



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

(11) PI 0007815-8 B1

(22) Data do Depósito: 12/01/2000

(45) Data de Concessão: 19/04/2016
(RPI 2363)



* B R P I O O 7 8 1 5 B 1 *

(54) Título: PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO DA SOJA

(51) Int.Cl.: C12N 15/82

(30) Prioridade Unionista: 14/01/1999 US 60/115,833

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC

(72) Inventor(es): EDWARD J. WILLIAMS, CAROL A. ELMER, LORI S. JULSON, BRIAN J. MARTINELLI, DENNIS E. MCCABE, YOUNG HUANG

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE UMA PLANTA DE SOJA COM A LINHAGEM GERMINATIVA TRANSFORMADA UTILIZANDO A MEDIAÇÃO POR AGROBACTERIUM**".

5 Este pedido de patente reivindica a prioridade para o pedido de patente provisório US 60/115.833 depositado em 14/1/1999, incorporado aqui em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção refere-se à transformação de células vegetais e à regeneração em uma planta transformada diferenciada. Mais particularmente, a invenção refere-se a um processo para a transformação da soja (*Glycine max*) utilizando a transformação mediada por *Agrobacterium* de um explante de tecido vegetal e a regeneração subsequente das células transformadas em uma planta inteira.

15 **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

A soja (*Glycine max*) cultivada possui um valor comercial substancial por todo o mundo. Mais de 50 milhões de hectares por todo o mundo são utilizados para produzir um cultivo anual de soja em um excesso de 100 toneladas por metro com um valor estimado excedendo 20 bilhões de dólares.

20 O desenvolvimento de processos científicos úteis em melhorar a quantidade e a qualidade deste cultivo é, portanto, de interesse comercial significativo.

A pesquisa e o desenvolvimento biotecnológicos modernos forneceram técnicas úteis para o melhoramento de produtos agrícolas por engenharia genética de plantas. A engenharia genética de plantas envolve a

25 transferência de um gene ou genes desejados na linhagem germinativa de plantas de cultivo tais como os genes que podem ser passados para ou entre as variedades de elite utilizadas na agricultura moderna. As técnicas de transferência gênica permitem o desenvolvimento de novas classes de variedades de plantas de cultivo de elite com resistência aumentada a doenças,

30 tolerância a herbicidas e valor nutricional aumentado. Foram desenvolvidos vários processos para transferir genes para tecidos vegetais incluindo microinjeção de alta velocidade, microinjeção, eletroporação, captação direta de DNA e transformação gênica mediada por *Agrobacterium*.

A transformação gênica mediada por *Agrobacterium* é a técnica de transformação gênica mais amplamente utilizada em plantas. Esta técnica se vale da vantagem da patogenicidade de bactérias que permanecem no solo, de *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*. *Agrobacterium tumefaciens* originalmente possui a capacidade de transferir uma porção de seu DNA, chamada de T-DNA, para o genoma das células de uma planta para induzir estas células a produzir metabólitos úteis para a nutrição da bactéria. A transformação mediada por *Agrobacterium* se vale da vantagem deste conceito através da substituição do T-DNA de uma *Agrobacterium* por um grupo de genes, desta maneira, tornando a bactéria um vetor capaz de transferir os genes estranhos para o genoma da célula vegetal. Tipicamente, o constructo do gene estranho que é transferido para a célula vegetal envolve um gene específico de interesse, que é desejado para ser introduzido na linhagem germinativa da planta, acoplado com um marcador selecionável que confere para a célula vegetal uma resistência a um agente de seleção químico. Tipicamente, a transferência gênica mediada por *Agrobacterium* ocorre para uma célula indiferenciada cultivada em cultura de tecido, conhecida como uma célula do calo ou a transferência é feita para uma célula vegetal diferenciada de uma folha ou de caule, que é então induzida para se tornar uma cultura de calo indiferenciado.

Embora tenham sido obtidos avanços no campo dos processos de transformação mediados por *Agrobacterium*, continua a existir uma necessidade de processos melhorados para aumentar a facilidade, a velocidade e a eficiência de tais processos para a transformação de plantas da soja.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece um processo novo e eficiente para realizar uma transformação da linhagem germinativa da soja utilizando transformação mediada por *Agrobacterium* diretamente em células meristemáticas de embriões da soja. A indução direta de brotos partindo das células meristemáticas transformadas resulta em plantas de linhagem germinativa transgênicas. O processo global é rápido e eficiente.

Um aspecto significativo desta invenção é que a redução do pe-

ríodo de pré-tratamento de sementes da soja melhorou a produção de brotos nos explantes sobreviventes assim como reduziu o tempo tomado para produzir plantas que podem ser transferidas para uma estufa. Ainda, a redução do tempo e dos materiais fornece um sistema que é economicamente benéfico para os que o implementam.

É um objetivo da invenção fornecer um processo rápido e eficiente para realizar a transformação genética da soja utilizando transferência gênica mediada por *Agrobacterium*.

Um outro aspecto da invenção é fornecer um método de transformação de soja que não precise da etapa de cultura de calo de modo que o método possa ser usado em qualquer variedade de soja.

Um outro aspecto da presente invenção é fornecer novos processos de danificação da planta aumentando a eficiência de transformação. Um processo de danificação da planta envolvia a exposição dos embriões da soja a ondas sonoras ultra-som (isto é, sonicação). Um outro processo envolve a danificação da planta através da produção de jato de plasma com uma pistola elétrica de gene.

Outros objetivos, vantagens e características da presente invenção se tornarão aparentes partindo da especificação a seguir.

20 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção é um processo para a transformação genética direta da linhagem germinativa de variedades da soja, *Glycine max*. Este processo é baseado na distribuição gênica mediada por *Agrobacterium* em células individuais da soja no meristema de um embrião da soja. As células transformadas são então induzidas para formar brotos que são, a uma alta frequência, transformantes de linhagem germinativa da soja que podem ser cultivados em plantas de soja transgênicas inteiras sexualmente maduras e férteis. O processo não envolve uma fase de cultura de calo e assim o período de tempo do processo inteiro partindo da semente para a semente transgênica é notavelmente conciso.

O processo descrito aqui é baseado na distribuição gênica mediada por *Agrobacterium* em células em crescimento em um meristema em-

brionário. As técnicas mediadas por *Agrobacterium* resultam tipicamente somente na distribuição gênica para uma ou somente algumas, células no tecido alvo. Tipicamente, um agente seletivo é aplicado após a transformação para matar todas as células nos tecidos alvo que não estão transformadas ou para identificar as células transformadas através de uma vantagem seletiva. Pode então ser cultivado um calo ou outro crescimento proliferativo de células transformadas do qual plantas podem ser finalmente regeneradas.

O processo descrito aqui não utiliza um calo ou uma fase proliferativa. Ao invés disso, a distribuição gênica mediada por *Agrobacterium* é feita em células no meristema vivo de um embrião de soja retirado de uma semente de soja. Então a região meristemática é cultivada na presença de um agente de seleção e um hormônio para induzir a formação direta de broto. Preferencialmente, o meristema é cultivado na presença do herbicida glifosato, que atua tanto como um agente de seleção assim como um hormônio indutor de broto. O resultado desta etapa é a interrupção ou pelo menos o retardo do crescimento da maioria das células para as quais a construção genética estranha não foi distribuída e a indução simultânea da formação dos brotos de soja, que surgem de um pequeno agrupamento de células incluindo uma célula meristemática transformada. O meristema pode também ser cultivado na presença de um agente de seleção, incluindo, mas não limitado, à canamicina.

Este processo é independente de cultivar. As manipulações do tecido da soja neste processo são análogas às dos processos anteriores de transformação mediada por partícula, que provaram ser adaptáveis a todas as variedades de soja de elite testadas. Este processo está equivalentemente adaptado para direcionar a transformação genética nos cultivares de soja da elite, evitando potencialmente assim a necessidade da reprodução por cruzamentos entre as variedades.

O período de tempo necessário para este processo é enormemente reduzido comparado a outros protocolos de transformação mediada por *Agrobacterium*. Os embriões da soja são expostos à transformação por

Agrobacterium tão logo quanto 6 - 14 horas após a inibição da semente, são co-cultivados durante um ou quatro dias e são então submetidos à seleção de pós-transformação. Os brotos de soja positivos fenotipicamente viáveis podem ser coletados 3 a 6 semanas partindo do início do procedimento. O ciclo de vida da planta R0 inteiro (transformante primário) não é maior que o mínimo necessário para uma planta de soja crescer até a maturidade em uma estufa.

Como com outros processos mediados por *Agrobacterium*, a construção genética estranha ou o transgene, a ser inserida no genoma da soja é criada *in vitro* por técnicas normais de manipulação do DNA recombinante. O constructo genético é então transformado na cepa de *Agrobacterium* para distribuição nas células de soja. A *Agrobacterium* não é oncogênica e várias cepas desta estão atualmente amplamente disponíveis. A construção genética estranha inclui um gene marcador selecionável. São conhecidos vários destes genes marcadores selecionáveis, tal como o gene para a neomicina fosfotransferase II (NPT II), que expressa uma enzima que confere resistência ao antibiótico canamicina e os antibióticos relacionados neomicina, paromomicina, gentamicina e G418. Entretanto, um tipo de gene marcador selecionável preferido é um dos genes que conferem resistência ao herbicida glifosato, tal como o gene EPSP sintase descrito na Patente U.S. Nº 5.633.435 ou o gene da glifosato oxidoredutase descrito na Patente U.S. Nº 5.463.175.

O material de partida para o processo de transformação é uma semente de soja. A semente é primeiro encharcada para amolecimento e então é induzida a iniciar a germinação. As sementes são embebidas em água durante aproximadamente 3 minutos e então permite-se que amoleçam até 2 horas. A etapa de amolecimento não é necessária para cada lote de semente. As sementes de alta qualidade requerem menos amolecimento que as sementes de baixa qualidade. A etapa de amolecimento é para auxiliar a manter o meristema intacto. As sementes são então colocadas em meios de germinação e permite-se que comecem a germinação durante um período de tempo de aproximadamente 6 - 24 horas, preferencialmente du-

rante aproximadamente 6 - 14 horas e mais preferencialmente durante aproximadamente 8 - 12 horas.

Então o embrião é retirado da semente e os tecidos foliares primários são removidos para expor o meristema do embrião da soja.

5 Para a transferência gênica mediada por *Agrobacterium*, é sabido que a produção de danificação na planta facilita a transferência do gene. Portanto é preferido, mas não necessário, que o meristema embrionário seja danificado nesta etapa do processo. Muitos processos de danificação podem ser utilizados, incluindo, por exemplo, corte, raspagem, perfuração, 10 tratamento com agulhão, penetração de partículas finas ou de fluidos pressurizados, danificação do plasma, aplicação de pressão hiperbárica ou sonicação. A danificação pode ser realizada utilizando objetos tais como, mas não limitados a, bisturis, tesouras, agulhas, objetos abrasivos, pistola de ar comprimido, partículas, pistolas elétricas de genes ou ondas sonoras. Uma 15 outra alternativa é a infiltração a vácuo. O procedimento até este ponto terá levado tipicamente 12 - 14 horas.

Preferencialmente a danificação é feita por sonicação ou por danificação por jato de plasma. A sonicação pode ser feita em um sonicador em banho ou com um sonicador em sonda. Um agente umectante, tal como, 20 mas não limitado a, Triton X-100 pode ou não ser utilizado. A sonicação pode ser feita durante entre aproximadamente 5 seg e 10 min, preferencialmente entre aproximadamente 5 segundos e aproximadamente 40 segundos. A sonicação é preferencialmente feita na presença da *Agrobacterium*.

A danificação por jato de plasma é feita utilizando uma pistola 25 elétrica de gene. Os embriões são colocados a aproximadamente 3 - 6 cm, preferencialmente aproximadamente 4 cm dos eletrodos expostos, com 10 µL de água entre eles. Uma dorna Plexiglass é então colocada sobre a câmara e um vácuo parcial é aplicado concorrentemente com um influxo de gás hélio. Um mínimo de aproximadamente 16.000 volts é descarregado 30 através da água, vaporizando a água e criando uma onda de plasma e choque que engolfa os embriões. Os embriões são então colocados na cultura de *Agrobacterium*.

Os explantes são então inoculados com a cultura de *Agrobacterium* durante poucos minutos até algumas horas, tipicamente aproximadamente 0,5 - 3 horas. O meio em excesso é drenado e permite-se que a *Agrobacterium* seja co-cultivada com o tecido meristemático durante vários dias, tipicamente três dias no escuro. Durante esta etapa, a *Agrobacterium* transfere a construção genética estranha para algumas células no meristema da soja.

Depois os explantes são transferidos para um meio contendo o agente de seleção e os antibióticos apropriados. Pretende-se que esta etapa interrompa ou retarde o crescimento de células não transformadas e mate as células de *Agrobacterium* remanescentes. O tempo da cultura depende, em parte, da toxicidade do agente de seleção para as células não transformadas. Para a seleção com glifosato, uma cultura de dois dias é eficiente, mas o tempo desta etapa da cultura é variável, se estendendo de um a sete dias. Para a seleção com a canamicina, os explantes são cultivados de um a sete dias.

Após esta etapa, os meristemas são colocados em um meio condutor para o desenvolvimento do broto 3 - 7 dias. O meio MSR utilizando nos exemplos abaixo contém benzilaminopurina (BAP), um hormônio indutor de broto. Foi descoberto que o glifosato por si só induz a formação de brotos na soja. O termo hormônio também inclui os compostos que regulam o crescimento celular que induzem a formação de broto, incluindo, mas não limitados a, IAA, NAA, IBA, citocininas, auxinas, quinetas, glifosato e tiadiazorun. Sempre que for usado tratamento hormonal, as células individuais transformadas em um meristema dão origem a setores transgênicos de tecido que são incorporados até uma extensão variável no broto que surge diretamente do explante. Após cultura no meio MSR, os explantes são transferidos para WPM-BAP (um meio adequado para desenvolvimento do broto) durante 4-5 semanas.

Os brotos alongados estão prontos para colheita 3-6 semanas após o início do processo inteiro de transformação. Os brotos são avaliados para regularidade fenotípica e saúde e são colhidos apenas os brotos com

caules alongados (com aproximadamente 2,5 cm (1 polegada)) e formação completa de folha trifoliada. Os brotos coletados são colocados em um meio para criar raízes para induzir a formação de raiz. A formação da raiz leva aproximadamente 1-4 semanas, após o que as plantas podem ser transferidas para o solo e deixadas crescer até maturidade completa. Teoricamente, o meio para criar raízes também contém o agente de seleção para ajudar a terminar quaisquer não transformantes.

As plantas R0 criadas por esta técnica são plantas transgênicas e são regularmente recuperadas com rendimentos bastante razoáveis. O número de linhagens germinativas da planta independentes recuperadas está habitualmente na faixa de número de percentagem de apenas um dígito. Assim, uma repetição deste procedimento em 100 meristemas de soja plantados forneceria tipicamente 1-10 linhagens de soja transgênica.

EXEMPLOS

Os exemplos a seguir ilustram melhor a presente invenção. Eles não devem de modo algum ser considerados como uma limitação no âmbito e no significado das reivindicações.

Métodos e materiais

Preparação dos meios

Os meios usados no protocolo de transformação mediado por *Agrobacterium* para desenvolver plantas de soja transformadas foram preparados usando-se métodos padronizados conhecidos de um versado na técnica. As formulações de meios podem ser encontradas nas referências citadas ou na Tabela de Meios (Tabela 3) que estão a seguir destes exemplos.

Preparação de *Agrobacterium*

Os vetores de transformação de *Agrobacterium tumefaciens* foram construídos usando-se técnicas moleculares padronizadas conhecidas daqueles versados na técnica. Estes exemplos usaram os constructos de plasmídeo pMON 21112, que contém tanto o gene FMV CP4syn como o gene e35s GUS; pMON 15737, que contém FMV GUS, NOS NPTII e FMV CP4syn; pMON 36133, que contém e35S NPTII, GFP; e pMON 36152, que

contém e35S cre, FMV CP4. O gene FMV CP4 usado na construção dos plasmídeos é o promotor proveniente do Vírus Mosaico da Verruga do Figo (FMV) seguido pelo gene CP4syn, um gene sintético que codifica a CP4 EPSP sintase. Ver, a Patente US Nº. 5.633.435, que é aqui incorporada
5 como referência. A EPSP sintase, quando expressa, confere um grau substancial de resistência a glifosato sobre a célula da planta e das plantas geradas partindo da mesma. O gene e35s GUS é um gene da beta-glucuronidase, que é tipicamente usada como um marcador histoquímico, atrás do promotor e35s. O gene FMV GUS é o promotor FMV com GUS. O
10 gene NOS NPTII é um gene da neomicina fosfotransferase, que confere resistência à canamicina, atrás do promotor para o gene da nopalina sintase (NOS). GFP é o gene para a proteína de fluorescência verde, que é um marcador selecionável. As culturas de durante toda a noite de cepa de *Agrobacterium* que contém o plasmídeo usado foram cultivadas até a fase
15 log e então diluídas até uma densidade óptica final de 0,3 a 0,6.

Exemplo 1

Transformação e regeneração de explantes

Sementes de soja de cultivar A5403 foram esterilizadas na superfície durante três minutos em clorox a 50%. As sementes foram germinadas em meios de germinação líquidos para o grão (BGM) a uma profundidade do dobro da profundidade dos grãos e incubadas durante toda a noite a 20°C na escuridão. A composição de BGM é fornecida na Tabela de Meios (Tabela 3).
20

Os eixos de semente foram preparados por remoção do revestimento da semente, rompimento dos cotilédones e remoção cuidadosa do tecido da folha primária para expor a região meristemática. Os explantes foram então colocados sobre meios OR perpendiculares à superfície com meristemas fora dos meios e estocados a 15 °C na escuridão durante toda a noite. OR é um meio MS como modificado por Barwale e outros, (Plants
25 167: 473-481, 1986) mais 3 mg/L de BAP, 200 mg/L de Carbenicilina, 62,5 mg/L de Cefotaxima e 60 mg/L de Benomyl.
30

No dia seguinte foram preparados os explantes para inoculação.

Os explantes não-danificados foram colocados diretamente no inóculo do *Agrobacterium tumefaciens*. Os explantes danificados, aqueles com danos no tecido meristemático, foram danificados por jateamento com partículas de ouro, raspando com uma lâmina de bisturi, espicaçando, tratamento com ondas sonoras ou perfurando com agulhas finas. Foi usada infiltração a vácuo também e como uma alternativa a outras técnicas de danificação. Após uma hora no inóculo, os explantes foram colocados com os meristemas com a face para baixo sobre as placas contendo papel de filtro e 3-10 mL de co-cultura padronizada (1/10 meio B5 [Gamborg e outros, Exp. Cell Res., 50: 151-158, 1968]). As placas foram incubadas no escuro à temperatura ambiente durante três dias.

Após a cultura de transformação, os explantes foram transferidos para meios OR líquidos que contêm glifosato 0,2 mM e incubados durante três dias no escuro a 23-28 °C. Após este estágio, os explantes são removidos de meios com OR + glifosato 0,2 mM e transferidos para MSR + glifosato 0,2 mM e incubados no escuro a 28 °C durante sete dias. O meio MSR é meio MS como relacionado acima modificado para incluir 0,4 mg/L de BAP e 0,04 mg/L de IBA (ácido indol 3-butírico). Então os explantes foram transferidos para pequenos recipientes de plástico usados para cultivar pequenas plantas (plantcons) contendo meio de madeira para plantas (WPM) (McCown & Lloyd, Proc. International Plant Propagation Soc., 30: 421, 1981) menos BAP + glifosato 0,075 mM e incubados em luz em câmaras de crescimento a 28 °C com um fotoperíodo de 16 horas de luz / 8 horas de escuridão. Esta etapa induziu a formação de broto e foram observados brotos provenientes de alguns explantes cultivados neste estágio. Tipicamente, os explantes foram transferidos para meio WPM novo de duas em duas semanas até que a colheita estivesse completa.

Após cinco a seis semanas, os explantes tinham crescido de tal modo que os brotos fenótipo positivos podiam ser puxados e enraizados. Estas plantas foram então enviadas para a estufa para crescer e para análise posterior.

Eficiência da transformação

A seleção de glifosato indicou uma eficiência de transformação de 1-3%. A eficiência da transformação foi determinada comparando-se o número de plantas fenotipicamente normais que sobreviveram ao protocolo de seleção com o número de explantes inicialmente preparados e inoculados. A Tabela 1 resume os dados sobre a eficiência da transformação. Todas as plantas indicadas como linhagens germinativas positivas passavam corretamente os transgenes para sua progênie por herança Mendeliana.

Tabela 1 - TRANSFORMAÇÃO DE MERISTEMAS DE *AGROBACTERIUM*
10 Constructo pMON 21112 (FMV CP4, e35s GUS), Cultivar A5403

Experi- mento	Nº de ex- plantes	Prepara- ção do explante	Inocula- ção	Brotos totais envia- dos a GH	Brotos CP4+ Totais	Linhagem germinativa Total até Esta Data (20/4/98)	Linha- gem germi- nativa T.E.
58,1	100	Bombar- deado	Infiltra- do a vácuo	3	3	2/3	2%
58,2	100	Entalha- do	Padrão (sem vácuo)	1	0	0/1	0%
58,3	100	Entalha- do	Padrão	4	4	2/4	2%
58,4	100	Perfurado	Padrão	1	1	1	1%
58,5	100	Perfurado	À vácuo	2	2	2/2	2%
138,8	80	Perfurado	Padrão	1	n/a	1/1	1,2%

Exemplo 2

Sementes de soja de cultivar A 4922 foram deixadas de molho em água destilada estéril durante três minutos à temperatura ambiente então drenadas e deixadas úmidas durante duas horas com agitação periódica. Após duas horas, as sementes foram colocadas em meio BGM até o dobro da profundidade das sementes e as sementes foram incubadas à temperatura ambiente na escuridão.

A doze horas após o início da germinação, foram removidos os eixos das sementes e colocados em água destilada estéril para manutenção. Os meristemas foram então danificados por perfuração com uma agulha, a ferida sendo repetida em todos os três meristemas em cada eixo de semente, o meristema principal e dois secundários associados com cada primórdio de folha axilar. Os meristemas foram então inoculados com cultura de *Agrobacterium* induzida que contém o transgene, aproximadamente 12-14 horas após o início da germinação. Após duas horas, os meristemas foram drenados e colocados em meio de co-cultura durante três dias de co-cultivo no escuro.

No dia 4, os explantes foram colocados em uma placa de petri com BGM, colocados em redemoinho e agitados durante 1 a 2 horas com mudanças de meio BGM. Então, os explantes foram colocados em meio OR com glifosato 0,075 mM e cultivados no escuro à temperatura ambiente durante dois dias.

No dia 6 os explantes foram transferidos para o meio MSR com glifosato 0,075 mM e cultivados no escuro durante três dias à temperatura ambiente.

No dia 9, os explantes foram transferidos para recipientes para cultivo de pequenas plantas contendo WPM menos BAP porém com glifosato 0,075 mM para formação de brotos e foram incubados à luz a 28 °C. Os brotos que apareceram foram cortados dos meristemas dos quais eles surgiram após 4 a 5 semanas. Os brotos foram enraizados e cultivados até a maturidade em uma estufa.

Dos 170 explantes originais sujeitos a este procedimento, foram recuperadas oito plantas fenotipicamente positivas que eram resistentes a glifosato. A análise de dados R1 confirma a presença dos transgenes inseridos.

Exemplo 3

30 Ataque por ondas sonoras e seleção de canamicina

Sementes de soja foram deixadas de molho em água destilada estéril durante três minutos à temperatura ambiente e deixadas úmidas du-

rante duas horas. O meio BGM é adicionado após duas horas a 2-3 vezes a profundidade do volume da semente e incubado à temperatura ambiente no escuro durante seis a onze horas.

5 A oito até treze horas desde o início da germinação, os eixos da semente são removidos das sementes e mantidos em água destilada estéril. Os explantes são lavados com água destilada estéril, drenados e divididos em conjuntos de 50-300. Os conjuntos são colocados em um recipiente juntamente com *Agrobacteria* (induzido ou não induzido) e também podem incluir um agente umidificante. Exemplo de recipientes incluem um tubo de
10 ensaio de vidro de 25 mL juntamente com 2 mL de *Agrobacterium* ou um frasco de vidro de 125 mL com 5-10 mL de *Agrobacterium*.

Cada recipiente é então mantido em um aparelho de ondas sonoras com 500-1000 mL de água destilada no banho de Triton X-100 +/- a 0,1% e tratado com ondas sonoras durante 5-30 minutos nos tubos de ensaio ou durante 20-40 segundos no frasco. O tempo total de inoculação está na faixa de cinco minutos até três horas *Agrobacterium* +/- novo, aplicada infiltração +/- a vácuo múltiplas vezes ou mantida a 63 cm (25 polegadas) de mercúrio ou agitação a 0-120 RPM em um agitador orbital.
15

Os explantes foram então co-cultivados sobre um papel de filtro com um a sete mililitros de meio B5 1/10 durante dois a quatro dias a 23 °C no escuro. Após a co-cultura, os explantes foram enxaguados com BGM e agitados em um agitador orbital durante duas horas para reduzir a carga bacteriana antes da transferência para o próximo estágio.
20

A seleção dos brotos transformados é obtida pelo uso de canamicina ou de glifosato.
25

Seleção de Canamicina

Pode ser usado sulfato de canamicina ou nitrato de canamicina. Após a co-cultura, os explantes são então transferidos para meios OR sólidos mais 0 a 300 ppm de canamicina durante um a sete dias a 23 °C, no escuro. Os explantes são então transferidos para meios WPM menos BAP contendo 50 a 300 ppm de canamicina e colocados a 28 °C, fotoperíodo de
30 16 horas de luz / 8 horas de escuridão. Subculturas a meios WPM com a

mesma concentração de canamicina ou mais alta são feitas um a três semanas mais tarde.

Os brotos surgem entre três e seis semanas após a inoculação. Os brotos são enraizados em BRM com 0 a 175 ppm de canamicina.

5 Seleção de Glifosato

Após co-cultura, os explantes são transferidos a meios OR, OR / MSR ou diretamente a WPM mais glifosato 0 a 2000 μ M glifosato. Os explantes podem levar dois a sete dias sobre meios OR ou dois a cinco dias em OR mais dois a sete dias em meio MSR. Os explantes são transferidos a 10 WPM menos BAP. Em alguns casos é feita uma transferência nova para o mesmo meio após duas semanas.

Os brotos surgem entre três e seis semanas após a inoculação. Os brotos são enraizados em BRM (ver Tabela 3) com glifosato 0 a 40 μ M.

As linhagens germinativas são confirmadas por testagem de 15 tecido da folha de plantas R1 por ensaio GUS, NPTII ELISA, CP4 ELISA ou PCR.

A Tabela 2 apresenta resultados de transformação para três 20 construções diferentes e três variedades de soja que utilizam seleção de canamicina ou de glifosato após danificar por tratamento com ondas sonoras ou agulhão. As eficiências da linhagem germinativa (Número total de explantes / Número total de transformantes da linhagem germinativa) estão na faixa de desde 0,5% até 3,3%.

Tabela 2 - Transformação de *Agrobacterium* Usando Tratamento com Ondas Sonoras e Danificando com Agulhão Utilizando Seleção de Glifosato ou Canamicina

Construtos: pMON 15737 (FMV: GUS; NOS; NPTII; FMV:CP4syn)
 pMON 36133 (e35s:lox: modificado NPTII:lox:GF)
 pMON 36152 (e35s: cre; FMV: arab EPSP TP;CP4 EPSPS)

Experimento	Construto	Varie- dade	Nº de ex- plantes	Tratamento com Ondas Sonoras (s)	Inoculação (horas)	Seleção	Nº. de linha- gens germi- nativas	Linhagem Germinativa TE
4,2	pMON36133	A4922	106	30	1	canamicina (SO4)	1	0,9%
60,6	pMON36133	A4922	33	5	1+vácuo	canamicina (SO4)	1	3,0%
60,7	pMON36133	A4922	30	30	1+vácuo	canamicina (SO4)	1	3,3%
92,5	pMON15737	A3244	92	15	1+vácuo	canamicina (NO3)	1	1,1%
123,1	pMON15737	A3469	200	poked*	1,25	canamicina (NO3)	1	0,5%
123,2	pMON15737	A3469	183	poked	1,25+vácuo	canamicina (NO3)	1	0,5%

continuação

Tabela 2 - Transformação de *Agrobacterium* Usando Tratamento com Ondas Sonoras e Danificando com Agulhão Utilizando Seleção de Glifosato ou Canamicina

Construtos:

PMON 15737 (FMV: GUS; NOS; NPTII; FMV:CP4syn)
 pMON 36133 (e35s:lox: modificado NPTII:lox:GF)
 pMON 36152 (e35s: cre; FMV: arab EPSP TP;CP4 EPSPS)

11,1	pMON36152	A4922	62	15	1	glifosato	1	1,6%
39,1	pMON36152	A4922	38	15	3	glifosato	1	2,6%
68,1	pMON15737	A4922	105	15	1,5	glifosato	2	1,9%
70,2	pMON15737	A4922	107	15	1,25+vácuo	glifosato	1	0,9%
81,1	pMON15737	A4922	113	15	1,75+vácuo	glifosato	1	0,9%

*poked = tratado com agulhão - placa simples para o centro de todos os três meristemas usando uma agulha para tatuagem para sombreado plano 4

Danificação com Jato de Plasma

Grãos de soja foram germinados durante 14 horas como descrito no Exemplo 2. Os danos foram feitos por suspensão dos embriões 4 cm dos eletrodos expostos da pistola elétrica de gene. A descarga foi ajustada até 16.000 volts. Foi estabelecido um vácuo parcial sob gás hélio na câmara de jato. Os embriões foram engolfados no plasma e onda de choque por descarga da voltagem através de um gotícula de água de 10 µL formando ponte entre os eletrodos.

Após danificação os embriões foram incubados com inóculo de *Agrobacterium* contendo pMON 15737 durante 1,5 hora e selecionado com glifosato como descrito no Exemplo 2. Dos sete alvos de 12 embriões para o grupo de controle, foi observado um broto fenotípico e não enraizou sobre o meio de formação de raiz de glifosato. Dos sete alvos de 12 embriões para o grupo de tratamento, foram observados três brotos fenotípicos, um destes foi enraizado e foi enviado para a estufa. Ele deu teste positivo para expressão de GUS no tecido vascular, o que indica transformação de linhagem germinativa e tinha semente GUS positiva, confirmando a transformação na geração R1.

Tabela 3 - MEIOS

20 MEIO DE GERMINAÇÃO DO GRÃO (BGM 2,5%)

<u>COMPOSTO</u>	<u>QUANTIDADE POR LITRO</u>
ESTOQUE BT # 1	10 mL
ESTOQUE BT # 2	10 mL
ESTOQUE BT # 3	3 mL
25 ESTOQUE BT # 4	3 mL
ESTOQUE BT # 5	1 mL
SACAROSE	25 g
Ajustar até pH 5,8	
DISTRIBUÍDO EM FRASCOS COM 1 LITRO DE MEIO, AUTOCLAVADO	
30 <u>ADIÇÕES ANTES DO USO:</u>	<u>por 1 L</u>
CEFOTAXIME (50 mg / mL)	2,5 mL
ESTOQUE DE FUNGICIDA	3 mL

ESTOQUE BT PARA MEIO DE GERMINAÇÃO DO GRÃO

Obter e estocar cada estoque individualmente. Dissolver cada substância completamente na ordem relacionada antes da adição da próxima. Ajustar o volume de cada estoque conseqüentemente. Estocar a 4 °C.

5	<u>Estoque Bt 1</u> (1 litro)	
	KNO ₃	50,5 g
	NH ₄ NO ₃	24,0 g
	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	49,3 g
	KH ₂ PO ₄	2,7 g
10	<u>Estoque Bt 2</u> (1 litro)	
	CaCl ₂ * H ₂ O	17,6 g
	<u>Estoque Bt 3</u> (1 litro)	
	H ₃ BO ₃	0,62 g
	MnSO ₄ .H ₂ O	1,69 g
15	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,86 g
	KI	0,083 g
	NaMoO ₄ .2 H ₂ O	0,072 g
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,25 mL de 1,0 mg/mL de estoque
	CoCl ₄ . 6H ₂ O	0,25 mL de 1,0 mg/mL de estoque
20	<u>Estoque Bt 4</u> (1 litro)	
	Na ₂ EDTA	1,116 g
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,834 g
	<u>Estoque Bt 5</u> (500 ml) Estocar em um recipiente embrulhado em folha metálica	
25	Tiamina-HCl	0,67 g
	Ácido Nicotínico	0,25 g
	Piridoxina-HCl	0,41 g
	<u>ESTOQUE DE MEIO BRM (para 4 L)</u>	
	Sais MS	8,6 g
30	Mio-Inositol (Grau de Cultura de Célula)	0,40 g
	Estoque de Vitamina de Meio de	

	Enraizamento de Soja	8 mL
	L-Cisteína (10 mg / mL)	40 mL
	Sacarose (Ultra Pura)	120 g
		pH 5,8
5	Ágar Lavada	32 g
	ADIÇÕES APÓS AUTOCLAVAGEM:	
	Estoque de Hormônio BRM / TSG	20,0 mL
	Ticarcilina / ácido clavulâmico (100 mg/mL Ticarcilina)	4,0 mL
10	<u>PRÉ-MISTURAS DE HORMÔNIO DE CULTURA DE TECIDO DE SOJA</u>	
	<u>Hormônios MSR Pré-misturados</u>	
	Usar 10,0 mL por litro	
	Estocar no escuro a 4 °C	
	<u>Quantidade para 1 litro</u>	<u>Quantidade para 20 litros</u>
15	0,80 mL de BAP (0,5 mg/mL)	16,0 mL de BAP (0,5 mg/mL)
	0,040 mL de IBA (1,0 mg/mL)	0,80 mL de IBA (1,0 mg/mL)
	9,16 mL de SDW (água destilada estéril)	183,2 mL de SDW
	<u>Hormônios pré-mistos de OR</u>	
	Usar 10,0 mL por litro. Estocar no escuro a 4 °C	
20	<u>Quantidade para 1 litro</u>	<u>Quantidade para 30 litros</u>
	6,0 mL de BAP (0,5 mg/mL)	180,0 mL de BAP (0,5 mg/mL)
	0,037 mL de NAA (1,0 mg/mL)	1,11 mL de NAA (1,0 mg/mL)
	3,96 mL de SDW	118,8 mL de SDW
	<u>Hormônios Pré-misturados de WPM</u>	
25	Usar 10,0 mL por litro	
	<u>Quantidade para 1 litro</u>	<u>Quantidade para 50 litros</u>
	0,080 mL de BAP (0,5 mg/mL)	4,0 mL de BAP (0,5 mg/mL)
	9,92 mL de SDW	496,0 mL de SDW
	Estocar no escuro a 4°C.	
30	Estoque de hormônio de BRM/TSG	
	<u>Quantidade para 1 litro</u>	<u>Quantidade para 40 litros</u>
	6,0 mL de IAA (0,033 mg/ml)	240,0 ml de IAA (0,033 mg/ml)

4,0 mL de SDW

160,0 mL de SDW

Estocar no escuro a 4°C

ESTOQUE DE VITAMINA PARA MEIO DE ENRAIZAMENTO DE SOJA (1 litro)

5	Glicina	1,0 g
	Ácido Nicotínico	0,25 g
	Piridoxina HCl	0,25 g
	Tiamina HCl	0,05 g

10 Dissolver um ingrediente de cada vez, levar até volume, estocar em frasco coberto com folha metálica em refrigerador por não mais do que um mês.

ESTOQUE DE SAIS MS MÍNIMOS 3X (1 litro)

	H ₃ BO ₃	1,86 g
	MnSO ₄ .H ₂ O	5,07 g
15	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2,58 g
	KI	0,249 g
	NaMoO ₄ .2 H ₂ O	0,075 g
	Estoque de CuSO ₄ . 5H ₂ O (1,0 mg/mL)	7,5 µL
	Estoque de CoCl ₄ . 6H ₂ O (1,0 mg/mL)	7,5 µL

20 Dissolver um produto químico de cada vez, ajustar volume, estocar em refrigerador.

ESTOQUE DE FUNGICIDA (100 mL)

	clorotalonila (75% WP)	1,0 g
	benomil (50% WP)	1,0 g
25	captan (50% WP)	1,0 g

Adicionar a 100 mL de água destilada estéril.

Agitar bem antes de usar.

Estocar a 4°C no escuro por não mais do que uma semana.

30 Todas as publicações de pedidos de patente mencionados neste relatório descritivo são indicadoras do nível de conhecimento daqueles versados na técnica à qual pertence esta invenção. Todas as publicações de pedidos de patente estão aqui incorporadas como referência até a mes-

ma extensão como se cada publicação ou pedido de patente individual estivesse especificamente e individualmente indicada para ser incorporada como referência.

5. Embora a invenção tenha sido descrita em detalhe com a finalidade de ilustração, é entendido que tal detalhe é unicamente para aquela finalidade e podem ser feitas variações na mesma por aqueles versados na técnica sem sair do espírito e do âmbito da invenção que é definida pelas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de produção de uma planta de soja com a linhagem germinativa transformada utilizando mediação por *Agrobacterium*, o processo sendo caracterizado pelo fato de que compreende:

5 (a) a iniciação da germinação de uma semente de soja, de 6 a 24 horas;

(b) o isolamento do eixo embrionário da semente de soja para preparar um explante;

(c) a danificação do explante;

10 (d) a transformação de pelo menos uma célula meristemática embrionária do explante através da exposição do explante entre 0,5 a 3 horas a um vetor de *Agrobacterium* desarmado que compreende um constructo genético heterólogo incluindo um gene marcador selecionável, em que a exposição do vetor de *Agrobacterium* ao explante é dentro de 14 horas após o
15 início da etapa (a) e em que o gene marcador selecionável é um gene que codifica a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase;

(e) o cultivo do explante da etapa (d) por 1 a 7 dias na presença de um agente de seleção e um agente indutor de broto para induzir a formação de um ou mais brotos a partir do explante, em que tanto o agente de
20 seleção quanto o agente indutor de broto são glifosato;

(f) o cultivo do broto em uma planta de soja madura fértil inteira.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a proteína EPSP sintase é a proteína CP4.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
25 fato de que o processo de danificação compreende a exposição do explante a ondas ultra-sônicas.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o processo de danificação compreende a exposição do explante a uma descarga de jato de plasma.

30 5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o processo de danificação compreende a perfuração do explante com uma agulha, um objeto afiado ou um objeto abrasivo.

RESUMO

Patente de Invenção: **"PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE UMA PLANTA DE SOJA COM A LINHAGEM GERMINATIVA TRANSFORMADA UTILIZANDO A MEDIAÇÃO POR *AGROBACTERIUM*".**

5 É descrito um processo para a transformação genética de linhagem germinativa mediada por *Agrobacterium* de soja. O processo é baseado na distribuição gênica mediada por *Agrobacterium* em células individuais em um meristema de soja recém-germinado, cujas células podem ser diretamente induzidas a formar brotos que dão origem a plantas transgênicas. O
10 processo não envolve cultura de tecido de fase calo e é rápido e eficiente.