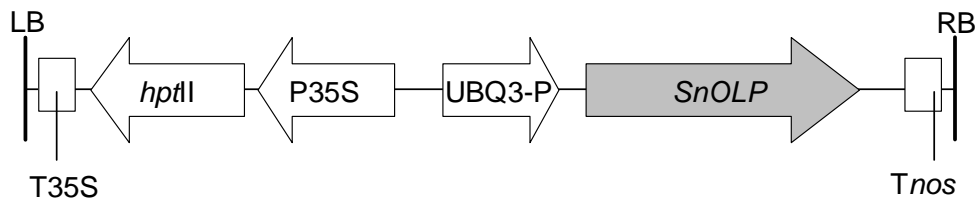
Osmotin has been reported to be effective against a number of economically important fungal pathogens. A high concentration of osmotin can cause the lysis of hyphae tips (Woloshuk *et al.* 1991; Vigers *et al.* 1991). Osmotin expression in transgenic plants was found to delay the development of disease symptoms in several plants such as potato (Liu *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1995), tomato (Ouyang *et al.*, 2005) and mulberry (Das *et al.*, 2010). Since the single difference between transgenic and non-transgenic plants must be the *SnOLP* expression, our results indicate that in soybean this protein impaired fungal growth. Therefore we assumed that *SnOLP* overexpression can be a strategy to reduce symptoms of soybean fungal diseases.

In order to evaluate the response of whole transgenic plants to water deficit the irrigation was withheld. After seven days, transgenic plants performed better than the non-transgenic plants (Figure 4). Wild-type plants exhibited visible loss of turgidity, becoming limp and droopy. Transgenic plants appeared quite healthy until 10 days withheld irrigation, when they started withering (data not shown). Differences between transgenic and non-transgenic plants were more prominent for cultivar Bragg than for IAS-5. These results can be accounted for the variation in drought tolerance of soybean cultivars (Oya *et al.*, 2004). Anyway, the results obtained in the present study suggested that *SnOLP* expression improved drought tolerance in transgenic soybean plants. Similar results were described for transgenic cotton, tomato and mulberry plants overexpressing tobacco osmotin (Parkhi *et al.* 2009; Das *et al.*, 2010; Goel *et al.*, 2010).

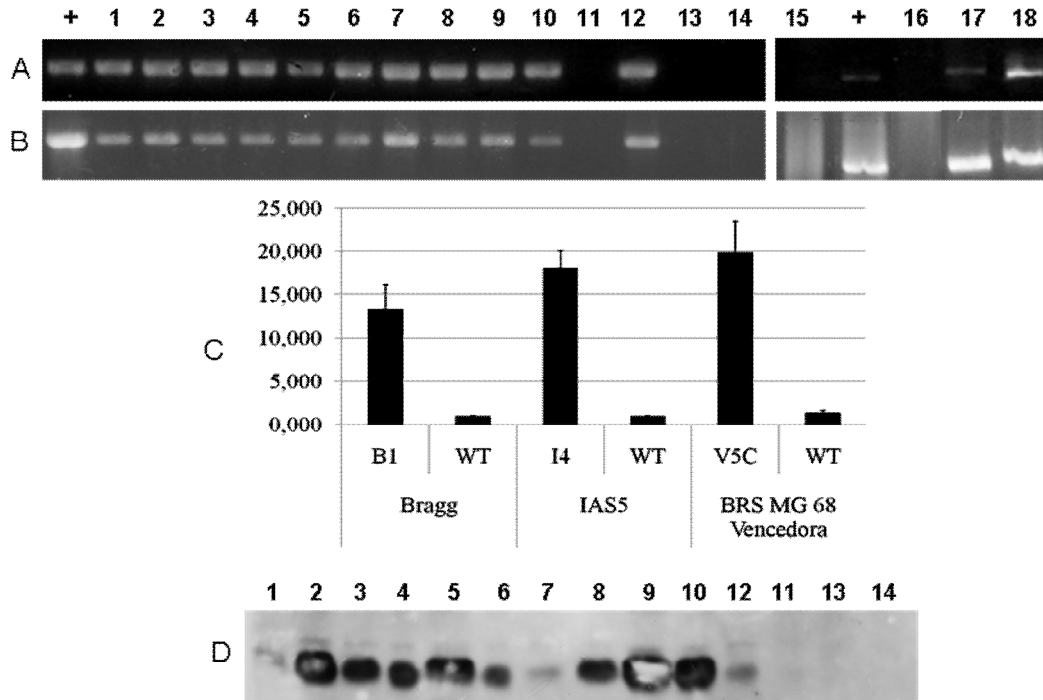
Tobacco osmotin has been used to develop transgenic plants able to tolerate salt, drought, as well as increase resistance to fungal diseases. The results obtained in the present study indicate the usefulness of *SnOLP* in developing soybean transgenic plants with enhanced tolerance against abiotic and biotic stresses.

**Table 1.** Segregation of the T<sub>1</sub> generation obtained from the T<sub>0</sub> generation of transgenic soybean plants positive for *hptII* gene. The segregation ratios were tested using the chi-square test.

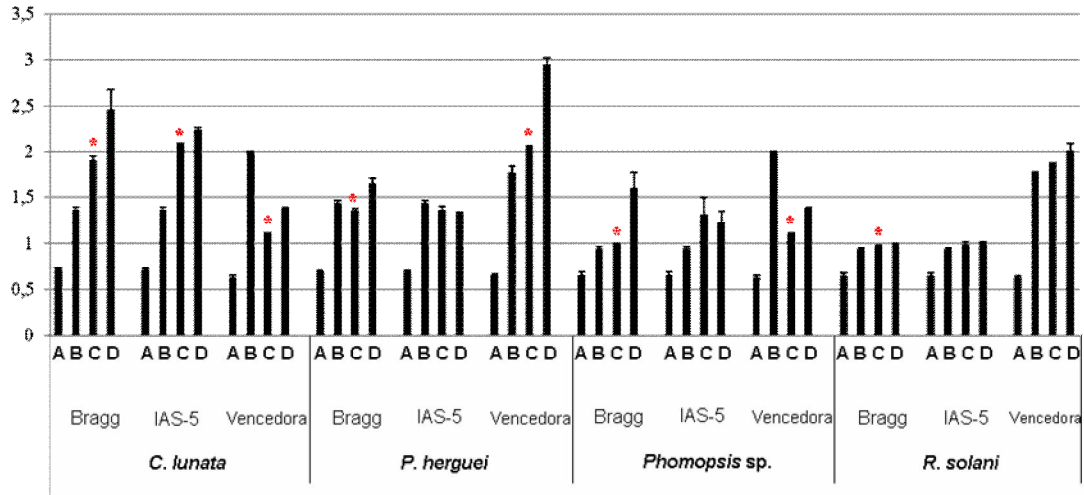
Plant (T <sub>0</sub> )	Cultivar	N° of plants (T <sub>1</sub> generation)	<i>hpt/SnOLP</i>		Expected ratio	<i>p</i> value
			+	-		
<b>B1</b>		20	11	9	3:1	>0.05
<b>B7</b>	Bragg	29	16	13	3:1	<0.05
<b>B12</b>		26	14	12	3:1	<0.05
<b>I4</b>	IAS-5	30	24	6	3:1	>0.05
<b>V5</b>	BRSMG 68 Vencedora	20	12	8	3:1	>0.05



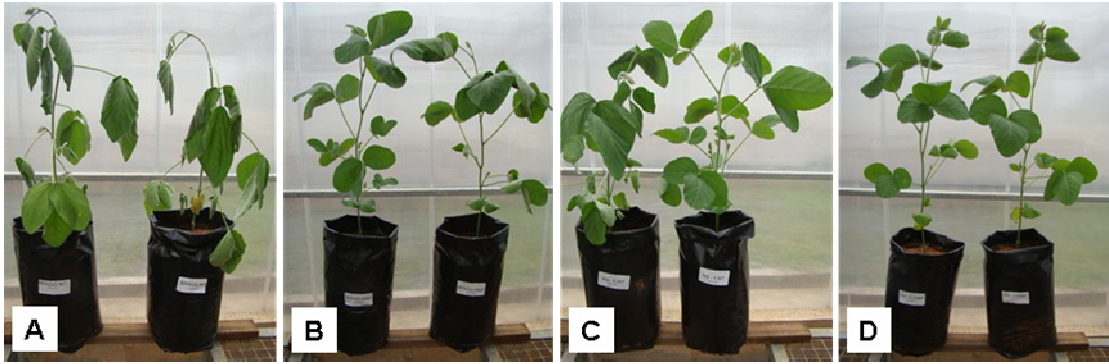
**Figure 1.** Diagram of the T-DNA region of binary vector pCL1390-UBQ3-SnOLP. BR T-DNA right border, BL left border, *hptII* hygromycin phosphotransferase gene, P35S Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter, *Tnos* nopaline synthase gene terminator, T35S CaMV 35S terminator.



**Figure 2.** Molecular analysis in transgenic soybean plants. PCR products of *hptII* (A) and *SnOLP* (B) genes amplified from DNA extracted from controls or transgenic plants pCL1390-UBQ3-*SnOLP* (+); plants from transgenic event from Bragg (1–10); escape, I3 (11), IAS-5 event I4 (12); wild-type plants (13, 14, 15 – Bragg, IAS-5 and BRSMG 68 Vencedora, respectively); plants from event V5 (17 and 18). **C** *SnOLP* expression in transgenic and non-transgenic (WT) plants. Three transgenic lines (B1, I4 and V5) were evaluated. Data represents the mean±SD of two pools (six plants/pool) from B1 and I4 transformation events, as well as from non-transformed plants. Four plants from V5 transformation event were assayed. F-Box protein, Metalloprotease and Actin 11 reference genes were used as internal controls to normalize the amount of mRNA present in each sample. Transcript level of *SnOLP* present in non-transformed plants was used to normalize transcript accumulation in transgenic plants. **D** Detection of SnOLP protein (~27 kDa) in soybean plants by *Western blot* hybridization. Transgenic plants from Bragg event (1-10); plant from IAS-5 event I4 (11), and I3 (12); Bragg and IAS-5 wild-type (13 and 14, respectively).



**Figure 3.** Fungal growth after 60 h on soybean crude extracts of SnOLP overexpressing plants. Spores (1000 spores in 10  $\mu$ L) were inoculated in 110  $\mu$ L PDB, incubated at 28  $^{\circ}$ C for 16 h and subsequently leaf protein crude extract (15  $\mu$ g in 50  $\mu$ L) was added to the fungal culture. Samples were incubated at 28  $^{\circ}$ C and the absorbance (430 nm) was recorded after 60 h. The mean $\pm$ SD was calculated proportionally to the 0 h absorbance, which was considered one. The experiment was carried out with two pools (six plants/pool) from B1 and I4 transformation events, as well as from non-transformed plants. Four plants from V5 transformation event were assayed. Three technical replicates were analyzed per sample. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and protein extraction buffer were taken as positive and negative controls of the experimental conditions, respectively. For biological interpretations, transgenic and non transgenic plants of the same cultivar must be compared. A: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; B: Buffer; C: Transgenic plant; D: Wild-type plant. (\*) growth means significantly different between transgenic and non-transgenic samples in the same fungus/experiment (t-student test, p<0.05).



**Figure 4.** Physical appearance of non-transgenic and transgenic plants expressing SnOLP protein after the withholding of water for seven days. Bragg wild-type (A) and transgenic (B) plants; IAS-5 wild-type (C) and transgenic (D) plants.

## References

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

Barthakur S, Babu V, Bansal KC (2001) Overexpression of osmotin induces proline accumulation and confers drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol* 45: 346–350.

Beaujean A, Sangwan RS, Hodges M, Sangwan-Norreel, BS (1998) Effect of ploidy and homozygosity on transgene expression in primary tobacco transformants and their androgenetic progenies. *Molecular and General Genetics* 260 (4): 362-371.

Becker-Ritt, A.B., A.H. Martinelli, S. Mitidieri, V. Feder, G.E. Wassermann, L. Santi, M.H. Vainstein, J.T. Oliveira, L.M. Fiuza, G. Pasquali, and C.R. Carlini. (2007) Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon* 50: 971-983.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Zoneamento agrícola de risco climático: cultivares de soja ano-safra 2008/2009. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. acesso em 04 Nov. 2009.

Callis J, Carpenter T, Sun C, Vierstra RD (1995) Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype columbia. *Genetics*, 139: 921-939.

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

Campos M de A, Silva MS, Magalhaes CP, Ribeiro SG, Sarto RP, Vieira EA, Grossi de Sá MF (2008) Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum*. *Microb Cell Fact* 7:7

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

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

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

Christou P (1992) Soybean and other *Glycine* species. p. 37-127. In: Genetic Engineering and In Vitro Culture of Crop Legumes. Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster Basel.

D'Angeli S, Altamura MM (2007) Osmotin induces cold protection in olive trees by affecting programmed cell death and cytoskeleton organization. *Planta* 225: 1147–1163.

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

Droste A, Bodanese-Zanettini MH, Mundstock E, Hu CY (1994) Susceptibility of Brazilian soybean cultivars to *Agrobacterium tumefaciens*. *Brazil J Genet* 17: 83–88.

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



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

Droste A, Silva AM, Souza IF, Wiebke-Strohm B, Bucker-Neto L, Bencke M, Sauner MV, Bodanese-Zanettini MH (2010) Screening of Brazilian soybean genotypes with high potential for somatic embryogenesis and plant regeneration. *Pesq Agrop Bras* 45: 715-720.

Gimeno J, Gadea J, Forment J, Pérez-Valle J, Santiago J, Martínez-Godoy MA, Yenush L, Bellés JM, Brumós J, Colmenero-Flores JM, Talón M, Serrano R (2009) Shared and novel molecular responses of mandarin to drought. *Plant Mol Biol*. 70(4): 403-20.

Goel D, Singh AK, Yadav V, Babbar SB, Bansal KC (2010) Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Protoplasma* 245: 133-41.

Hadi MZ, McMullen MD, Finer JJ (1996) Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Rep*. 15: 500-505.

Harada E, Kim JA, Meyer AJ, Hell R, Clemens S, Choi YE (2010) Expression profiling of tobacco leaf trichomes identifies genes for biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Physiol*. 51(10): 1627-37.

Homrich MS, Passaglia LMP, Pereira JF, Bertagnolli PF, Pasquali G, Zaidi MA, Altosaar I, Bodanese-Zanettini MH (2008) Resistance to *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill, Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. *Genet Mol Biol* 31: 522-531.

Husaini AM, Abdin MZ (2008) Development of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa* Dutch.) plants tolerant to salt stress. *Plant Sci* 174: 446–455.

Jian B, Liu B, Bi Y, Hou Y, Wu C, and Han T (2008) Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. *BMC Mol Biol* 9:1-14.

Kim H, Mun JH, Byun BH, Hwang H, Kwon YM, Kim S (2002) Molecular cloning and characterization of the gene encoding osmotin protein in *Petunia hybrida*, *Plant Sci* 162: 745–752.

Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E, Christou P (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol Biol* 52: 247-258.

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

Li X and Yang XB (2009) Similarity, pattern, and grouping of soybean fungal diseases in the United States: Implications for the risk of soybean rust. *Plant Disease* 93 (2): 162-169.

Libault M, Thibivilliers R, Bilgin DD, Radwan O, Benitez M, Clough SJ, Stacey G (2008) Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. *Plant Genome* 1: 44-54.

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

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T))Method. *Methods* 25: 402-408.

Margaria P, Palmano S (2011) Response of the *Vitis vinifera* L. cv. 'Nebbiolo' proteome to Flavescence dorée phytoplasma infection. *Proteomics* 11 (2): 212-24.

Midoro-Horiuti T, Brooks EG, Goldblum RM (2001) Pathogenesis-related proteins of plants as allergens. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 87: 261–271.

Miles MR, Levy C, Morel W, Mueller T, Steinlage T, van Rij N, Frederick RD, and Hartman GL (2007) International fungicide efficacy trials for the management of soybean rust. *Plant Dis* 91:1450-1458.

Monteiro S, Barakat M, Piçarra-Pereira MA, Teixeira AR, Ferreira RB (2003) Osmotin and Thaumatin from Grape: A Putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology* 93 (12): 1505-12.

Mukherjee AK, Carp MJ, Zuchman R, Ziv T, Horwitz BA, Gepstein S. (2010) Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*. *J Proteomics* 73 (4): 709-20.

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

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

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

Noori SAS, Sokhansanj A (2008) Wheat plants containing an osmotin gene show enhanced ability to produce roots at high NaCl concentration. *Russ J Plant Physiol* 55: 256–258.

Olhoft 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.

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

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

Oya T, Nepomuceno AL, Tobita S, Neumaier N, Farias JRB, Ito O (2004) Drought tolerance characteristics of brazilian soybean cultivars – evaluation and characterization of drought tolerance of various Brazilian soybean cultivars in the field. *Plant Prod. Sci.* 7 (2): 129-137.

Parkhi V, Kumar V, Sunilkumar G, Campbell LM, Singh NK, Rathore KS (2009) Expression of apoplastically secreted tobacco osmotin in cotton confers drought tolerance. *Mol Breed* 23:625–639.

Schmidt M, Parrott W (2001) Quantitative detection of transgenes in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] and peanut (*Arachis hypogaea* L.) by real-time polymerase chain reaction. *Plant Cell Rep* 20: 422-428.

Shou H, Frame BR, Whitham SA, Wang K (2004) Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol Breeding* 13: 201-208.

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

Subramanian S, Graham MY, Yu O, Graham TL (2005) RNA interference of soybean isoflavone synthase genes leads to silencing in tissues distal to the transformation site and to enhanced susceptibility to *Phytophthora sojae*. *Plant Physiol* 137: 1–9.

- Suzuki S, Yuyama MM (eds) (2005) Boletim Técnico da soja. Fundação MT, 228p.
- Tachi H, Fukuda-Yamada K, Kojima T, Shiraiwa M, Takahara H (2009) Molecular characterization of a novel soybean gene encoding a neutral PR-5 protein induced by high-salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 73–79.
- Tada Y and Kashimura T (2010) Proteomic Analysis of Salt-Responsive Proteins in the Mangrove Plant, *Bruguiera gymnorhiza*. *Plant Cell Physiol.* 50 (3): 439-46.
- Teixeira de Freitas CD, Sousa Nogueira FC, Vasconcelos IM, Abreu Oliveira JT, Domont GB, Ramos MV (2011) Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. *Plant Physiol Biochem.*
- Trick HN, Dinkings RD, Santarém ER, Samoylov V, Meurer CA, Walker DR, Parrott WA, Finer JJ, Collins GB (1997) Recent advances in soybean transformation. *Plant Tissue Cult Biotechnol* 3: 9-24.
- Van Loon LC, Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.
- Vigers AJ, Roberts WK, Selitrennikoff CP (1991) A new family of plant antifungal proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 315-323.
- Vleeshouwers VGAA, Van Dooijeweert W, Govers F, Kamoun S, Colon LT. 2000. The hypersensitive response is associated with the host and non-host resistance to *Phytophthora infestans*? *Planta* 210: 853-864.
- Wiebke-Strohm B, Bücken-Neto L, Droste A, Homrich MS, Pasquali G, Passaglia LMP, Margis-Pinheiro M, Osorio MB, Bencke M, Bodanese-Zanettini MH (2011) Transgenic fertile soybean plants derived from somatic embryos transformed via the combined DNA-free particle bombardment and *Agrobacterium* system. *Euphytica* 177: 343–354.

Woloshuk CP, Meulenhoff JS, Sela-Buurlage M, van den Elzen PJM, Cornelissen BJC (1991) Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 3: 619-628.

Yuan Y *et al.* (2007) Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotech. J.* 5: 313-324.

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

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

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

## Conclusões e Perspectivas

---

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja e o Estado do Rio Grande do Sul é o terceiro maior produtor do Brasil. O grande interesse econômico desta espécie torna-a um importante alvo para o melhoramento genético. A transformação genética é uma ferramenta potencial para o aumento da qualidade das culturas e para a superação dos limites impostos pelo ambiente ao aumento da produção (Popelka *et al.* 2004). Entretanto, o sucesso com estas abordagens tem sido limitado, devido à falta de sistemas eficientes de regeneração e de transformação (Trick *et al.*, 1997; Wiebke-Strohm *et al.*, 2011).

As atuais mudanças climáticas que estamos enfrentando influenciam tanto fatores abióticos, como o regime de distribuição de chuvas e aumento da temperatura global, quanto os fatores bióticos, que podem ter suas complexas redes biológicas de interação amplamente afetadas pelo clima (Chakraborty & Newton, 2011). A busca por alternativas para enfrentar as dificuldades impostas pelo aquecimento global e o alto prejuízo causado pelos patógenos na produção de alimentos deve ser constante.

Além da prospecção de novos genes que confirmam resistência a diferentes tipos de estresse, é necessária a identificação de novas seqüências promotoras, que racionalizem a expressão de transgenes em experimentos de transformação genética. Por outro lado, é premente o estabelecimento de estratégias que diminuam a dependência dos grupos de pesquisa brasileiros em relação às seqüências promotoras de uso restrito a determinados grupos de pesquisa e empresas.

A caracterização de promotores órgão/tecido-específicos representa, portanto, um tema relevante de pesquisa visando disponibilizar novas ferramentas para a manipulação genética. A identificação de promotores com padrão de expressão raiz-específico é importante para estratégias de combate a nematóides e outras moléstias que tenham como alvo principal as raízes.

A obtenção de raízes transformadas através de *Agrobacterium rhizogenes* é, também, uma ferramenta bastante útil para testar promotores e novos genes de interesse. A metodologia descomplicada, pouco laboriosa e de rápida obtenção de resultados é essencial para atender às demandas da genômica funcional. É importante ressaltar a vantagem desta metodologia em possibilitar o teste de genes e promotores em vegetal homólogo de transformação, já discutida no Capítulo I.

Para a implementação do método de transformação mediada por *A. rhizogenes* em nosso laboratório, foram necessárias algumas etapas fundamentais, como a escolha de cultivares mais propícias para a transformação. No presente trabalho foi identificada a cultivar MG/BR 46 Conquista como a que apresenta maior eficiência de transformação e menor tempo para a produção de raízes transgênicas, dois parâmetros fundamentais para tornar a técnica mais eficiente. O método já está bem estabelecido no laboratório e, além da aplicação na análise de promotores, vem sendo utilizado para testar novos genes candidatos para a transformação da soja e para a localização subcelular de proteínas codificadas pelos genes em estudo.

No presente trabalho quatro novos promotores de soja foram isolados e parcialmente caracterizados: *GmAQP* (aquaporina – MIPC), *GmAS2* (asparagina sintase II), *GmEXT* (extensina) e *GmRB7* (semelhante a RB7 18C de tabaco). Estes resultados foram alcançados graças à disponibilidade do genoma da soja no banco de dados Phytozome, que abre várias perspectivas de trabalhos. A metodologia aplicada para a prospecção e caracterização dos promotores, unindo conhecimentos de bioinformática e transformação estável de raízes, se mostra bastante eficaz. Uma metodologia semelhante e com excelentes resultados é descrita por Hernandez-Garcia e colaboradores (2010).

Apesar de não ser possível responder todas as questões referentes ao padrão de expressão na planta inteira, é importante uma análise inicial através do sistema de transformação por *A. rhizogenes*. Um exemplo é a construção gênica com o promotor do gene *GmAQP*, que codifica uma aquaporina. O fragmento do



promotor utilizado em nosso experimento não foi capaz de propiciar a expressão em raízes. Este resultado foi obtido em poucas semanas. Se tivéssemos partido logo para uma abordagem de transformação na planta completa, só teríamos essa resposta após pelo menos um ano (contando a obtenção de embriões somáticos, etapas de transformação, seleção e regeneração dos transformantes primários). O método utilizado poupa tempo e dinheiro, bens escassos na pesquisa brasileira. Com base nos resultados obtidos até o momento, a caracterização do promotor de *GmAQP* será descontinuada, mas pretendemos confirmar o padrão de expressão na planta completa de soja dos outros três promotores candidatos (*GmAS2*, *GmEXT* e *GmRB7*).

O promotor de *GmRB7* está em estágio mais avançado de caracterização. Entretanto, ainda são necessários vários experimentos para a conclusão da caracterização deste promotor, tais como *Southern blot* para confirmar que as linhagens de tabaco são provenientes de eventos independentes de transformação, análise quantitativa da expressão de GUS, e testes para comprovar a possível resposta diferencial da expressão em condições de estresse. A confirmação ou não do padrão de expressão raiz-específico só será obtida após a transformação de plantas completas de soja.

As análises de deleção de fragmentos do promotor permitem a obtenção de resultados bastante interessantes sobre a arquitetura do promotor. Como discutido no Capítulo I, há a expectativa de identificação de um novo *cis*-elemento com atividade repressora da expressão gênica em ápices radiculares. A descoberta de novos *cis*-elementos é fundamental para o melhor entendimento do controle da expressão gênica e para a construção de promotores sintéticos. As construções gênicas com deleções de fragmentos de alguns dos promotores candidatos já estão prontas, sendo necessária apenas a transformação de raízes e análise dos resultados. Novas construções, com deleções que permitam o conhecimento detalhado do funcionamento do promotor, poderão ser feitas de acordo com as necessidades do estudo. A caracterização dos demais promotores candidatos será feita da mesma forma.

Após a caracterização completa, os promotores poderão ser empregados para direcionar a expressão de proteínas capazes de combaterem nematóides e outras pragas apenas nos órgãos-alvo do ataque, ou seja, raízes. Adicionalmente, a disponibilização de promotores raiz-específicos poderá permitir a regulação da expressão transgênica relacionada a vários outros fenótipos de interesse como, por exemplo, a síntese de alcalóides e outros metabólitos secundários, a tolerância à seca e a metais tóxicos, por exemplo.

No presente trabalho, com a expectativa de obter plantas transgênicas com maior resistência a moléstias fúngicas e tolerantes a seca, foi introduzido em soja o gene *SnOLP* de *Solanum nigrum* var. *americanum* através de sistemas de transformação bem estabelecidos em nosso laboratório. Foram obtidas três linhagens transgênicas independentes, todas com uma única cópia do transgene. A linhagem B1, proveniente da transformação da cultivar Bragg, apresenta melhores resultados, tanto na resposta a estresses bióticos (fungos) quanto abióticos (seca).

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que existe potencial para a aplicação do gene *SnOLP* em estratégias de melhoramento da soja. A próxima etapa será avaliar a resposta das plantas quando desafiadas com fungos economicamente importantes. Estão previstos também experimentos mais abrangentes para investigar as respostas fisiológicas das plantas quando submetidas ao estresse hídrico, bem como a avaliação agrônômica das mesmas. Estes testes são imprescindíveis para confirmar se as plantas obtidas serão de interesse ao setor produtivo.

## Referências Bibliográficas da Introdução Geral e Conclusões e Perspectivas

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

Atkinson HJ, Urwin PE, Hansen E, McPherson MJ (1995) Designs for engineered resistance to root-parasitic nematodes. *Trends in Biotechnology*, 13: 369-374.

Barros R (2009) Doenças da Cultura da Soja. *Tecnologia e Produção: Soja e Milho* 2008/2009, pp 109-122. Disponível em <[www.fundacaoms.org.br/request.php?97](http://www.fundacaoms.org.br/request.php?97)>

Barros R, Borges EP (2007) Doenças da cultura da soja *Soja. Tecnologia e Produção: Soja e Milho* 2006/2007. Disponível em <[www.fundacaoms.org.br/request.php?65](http://www.fundacaoms.org.br/request.php?65)>

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

Broothaerts W, Mitchell HJ, Weir B, Kaines S, Smith LMA, Yang W, Mayer JE, Roa-Rodriguez C, Jefferson RA (2005) Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 433: 629– 633.

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

Camargo TV, Yuyama MM (2001) Doenças que atacam a Soja. *Cultivar Grandes Culturas*. Disponível em <[www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=698](http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=698)>

Campos M de A, Silva MS, Magalhaes CP, Ribeiro SG, Sarto RP, Vieira EA, Grossi de Sa MF (2008) Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum*. *Microb Cell Fact* 7:7

Chakraborty S, Newton AC (2011) Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathology* 60: 2–14.

Chaves MM, Oliveira MM (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* 55 (407): 2365-2383.

Cho HJ, Farrand SK, Noel GR (2000) High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. *Planta* 210: 195–204.

Christey MC (2001) Use of Ri mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 37: 687– 700.

Christou P, Swain WF, Yang NS, McCabe DE (1989) Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7500-7504.

Collier R, Fuchs B, Walter N, Kevin LW, Taylor CG (2005) *Ex vitro* composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *The Plant Journal* 43:449–457.

Confalone AE, Costa LC, Pereira CR (1998) Crescimento e captura de luz em soja sob estresse hídrico. *Revista Brasileira de Agrometeorologia* 6 (2): 165-169.

COODETEC (2002). Doenças emergentes em soja. Cascavel: COODETEC: BAYER Crop Science, 51 p.

Crane C, Wright E, Dixon RA, Wang ZY (2006) Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens* transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta*, 223: 1344-54.

D'Angeli S and Altamura MM (2007) Osmotin induces cold protection in olive trees by affecting programmed cell death and cytoskeleton organization. *Planta* 225: 1147–1163.

Desclaux D, Huynh T, Roumet P (2000) Identification of soybean plant characteristics that indicate the timing of drought stress. *Crop Science* 40 (3): 716-722.

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

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

Embrapa Soja, disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br>> Acesso em novembro de 2010.

ERS-USDA, Soybeans and Oil <<http://www.ers.usda.gov/Briefing/SoybeansOilCrops>> Acesso em novembro de 2010.

Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Guillen G, Diaz-Camino C, Campos F, Quinto C, Gresshoff PM, Sanchez F (2007) Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols* 2: 1819–1824.

Fenille RC, Ciampi MB, Kuramae EE, Souza NL (2003) Identification of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil by rDNA-ITS sequences. *Fitopatol Bras* 28:413-419.

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

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

Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND (2005) Legumes as a model plant family: genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol* 137: 1228-1235.

Goel D, Singh AK, Yadav V, Babbar SB, Bansal KC (2010) Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Protoplasma* 245:133-41.

Goellner K, Loehrer M, Langenbach C, Conrath U, Koch E, Schaffrath U (2010) *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Mol Plant Pathol* 11: 169-177.

Govindarajulu M, Elmore JM, Fester T, Taylor CG (2008) Evaluation of constitutive viral promoters in transgenic soybean roots and nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1027–1035.

Hayashi S, Gresshoff PM, Kinkema M (2008) Molecular analysis of lipoxygenases associated with nodule development in soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 843–853.

Hepher A, Atkinson, HJ. 1992. Nematode Control with Protease Inhibitors. European Patent Publication Number 0 502 730 A1.

Hernandez-Garcia C M, Bouchard R A, Rushton P J, Jones M L, Chen X, Timko M P, Finan JJ (2010) High level transgenic expression of soybean (*Glycine max*) *GmERF* and *Gmubi* gene promoters isolated by a novel promoter analysis pipeline. *BMC Plant Biology* 10: 237.

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

Homrich MS, Passaglia LMP, Pereira JF, Bertagnolli PF, Pasquali G, Zaidi MA, Altosaar I, Bodanese-Zanettini MH (2008) Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill, Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. *Genet Mol Biol* 31: 522-531.

Hu C–Y, Bodanese-Zanettini MH (1995) Embryo culture and embryo rescue for wide cross hybrids. In: Gamborg OL and Phillips (eds) *Plant Cell, Tissue and Organ Cultures: Fundamental Methods*. Berlin, pp. 129-141.

Husaini AM, Abdin MZ (2008) Development of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa* Dutch.) plants tolerant to salt stress. *Plant Sci* 174:446–455.

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

Jeyaratnam J (1990) Acute pesticide poisoning: a major global health problem. *World Health Stat Quaterly* 43(3):139-144.

Jian B, Hou W, Wu C, Liu B, Liu W, Song S, Bi Y, Han T (2009) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of Superroot-derived *Lotus corniculatus* plants: a valuable tool for functional genomics. *BMC Plant Biology* 9: 78.

Kern MF, Maraschin SD, Endt DD, Schrank A, Vainstein MH, Pasquali G (2009) Expression of a chitinase gene from *Metarhizium anisopliae* in tobacco plants confers resistance against *Rhizoctonia solani*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152.

Koyama T, Ono T, Shimizu M (2005) Promoter of *Arabidopsis thaliana* phosphate transporter gene drives root-specific expression of transgene in rice. *Journal of Bioscience and Bioengineering*: 99:38–42.

Li J, Todd TT, Trick HN (2010) Rapid *in planta* evaluation of root expressed transgenes in chimeric soybean plants. *Plant Cell Reports*, 29: 13–123.

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

Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toros JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzunn S, Scala F (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7860-7865.

Lozovaya VV, Lygin AV, Zernova OV, Li S, Hartman GL, Widholm, JM (2004) Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 671–679.

Marra BM, Souza DS, Aguiar JN, Firmino AA, Sarto RP, Silva FB, Almeida CD, Cares JE, Continho MV, Martins de Sá C, Franco OL, Grossi de Sá MF (2009) Protective effects of a cysteine proteinase propeptide expressed in transgenic soybean roots *Peptides* 30: 825-31.

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

Morales AMAP, Lemos EGM, Fuganti R, Marin SRR, Marcelino FC, Silva JFV, Pereira AA, Nepomuceno AL (2009) Expressão de Genes Envolvidos na Resistência da Soja a *Meloidogyne javanica*, *Nematologia Brasileira* 33(3): 226-234.

Nepomuceno AL, Neumaier N, Farias JRB, Oya T (2001) Tolerância à seca em plantas. *Biotecnologia ciência e desenvolvimento* 23:12-18.

Noori SAS, Sokhansanj A (2008) Wheat plants containing an osmotin gene show enhanced ability to produce roots at high NaCl concentration. *Russ J Plant Physiol* 55: 256–258.



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

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

Parkhi V, Kumar V, Sunilkumar G, Campbell LM, Singh NK, Rathore KS (2009) Expression of apoplastically secreted tobacco osmotin in cotton confers drought tolerance. *Mol Breed* 23: 625–639.

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

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

Popelka JC, Terryn N, Higgins TJV (2004) Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? *Plant Sci* 167: 195–206.

Preisner J, Van Toait T, Huynh L, Bolla RI, YEN HH (2001) Structure and activity of a soybean *Adh* promoter in transgenic hairy roots. *Plant Cell Reports* 20: 763-769.

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

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

- Reis EM, Casa RT (2002) Com fungicida, safra tranqüila. *Cultivar*, 35, 32-33.
- Salmeron JM, Vernooij B (1998) Transgenic approaches to microbial disease resistance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol* 1: 347-352.
- Schmidt MA, LaFayette PR, Artelt BA, Parrott WA (2008) A comparison of strategies for transformation with multiple genes via microprojectile-mediated bombardment. *In Vitro Cell Dev Biol* 44 (3): 162-168.
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463: 178-183.
- Schots A, deBoer J, Schouten A, Roosien J, Zilverentant JF, Pomp H, Bouwmansmits L, Overmars H, Gommers FJ, Visser B, Stiekema WJ, Bakker J (1992) Plantibodies - a flexible approach to design resistance against pathogens. *Neth. J. Plant Pathol.* 9: 39-46.
- Stewart CN, Adang MJ, All JN, Boerma HR, Cardineau G, Tucker D, Parrott WA (1996) Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene. *Plant Physiol.* 112: 121-129.
- Subramanian S, Graham MY, Yu O, Graham TL (2005) RNA interference of soybean isoflavone synthase genes leads to silencing in tissues distal to the transformation site and to enhanced susceptibility to *Phytophthora sojae*. *Plant Physiol* 137: 1–9.
- Subramanyam K, Subramanyam K, , Sailaja KV, Rao DM, Lakshmidevi K (2010) Ectopic expression of an osmotin gene leads to enhanced salt tolerance in transgenic chilli pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult.* DOI 10.1007/s11240-010-9850-1
- Suzuki S, Yuyama MM (eds) (2005) Boletim Técnico da soja. Fundação MT, 228p.

Trick HN, Dinkins RD, Santarém ER, Di R, Samoylov V, Meurer CA, Walker DR, Parrott WA, Finer JJ, Collins GB (1997) Recent advances in soybean transformation. *Plant Tiss Cult Biotechnol* 3: 9-26.

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

Urwin PE, Lilley CJ, Atkinson, HJ (1998) Nematode control by genetically modified crops. *Aspects of Applied Biology* 52: 255-262.

Urwin PE, Levesley A, McPherson MJ, Atkinson HJ (2000) Transgenic resistance to the nematode *Rotylenchulus reniformis* conferred by *Arabidopsis thaliana* plants expressing proteinase inhibitors. *Molecular Breeding*, 6: 257-264.

Van de Velde W, Mergeay J, Holsters M, Goormachtig S (2003) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Sesbania rostrata*. *Plant Science* 165: 1281–1288.

Veena V, Christopher GT (2007) *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 43: 383–403.

Vidor C, Fontoura JUG, Macedo J, Napoleão BA, Min T (2004) Tecnologias de produção de soja região central do Brasil 2004: Doença e Medidas de Controle. Disponível em <[www.cnpso.embrapa.br/producaosoja](http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja)>

Vishnudasana D, Tripathy MN, Rao U, Khurana P (2005) Assessment of nematode resistance in wheat transgenics expressing potato proteinase inhibitor (PIN2) gene. *Transgenic Research*, 14: 665-675.

Wiebke-Strohm B, Bücken-Neto L, Droste A, Homrich MS, Pasquali G, Passaglia LMP, Margis-Pinheiro M, Osorio MB, Bencke M, Bodanese-Zanettini MH (2011) Transgenic fertile soybean plants derived from somatic embryos transformed via the combined DNA-free particle bombardment and *Agrobacterium* system. *Euphytica* 177: 343–354.

Wit PJGM (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol Life Sci* 64: 2726-2732.

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

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

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