

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DA SOJA PELA TÉCNICA DE  
BIOBALÍSTICA

Aluno: Karina Lais Baungratz

Orientador: Prof. Dr. Robson Fernando Missio

Supervisora: Leandra Regina Teixeira

PALOTINA-PR

Julho de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DA SOJA PELA TÉCNICA DE  
BIOBALÍSTICA

Aluno: Karina Lais Baungratz

Orientador: Prof. Dr. Robson Fernando Missio

Supervisora: Leandra Regina Teixeira

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
como requisito parcial para a conclusão do  
Curso de Graduação em Tecnologia em  
Biotecnologia pela Universidade Federal  
do Paraná-Setor Palotina.

PALOTINA-PR

Julho de 2013



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE PALOTINA  
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

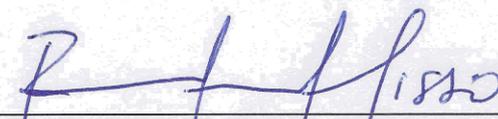
Universidade Federal do Paraná  
Setor Palotina  
Curso de Tecnologia em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso  
Área de Estágio: Biotecnologia Vegetal  
Acadêmico: Karina Lais Baungratz  
Supervisor do Estágio: Leandra Regina Teixeira  
Orientador do Estágio: Robson Fernando Missio

O presente TCC foi apresentado e aprovado pela seguinte banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Poliana Graziela Schreiner

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Roberta Paulert

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Robson Fernando Missio  
Orientador

Palotina, PR, 23 de julho de 2013.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida e por ter me dado força para cumprir mais uma etapa.

A meus pais Viro Baungratz e Carmelita Baungratz pelo amor, confiança, motivação e apoio em toda minha vida.

A Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (Coodetec), pela oportunidade.

Ao meu orientador professor Dr. Robson Fernando Missio, pela orientação e apoio.

A professora Rita Félix Fortes, pela disposição e por toda ajuda.

A Leandra Regina Texeira, pelos ensinamentos.

Aos amigos e colegas do setor de Biotecnologia pela ajuda constante e agradável companhia.

A todos do laboratório de Cultura de Tecidos pela paciência, amizade, conhecimento e disponibilidade.

A todos meus amigos que estiveram presentes em todos os momentos com palavras amigas e carinho.

Por fim, a todos que contribuíram de alguma maneira, para a minha formação.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 A cultura da soja .....	3
2.1.1 Melhoramento genético da soja.....	4
2.2 Ferrugem da soja .....	5
2.3 Transformação genética de plantas.....	6
2.3.1 Biobalística.....	8
2.4 Cultura de tecidos.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Local e condução dos experimentos.....	12
3.2 Experimento 1.....	12
3.2.1 Material vegetal e desinfestação das sementes.....	12
3.2.2 Isolamento dos eixos embrionários.....	12
3.2.3 Posicionamento dos eixos embrionários.....	13
3.2.4 Vetor.....	13
3.2.5 Precipitação de DNA nas micropartículas para bombardeamento.....	13
3.2.6 Transformação das plantas.....	14
3.2.7 Cultura de tecidos.....	14
3.2.8 Aclimação das plântulas.....	15
3.2.9 Eficiência da transformação genética.....	15
3.3 Experimento 2.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1 Experimento 1.....	18
4.1.1 Regeneração das plantas.....	18

4.1.2 Eficiência da transformação genética.....	20
4.2 Experimento 2.....	23
5. CONCLUSÕES.....	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	26

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Tratamentos de precipitação de DNA nas micropartículas.....	17
Tabela 2 - Porcentagem de eixos embrionários em relação ao desenvolvimento e contaminação.....	19

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Esquema do processo de transferência direta de genes através da biobalística.....	10
Figura 2 - Aplicação de glufosinato de amônio (1%) em planta de soja bombardeada com o plasmídeo pCambia 3301.....	16
Figura 3 - Folha com necrose em planta de soja bombardeada com o plasmídeo pCambia 3301, após aplicação de glufosinato de amônio (1%).....	20
Figura 4 - Análise de PCR de plantas (T <sub>0</sub> ) de soja da cultivar CD 217. Colunas 1, 2, ...; Colunas C1 controle positivo (plasmídeo pCambia 3301); C2 e C3 – CD217 não transformadas e regeneradas “ <i>in vitro</i> ”; Coluna C4 - H <sub>2</sub> O; Coluna M – Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb).....	22
Figura 5 - Análise em gel de agarose 0,8%. Colunas 1 a 12 Tratamentos; Coluna C: controle positivo (DNA Plasmidial não precipitado).....	23

## RESUMO

BAUNGRATZ, Karina Lais. Universidade Federal do Paraná- Setor Palotina, julho de 2013. **Transformação genética da soja pela técnica de biobalística.** Orientador: Robson Fernando Missio.

Com o advento da engenharia genética e da Biotecnologia, tem sido criado novas alternativas em contribuição ao melhoramento genético de plantas, permitindo a introdução de genes que contribuam para o aumento da produtividade e estabilidade da produção. Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a eficiência no processo de isolamento dos eixos embrionários, visando aumentar a frequência de plantas de soja transformadas via biobalística para conferência a resistência da doença ferrugem asiática e, avaliar algumas condições de precipitação do DNA sobre as micropartículas. Para a transformação, foi utilizado o vetor binário pCambia3301 e a avaliação da eficiência de sua introdução foi realizada pela aplicação de glufosinato de amônia e, pelo uso da análise molecular via PCR. Não foram obtidas plantas transformadas com a integração do transgene *bar*. A eficiência no processo de isolamento dos eixos embrionários viáveis no experimento 1 foi de 67,18% na avaliação do seu desenvolvimento e de 75,91% na avaliação de transformação utilizando o método de biobalística. A precipitação do DNA plasmidial nas micropartículas conferiu com a realização cinco minutos na primeira centrifugação e três lavagens com um minuto de centrifugação, assim ressuspensas em etanol nos procedimentos do protocolo.

**Palavras-chave:** Transformação de plantas; biobalística; regeneração de plantas.

## ABSTRACT

BAUNGRATZ, Karina Lais. Federal University of Paraná- Sector Palotina, July 2013. **Genetic transformation of soybean by biolistic technique.** Advisor: Robson Fernando Missio.

With the advent of genetic engineering and biotechnology, has been created new alternatives contribution to plant breeding, allowing the introduction of genes that contribute to increased productivity and stability of production. This work was carried out to verify the efficiency of the isolation process of embryonic axes, aiming to increase the frequency of soybean plants transformed via biolistic conference for disease resistance and rust, evaluate some conditions on the precipitation of DNA microparticles . For the transformation, we used the binary vector pCambia3301 and evaluating the efficiency of its introduction was performed by application of glufosinate ammonium, and the use of molecular analysis by PCR. Weren't obtained from plants transformed with the integration of the transgene bar. The efficiency of the process of isolation of viable embryo axes in Experiment 1 was 67.18% for the development and evaluation of 75.91% on the assessment of the transformation using biolistic method. The precipitation of DNA plasmid into microparticles conferred with the performance in the first five minutes centrifugation and three washes with a minute of centrifugation, and resuspended in ethanol in the protocol procedures.

**Keywords:** Transformation of plants; biobalistics; plant regeneration.

## 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), é uma espécie de planta anual, nativa da China e explorada no Oriente há mais de cinco mil anos. No Brasil a cultura foi estabelecida a partir da década de 1960 e, hoje, é uma das espécies vegetais de maior interesse econômico do país. Atualmente, a produção da soja no Brasil segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) foi de 66,383 milhões de toneladas na safra de 2011/2012, em uma área de 25,042 milhões de hectares, fazendo com que o país se torne o segundo maior produtor mundial.

A soja possui baixa variabilidade genética, o que tem dificultado o seu melhoramento através de técnicas clássicas de cruzamento, devido à incompatibilidade sexual dos cruzamentos interespecíficos (HOMRICH, 2008). Desta forma, a transformação genética de plantas acelera este processo de melhoramento, permitindo que genes derivados de plantas relacionadas ou de outros organismos, possam ser utilizados através de técnicas de transferência de genes (SANTARÉM, 2000).

Com a introdução do gene em um genoma receptor, as culturas podem apresentar resistência ou tolerância a herbicidas, fungos, bactérias, vírus, insetos, e estresses ambientais. As técnicas de transferência são agrupadas em métodos diretos e indiretos. O método indireto é aquele que se utiliza um vetor, como *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*, de forma a intermediar a transferência de genes. Esse método tem sido bastante usado na obtenção de plantas transgênicas, entretanto algumas plantas não são suscetíveis a infecção por *Agrobacterium* (ANDRADE, 2003).

No método direto, a transferência é realizada através de processos físicos e químicos, que causam modificações nas membranas e paredes celulares, facilitando a entrada do DNA exógeno. O método mais utilizado é via Biobalística, onde microscópicos projéteis de metal revestidos de DNA são inseridas no tecido celular em razão da alta velocidade (MARTINS & DUARTE, 2008).

Embora, os métodos de transformação genética estejam bem descritos na literatura, há a necessidade de adaptação e otimização para cada laboratório. Diversos fatores podem

influenciar na eficiência de transformação genética. Dentre os principais, está a qualidade fisiológica/sanitária da planta doadora de explantes, o genótipo, qualidade/quantidade de DNA utilizada em cada bombardeamento, umidade do ambiente durante o processo de bombardeamento, e precipitação do DNA sobre as micropartículas de tungstênio. Durante o processo de seleção/regeneração pode-se destacar os fatores como, a concentração do agente seletivo, possíveis injúrias causadas pelas micropartículas, ou ainda injúrias pelo processo de manipulação do explantes.

No laboratório da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC), tem-se observado uma frequência muito baixa de plantas transformadas e, neste sentido, há a necessidade da otimização de protocolos e até mesmo dos métodos de manipulação de explantes. Desta forma, este trabalho teve como objetivo geral a transformação da cultura da soja através do processo de biobalística, conferindo a resistência da doença ferrugem asiática. Os objetivos específicos consistem em verificar a eficiência no processo de isolamento dos eixos embrionários em plantas de soja, visando aumentar a frequência de plantas transformadas e, avaliar algumas condições de precipitação do DNA sobre as micropartículas, para garantir que na suspensão utilizada no bombardeamento contenha todo o DNA precipitado.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A CULTURA DA SOJA

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), é considerada uma das oleaginosas mais importantes do planeta. Seus grãos apresentam aproximadamente 20% de teor de óleo, o que a torna uma excelente cultura para a produção de óleo vegetal. Além da produção de óleo, a soja tem sido amplamente utilizada pela agroindústria, na produção de ração para a alimentação animal, na indústria química, na indústria de alimentos e, recentemente, como uma fonte alternativa renovável de biocombustível (FREITAS, 2011).

A soja é originária da região leste da Ásia, onde acredita-se que o grão já era cultivado na China desde 3000 anos a.C. (PRADO, 2007). Sua evolução começou com o aparecimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais, entre duas espécies de soja selvagem, a *Glycine soja* e *Glycine max*, que foram melhoradas por cientistas da antiga China (EMBRAPA, 2004).

No Brasil, a sua introdução foi em 1882, via Estados Unidos da América e o cultivo teve início na Bahia (EMBRAPA, 2004). Em 1908, imigrantes japoneses levaram-na para São Paulo, e somente em 1914 foi introduzida no Rio Grande do Sul ocorrendo a expansão da lavoura em nível significativo (SEDIYAMA et al., 2005).

A partir de 1960, o cultivo da soja se consolidou como uma cultura economicamente importante para o Brasil, que buscava a autossuficiência. No entanto, somente na década de 70 a oleaginosa passou a ter relevância no agronegócio brasileiro (EMBRAPA, 2004). Segundo dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (2004) de 1970 até 1980 a produção do grão aumentou 25,9% ao ano, passando de 1,5 milhões de tonelada para mais de 15 milhões de tonelada, respectivamente. Isto graças às novas tecnologias disponibilizadas, as quais proporcionaram um significativo aumento da produção e participação do Brasil em relação ao mercado mundial.

Segundo o levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra de 2010/2011 o país alcançou um índice recorde na colheita, com 75,324 milhões de toneladas, em 24,181 milhões de hectares cultivados. Deste total, 18,4 milhões de hectares correspondem à soja geneticamente modificada. A previsão para a safra de 2012/2013 está

estimada em um novo recorde de 81,281 milhões de toneladas em uma área de 27,715 milhões de hectares. Atualmente, a região centro-oeste se consolida como polo de produção, alcançando na safra de 2011/2012, a produção de 34,904 milhões de toneladas, seguida da região sul com 18,553 milhões de toneladas.

O estado do Mato Grosso é, atualmente, o maior produtor de soja no Brasil. Na safra 2011/2012, de acordo com os dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o Estado ampliou o plantio chegando a 6,980 milhões de hectares, dos quais 5,074 milhões correspondem à soja geneticamente modificada, chegando a uma produção de 21,849 milhões de toneladas. Para a próxima safra 2012/2013, a CONAB prevê uma produção de 23,532 milhões de toneladas em uma área plantada de 7,818 milhões de hectares.

No contexto mundial, os maiores produtores de soja são os Estados Unidos, em primeiro lugar, o Brasil, em segundo lugar e a Argentina em terceiro lugar. O Brasil apresenta uma grande capacidade de multiplicar a atual situação, tanto em relação ao aumento da produtividade quanto à expansão da área cultivada (SANTOS et al., 2011 (A)).

Aproximadamente 65% de toda a soja produzida no Brasil é exportada. Ao todo o país embarcou 48,7 milhões de toneladas em 2010, dos quais: 29,1 milhões de toneladas são de grãos; 13,7 milhões de toneladas de farelo e 1,6 milhões de toneladas de óleo, sendo a China o principal país importador, que atualmente comprou 66% do total da soja exportada em grão e 60% em óleo (SANTOS et al., 2011(B)).

### 2.1.1 Melhoramento genético da soja

O melhoramento genético alcançado na soja atual é resultante de um processo contínuo de desenvolvimento de novos genótipos, baseados em objetivos estabelecidos para a solução de problemas. O processo de melhoramento da soja no Brasil teve início no Rio Grande do Sul na década de 1930, os resultados deste processo só se tornaram evidentes na década de 1960, o que implicou trinta anos de experimentos, ou de estudos (SEDIYAMA et al., 2005).

A implantação de programas de melhoramento genético no Brasil possibilitou o

avanço da cultura, através do desenvolvimento de cultivares mais resistentes e adaptadas a determinadas características climáticas e maior resistência a doenças e pragas. Tais aprimoramentos vieram da incorporação de genes (COSTA, 2008).

Com a adoção da Biotecnologia com sementes, a soja *Round up Ready* (RR - resistente ao glifosato), da empresa Monsanto, foi a primeira planta transgênica a ser aprovada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), no ano de 1998, no Brasil (FREITAS, 2011). Entretanto, a liberação de seu cultivo comercial ocorreu efetivamente na safra de 2006/2007, em virtude de algumas organizações alegarem que ainda não haviam estudos efetivos em relação ao seu impacto, tanto no meio ambiente, quanto nos organismos que os consumissem (FREITAS, 2011).

Segundo Santos e colaboradores (2011, (C)), está previsto para no máximo até 2015, chegar nas lavouras quatro eventos transgênicos aprovados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). As variedades são tolerantes a diferentes princípios ativos de herbicidas, e uma delas resistente a insetos.

Dos eventos aprovados, dois são da empresa Bayer CropScience, e portarão um gene que tolera herbicidas contendo glufosinato de amônio como princípio ativo. A EMBRAPA Soja, de Londrina (PR), em parceria com a empresa Basf, desenvolveu a cultivar Cultivance, tolerante aos herbicidas do grupo das imidazolinonas. A meta é que esta abarque até 20% do mercado nacional (SANTOS et al., 2011(C))

## 2.2 FERRUGEM DA SOJA

Atualmente a cultura da soja tem como sua principal doença, a ferrugem asiática, e esta tem comprometido muito a produtividade e qualidade das lavouras. Essa doença é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, e foi detectada pela primeira vez no Japão em 1903, chamada de *Uredo sojae* (CARVALHO JÚNIOR & FIGUEIREDO, 2000). No continente americano foi constatada inicialmente no Paraguai na safra de 2001/2002, e, neste mesmo ano, também foi identificada no norte do Paraná e, se alastrando pelos estados de São

Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás, causando perdas de rendimento de até 70% (YUYAMA et al., 2007).

A disseminação do patógeno em todas as regiões produtoras pode ser observada na safra de 2006/2007 pelas perdas ocasionadas, sendo de aproximadamente 4,5% da produção brasileira, equivalendo a cerca de US\$ 615,7 milhões, e que, somada aos custos com operações de controle chegam a um prejuízo de US\$ 2,19 bilhões (EMBRAPA, 2007).

Inicialmente, as lesões causadas pelo patógeno aparecem como pequenas pontuações angulares de coloração castanho-claro a marrom na face superior das folhas, que gradualmente aumentam de tamanho, abrindo-se um poro através do qual são expelidos os uredosporos, posteriormente carregados pelo vento. As lesões são mais numerosas na base e nas bordas dos folíolos das folhas mais baixas, por serem as áreas que retêm umidade por períodos prolongados, o que torna a doença mais severa e permanente em regiões com abundante formação de orvalho no verão (GODOY et al., 2012). As temperaturas mais amenas são ideais, mas o patógeno pode se estabelecer entre 15 e 30°C (COSTA, 2008). As plantas infectadas apresentam desfolha precoce, comprometendo a formação e o pleno graneio das vagens e, conseqüentemente, a densidade e o peso final do grão (GODOY et al., 2012).

Atualmente, para tentar controlar o surgimento da ferrugem asiática nas lavouras, se empregam técnicas de manejo, como utilização de fungicidas, a rotação de culturas, o plantio no início da época recomendada para cada região, entre outras (YORINORI & LAZZAROTTO, 2004).

## 2.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS

A revolução da Biotecnologia possibilitou aos melhoristas de plantas o acesso a novas fontes de variabilidade genética para o desenvolvimento de cultivares, afim de regular importantes características agrônômicas e possibilitar a criação de novos tipos de plantas.

A transformação genética é a transferência (introdução) de um ou vários genes em um

organismo, sem que haja a fecundação ou o cruzamento. Estes genes podem ser isolados de outras plantas, microrganismos ou animais e são responsáveis por determinadas características agrônomicas importantes, como a resistência ou a tolerância a pragas, doenças, herbicidas e estresse. Estes são isolados, clonados, sequenciados e utilizados em programas de melhoramento genético (BRASILEIRO & ALENCAR, 1999).

O início do processo de transformação genética envolve vetores que contêm a estrutura genética que se objetiva isolar. Tal processo se dá através da ligação de três partes principais do gene, a saber: a região promotora, a codificadora e a terminal. Neste processo, normalmente são utilizados os plasmídeos de bactérias. Os plasmídeos são moléculas de DNA circular extra-cromossomal, que se replicam independente do genoma hospedeiro e conferem resistência a antibióticos. A sua extração mais utilizada é por lise alcalina, empregando-se o dodecil-sulfato de sódio (SDS) para ressuspender as células e, em seguida, o hidróxido de sódio, que desnatura o DNA e inicia a hidrólise de RNAs (PEREIRA & VIEIRA, 2006).

Um plasmídeo vetor bastante utilizado para transformações genéticas é o pCambia3301. Este contém o gene marcador de seleção *bar* que codifica para a enzima fosfinotricina acetil transferase (confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio), sob o controle do promotor constitutivo P35S do vírus do mosaico da couve-flor. O gene *bar* possui, ainda, a sequência terminadora de transcrição do gene da nopalina sintase – *TNOS* (PEREIRA & VIEIRA, 2006).

Existem diversas técnicas de transformação genética de plantas, sendo agrupadas em métodos indiretos e diretos. A transferência indireta é aquela na qual utiliza-se um vetor, a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*, para intermediar a transformação. Esta técnica é mais utilizada em dicotiledôneas, devido a pouca susceptibilidade a infecção nas monocotiledôneas (ANDRADE, 2003). A transformação direta é baseada em métodos físicos ou químicos, destacando-se a transformação com polietilenoglicol (PEG): agente químico que permite a passagem do DNA para dentro da célula vegetal; a eletroporação, que consiste em submeter o material vegetal a curtos choques em um campo elétrico de intensidade controlada; na aceleração de partículas (biobalística), através da qual microprojéteis cobertos de moléculas de DNA são acelerados a alta velocidade

em direção da planta (BRASILEIRO & ALENCAR, 1999).

### 2.3.1 Biobalística

A biobalística, também conhecida como método de bombardeamento com micropartículas ou acelerador de micropartículas, é um processo inicialmente descrito por Sanford et al. (1987), cujo principal objetivo a introdução de DNA ou RNA, no interior de células e tecidos de plantas, em bactérias, protozoários, fungos e animais.

Segundo Sanford, 1988, a biobalística abrangeria as três condições principais que compõem um mecanismo ideal de transferência de genes: permitiria a transformação de células, tecidos e espécies mais direta, simples e rapidamente; seria aplicável para a transferência de genes em grandes quantidades de células, tecidos e espécies, para as quais os outros métodos são falhos, e seria de fácil manuseio, podendo transformar eucariotos e procariotos.

Esta técnica utiliza microprojéteis bastante pequenos (0,5-5mm) de ouro ou tungstênio cobertos com o DNA e acelerados a altas velocidades (superiores a 1.500 km/h), penetrando no genoma de maneira não-letal (RECH & ARAGÃO, 1998), rompendo a barreira da parede celular e membrana plasmática. As micropartículas aceleradas alojam-se aleatoriamente nas organelas e, posteriormente, o DNA é dissociado pela ação do líquido celular, ocorrendo o processo de integração do gene no genoma (ARAGÃO et al., 1998). A desvantagem do uso do tungstênio é que, com o passar do tempo, as suas partículas podem sofrer degradação catalítica, tornando-se tóxicas para alguns tipos de células, e também sendo sujeitas à oxidação, afetando a adesão do DNA ou degradando-o (MARTINS & DUARTE, 2008).

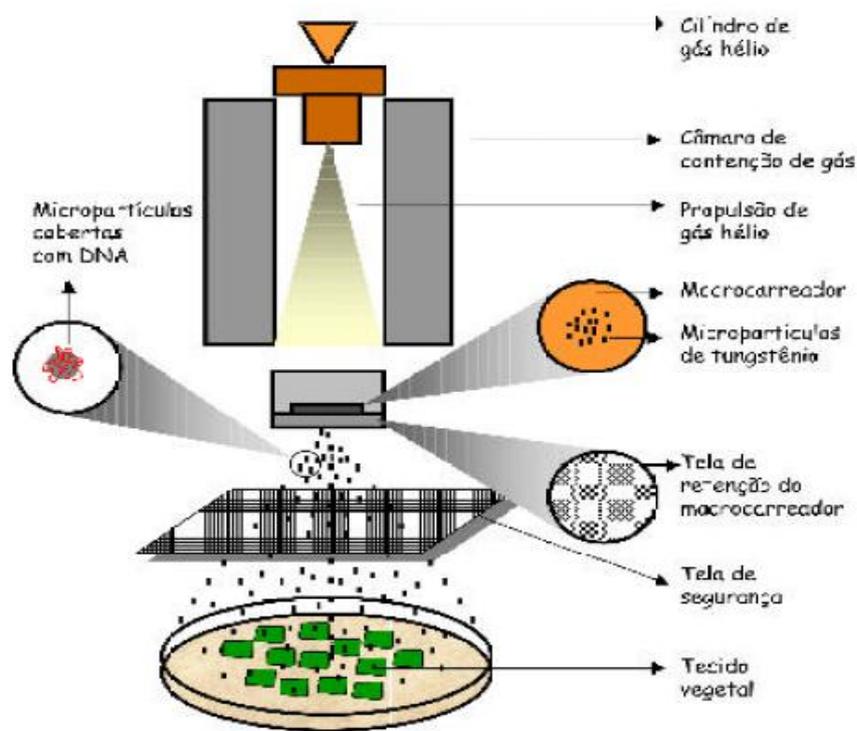
Com o uso das partículas de ouro, as mesmas tem a vantagem de não causar danos às células, por serem são mais uniformes e inertes biologicamente. No entanto, elas tendem a se aglomerar irreversivelmente em soluções aquosas, reduzindo a eficiência do processo de introdução de DNA (MARTINS & DUARTE, 2008).

Muitos equipamentos foram desenvolvidos para a aceleração de micropartículas,

utilizando sistemas de onda de choque gerados por uma explosão química; de pressão de gás hélio, ou descarga elétrica (PEREIRA & VIEIRA, 2006).

Os sistemas que empregam o gás hélio sob alta pressão e descarga elétrica possuem amplo espectro de utilização, e são mais eficientes para a obtenção de altas frequências de transformação em diferentes espécies de vegetais, por isso, são responsáveis pela quase totalidade das plantas transgênicas monocotiledôneas (RECH & ARAGÃO, 1998). Uma das suas principais vantagens é a eficiência na transformação de Gimnospermas e Angiospermas monocotiledôneas, o que não é observado na transformação por meio de *Agrobacterium*. Outra importante vantagem está na possibilidade de obtenção de plantas transgênicas através da transformação de célula-mãe do meristema apical, podendo atingir as suas três camadas, a protoderme, o procâmbio e o câmbio vascular (RECH & ARAGÃO, 1998).

Nos equipamentos de pressão a gás (figura 1), membranas de determinadas espessuras são utilizadas para vedar um tubo de aceleração, no qual ocorre um acúmulo de pressão no interior da câmara de vácuo para evitar a desaceleração das partículas causada pelo ar. A pressão se acumula de acordo com a espessura da membrana provocando então o seu rompimento, acelerando assim o macrocarregador, no qual as partículas de metal associadas ao DNA foram depositadas previamente em uma segunda membrana. Uma tela de proteção dentro da câmara de pressão bloqueia o metal, diminuindo a quantidade de partículas atingidas no tecido (PEREIRA & VIEIRA, 2006).



**FIGURA 1.** Esquema do processo de transferência direta de genes através da biobalística. (FONTE: CARNEIRO et al., 2004).

## 2.4 CULTURA DE TECIDOS

O termo cultura de tecidos vegetais é utilizado para definir a cultura asséptica *in vitro* (dentro de recipientes de vidro) de células, tecidos, e órgãos de plantas previamente extraídos de uma planta matriz. Um ambiente artificial é criado sob efeitos de fatores químicos (meio e cultura) e físicos (luz e temperatura), visando proporcionar condições adequadas para o processo de desenvolvimento (SILVA NETO & ANDRADE, 2011).

Nesse sentido, a propagação *in vitro* de plantas oferece aos produtores mudas de alto padrão em qualidade em um determinado espaço de tempo.

As células de plantas são totipotentes, no que se refere ao seu potencial de

reproduzirem um organismo inteiro, uma vez submetidas a um estímulo apropriado. Cada espécie vegetal, ou diferentes genótipos dentro de uma mesma espécie, possui diferentes exigências nutricionais e hormonais para a sua regeneração, como a composição do meio de cultura (FAVRETO, 2012).

O processo de desenvolvimento de uma nova plântula pode ocorrer via organogênese, a partir de um explante, ou via embriogênese somática, onde ocorre a formação de embriões a partir de células somáticas, sem a fecundação zigótica. Ambas as rotas podem ocorrer de forma direta, quando as plântulas/embriões surgem a partir de meristemas pré-existentes nos tecidos do explante, ou de forma indireta, quando ocorre primeiro a formação de calos, seguida da formação de meristemoides e, finalmente, plântulas/embriões (SILVA NETO & ANDRADE, 2011).

O primeiro grupo de cultivares de transgênicos comercializados em diversas partes do planeta com resistência, por exemplo a herbicidas, insetos e patógenos foi desenvolvido a partir da combinação da técnica de cultura de tecidos com métodos da biologia molecular (PEREIRA & VIEIRA, 2006).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 3.1 Local e condução dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos, no Núcleo de Biotecnologia da Cooperativa Central de Pesquisas Agrícola- COODETEC, localizada na cidade de Cascavel- PR.

#### 3. 2 EXPERIMENTO 1

No experimento um, realizaram-se dois tipos de avaliação. No primeiro, os eixos embrionários foram resgatados, e os explantes não foram submetidos à transformação via biobalística, sendo apenas para análise de desenvolvimento. Na segunda avaliação, os eixos embrionários foram submetidos ao método de transformação biobalística, para a sua averiguação de transformação.

##### 3.2.1 Material vegetal e desinfestação das sementes

Foram utilizadas sementes maduras de soja da cultivar CD 217 para os ensaios de transformação genética. As mesmas foram previamente desinfestadas em etanol 70% (v/v) por cinco minutos e a seguir, por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio 50% (v/v) acrescida com três gotas de Tween 20. Em seguida estas foram enxaguadas quatro vezes, por aproximadamente 1 minuto cada, com água destilada esterilizada e posteriormente embebidas por aproximadamente 18 horas.

##### 3.2.2 Isolamento dos eixos embrionários

Após o processo supracitado, e em fluxo laminar esterilizado, os cotilédones foram separados isolando o eixo embrionário. Com o auxílio de uma lupa removeu-se os primórdios foliares, ocorrendo a exposição da região meristemática. Usaram-se 162 eixos embrionários, para o experimento de transformação genética submetendo-os para as avaliações.

No primeiro método, 79 eixos embrionários, logo após serem isolados foram transferidos para placas de Petri com o meio de indução, contendo meio MS (Murashige e Skoog, 1962), 22,2 µM de benzilaminopurina (BAP), 3% de sacarose, 0,6% de phytigel e pH 5,7 e mantidas no escuro a 24±1°C por 24 horas. Após esta etapa, os explantes foram transferidos para vidros magenta em meio de cultura contendo sais MS (Murashige e Skoog, 1962), 3% de sacarose, 0,6% de phytigel e pH 5,7.

No segundo método, 83 eixos embrionários foram submetidos a técnica de transformação via biobalística, seguindo as etapas abaixo.

### 3.2.3 Posicionamento dos eixos embrionários

Os eixos embrionários foram posicionados em placas com meio de cultura de bombardeamento, contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), sacarose, phytigel, vitamina B5 e pH 5,7, sob a linha que delimita a zona de morte, esta previamente marcada com auxílio de um delimitador de zona de morte no fundo da placa, de forma que este posicionamento da região meristemática fique totalmente exposto durante o bombardeamento.

### 3.2.4 Vetor

O plasmídeo vetor pCambia3301, foi usado para transformação da soja. Neste também foi inserido um gene<sup>1</sup>, que pode apresentar ação de resistência sobre o fungo causador da ferrugem asiática. Esta sequência também está sob controle promotor constitutivo P35S.

### 3.2.5 Precipitação de DNA nas micropartículas para bombardeamento

Para o preparo da solução de micropartículas de tungstênio contendo o DNA, a umidade relativa do ar manteve-se em 49%, para tal utilizou-se um aparelho desumidificador de ar com pelo menos 30 minutos de antecedência. O preparo da solução de micropartículas de tungstênio foi realizado de acordo com o protocolo de Carneiro et al. (2004). Em seguida colocou-se a suspensão de micropartículas por 5 minutos no aparelho sonificador, e submeteu-se os microtubos por 2 minutos à agitação, utilizando-se um aparelho vortex.

<sup>1</sup> A omissão do gene foi proposital e visa preservar a propriedade intelectual da empresa.

Antes de iniciar a precipitação, os suportes das membranas carreadoras foram flambados em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de pinças encaixou-se as membranas carreadoras em seus devidos suportes, e acondicionou-se as mesmas em placas de Petri contendo sílica gel, guardando-as no dessecador por no mínimo 10 minutos.

A precipitação do DNA nas micropartículas de tungstênio foi preparada de acordo com o protocolo de Sanford et al., (1993), com as seguintes modificações: foi adicionado 12 µL de DNA plasmidial, 50 µL de micropartículas de tungstênio, 50 µL de CaCl<sub>2</sub> e 20 µL de espermidina. Adicionou-se 30 µL de etanol absoluto gelado no eppendorf para a distribuição das alíquotas, com 3,5 µL em cada membrana e acondicionou-se em dessecador nas placas de Petri contendo sílica gel por 10 minutos.

### 3.2.6 Transformação das plantas

A transformação dos eixos embrionários foi conduzida através do bombardeamento de micropartículas. A pressão de saída de gás hélio utilizada foi de 1200 psi, assim usou-se um conjunto de 4 membranas de ruptura. A pressão de vácuo foi mantida a 27 polegadas de Hg a cada disparo.

### 3.2.7 Cultura de tecidos

Após o bombardeamento, os eixos embrionários foram transferidos para placas de Petri, no escuro a 24±1°C por 24 horas, em meio de indução, contendo meio MS (Murashige e Skoog, 1962), 22,2 µM de benzilaminopurina (BAP), 3% de sacarose, 0,6% de phytigel e pH 5,7.

Após esta etapa, os explantes foram transferidos para vidros magenta em meio de cultura contendo sais MS (Murashige e Skoog, 1962), 3% de sacarose, 0,6% de phytigel e pH 5,7.

Em ambas as avaliações, as plantas foram regeneradas em um período de quatro a seis semanas e durante o processo foram observados os seguintes parâmetros:

- número de eixos que se desenvolveram livres de contaminação;
- número de eixos que não se desenvolveram livres de contaminação;
- número de eixos que desenvolveram e foram contaminados;

- número de eixos que não desenvolveram e foram contaminados.

### 3.2.8 Aclimatação das plântulas

As plântulas bem desenvolvidas, provenientes da avaliação da biobalística, foram transplantadas em copos plásticos contendo substrato de terra e vermiculita (1/2:1), e cobertas por sacos plásticos. Após o terceiro dia foram feitos cortes nos sacos plásticos possibilitando maior entrada de ar. As plântulas foram mantidas na câmara de crescimento por aproximadamente 90 dias, regadas três vezes por semana e, aos 60 dias foram transplantadas para vasos maiores com o substrato de terra e vermiculita. Após este período por terem apresentando um desenvolvimento satisfatório, as mesmas foram transplantadas para vasos na casa de vegetação. As plântulas do método de avaliação de regeneração, foram descartadas assim que apresentaram-se bem desenvolvidas, em cultura *in vitro*.

### 3.2.9 Eficiência da transformação genética

Todas as plantas T<sub>0</sub>, que regeneraram, juntamente com plantas controle (não transformadas), foram usadas para o ensaio de resistência ao herbicida glufosinato de amônio. Uma folha de cada planta foi pulverizada com o herbicida glufosinato de amônio a 1% e avaliadas 8 dias após a pulverização (figura 2).

Assim que as plantas regeneradas atingiram cerca de 30 a 45cm de altura, coletou-se amostras das folhas individualmente, para detectar *in vitro* a presença do transgene *bar* nas plântulas. O DNA genômico foi extraído com o auxílio do equipamento Biosprint da Qiagen, de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante. A quantificação das amostras foi feita pelo Nanodrop. A análise das plantas transformadas foi realizada pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). Cada reação (20 µL) continha 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM de cada desoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 1,0 U de *Taq DNA polimerase*, 30 ng de DNA e 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador específico para o gene *bar*. Os oligonucleotídeos iniciadores 5'-GTCTGCACCGTCAACC-3' e 5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3' foram utilizados para a amplificação de um fragmento de 450 pb. As reações foram submetidas ao seguinte programa de temperaturas: 3

minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (30 segundos a 94°C; 30 segundos a 58°C; 40 segundos a 72°C) e extensão final de 7 minutos a 72°C, em termociclador modelo Veriti 96 well da Applied Biosystems.

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em tampão SB 0,5X (Brody e Kern, 2004) em gel de agarose 0,8% (p/v) com brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e visualizados com luz ultravioleta em aparelho de fotodocumentação (Vilber Loumat, Marne-la-Vallee, França).



**FIGURA 2.** Aplicação de glufosinato de amônio (1%) em planta de soja bombardeada com o plasmídeo pCambia 3301.

### 3.3 EXPERIMENTO 2

Para analisar a melhor fase de precipitação de DNA nas micropartículas devido a baixa eficiência de plantas transformadas constatada no experimento 1, realizou-se o experimento 2.

O processo foi realizado seguindo os tratamentos descritos na Tabela 1. O Tratamento um corresponde ao proposto pela metodologia de Sanford et al., 1993, e os demais são modificações testadas.

**TABELA 1.** Tratamentos de precipitação de DNA nas micropartículas.

Tratamento	1° Centrifugação (12000rpm) (Tempo)	Precipitação		Ressuspensão (24 uL)
		N° de lavagem	Tempo de Centrifugação	
1	15 s	3	15 s	Etanol
2	15 s	3	15 s	TE
3	15 s	3	15 s	Água
4	5 min	3	1 min	Etanol
5	5 min	3	1 min	TE
6	5 min	3	1 min	Água
7	15s	0	0	Etanol
8	15s	0	0	TE
9	15s	0	0	Água
10	5 min	1	1 min	Etanol
11	5 min	1	1 min	TE
12	5 min	1	1 min	Água

Após a ressuspensão, todas as amostras foram submetidas à eletroforese em tampão SB 0,5X (Brody e Kern, 2004) em gel de agarose 0,8% (p/v) com brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e visualizados com luz ultravioleta em aparelho de fotodocumentação (Vilber Loumat, Marne-la-Vallee, França).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EXPERIMENTO 1

#### 4.1.1 Regeneração das plantas

Em relação à regeneração, foram obtidas algumas plantas completas e bem desenvolvidas para os dois tratamentos avaliados, porém não atingindo taxas de desenvolvimento ideais. O desenvolvimento das mesmas ocorreu em um período total de aproximadamente 100 dias a partir do seu resgate nas sementes. É importante observar (tabela 2), a porcentagem dos eixos embrionários obtidos, e desenvolveram livres de contaminação na avaliação de regeneração e transformação via biobalística, com aproximadamente 44,40% e 61,45%, respectivamente. Ainda se considerarmos eixos que se desenvolveram e foram contaminados, observamos com 22,78% e 14,46% respectivamente de eixos viáveis. Os resultados indicam que o processo de isolamento dos eixos embrionários deve estar causando injúrias, danos mecânicos, a ponto de não se desenvolverem. O procedimento deve ser executado com mais cautela, com o objetivo de aumentar a frequência de eixos viáveis. Com base nas frequências de desenvolvimento observadas, também é possível inferir que o processo de bombardeamento não influenciou no percentual dos dois tratamentos.

Observou-se que, em relação à velocidade de regeneração entre as plantas, que esta não foi a mesma. Depois de 33 dias em meio de cultivo, cerca de 20 plantas do método via biobalística, foram transferidas para o copo, e mais 7 plantas após duas semanas. O plantio para os vasos na câmara de crescimento aconteceu depois 23 dias após da primeira transferência do copo, quando somente 18 plantas foram transplantadas. Seis plantas foram transplantadas depois de três semanas. Três plantas morreram enquanto estavam ainda no copo. Assim, após 10 dias da primeira transferência para o vaso, as 18 plantas foram plantadas na casa de vegetação e, 26 dias depois, mais 6 plantas foram transplantadas. Uma planta morreu na casa de vegetação.

**TABELA 2.** Porcentagem de eixos embrionários em relação ao desenvolvimento e contaminação.

	<b>Avaliação 1</b>	<b>Avaliação 2</b>
Número de eixos colocados em meio MS	79	83
Porcentagem de eixos que se desenvolveram e livres de contaminação	44,40%	61,45%
Porcentagem de eixos que não desenvolveram e livres de contaminação	27,84%	24,09%
Porcentagem de eixos que desenvolveram e contaminaram	22,78%	14,46%
Porcentagem de eixos que não desenvolveram e contaminaram	5,06%	0

As plantas que foram transferidas para os copos plásticos contendo terra e vermiculita, estiveram sempre cobertas com sacos plásticos, dado que as mesmas necessitam de uma adaptação antes de serem transferidas para o meio externo, pois permaneceram todo tempo em vidraria fechada, e uma exposição drástica poderia causar estresse na planta devido da mudança de ambiente e leva-la à morte. O sucesso desta etapa requer que as plantas que se desenvolveram heterotroficamente, em condições de alta umidade, posteriormente desenvolvam-se autotroficamente em condições de moderada ou baixa umidade (SILVA et al., 2008).

Muitos vidros magenta contendo os eixos embrionários foram parcialmente contaminadas com fungos e bactérias, provocando a sua perda, sendo descartados para que não houvesse proliferação. Embora alguns contaminantes possam agir de forma direta sobre o crescimento e desenvolvimento dos explantes, a maioria compromete o desenvolvimento normal dos cultivos de forma indireta, pela competição por nutrientes e vitaminas do meio de cultura e pela produção de metabólitos fitotóxicos (LIMA & MORAES, 2006).

Não se sabe ao certo, a origem desta contaminação, pois a mesma surgiu em alguns vidros magenta, mas em outras não. As explicações para este problema podem ser deduzidas

em função da falta de uma desinfecção mais severa nos materiais durante o manuseio dos procedimentos, e na higienização das mãos de quem realizou a manipulação do trabalho, ou ainda, algum descuido ou falta de atenção retirando o material do fluxo sem sua vedação. Outra suposição para este problema está relacionada às condições climáticas da câmara de crescimento, pois, os vidros magenta armazenados na mesma apresentavam certo suor interno, acumulando gotículas de água, o que poderia propiciar a referida contaminação.

#### 4.1.2 Eficiência da transformação genética

Durante a avaliação dos sintomas apresentados nas plantas, depois de pulverizadas com glufosinato de amônia, observou-se que todas as plantas apresentavam necrose, conforme a Figura 3.



**FIGURA 3.** Folha com necrose em planta de soja bombardeada com o plasmídeo pCambia 3301, após aplicação de glufosinato de amônio (1%).

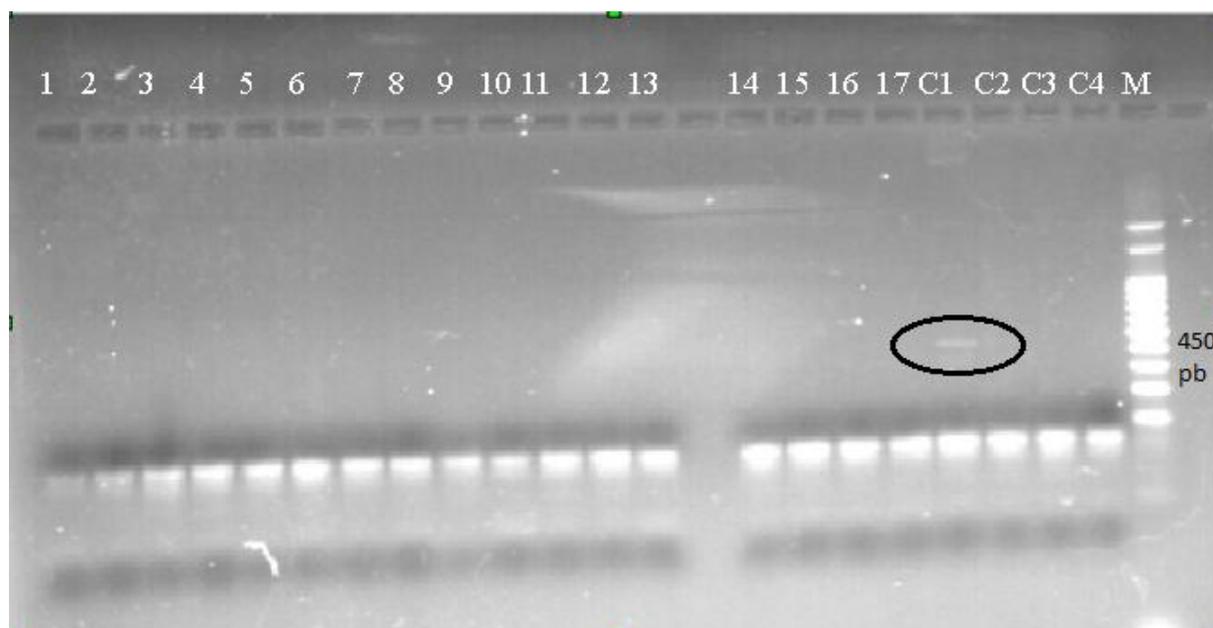
O agente seletor glufosinato de amônia, é um composto usado atualmente como um herbicida, comercialmente conhecido como Finale. Este componente é muito utilizado em estudos como agente seletor, pois o mesmo apresenta tolerância nas plantas obtidos pelo uso dos genes bacterianos *bar*, isolado de *Streptomyces hygroscopicus*, e o gene *pat* isolado de *S. Viridochromogenes* (MARTINEZ et al., 2005).

Este gene codifica a enzima phosphinothricin-N-acetyltransferase (PAT), que acetila o grupo NH<sub>2</sub> da fosfotricina (PPT) sendo um composto ativo do glufosinato, levando a sua inativação, portanto, prevenindo a autotoxicidade na planta, tornando-a tolerante ao herbicida.

De acordo com Ribas et al. (2005), verificou-se que na espécie do café o uso do glufosinato de amônio nas plantas geneticamente modificadas, confere a sua tolerância devido à transformação da cultivar pelo plasmídeo pCambia3301 com promotor P35S, no qual apresenta o gene *bar*. Além disso, plantas transformadas com este gene podem tolerar altas doses do herbicida facilitando assim o controle de plantas daninhas.

Pôssa, 2010, avaliou em seu trabalho a transformação do milho contendo a construção gênica Ubi::SbMATE::NOS utilizando a técnica de biobalística e transformação por *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando em sua metodologia o Glufosinato de amônio para a identificação do progresso da transformação para a tolerância do gene *bar*, onde obteve resultados positivos com a utilização deste composto.

A integração do transgene *bar* no genoma da cultivar CD 217 não foi detectada por análise molecular. Das 17 plantas avaliadas via PCR o fragmento esperado de 450 pb, correspondente ao gene *bar*, foi encontrado apenas no controle positivo. Como esperado, plantas não submetidas à transformação, que passaram pelo mesmo protocolo de regeneração, não apresentaram o fragmento correspondendo ao controle negativo (Figura 4).



**FIGURA 4.** Análise de PCR de plantas ( $T_0$ ) de soja da cultivar CD 217. Colunas 1 ao 17 de amostras coletadas; Colunas C1 controle positivo (plasmídeo pCambia 3301); C2 e C3 – CD217 não transformadas e regeneradas “*in vitro*”; Coluna C4 -  $H_2O$ ; Coluna M – Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb).

A baixa eficiência de transformação pode ser justificada pelo material genético não ter se despreendido do tungstênio durante os tiros do processo da biobalística, não havendo a sua introdução. Em outros casos, o gene de interesse pode não ser expresso devido à fragmentação da construção gênica durante os processos de precipitação do DNA nas micropartículas de tungstênio e transformação via biobalística (PÔSSA, 2010). Outra justificativa para a baixa eficiência de transformação, e que ao realizar a extração do vetor inoculado o gene, o mesmo possa ter sido descartado em algum procedimento do protocolo, assim, sendo necessário a otimização dos processos para a sua devida extração.

Contudo, o não aparecimento das bandas referentes ao gene alvo, sugere que as plantas não foram transformadas. Porém, nesta fase da pesquisa, ainda não há possibilidade de se chegar tal conclusão, pois foi usado o tecido multicelular para a transformação das plantas, o que permite que algumas células sejam transformadas e outras não, ou seja, é possível que as plantas transformadas apresentem regiões não transformadas e ou transformadas e com diferentes eventos de transformação, caso mais de uma célula tenha sido transformada no eixo embrionário. Para certificar-se da existência ou não plantas transformadas, a sugestão é que

sementes  $T_1$  descendentes de plantas  $T_0$  sejam avaliadas quanto à tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

#### 4.2 EXPERIMENTO 2

Após o processo de precipitação, foi possível visualizar o DNA no gel, conforme ilustra a Figura 5. Independente do número de lavagens e tempo de centrifugação, no processo de transformação via biobalística, sempre a ressuspensão é em etanol. Porém, quando este é aplicado no gel, a suspensão não fica dentro do poço, ao fazer a aplicação, observa-se que ele sai rapidamente e se dispersa no tampão. Neste caso, não é possível visualizar o DNA, e assim não sabendo se havia DNA na amostra ou se o mesmo saiu do poço. Por este motivo, optou-se em ressuspender em TE e água, apenas para visualização no gel.



**FIGURA 5.** Análise em gel de agarose 0,8%. Colunas 1 ao 12 de tratamentos de precipitação; Coluna C: controle positivo (DNA Plasmidial não precipitado).

Embora o perfil observado nos tratamentos 2, 3 e 4 estejam bem semelhantes, optou-se por seguir o tratamento 4 na rotina do laboratório. O tratamento 4 é caracterizado pela primeira centrifugação de 5 minutos e três lavagens com 1 minuto de centrifugação, após cada lavagem. Optou-se pelo tratamento 4, justamente pelo maior tempo de centrifugação que sugere maior segurança na precipitação.

## 5. CONCLUSÕES

A integração do transgene *bar* no genoma da cultivar CD 217 não foi detectada por análise molecular, não sendo transformadas para conferência da resistência da doença ferrugem asiática. A sua baixa eficiência refere-se a perda do material no momento de sua extração, como também o não desprendimento das micropartículas de tungstênio nos tiros do processo via biobalística.

A eficiência no processo de isolamento dos eixos embrionários viáveis no experimento 1 foi de 67,18% na avaliação do seu desenvolvimento e de 75,91% na avaliação de transformação no método de biobalística . Neste caso, há necessidade de otimizar o processo de isolamento dos eixos.

Após os procedimentos de precipitação avaliados foi possível visualizar o DNA plasmidial em praticamente todos os tratamentos, e para as condições avaliadas, optou-se pela realização do tratamento 4 na rotina do laboratório sendo caracterizado pela primeira centrifugação de 5 minutos e três lavagens com 1 minuto de centrifugação, após cada lavagem.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

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

ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Feijão Transgênico: Um produto da engenharia genética. **Biociência**. Brasília-DF: v. 5, p. 48-51, 1998.

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

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **Biotechniques**, v. 36, p. 214-216, 2004.

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

CARVALHO JÚNIOR, A. A. ; FIGUEIREDO, M. B. A verdadeira identidade da ferrugem da soja no Brasil. **Summa Phytopathologica**. Botucatu-SP: v. 26, n. 2, p. 197-200, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Soja**. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/conteudos.phpa=1252&t=2&Pagina\\_objcmsconteudos=3#A\\_objcmsconteudos](http://www.conab.gov.br/conteudos.phpa=1252&t=2&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objcmsconteudos). Acesso: 02/06/2013.

COSTA, M. M. **Herança quali-quantitativa e marcadores moleculares para seleção assistida de genótipos de soja resistentes à ferrugem asiática**. Jaboticabal-SP, 2008. Dissertação de tese de doutorado em Agronomia (Genético e melhoramento de plantas), Universidade Estadual Paulista- Campus Jaboticabal.

EMBRAPA 2004. **A soja no Brasil**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>. Acesso: 02/06/2013.

EMBRAPA 2007. **Prejuízo com ferrugem da soja se mantém estável nessa safra**. Disponível em: [www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver\\_alerta.php?cod\\_pagina\\_sa=175&cultura=1](http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver_alerta.php?cod_pagina_sa=175&cultura=1). Acesso: 06/06/2013.

FRAVETO, C. B. **Transformação genética de soja usando biobalística, *Agrobacterium* e método integrado, em meio com ácido lipóico.** Maringá- Paraná, 2012. Dissertação de tese de mestrado do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá.

FREITAS, M. C. M. **A cultura da soja no Brasil: O crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola.** Uberlândia, 2011. Dissertação de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia.

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; CAMPOS, H. D.; ROESE, A. D.; FORCELINI, C. A.; PIMENTA, C. B.; JACCOUD-FILHO, D. S.; BORGES, E. P.; JULIATTI, F. C.; HENNING, F. A.; FEKSA, H. R.; NUNES Jr, J.; COSTAMILAN, L. M.; CARNEIRO, L.C.; SILVA, L. H. C. P.; SATO, L. N.; CANTERI, M. G; MADALOSSO, .; ITO, M. F.; BARROS, R. BALARDIN, R. S.; SILVA, S. A .; FURLAN, S. H.; MONTECELLI, T. D. N.; CARLIN, V. J.; BARROS, V. L. P.; VENANCIO, W. S.; SIQUERI, F. V.; MEYER, M. C. **Eficiência de fungicidas para controle de ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2011/12: Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos.** Londrina: Embrapa Soja (Embrapa Soja. Circular Técnica, 93), 8p. 2012.

HOMRICH, M. S. **Plantas transgênicas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] resistentes à lagarta *Anticarsia gemmatalis*.** Porto Alegre, 2008. Dissertação de tese de doutorado no Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. CAIPIRA). **Pesquisa agropecuária tropical**, v. 36, p. 181-186, 2006.

MARTINEZ, C. O.; SANTEN, M. V.; AYUB, R. A.; CORTEZ, M. G. Glifosato e glifosinato como agentes seletivos para transformação genética de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Revista brasileira de herbicidas**. Passo Fundo-RS: nº 3, p. 18-34, 2005.

MARTINS, A. L. S. S. R.; DUARTE, P. K. **Método de transformação de plantas.** Goiânia-GO, 2008. Dissertação de graduação de ciências biológicas, Uni- ANHANGUERA Centro Universitário de Goiás.

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

PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Transformação de plantas. In: PÍPOLO, V. C.; GARCIA, J. E. **Biotecnologia na agricultura: aplicações e biossegurança**. 1ª Ed :Cascavel-PR, p. 59-83, 2006.

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

PRADO, R. C. O. Soja é alimento e energia. **Boletim de pesquisa de soja 2007**, Fundação MT. Mato Grosso: Ed Central de Texto Carrion Et Carracedo Editores Associados, nº. 11, p. 11-14, 2007.

RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Biobalística. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de Transformação genética de plantas**. 1ª Ed: Brasília-DF, Ed Embrapa-SPI, p. 51-64, 1998.

RIBAS, A. F.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. **Produção de plantas transgênicas de café resistentes ao herbecida glufosinato de amônio**. Brasília-DF: Embrapa Café, 4p, 2005.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science Technology**. v. 5, p. 27-37, 1987.

SANFORD, J. C. The biolistic process. A new concept in gene transfer and biological delivery. **TIBTech**, v. 6, p. 299-302, 1988.

SANFORD, J.C.; SMITH, F.D.; RUSSEL, J.A. Optimizing the biolistic process for diferent biological applications. IN: WU, R. (ed.). **Recombinant DNA – Part H**. San Diego: Academic Press, p. 483-510, 1993.

SANTARÉM, E. R. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. **Ciência e Tecnologia**. Piracicaba- SP: Ed UNIMEP, v. 8, nº.15, p. 81-90, 2000.

SANTOS, C.; VENCATO, A. Z.; KIST, B. B.; CARVALHO, C.; BELING, R. R. Contagem regressiva. **Anuário Brasileiro da Soja 2011**. Santa Cruz do Sul-RS: Editora Gazeta Santa Cruz, p.74-75, 2011. (A)

SANTOS, C.; VENCATO, A. Z.; KIST, B. B.; CARVALHO, C.; BELING, R. R. Extração em alta. **Anuário Brasileiro da Soja 2011**. Santa Cruz do Sul-RS: Editora Gazeta Santa Cruz, p. 118-119, 2011. (B)

SANTOS, C.; VENCATO, A. Z.; KIST, B. B.; CARVALHO, C.; BELING, R. R. Sinal verde. **Anuário Brasileiro da Soja 2011**. Santa Cruz do Sul-RS: Editora Gazeta Santa Cruz, p. 10-11, 2011. (C)

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; REIS, M. S. Melhoramento da Soja. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2ª Ed.: Viçosa-Minas Gerais, Ed UFV, p. 553-603, 2005.

SILVA, K. J. D.; SOUZA, V. A. B.; GOMES, R. L. F. Efeito da altura de mudas na adaptação pós-cultivo *in vitro* de abacaxizeiro ornamental. **Revista Ceres**, v. 55, p. 551-555, 2008.

SILVA NETO, S. P.; ANDRADE, S. R. M. Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JÚNIOR, F. B. **Biotecnologia estado da arte e aplicações na agropecuária**. 1ª Ed: Planaltina-DF, Embrapa-Cerrados, p. 411-434, 2011.

YORINORI, J. T.; LAZZAROTTO, J. J. **Situação da ferrugem asiática no Brasil e na América do Sul**. Londrina-PR: Embrapa Soja- Londrina, nº 236, 30p, 2004.

YUYAMA, M. M.; SUZUKI, S.; CAMACHO, S. A. Doenças da soja. **Boletim de pesquisa de soja 2007**, Fundação MT. Mato Grosso: Ed Central de Texto Carrion Et Carracedo Editores Associados, nº. 11, p. 129-142, 2007.

