

Londrina, PR  
Junho, 2017**Autores****Norihito Kanamori**Pesquisador do Japan  
Internacional Research  
Center for Agricultural  
Sciences (JIRCAS)  
Tsukuba, Japão**Liliane Marcia  
Mertz-Henning**Eng.<sup>a</sup> Agrônoma, Dra.  
Pesquisadora da  
Embrapa Soja  
Londrina, PR**Silvana Regina  
Rockenbach Marin**Química, M.Sc.  
Analista da Embrapa Soja  
Londrina, PR

## Metodologia para transformação de soja via *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação genética de plantas é uma ferramenta amplamente utilizada nas mais diversas espécies, com aplicações que incluem desde a validação funcional de genes na pesquisa básica, até a obtenção comercial de plantas Geneticamente Modificadas (GMs). Uma das principais vantagens da técnica é a obtenção de plantas transgênicas, que permite a incorporação de características desejadas presentes em espécies não relacionadas, as quais não poderiam ser incorporadas por meio do melhoramento convencional.

Existem diversas metodologias para a transformação genética, incluindo eletroporação, microinjeção, choque térmico, entretanto, os sistemas utilizados na transformação de plantas são majoritariamente a biobalística (bombardeamento de micropartículas) e a *Agrobacterium tumefaciens* (agro infiltração ou co-cultivo) (BRASILEIRO; CARNEIRO, 2015).

O primeiro evento transgênico de soja aprovado para comercialização, a Soja RR (resistente ao herbicida glifosato), foi obtido através da técnica de biobalística (PADGETTE et al., 1995). Apesar de eficiente, esse sistema apresenta algumas limitações em comparação a transformação por *Agrobacterium*, sendo a principal delas a introdução de múltiplas cópias do gene no genoma da planta transformada (LEE et al., 2013), dificultando o trabalho para obtenção de um evento elite.

Embora a transformação genética via *Agrobacterium* seja rotina para muitas espécies, principalmente em plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, em outras, como a soja, a eficiência de transformação ainda é baixa. Ao longo dos anos, muitos esforços têm sido colocados visando o desenvolvimento e adaptação de metodologias de transformação de soja. Apesar dos avanços obtidos, a eficiência ainda é abaixo do desejado, além de ser influenciada pelo genótipo utilizado (JIA et al., 2015).

A seguir, descrevemos um protocolo para transformação genética de soja via *Agrobacterium tumefaciens*, adaptado a partir da metodologia de PAZ et al. (2006). Esse protocolo tem sido eficiente na obtenção de plantas de soja GMs, com resultados satisfatórios em diferentes cultivares e com diferentes construções gênicas.

### Metodologia

#### Crescimento de *Agrobacterium tumefaciens* para o co-cultivo

- Iniciar o pré-inóculo a partir de uma colônia isolada de *Agrobacterium* contendo a construção alvo, transferindo para 5 mL de meio YEP líquido (Anexo 1) suplementado com antibiótico específico para a estirpe e construção em uso;
- Manter o pré-inoculo em incubadora com agitação orbital a 150 x rpm, em temperatura de 28°C por 24h;
- Após esse período, transferir 50 µL do pré-inóculo para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio YEP líquido (Anexo 1) suplementado com antibiótico apropriado, incubando nas mesmas condições descritas anteriormente;
- Medir a densidade óptica (absorbância) DO600 da cultura, que deverá estar entre 0,6-0,9;
- Centrifugar o inóculo a 5.000 x g por 10 minutos;

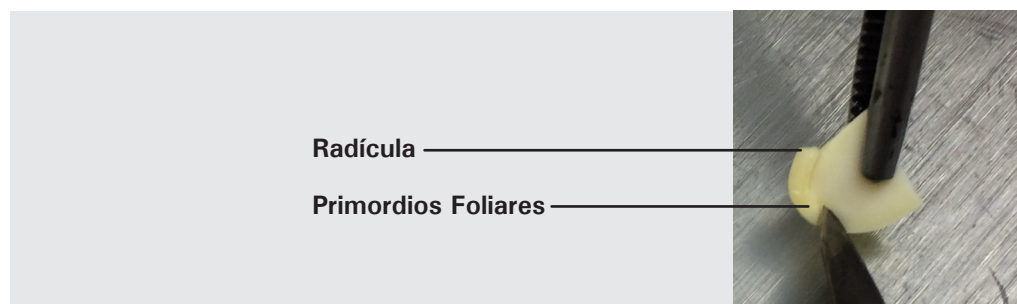
- Remover o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 40 mL de meio de Co-Cultivo Líquido (MCC Líquido) (Anexo 2).

## Assepsia e germinação das sementes para preparo dos cotilédones

- Dispor as sementes em placas de Petri e manter em dessecador para desinfestação por 16 horas, através da utilização de gás cloro, produzido pela adição de 3,5 mL de 12N HCl em 100 mL de hipoclorito de sódio comercial 2,0%;
- Após a exposição ao gás cloro, transferir as placas fechadas para câmara de fluxo laminar, onde permanecerão abertas por 30 minutos para remoção do gás;
- Efetuar a semeadura das sementes em Meio de Germinação (MG) (Anexo 3), mantendo as mesmas incubadas em câmara de crescimento com condições de fotoperíodo (F), temperatura (T) e umidade relativa (UR) controladas (F16h/T25°C/UR60%) para hidratação.

## Infecção dos explantes

- Com auxílio de pinça e bisturi realizar um corte no sentido horizontal na semente (será utilizada somente a metade contendo a região do eixo embrionário, sendo a outra metade descartada);
- Fazer uma pequena excisão no eixo embrionário na região correspondente a ponta da radícula (Figura 1);
- Remover o tegumento e separar os cotilédones para exposição do eixo embrionário;
- Efetuar a retirada dos primórdios foliares (Figura 1), para que o meristema apical seja exposto;



**Figura 1.** Morfologia interna da semente de soja com a indicação das regiões da radícula (após corte na extremidade) e dos primórdios foliares.

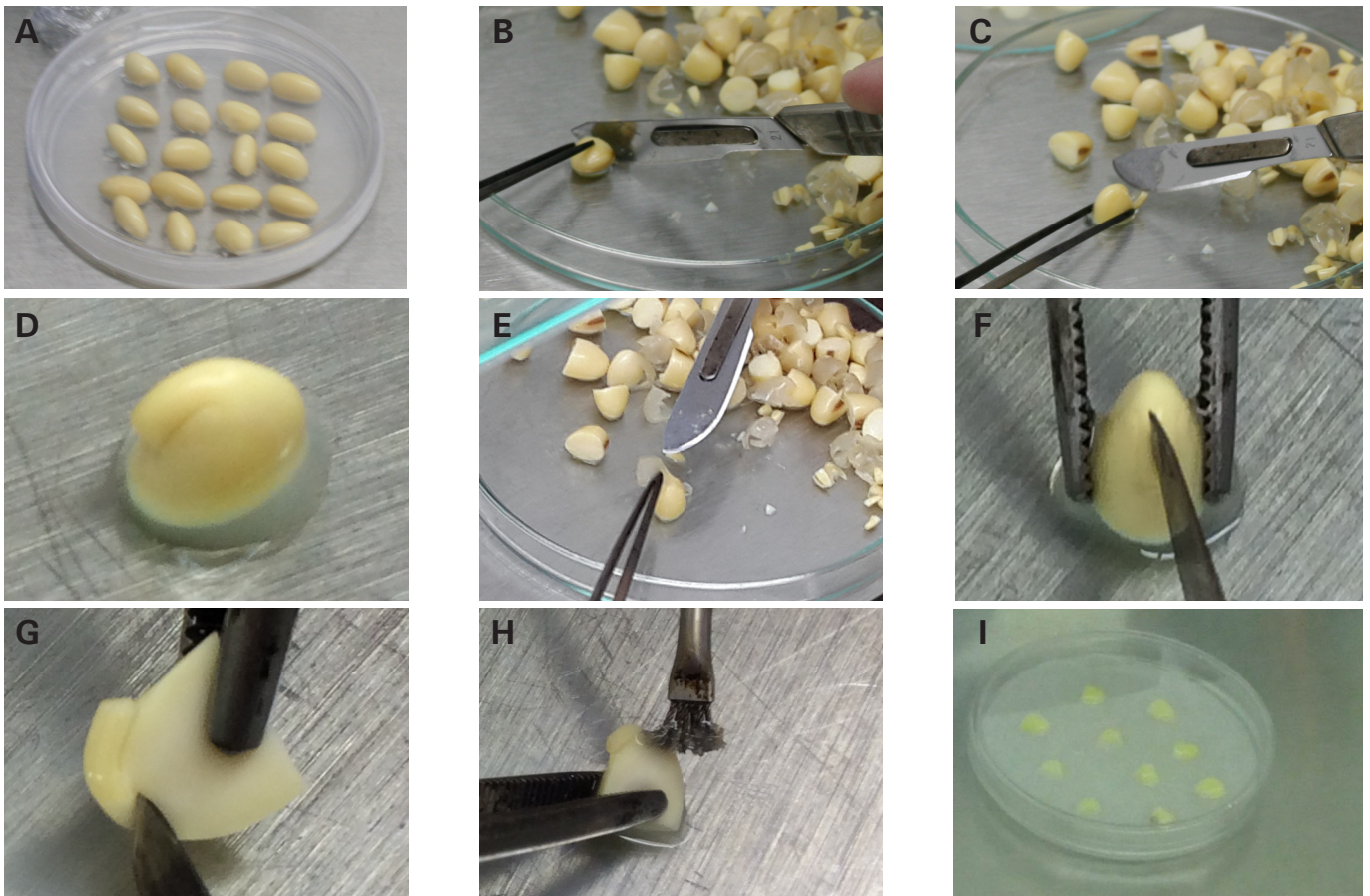
- Com auxílio de uma microescova de aço inoxidável, que auxilia na abertura de poros para facilitar a infecção, realizar o ferimento (raspando 10 a 15 vezes) na região do meristema apical (logo abaixo dos primórdios foliares). Tal ferimento deve ser feito dentro do meio MCC Líquido (Anexo 2) e os explantes devem permanecer no meio por aproximadamente 10 min;
- Transferir para placa de Petri contendo meio MCC Sólido (Anexo 4) recoberto com uma folha de papel de filtro estéril, 10 explantes com a parte adaxial voltada para o meio de cultura. O uso do papel de filtro estéril sobre o meio tem a finalidade de evitar o crescimento excessivo de *Agrobacterium*;
- Fechar a placa e vedar com fita selante porosa (tipo micropore);
- Incubar por cinco dias em câmara de crescimento (F16h/T25°C/UR60%).

**Cesar Augusto da Silveira**  
Químico, Especialista  
Analista da Embrapa Soja  
Londrina, PR

**Juliane Prael Marinho**  
Bióloga, M.Sc.  
Doutoranda em Genética e  
Biologia Molecular  
Universidade Estadual de  
Londrina  
Londrina, PR

**Alexandre Lima  
Nepomuceno**  
Engenheiro Agrônomo, Dr.  
Pesquisador da  
Embrapa Soja  
Londrina, PR

A Figura 2 ilustra os procedimentos acima descritos.



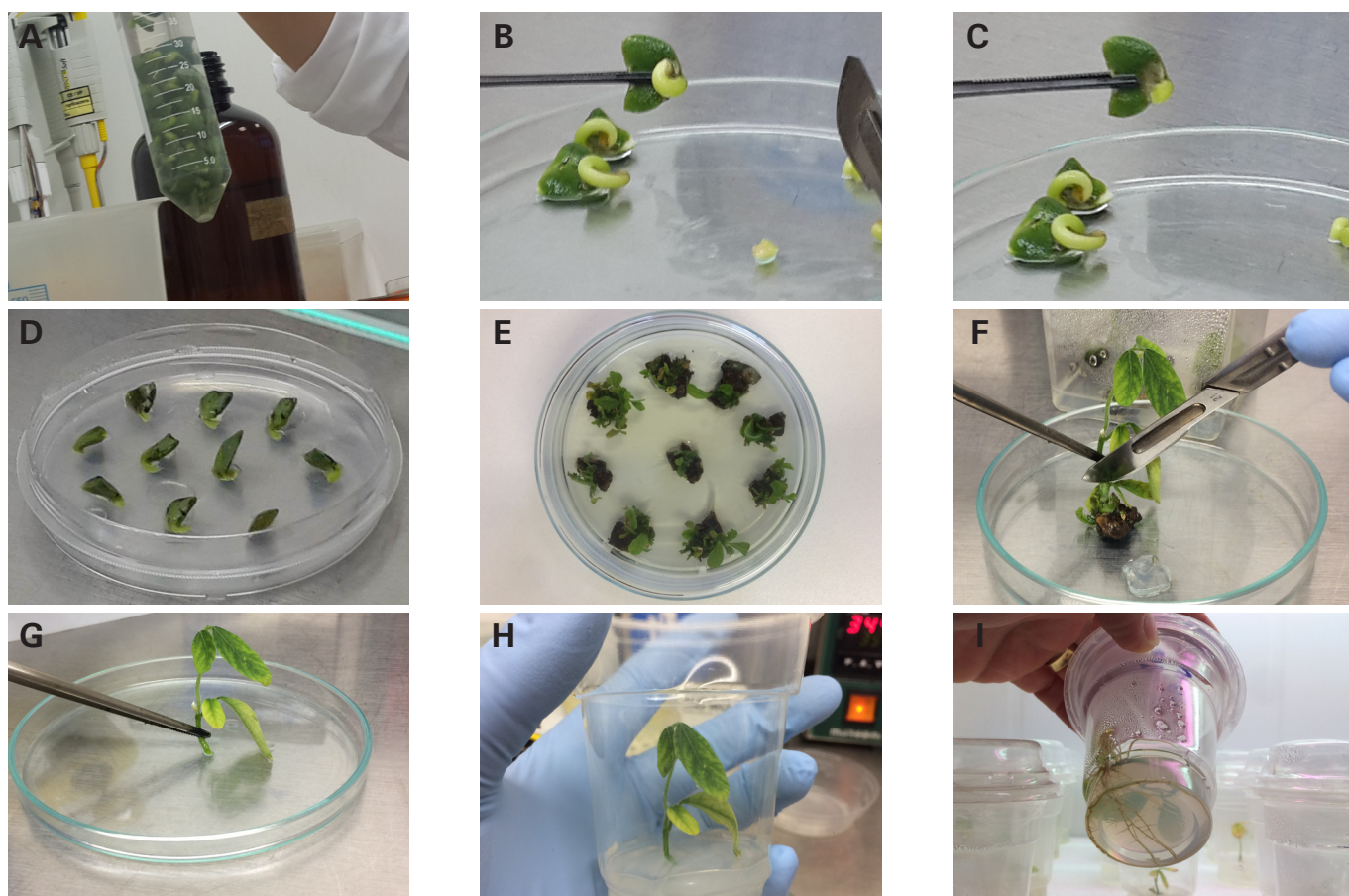
**Figura 2.** Etapas da infecção de explantes de soja por *Agrobacterium*. A) Sementes após 16h em Meio de Germinação; B) Corte horizontal das sementes; C) Remoção da ponta da radícula; D) Semente após a remoção da ponta da radícula; E) Retirada do tegumento; F) Abertura dos cotilédones; G) Remoção dos primórdios foliares; H) Realização do ferimento com auxílio de micro escova; I) Transferência dos explantes para o Meio de Co-Cultivo Sólido.

## Regeneração e seleção

- Após o período em meio MCC Sólido (Anexo 4), lavar os explantes em água destilada autoclavada para retirar o excesso de *Agrobacterium* (4 a 5 vezes);
- Observar a presença de fungos, bactérias e a coloração. Os materiais contaminados podem ser submetidos a uma tríplice lavagem com uma solução de meropenem ( $25 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ou então descartar. Apenas os explantes saudáveis serão utilizados na próxima etapa;
- Cortar a região do hipocótilo que cresceu;
- Transferir os explantes para o Meio de Indução de Multibrotamento (MIB1) - Sem agente seletivo - (Anexo 5), com a parte aérea em contato com o meio de cultura para induzir a formação de multibrotos. Nesta etapa dar preferência pela utilização de placas mais altas para permitir o crescimento dos brotos;
- Manter os explantes em meio MIB1, incubados em câmara de crescimento ( $F16h/T25^\circ\text{C}/UR60\%$ ) por 15 dias;
- Transferir os explantes para o Meio de Indução de Multibrotamento 2 (MIB2) - Com o agente seletivo - (Anexo 6), onde permanecerão incubadas por mais 15 dias nas condições descritas anteriormente;
- Cortar na base do cotilédone para exposição de novos tecidos e transferir para o Meio de Alongamento (MA) (Anexo 7). Manter incubado em câmara de crescimento ( $F16h/T25^\circ\text{C}/UR60\%$ );
- A cada 15 dias, realizar nova transferência para o mesmo meio (MA), realizando um novo corte da base do cotilédone, até que os novos brotos alcancem tamanho ideal para a próxima etapa. Os brotos podem permanecer nessa etapa por até oito semanas;
- Quando os brotos atingirem aproximadamente 3 cm de comprimento (Figura 3), cortar e transferir para frascos magenta com Meio de Enraizamento (ME) (Anexo 8);
- Para uma melhor indução do enraizamento, os brotos recém cortados são imersos durante um minuto em uma solução de ácido indolbutírico ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e inseridos no meio de cultura. Os explantes alongados permanecem em câmara de crescimento ( $F16h/T25^\circ\text{C}/UR60\%$ ), por uma ou duas semanas, até o aparecimento de mais de duas raízes.

A seguir (Figura 3), estão representadas as principais etapas da fase de regeneração e seleção de plantas de soja GMs:





**Figura 3.** Etapas da regeneração e seleção dos explantes. A) Lavagem com água destilada; B) Explantes antes do corte do hipocótilo; C) Explantes após o corte do hipocótilo; D) Transferência para placas com Meio de Indução de Multibrotamento 1; E) Explantes em Meio de Alongamento; F) Corte dos brotos; G) Imersão em solução de ácido indolbutírico; H) Transferência dos brotos para o meio de enraizamento; I) Plantas com desenvolvimento adequado para transferência e aclimação em vasos.

## Aclimação

- Remover cuidadosamente as plantas desenvolvidas da magenta e lavar em água destilada para remover o excesso de meio presente nas raízes;
- Colocar cada planta em um vaso plástico contendo substrato constituído de terra:areia:composto orgânico (3:2:2), cobrir o vaso com saco plástico e manter em câmara de crescimento (F16h/T25 °C/UR60%) por pelo menos uma semana;
- Ao final da aclimação, transferir as plantas para casa de vegetação e testar via PCR convencional (Reação em Cadeia da Polimerase) para confirmação do inserto.

## ANEXOS - Procedimentos para preparo dos meios

### 1- Meio YEP Líquido

Em um Becker de 1 L adicionar:

- 5 g de extrato de levedura
- 10 g de bacto peptona
- 5 g de NaCl

Completar o volume para 900 mL com água destilada

Ajustar o pH para 7,0

Completar o volume para 1 L, aliquotar e autoclavar.

Esfriar o meio até 60 °C e adicionar os antibióticos específicos para a estirpe e a construção em uso.

### 2- Meio de Co-Cultivo Líquido (MCC)

Em um Becker de 1 L adicionar:

- 0,32 g de *Gamborg's B-5 Basal Salt Mixture*
- 1 mL de solução de vitamina *Gamborg's* (1000X)
- 4,26 g de ácido 2-(n-morfolino) etanosulfônico monohidratado (MES)
- 30 g de sacarose
- 334 µL de benzil amino purina (BAP) (5 mg.mL<sup>-1</sup>)

Completar o volume para 900 mL com água destilada

Ajustar o pH para 5,4

Completar o volume para 1 L, aliquotar em frascos de 250 mL e autoclavar.

Após autoclavagem, esfriar o meio até 60 °C e adicionar os componentes previamente filtro esterilizados:

- 1 mL de ditiotreitol (DTT) 1 M
- 200 µL de *Silwet L-77*

- 250  $\mu\text{L}$  de ácido giberélico (1 mg.mL<sup>-1</sup>)
- 200  $\mu\text{L}$  de acetoseringona (1 M)
- 1 mL de tiosulfato de sódio (1 M)
- 4 mL de cisteína (100 mg.mL<sup>-1</sup>).

### 3- Meio de Germinação (MG)

Em um Becker de 1 L adicionar:

- 3,2 de *Gamborg's B-5 Basal Salt Mixture*
- 1 mL de solução de vitamina *Gamborg's* (1000X)
- 0,64 g de ácido 2-(n-morfolino) etanosulfônico monohidratado (MES)
- 30 g de sacarose

Completar o volume para 900 mL com água destilada

Ajustar o pH para ~5,6-5,7

Completar o volume para 1 L e adicionar em um Erlenmeyer de 2 L contendo 6,5 g de ágar e autoclavar

Esfriar o meio até 60 °C e distribuir em placas de Petri (90x15 mm).

### 4- Meio de Co-Cultivo Sólido (MCC)

Em um Becker de 1 L adicionar:

- 0,32 g de *Gamborg's B-5 Basal Salt Mixture*
- 1 mL de solução de vitamina *Gamborg's* (1000X)
- 4,26 g de ácido 2-(n-morfolino) etanosulfônico monohidratado (MES)
- 30 g de sacarose
- 334  $\mu\text{L}$  de benzil amino purina (BAP) (5 mg.mL<sup>-1</sup>)

Completar o volume para 900 mL com água destilada

Ajustar o pH para 5,4

Completar o volume para 1 L e adicionar em um Erlenmeyer de 2 L contendo 4 g de ágar e autoclavar. Após autoclavagem, esfriar o meio até 60 °C e adicionar os componentes previamente filtro esterilizados:

- 1 mL de ditioneitol (DTT) 1 M
- 250  $\mu\text{L}$  de ácido giberélico (1 mg.mL<sup>-1</sup>)
- 200  $\mu\text{L}$  de acetoseringona (1 M)
- 1 mL de tiosulfato de sódio (1 M)
- 4 mL de cisteína (100 mg.mL<sup>-1</sup>)
- Distribuir o meio em placas de Petri (90x15 mm).

### 5- Meio de Indução de Multibrotamento1 (MIB1) - Sem agente seletivo

Em um Becker de 1 L adicionar:

- 3,2 g de *Gamborg's B-5 Basal Salt Mixture*
- 1 mL de solução de vitamina *Gamborg's* (1000X)
- 0,64 g de ácido 2-(n-morfolino) etanosulfônico monohidratado (MES)
- 30 g de sacarose
- 334  $\mu\text{L}$  de benzil amino purina (BAP) (5 mg.L<sup>-1</sup>)

Completar o volume para 900 mL com água destilada

Ajustar o pH para ~5,6-5,7

Completar o volume para 1 L e adicionar em um Erlenmeyer de 2 L contendo 7 g de ágar e autoclavar. Após autoclavagem, esfriar o meio até 60 °C e adicionar os componentes previamente filtro esterilizados:

- 2 mL de meropene (12,5 mg.L<sup>-1</sup>)
- Distribuir o meio em placas de Petri (90x15 mm).

### 6- Meio de Indução de Multibrotamento2 (MIB2) - Com agente seletivo

Em um Becker de 1 L adicionar:

- 3,2 g de *Gamborg's B-5 Basal Salt Mixture*
- 1 mL de solução de vitamina *Gamborg's* (1000X)
- 0,64 de ácido 2-(n-morfolino) etanosulfônico monohidratado (MES)
- 30 g de sacarose
- 334  $\mu\text{L}$  de benzil amino purina (BAP) (5 mg.L<sup>-1</sup>)

Completar o volume para 900 mL com água destilada

Ajustar o pH para ~5,6-5,7

Completar o volume para 1 L e adicionar em um Erlenmeyer de 2 L contendo 7 g de ágar e autoclavar. Após autoclavagem, esfriar o meio até 60 °C e adicionar os componentes previamente filtrados e esterilizados:

- 2 mL de meropene (12,5 mg.L<sup>-1</sup>)
- Adicionar o agente seletivo na concentração recomendada
- Distribuir o meio em placas de Petri (90x15 mm).

### 7- Meio de Alongamento (MA)

Em um Becker de 1 L adicionar:

- 4,4 g de meio MS (Murashige e Skoog, 1962)
- 1 mL de solução de vitamina *Gamborg's* (1000X)
- 0,64 g de de ácido 2-(n-morfolino) etanosulfônico monohidratado (MES)
- 30 g de sacarose

Completar o volume para 900 mL com água destilada

Ajustar o pH para ~5,6-5,7

Completar o volume para 1 L e adicionar em um Erlenmeyer de 2 L contendo 7 g de ágar e autoclavar. Após autoclavagem esfriar o meio até 60 °C e adicionar os componentes previamente filtro esterilizados:

- 500  $\mu\text{L}$  de ácido giberélico (1 mg.mL<sup>-1</sup>)
- 2 mL de meropene (12,5 mg.L<sup>-1</sup>)
- Adicionar o agente seletivo na concentração recomendada
- 1 mL de asparagina (50 mg.L<sup>-1</sup>)
- 1 mL de ácido piroglutâmico (50 mg.L<sup>-1</sup>)

- 1 mL de zeatina (0,5 mg.L<sup>-1</sup>)
- 100 µL ácido 3-indol acético (1 mg.mL<sup>-1</sup>)
- Distribuir o meio em placas de Petri (90x20 mm).

## 8- Meio de Enraizamento (ME)

Em um Becker de 1 L adicionar:

- 2,2 g de meio MS (Murashige e Skoog, 1962)
- 1 mL de solução de vitamina *Gamborg*'s (1000X)
- 0,64 g de ácido 2-(n-morfolino) etanosulfônico monohidratado (MES)
- 20 g de sacarose

Completar o volume para 900 mL com água destilada

Ajustar o pH para ~5,6-5,7

Completar o volume para 1 L e adicionar em um Erlenmeyer de 2 L contendo 7 g de ágar e autoclavar. Após autoclavagem, esfriar o meio até 60 °C e distribuir o meio em magentas e/ou copos de plástico.

## Referências

BRASILEIRO A. C. M.; CARNEIRO V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 453 p.

JIA, Y.; YAO, X.; ZHAO, M.; ZHAO, Q.; DU, Y.; YU, C.; XIE, F. Comparison of soybean transformation efficiency and plant factors affecting transformation during the agrobacterium infection process. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 18522-18543, 2015.

LEE, H.; PARK, S. Y.; ZHANG, Z. J. An overview of genetic transformation of soybean. In: BOARD, J.E. (Ed). **A comprehensive survey of international soybean research: genetics, physiology, agronomy and nitrogen relationships**. Rijeka: INTECH Open Science, 2013. p. 489-506.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, v. 15, p. 473-479, 1962.

PADGETTE, S. R.; KOLACZ, K. H.; DELANNAY, X.; RE, D. B.; LAVALLEE, B. J.; TINIUS, C. N.; RHODES, W. K.; OTERO, Y. I.; BARRY, G. F.; EICH-HOLTZ, D. A.; PESCHKE, V. M.; NIDA, D. L.; TAYLOR, N. B.; KISHOREG. M. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, v. 35, p. 1451-1461, 1995.

PAZ, M. M.; MARTINEZ, J. C.; KALVIG, A. B.; FONGER, T. M.; WANG, K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. **Plant Cell Report**, v. 25, p. 206-213, 2006.

### Circular Técnica, 128

**Embrapa Soja**  
Rodovia Carlos João Strass, s/n, acesso Orlando Amaral,  
Distrito Warta, Londrina, PR  
Caixa Postal 231  
CEP 86001-970  
Fone: (43) 3371 6000 Fax: (43) 3371 6100  
www.embrapa.br/soja  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

1ª edição  
PDF Digitalizado (2017)



### Comitê de publicações

**Presidente:** Ricardo Villela Abdelnoor  
**Secretário-Executivo:** Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite

**Membros:** Alvaldi Antonio Balbinot Junior, Claudine Dinali Santos Seixas, Fernando Augusto Henning, José Marcos Gontijo Mandarin, Lilliane Márcia Mertz-Henning, Maria Cristina Neves de Oliveira, Normam Neumaier e Osmar Conte

### Expediente

**Supervisão editorial:** Vanessa Fuzinartto Dall'Agnol  
**Normalização bibliográfica:** Ademir Benedito Alves de Lima  
**Edição eletrônica:** Gustavo Iuri de Barros