**REGENERAÇÃO DE PLANTAS E EXPRESSÃO TRANSIENTE DE
GUS EM *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. VIA *Agrobacterium*.**

LÚCIA VIEIRA HOFFMANN
Engenheira Agrônoma

Orientadora: Profa. Dra. **MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo-Brasil
1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Hoffmann, Lúcia Vieira

Regeneração de plantas e expressão transiente de gus em *Stylosanthes guianensis*
(Aubl.) Sw. via *Agrobacterium* / Lúcia Vieira Hoffmann. - - Piracicaba, 1996.
109p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
1996.

Bibliografia.

1. Bactéria 2. Cultura de tecido 3. Estilosante 4. Planta transgênica 5.
Transformação genética I. Título

CDD 633.39

**REGENERAÇÃO DE PLANTAS E EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GUS
EM *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. VIA *Agrobacterium***

LÚCIA VIEIRA HOFFMANN

Aprovada em: 16 / 12 / 1996

Comissão julgadora:

Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira

ESALQ / USP

Prof. Dr. Márcio Castro Silva Filho

ESALQ / USP

Prof. Dr. Natal Antônio Gonçalves

ESALQ / USP

Maria Lucia Carneiro Vieira

Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA
Orientadora

**À Tia Amélia
e à minha avó, Nair,
dedico.**

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira, pelo incentivo amigo, e pelo exemplo de dedicação.

À Dra. Elionor Rita Pereira de Almeida e ao Dr. Eugen S. Gander, pela concessão dos plasmídeos pEA24 e pEA ATS:2S.

Ao Dr. Márcio Castro Silva Filho, pelo auxílio com o teste de GUS e discussão de tópicos importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez, pela permissão de uso da lupa com aparato fotográfico.

Ao Dr. Carlos Alberto Labate, pela permissão de uso do espectrofotômetro.

A Sônia Vieira, minha mãe, pela realização de testes estatísticos.

A Carlos Alberto de Oliveira e Lissandra Aparecida Muzaranho pelo auxílio no laboratório, pela amizade e oportunidade de conviver com sua família.

A Victor Augustus Marin e Luciano Consoli pela colaboração no Laboratório e pelas discussões sobre *Agrobacterium*.

Aos colegas Gustavo F. Vieira, Adriana C. Alves, Maria I. Zucchi, Ilene P. Ribeiro, Luciana V. Barbosa, Alexandre F. Garcia e Marcelo C. Dornelas e às amigas Vera M. Quecini e Salete A. Graziola pela simpatia, pelos conselhos e pela confiança que posso ter em cada um.

A Paulo Augusto Vianna Barroso, pelas fotos na lupa, pela ajuda com o computador, e, principalmente, pela paciência e amor.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. O processo de infecção por <i>Agrobacterium</i>	4
3.2. A expressão do T-DNA.....	6
3.3. Transformação de plantas mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
3.4. O cultivo do <i>Stylosanthes</i>	13
3.5. Cultura de tecidos de <i>Stylosanthes</i>	14
3.6. Transformação genética de <i>Stylosanthes</i>	16
3.7. A metionina.....	17
3.8. A albumina 2S da castanha do Pará.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Cultivares.....	21
4.2. Linhagens de <i>Agrobacterium</i> utilizadas.....	21
4.3. Vetores binários utilizados.....	22
4.4. Germinação de sementes.....	24
4.5. Obtenção de explantes para cultura de tecido e transformação de plantas.....	24
4.6. Cultura de tecidos.....	25
4.7. Antibiógramas.....	26
4.8. Manutenção de linhagens de <i>Agrobacterium</i>	27
4.9. Preparo de cultura bacteriana para inoculação de explantes.....	28
4.10. Inoculação com linhagens selvagens.....	29

4.11. Brotação induzida por ferimento.....	30
4.12. Controles utilizados nos experimentos de transformação.....	31
4.13. Cultura de explantes inoculados com linhagens desarmadas.....	32
4.14. Inoculação e cocultivo em tabaco e explantes hipocotiledonares de <i>Stylosanthes guianensis</i>	35
4.15. Expressão de GUS.....	35
4.16. Cultura de explantes inoculados com linhagens de <i>Agrobacterium</i> transformadas com vetores binários contendo o gene da albumina 2S.....	36
5. RESULTADOS.....	40
5.1. Germinação de sementes e obtenção de explantes.....	40
5.2. Cultura de tecidos.....	41
5.3. Antibiógramas.....	53
5.4. Capacidade de infecção de linhagens selvagens.....	60
5.5. Brotação induzida por ferimento.....	68
5.6. Caracterização das linhagens desarmadas de através da expressão transiente de GUS em tabaco.....	71
5.7. Expressão transiente de GUS em <i>Stylosanthes</i>	73
5.8. Ensaio de transformação de explantes derivados de folíolos do cultivar Bandeirantes.....	76
5.9. Ensaio de transformação de explantes hipocotiledonares dos cultivares Mineirão e Bandeirantes.....	78
6. DISCUSSÃO.....	84
7. CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE FIGURAS

	Página
4.1 Os vetores binários pEA24 e pEA ATS:2S.....	23
4.2 Procedimentos utilizados nos quatro ensaios de inoculação de explantes derivados de folíolos com a linhagem LBA4404 (p35S GUS INT).....	34
4.3 Procedimentos utilizados para inoculação de explantes derivados de hipocótilos do cultivar Bandeirantes com a linhagem GV3101 (pEA24), nos tratamentos A e B.....	38
4.4 Procedimentos utilizados para inoculação de explantes derivados de hipocótilos do cultivar Mineirão com a linhagem GV2260 (pEA24), em três tratamentos (A, B e C).....	39
5.1 Explantes do cultivar Mineirão aos 28 dias de cultura A) Hipocótilo superior (0,1 mg/l NAA; 0,5 mg/l BAP) B) Hipocótilo inferior (0,1 mg/l NAA; 0,1mg/l BAP) C) Raiz (0,1 mg/l NAA; 0,1 mg/l BAP) D) Cotilédones nas 20 diferentes combinações dos reguladores de crescimento.....	53
5.2 Resposta do cultivar Bandeirantes à inoculação com linhagens selvagens. A) Tumores em hipocótilo inoculado com a linhagem A208; B) Brotos partindo dos locais de ferimento com seringa, em hipocótilo inoculado com a linhagem 8196; C) Hipocótilo inoculado com a linhagem 8196, mostrando tumor, e um broto desenvolvido; D) Plântula excisada de hipocótilo inoculado com a linhagem A4, mantida em ½ MS, mostrando sintoma semelhante a tumor.....	61
5.3 Expressão transiente de GUS A) Tabaco inoculado com as linhagens GV3101 (pEA24), GV2260 (pEA24) e GV2260 sem vetor binário B) Explante derivado de raiz do cultivar Bandeirantes inoculada com a linhagem GV3101 (pEA24) C) Explante hipocotiledonar do cultivar Mineirão com 4 dias inoculados com a linhagem GV2260 (pEA24) D) Explante hipocotiledonar do cultivar Mineirão com 4 dias inoculados com a linhagem GV2260 (pEA ATS:2S).....	74

5.4	Expressão transiente de GUS em explantes hipocotiledonares de 16 dias, durante os ensaios de transformação. A) Cultivar Mineirão inoculado com a linhagem GV2260 (pEA24) B) Cultivar Bandeirantes inoculado com a linhagem GV3101 (pEA24).....	75
-----	---	----

LISTA DE TABELAS

	Página
3.1 Espécies transformadas com a albumina 2S da castanha do Pará.....	20
4.1 Linhagens selvagens de <i>Agrobacterium</i> e sua classificação molecular por tipo de opina sintetizada	21
5.1 Pesos médios de explantes derivados de hipocótilo superior, hipocótilo inferior, folíolo, cotilédone e raiz, segundo cultivar, e número de repetições, entre parênteses.....	41
5.2 Proporção de explantes derivados de hipocótilos superiores que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes, segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; aos 28 dias em cultura (cultivar Bandeirantes).....	42
5.3 Proporção de explantes derivados de hipocótilos inferiores que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; aos 28 dias em cultura (cultivar Bandeirantes).....	43
5.4 Proporção de explantes derivados de cotilédones que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP ; aos 28 dias em cultura (cultivar Bandeirantes).....	44
5.5 Proporção de explantes derivados de raízes que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes, segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; aos 28 dias em cultura (cultivar Bandeirantes).....	45

- 5.6 Proporção de explantes derivados de folíolos que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot); e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes, segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP aos 28 dias em cultura (cultivar Bandeirantes).....46
- 5.7 Proporção de explantes derivados de hipocótilos superiores que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; aos 28 dias em cultura (cultivar Mineirão).....47
- 5.8 Proporção de explantes derivados de hipocótilos inferiores que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; aos 28 dias em cultura (cultivar Mineirão).....48
- 5.9 Proporção de explantes derivados de cotilédones que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes, segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; aos 28 dias em cultura (cultivar Mineirão).....49
- 5.10 Proporção de explantes derivados de raízes que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes, segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; aos 28 dias em cultura (cultivar Mineirão).....50

5.11	Proporção de explantes derivados de folíolos que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes, segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; aos 28 dias em cultura (cultivar Mineirão).....	51
5.12	Idade mínima para a ocorrência de gemas em pelo menos uma das combinações de reguladores de crescimento em função do tipo de explante e do cultivar analisado.....	52
5.13	Combinações de reguladores de crescimento mais adequadas para regeneração de explantes derivados de folíolo, raiz, cotilédone, hipocótilo superior e hipocótilo inferior dos cultivares Mineirão e Bandeirantes de <i>Stylosanthes guianensis</i>	56
5.14	Percentual de explantes hipocotiledonares com calos ou brotos segundo as doses e tempo de permanência em cefotaxime.....	57
5.15	Percentual de explantes derivados de cotilédones e hipocótilos com formação de calo e com regeneração de brotos e número médio de brotos nos que tiveram brotação, por época de avaliação e por doses de kanamicina.....	58
5.16	Percentual de explantes derivados de folíolos com formação de calo e com regeneração de brotos e número médio de brotos nos que tiveram brotação, por época de avaliação e por doses de kanamicina e cefotaxime.....	60
5.17	Segundo ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens de <i>Agrobacterium</i> : período de crescimento da subcultura (T), leitura de absorbância a 660 nm (A_{660}) e data da avaliação, em dias.....	62
5.18	Terceiro ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens de <i>Agrobacterium</i> : período de crescimento da subcultura (T), leitura de absorbância a 660 nm (A_{660}) e data da avaliação em dias.....	63

5.19 Número de repetições (n), média (x) e desvio padrão (s) do número de tumores, de acordo com o tratamento, no segundo ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens.....	63
5.20 Número de repetições (n), média (x) e desvio padrão (s) do número de brotos, de acordo com o tratamento, no segundo ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens	64
5.21 Número de repetições (n), média (x) e desvio padrão (s) do número de tumores , de acordo com o tratamento, no terceiro ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens.....	64
5.22 Número de repetições (n), média (x) e desvio padrão (s) do número de brotos, de acordo com o tratamento, no terceiro ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens	64
5.23 Comparações múltiplas, através de teste não paramétrico, ao nível de 5% de significância, do número de tumores e do número de brotos, de acordo com o tratamento, no segundo ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens.....	65
5.24 Comparações múltiplas, através de teste não paramétrico, ao nível de 5% de significância, do número de tumores e do número de brotos, de acordo com o tratamento, no terceiro ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens.....	66
5.25 Número de repetições (n) , proporção de cotolédones com calo no local de excisão (%CE), calo no local de ferimento (%CF), raízes no local de excisão (%RE) e raízes no local de ferimento (%RF) , segundo o tratamento.....	67
5.26 Porcentagem de hipocótilos com brotos nos locais de excisão (ápice), ou nos locais onde foi feito ferimento com seringa (terço superior), o número médio de brotos nos explantes que apresentaram brotação (med. broto) e tamanho médio dos brotos com 1mm ou mais, em centímetros, segundo o tratamento.....	69

Página

5.27 Número de repetições (n); porcentagem de explantes com broto (%broto); número médio de brotos nos experimentos que apresentaram brotos (med. broto), e tamanho médio dos brotos, em centímetros, decorridos 28 dias após a inoculação, segundo a linhagem inoculada, o método de preparo das bactérias para inoculação e o tratamento.....	69
5.28 Linhagens desarmadas caracterizadas através da expressão de GUS em tabaco, com o período de crescimento de subcultura (T), a leitura da densidade ótica (A_{660nm}), número de clones bacterianos testados e resultados do teste de GUS em tabaco.....	72
5.29 Número de explantes ou meio explantes com pontos azuis e total de explantes inoculados, entre parênteses.....	73
5.30 Número de explantes inoculados e porcentagem de calos com regeneração em explantes derivados de folíolos aos 28, 56 e aos 84 dias de cultura, segundo o ensaio, o método de inoculação e o tratamento utilizado.....	77
5.31 Número de explantes e meio explantes positivos para GUS e o número de explantes amostrados em cada ensaio, entre parêntesis.....	79
5.32 Número de explantes (n) derivados de hipocótilos superiores (S) e inferiores (I) inoculados e porcentagem de explantes com calo ou regeneração de brotos aos 28 e 56 dias em cultura, segundo o cultivar e o tratamento.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Asy - *acetosyringone*

BAP - 6-benzilaminopurina

EDTA - etilenodiaminotetraceto

GUS - β -glucuronidase

MS - meio de cultura basal descrito por Murashige & Skoog (1962)

$\frac{1}{2}$ MS - meio de cultura basal descrito por Murashige & Skoog (1962), com a metade da concentração original de sais e compostos orgânicos.

MYA - meio de cultura usado para *Agrobacterium*, descrito por Tepfer & Casse-Delbart, 1987.

NAA - ácido naftalenoacético

X-Gluc - ácido 5-bromo-4-cloro- 3-indolyl β -D-glucurônico

REGENERAÇÃO DE PLANTAS E EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GUS EM *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. VIA *Agrobacterium*.

Autora: Lúcia Vieira Hoffmann
Orientadora: Maria Lúcia Carneiro Vieira

RESUMO

Com o objetivo de estabelecer um protocolo de transformação de *Stylosanthes guianensis* via *Agrobacterium* foram estabelecidos primeiramente protocolos de cultura de tecidos para explantes derivados de hipocótilo superior, hipocótilo inferior, cotilédone, folíolos e raízes dos cultivares Mineirão e Bandeirantes. Houve pelo menos uma combinação dos reguladores de crescimento NAA (ácido alfa naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina) que propiciaram 100% de regeneração de brotos, exceto a partir de explantes cotiledonares de ambos os cultivares e raízes do cultivar Mineirão, onde observou-se regeneração da ordem de 67%. Os explantes mais eficientes foram hipocótilos superiores e inferiores do cultivar Mineirão, que deram origem, em média, a 20 e 16,7 brotos por explante, respectivamente. Os demais explantes apresentaram médias entre 2 a 10 brotos.

As linhagens A208 e T37 de *Agrobacterium tumefaciens* e as linhagens 8196, A4 e A4T de *A. rhizogenes* causaram aparecimento de tumores em hipocótilos excisados de plântulas do cv. Bandeirantes germinadas *in vitro*. Os ferimentos causados pela inoculação levaram à formação de brotos nestes locais. A suscetibilidade ao *Agrobacterium* dos explantes com capacidade de formar brotos, na presença de ferimentos, pode consistir em um método

alternativo para transformação de *Stylosanthes*, sem necessidade do uso de cultura de tecidos.

Nos experimentos de transformação, foram utilizados os plasmídeos pEA24 e pEA ATS:2S, que contêm o gene da albumina 2S da castanha do Pará, rico em metionina, ligado ao gene *uidA* e ao marcador seletivo NPTII. A eficiência da transferência genética foi avaliada através de ensaio de GUS, 48 horas após o término do cocultivo, e demonstrou-se a eficiência do procedimento de inoculação utilizando-se explantes derivados de hipocóilos e raízes.

Foram feitos dois experimentos de transformação com o cultivar Bandeirantes (303 explantes) e três com o cultivar Mineirão (753 explantes), inoculados, respectivamente, com as linhagens GV3101 (pEA24) e GV2260 (pEA24).

O uso de controles permitiu concluir que a lavagem em tetraciclina não prejudicou a regeneração, e o cefotaxime teve efeito similar ao de uma auxina, aumentando a formação de calo e atrasando a formação de brotos.

A kanamicina foi ineficaz como agente seletivo porque permitiu a formação de brotos não transformados e teve uma ação desuniforme, isto é, formaram-se brotos verdes não-transgênicos e brotos necróticos muito próximos, em um mesmo calo. Surgere-se então pela não utilização deste agente seletivo em experimentos de transformação com o cultivar Mineirão.

PLANT REGENERATION AND GUS TRANSIENT EXPRESSION IN *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. VIA *Agrobacterium*.

Author: Lúcia Vieira Hoffmann

Adviser: Prof. Dr. Maria Lúcia Carneiro Vieira

Protocols for hypocotyl, cotyledon, leaflet and root derived tissue culture from cultivars Bandeirantes and Mineirão of *Stylosanthes guianensis* were established. There was at least one combination of the growth regulators NAA (naphthaleneacetic acid) and BAP (6-benzylaminopurine) that led to 100% of plant regeneration for all explants except cotyledon explants. In this case, around 67% of plant regeneration was achieved. Mineirão hypocotyl derived explants were the most efficient because they generated, for the superior and inferior hypocotyl halves, on average 20 and 16,7 shoot buds per explant, respectively. All other explants produced averages between 2 to 10 shoot buds.

Tumors were incited on cv. Bandeirantes hypocotyl excised from *in vitro* germinated plantlets by the *Agrobacterium tumefaciens* A208 and T37 strains and the *A. rhizogenes* 8196, A4 e A4T strains. The inoculation led to shoot formation at the wound sites. Since shoot development and tumor occur at the same sites, it can be suggested that this procedure is an alternative for transforming *Stylosanthes* without using tissue culture.

The plasmids pEA24 e pEA:ATS2S containing the metionine rich 2S albumin gene, the selectable marker *nptII* and the reporter *uidA* were used in transformation assays. The GUS histochemical assay 48 hours after cocultivation showed efficiency of the inoculation procedure utilizing hypocotyl and root derived explants.

Two transformation experiments with Bandeirantes (303 explants) and two with Mineirão (753 explants) inoculated with MP90 (pEA24) and GV3101 (pEA24) respectively were carried out.

The procedures used to kill the bacterias were evaluated by comparing treated groups with controls. It was concluded that washing the explants in a tetracycline solution had no effect in regeneration and that cefotaxime had an auxin like effect.

Kanamycin was inefficient as a selective agent since it allowed untransformed shoot development and had an ambivalent effect because both non transgenic green shoots and necrotic shoots were formed very near in the same callus. So it can be suggested that this selective agent should not be used in *S. guianensis* cv. Mineirão transformation experiments.

1. INTRODUÇÃO

O *Stylosanthes* é uma leguminosa nativa das Américas Central e do Sul, sendo o Brasil seu principal centro de diversidade genética. Tem importância agrônômica como planta forrageira, tendo sido usado inicialmente na Austrália, e mais tarde também no Brasil. Recomenda-se seu uso no cerrado brasileiro, pois mostra tolerância tanto a solos ácidos como a solos com baixo teor de fósforo.

Um dos objetivos do melhoramento genético de plantas forrageiras é o de melhorar sua qualidade nutricional. Mais especificamente, o melhoramento de pastagens visa incrementar a qualidade proteica da matéria verde, onde os aminoácidos essenciais devem estar em proporções adequadas. No entanto, as composições de aminoácidos são características definidas nas espécies vegetais, com pouca variabilidade dentro da espécie e mesmo entre famílias vegetais. Uma abordagem possível para obter este balanço de aminoácidos é a transformação de variedades com genes que codificam para proteínas ricas em aminoácidos essenciais, cujos teores estejam aquém do desejado.

A metionina é um aminoácido essencial frequentemente em baixas proporções nos alimentos, particularmente em leguminosas. É necessário ser adicionado em rações para conseguir a formulação desejada. Assim, é de interesse a obtenção de um componente de ração especialmente rico neste aminoácido.

Um gene especialmente rico em metionina foi clonado a partir de uma proteína de reserva da castanha do Pará (Gander et al., 1991) e tem sido usado para transformação de diferentes espécies. Existe interesse em transformar o *Stylosanthes* com este gene, pois ele é fonte de proteína de pastagens. Ao mesmo tempo apresenta-se apto a transformação por ser planta modelo em cultura de tecidos, além de hospedeiro do *Agrobacterium*.

2. OBJETIVOS

- Estabelecer um protocolo de regeneração para cinco diferentes explantes (raiz, folíolo, cotilédone, hipocótilo superior e hipocótilo inferior) de dois cultivares de *Stylosanthes guianensis* desenvolvidos pela EMBRAPA, o Bandeirantes e o Mineirão.
- Verificar a suscetibilidade de *S. guianensis* às linhagens selvagens de *Agrobacterium*.
- Verificar a suscetibilidade dos diferentes explantes a linhagens engenheiradas de *Agrobacterium*, através da verificação da expressão transiente de GUS.
- Caracterizar a resposta de explantes ao agente seletivo kanamicina e ao cefotaxime .
- Colaborar na definição de um protocolo de transformação para *S. guianensis*

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O PROCESSO DE INFECÇÃO DE PLANTAS POR *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens e *A. rhizogenes* são patógenos de plantas. *A. tumefaciens* causa a doença galha da coroa e *A. rhizogenes* causa a síndrome da raiz em cabeleira. O processo que permite o aparecimento das doenças é peculiar, pois depende da transferência de uma série de genes (oncogenes), que originalmente encontram-se em um plasmídeo da bactéria, para a planta hospedeira. Para que os sintomas das doenças se manifestem é ainda necessário que os genes transferidos integrem-se no genoma do hospedeiro.

O conhecimento do processo de infecção pelo *Agrobacterium* permitiu aproveitá-lo para a transformação genética de plantas onde genes de interesse devem ser transferidos ao hospedeiro, em lugar dos oncogenes. Esta revisão aborda de forma resumida os mecanismos celulares que permitem a infecção, processo este revisto de forma mais completa por Brasileiro (1993), Baron & Zambryski (1995), Hooykaas & Beijersbergen (1994), Lipp-Nissinen (1993), Weising & Kahl (1996) e Zambryski (1988).

O processo de infecção inicia-se com o movimento da bactéria em direção à célula hospedeira. Mutantes deficientes em motilidade ou em quimiotaxia não são infectivos em condições de solo, mas são infectivos quando a bactéria é diretamente inoculada no tecido vegetal, enquanto mutantes

incapazes de fixar-se no hospedeiro são sempre avirulentos. A fixação da bactéria na superfície da célula hospedeira é, portanto, essencial à formação de tumor. É feita através de uma proteína de nome ricadesina. Fibrilas de celulose reforçam a ligação, e têm também a função de manter as bactérias unidas, formando agregados. Aparentemente, existe um componente de membrana específico na célula vegetal que a bactéria reconhece, e ao qual se liga, conforme relato de Broek & Vanderleyden (1995).

Fenóis e açúcares exsudados pelas plantas são reconhecidos por uma proteína localizada na membrana de *Agrobacterium*, chamada VirA. Lee et al. (1992) demonstraram que α -bromoacetosyringone, um composto que se demonstrou ser inibidor desta interação, não interage com VirA, mas com duas outras proteínas, que seriam então mediadoras da interação.

A proteína VirA tem a porção N-terminal no espaço periplasmático e a porção C-terminal no citoplasma. O domínio periplasmático de VirA está relacionado com o reconhecimento de moléculas-sinal. A porção citoplasmática tem atividade de autofosforilação, em uma histidina. A fosfohistidina é altamente energética tendo um período de existência curto, e transfere seu grupo fosfato a uma proteína citoplasmática, chamada VirG (Jin et al., 1990).

A proteína VirG tem a propriedade de, quando fosforilada, ligar-se ao plasmídeo Ti, em uma sequência regulatória responsável pela indução dos genes da região de virulência, chamada *vir box*. A fosforilação não é essencial para que o acoplamento ocorra: quando artificialmente produzem-se na célula moléculas VirG em excesso, ocorre acoplamento e indução de transcrição mesmo pelas moléculas não fosforiladas. Em condições normais, a fosforilação regula a atividade de transcrição, através, provavelmente, da alteração da conformação espacial da proteína VirG. A afinidade de VirG por *vir box* é significativamente aumentada com a fosforilação (Roitsch et al., 1990).

As proteínas VirD1 e VirD2 são responsáveis pela clivagem da região T-DNA e pela atividade topoisomerase, de maneira similar ao início da transferência conjugativa de um plasmídeo (Scheiffele et al., 1995).

As proteínas codificadas pela região VirC são necessárias para transformação de algumas espécies. Atuam no corte ou relaxamento do T-DNA juntamente com as proteínas VirD, de uma maneira ainda não identificada, segundo relato de Weising e Kahl (1996).

A região VirB é formada por 11 genes. Nove das proteínas VirB foram localizadas por técnicas imunológicas na membrana interna do *Agrobacterium* (Stephens et al., 1995). Esses genes têm homeologia com os genes *tra* do plasmídeo RP4, um plasmídeo conjugativo capaz de transferir DNA para bactérias gram - positivas, gram - negativas ou mesmo leveduras. A homeologia sugere que os plasmídeos RP4 e Ti tenham origem evolutiva comum (Lessi & Lanka, 1994). Os genes *tra* são responsáveis pela formação de *pilus* necessário para a transferência do plasmídeo durante a conjugação bacteriana. Supostamente, as proteínas VirB, do Ti, são responsáveis pela formação de poros na membrana que permitem a exportação do T-DNA.

As proteínas VirE formam um complexo com o T-DNA. A proteína VirE2 tem um sinal com função de direcionar o complexo ao núcleo da célula do hospedeiro (Citovsky et al., 1992).

3.2. A EXPRESSÃO DO T-DNA

Os plasmídeos Ti e Ri têm a região de virulência muito semelhante, no entanto, existem diferenças entre os dois plasmídeos na região que é transferida para a planta hospedeira.

Em *A. tumefaciens* os genes responsáveis pela formação do tumor na planta infectada localizam-se na região do Ti chamada T-DNA. O tumor é resultado do aumento simultâneo da concentração de auxinas e citocininas no local de infecção. Algumas linhagens mutantes são incapazes de provocar aumento na produção de auxina, e, com a produção de citocinina apenas, surgem, ao invés de tumor, brotos. As mutações que causam esta alteração de

sintoma podem ocorrer em dois diferentes *loci*, que são chamados “tumor morphology shoots” (*tms1* e *tms2*) (Garfinkel et al., 1981). De maneira análoga, mutantes em outro *locus* não alteram a concentração de citocinina, causando na planta inoculada a formação de raízes, devido ao aumento da concentração de auxina; este *locus* é chamado “tumor morphology roots” (*tmr*) (Leemans et al., 1982).

O produto do gene *tms1* (também chamado *iaaM*) converte triptofano em indol-3-acetamida (IAM), que, por si, não tem atividade auxínica; o produto do gene *tms2* (também chamado *iaaH*) é uma enzima que hidrolisa IAM, transformando-a em ácido 3-indol acético (IAA), uma auxina (Inzé et al., 1984; Schröder et al., 1984). O produto do gene *tmr* (também chamado *ipt*) é uma isopenteniltransferase, que atua no primeiro passo na biossíntese de citocininas (Buchmann et al., 1985).

Em *Agrobacterium rhizogenes*, na região de transferência do Ri para a planta hospedeira existem genes da biossíntese de auxinas *iaaM* e *iaaH*, também chamados, respectivamente, de *aux1* e *aux2*, conforme relato de Gaudin & Jouanin (1995). Na região TL estão os genes *rolA*, *rolB* e *rolC*. Os genes *rolA*, *rolB* e *rolC* podem, isoladamente induzir a formação de raízes em folhas de tabaco (Spena et al., 1987). O papel específico de cada um destes genes, no entanto, permanece obscuro.

Plantas de tabaco transformadas somente com a região TL podem apresentar fenótipo pouco alterado (T) ou muito alterado (T'), com entrenós curtos e folhas enrugadas. As plantas T ou T' não apresentaram no ápice, concentrações mais elevadas de ácido abscísico (ABA) e ácido indol acético (AIA), normalmente encontradas em plantas não transgênicas. Plantas de tabaco transformadas com o gene *rolA* também mostravam perda deste gradiente de concentração (Prinsen et al., 1994). Ao gene *rolA* atribuiu-se também atividade relacionada ao aumento de concentração de poliaminas, que são reguladores de crescimento necessários na divisão celular (Altabella et al., 1995). Surteu-se que o gene *rolB* estaria associado à formação de

meristemas, independentemente de sua posterior diferenciação (Altamura et al., 1994).

Oncogenes têm sido utilizados para transformar plantas com o objetivo de modificar caracteres de importância econômica que possam futuramente ser utilizados no melhoramento genético. Por exemplo, as auxinas são necessárias para manutenção de atividade do câmbio vascular, e genes da biossíntese de auxinas do T-DNA foram introduzidos em *Populus*, causando alterações na estrutura da madeira (Tuominen et al., 1995). Genes *rol* de *A. rhizogenes* foram utilizados para transformar alfafa visando obtenção de transformantes com aumento de produtividade (Frugis et al., 1995).

A inoculação de plantas com linhagens selvagens de *Agrobacterium tumefaciens* pode induzir a formação de brotos transformados que contêm T-DNA. Estes brotos são chamados de teratomas (Wilmitzer et al., 1983).

A propriedade de algumas linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*, quando inoculadas no hospedeiro, gerar desbalanço hormonal e induzir a formação de brotos, que não contêm T-DNA, tem sido aproveitada como um mecanismo de regeneração de plantas (Brasileiro, 1992). No caso de *A. rhizogenes* este fenômeno é mais raramente observado (Damgaard & Rasmussen, 1991).

As regiões de transferência de *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* contêm genes cujos produtos são enzimas responsáveis pela síntese de opinas. As opinas são sintetizadas pela planta hospedeira e secretadas no solo, onde são utilizadas. Este sistema dá vantagem seletiva ao *Agrobacterium*, conforme relato de Weising & Kahl (1996).

3.3. TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*

Em 1985, foi desenvolvido o chamado método de infecção de folhas de tabaco. Pedacos de folhas de tabaco, petúnia e tomate foram mergulhados em meio líquido com *Agrobacterium*, e transferidos para meio de regeneração sólido, onde explantes e bactérias eram cocultivados por dois ou três dias. Em seguida eram transferidos para o mesmo meio contendo carbenicilina, para eliminar as bactérias, e kanamicina, como agente seletivo (Horsch et al., 1985). Este método mostrou-se prático e de ampla aplicação, e vem sendo usado em um número crescente de espécies, ao mesmo tempo que modificações são feitas para otimização do método, em cada caso.

A eficiência do cocultivo depende do tipo de explante (Hiei et al., 1994; Li et al., 1992), do seu estágio de desenvolvimento (Schläppi & Hohn, 1992; Torres et al., 1993), de seu tamanho (Sarmiento et al., 1992) e das condições de crescimento da planta da qual é obtido esse explante (Van der Graaff & Hooykaas, 1996; Li et al., 1992).

A maioria das dicotiledôneas são suscetíveis a *Agrobacterium tumefaciens*, no entanto, em nenhuma monocotiledônea se observa, na natureza, a galha da coroa (Weising & Kahl, 1996). Demonstrou-se que os genes do T-DNA puderam ser transferidos e integraram-se no genoma da monocotiledônea *Discorea bulbifera* (Schäfer et al., 1987). Atualmente, existem muitos relatos de transformação de monocotiledôneas mediada por *A. tumefaciens*, como, por exemplo, milho (Ishida et al., 1996; Schläppi & Hohn, 1992; Shen et al., 1993), arroz (Hiei et al., 1994; Li et al., 1992; Rashid et al., 1996), banana (May et al., 1995), lírio (Langeveld et al., 1995) e antúrio (Chen & Kuehnle, 1996).

O tecido meristemático é o que tem sido mais frequentemente usado na transformação de monocotiledôneas por *Agrobacterium*. No entanto, o uso deste tecido facilita o surgimento de plantas quiméricas (Bidney et

al., 1992). A transformação de banana (*Musa acuminata*) por *Agrobacterium tumefaciens* foi demonstrada por May et al. (1995) a partir de tecidos meristemáticos. Das plantas regeneradas na presença do agente seletivo kanamicina, 60% mostraram sinais de toxidez quando colocadas em meio de enraizamento, também com kanamicina; isto foi atribuído ao quimerismo. Dos transformantes putativos que enraizaram, possivelmente também quiméricos, foram excisadas fatias de meristema, as quais foram colocadas em meio de regeneração; a pequena espessura das fatias permitia contato estreito com o meio de cultura contendo o antibiótico. Esta re-seleção, rígida, garantiu a obtenção de transformantes não quiméricos.

Exsudatos de ferimentos de tecidos vegetais têm a propriedade de induzir a região de virulência do Ti a processar a transferência do T-DNA. Um dos compostos responsáveis por esta propriedade é o *acetosyringone* (Stachel et al., 1985). A adição de *acetosyringone* à suspensão de bactérias ou ao meio de cocultivo pode aumentar a eficiência do *Agrobacterium* em transferir o T-DNA (Shen et al., 1993), ou ser essencial para que esta transferência ocorra (Hiei et al., 1994; Rashid et al., 1996).

A realização de ferimentos também pode favorecer a transferência do T-DNA. Bidney et al. (1992) demonstraram que ferimentos provocados por bombardeamento de micropartículas aumentaram a frequência de transformação mediada por *Agrobacterium* em tabaco e permitiram a transformação em girassol. O método tem sido usado em novas espécies (May et al., 1995; Scorza et al., 1995). Outros mecanismos, como uso de pinça (Shen et al., 1993) ou escova (Jong et al., 1993) para produzir ferimentos adicionais aqueles necessários para excisar o explante, podem favorecer a transferência de genes.

Numa segunda etapa, as células transformadas devem ser recuperadas em cultura de tecidos. Por problemas decorrente desta etapa, o sucesso da transferência de genes nem sempre coincide com taxas satisfatórias de transformação.

Mukhopadhyay et al. (1992), mostraram que hipocótilos e cotilédones de *Brassica campestris*, positivos para GUS após o cocultivo, não originavam brotos transgênicos quando a regeneração era direta, a partir de células do parênquima vascular. Porém, davam origem a brotos transformados quando as mesmas células regeneravam via calo.

O cocultivo pode afetar a capacidade de regeneração dos explantes transformados. A regeneração em crisântemo foi prejudicada pelo cocultivo, mas recuperada quando foi utilizado um intervalo de oito dias entre a excisão do explante e realização de ferimentos (Jong et al., 1993).

Em *Vitis vinifera* o cocultivo provoca necrose e morte do tecido, que ocorrem cerca de 48 horas após sua finalização; simultaneamente, ocorre aumento da atividade de peroxidases, um sistema enzimático relacionado a resposta de plantas a infecção por patógenos, e que provoca oxidação de polifenóis, e, conseqüentemente, necrose (Perl et al., 1996). O uso de antioxidantes durante o cocultivo e nos sete dias subsequentes restauraram a capacidade de regeneração dos embriões de *Vitis* e a obtenção de plantas transgênicas.

Para transformação em arroz, oito diferentes explantes foram cocultivados com *Agrobacterium* e, imediatamente após, verificou-se a expressão do gene repórter *uidA* em sete destes, demonstrando a eficiência do cocultivo; três semanas após, entretanto, a expressão de GUS mostrou-se variável dependendo do explante: por exemplo, 90% dos meristemas apicais expressavam GUS logo após o cocultivo, mas, com três semanas em cultura, nenhum manteve a expressão. Calos derivados de escutelo foram os mais eficientes, com 93% de explantes expressando GUS quando o teste foi realizado logo após o cocultivo e 23%, três semanas após (Hiei et al., 1994).

Resultados semelhantes foram obtidos em milho (Ishida et al., 1996), mostrando que a expressão do gene repórter imediatamente após o cocultivo não era coincidente com as melhores freqüências de transformação.

Para eliminar as bactérias dos explantes inoculados, os antibióticos mais frequentemente usados são a carbenicilina e o cefotaxime. Ambos podem ter ação de auxina (Lin et al., 1995; Sarma et al., 1995). O efeito tóxico destes antibióticos é considerado mínimo. Em quatro genótipos de *Solanum tuberosum* analisados a carbenicilina em doses de 0 a 750mg/l e cefotaxime em doses de 0 a 400mg/l não influenciaram a regeneração (Park et al., 1995). Em tabaco, o efeito tóxico da carbenicilina apareceu somente quando em combinação com o regulador de crescimento 2,4-D, surgindo que a toxidez fosse devida ao excesso de auxina (Lin et al., 1995). Em *Picea sitchensis*, o desenvolvimento de embriões maduros era impedido pela adição de carbenicilina ao meio de cultura, enquanto que, com o uso de cefotaxime, os embriões desenvolviam-se, embora em uma taxa reduzida de 66 a 80% em relação aos controles (Sarma et al., 1995). Em *Arabidopsis thaliana*, a alteração do antibiótico usado para eliminar as bactérias, de cefotaxime para vancomicina e augmentina, permitiu um aumento na frequência de transformação em 1,9 vezes (Van der Graaf & Hooykaas, 1996). Concluiu-se que a toxidez dos antibióticos deve ser sempre avaliada anteriormente aos experimentos de transformação.

O marcador seletivo mais frequentemente usado na transformação de plantas é o gene NPTII, que confere resistência a diversos antibióticos, dentre os quais kanamicina. Usualmente, o agente seletivo é adicionado ao meio de cultura logo após o término do cocultivo. No entanto, um intervalo de alguns dias entre o término do cocultivo e o uso de kanamicina pode ser benéfico. Archiletti et al. (1995) mostraram que, em dois cultivares de *Prunus amygdalus*, seis dias de cultura em meio sem kanamicina duplicaram a frequência de transformação. Em *Vitis vinifera*, a adição de kanamicina ao meio de cultura seis semanas após o término do cocultivo permitiu seleção, de forma que todos os brotos que regeneraram eram transgênicos (Scorza et al., 1995). Pode-se considerar que a presença de kanamicina favorece a multiplicação de células transformadas na competição com células não transformadas mesmo se

permitir a regeneração de um grande número de falsos transformantes (Peña et al., 1995). Em amendoim, considerou-se que a inibição de crescimento pela kanamicina era tão severa nos explantes inoculados com *Agrobacterium* como nos não inoculados, optando-se então pela não utilização do agente seletivo; então, a seleção de transformantes era feita através da realização do teste de GUS em folíolos das plantas regeneradas (McKently et al., 1995). Em soja, a kanamicina não foi eficiente quando adicionada ao meio de indução de brotos. No entanto, foi eficiente quando adicionada ao meio de enraizamento (Di et al., 1996).

3.4. O CULTIVO DE *Stylosanthes*

O gênero *Stylosanthes* tem distribuição natural nas Américas, África tropical e sudeste asiático (Mannetje, 1984). O desenvolvimento de cultivares de *Stylosanthes* para uso como planta forrageira foi inicialmente feito na Austrália (Hopkinson & Walker, 1984). Cultivares vem sendo desenvolvidos também no Brasil (EMBRAPA/ CPAC/ CNPGC; Ghisi et al., 1993; Pizarro et al., 1993), Colômbia (Ulrich et al., 1994) e Flórida (Williams et al., 1995).

O uso de leguminosas em pastagens é recomendado com o objetivo de aumentar o seu valor proteico. No Brasil a melhora da qualidade de pastagens tem muita relevância, tendo em vista que possui um rebanho bovino grande mas de baixa produtividade (Rodriguez et al. 1993). As leguminosas podem ser usadas como bancos de proteína ou em consorciação com gramíneas, aumentando a qualidade da pastagem com baixo custo.

O ganho econômico em termos da produção animal também tem sido relatado. Ulrich et al., 1994 demonstraram que a consorciação com leguminosas aumentou a produção de leite mesmo em raças não especializadas, onde grande parte dos nutrientes é convertido em ganho de peso.

O *Stylosanthes guianensis* é recomendado por ser adaptado a solos ácidos, deficientes em fósforo e com elevados teores de alumínio, principais problemas de solo da América do Sul. É também resistente a seca e sensível a baixas temperaturas, segundo relato de Ghisi et al., 1993.

O principal problema dessa cultura é a ocorrência de antracnose, que provoca desfolhamento e morte de plantas jovens. A doença pode ser controlada com o uso de resistência varietal (Fernandes et al., 1993; Chakraborty et al., 1995).

3.5. CULTURA DE TECIDOS DE *Stylosanthes*

A cultura de tecidos no gênero *Stylosanthes* foi revista por Meijer & Szabados (1990). Estes autores mostram que a regeneração via organogênese já foi relatada para dez espécies: *S. capitata*, *S. guianensis*, *S. hamata*, *S. hippocampoides*, *S. humilis*, *S. leiocarpa*, *S. macrocephala*, *S. macrossoma*, *S. montevidensis* e *S. scabra*.

A embriogênese somática foi relatada em *S. scabra* por Dornelas et al. (1992). Explantes derivados de cotilédones e embriões zigóticos regeneraram via organogênese quando na presença de ANA e BAP, mas regeneraram via embriogênese quando usado 2,4D somente, na concentração de 5,0 mg/l.

Experimentos preliminares com meio basais mostraram ser o MS (Murashige & Skoog, 1962) o mais adequado (Meijer & Broughton, 1981; Meijer, 1982). Assim, este é o meio basal empregado com maior frequência em cultura de tecidos de *Stylosanthes*.

A fonte de explante mais adequada depende do genótipo e das condições de cultura. Folíolos são mais comumente usados, embora tenham sido utilizados também explantes derivados de raiz, cotilédone e hipocótilos (Meijer & Szabados, 1990). Em *S. guianensis*, as porcentagens de regeneração

de explantes derivados de hipocótilos, folíolos e raízes, aos 30 dias em cultura foi, respectivamente, 57, 80 e 36% (Meijer & Broughton, 1981), sendo portanto, folíolos os explantes mais responsivos. Em *S. humilis*, as porcentagens de explantes com regeneração de brotos foram de 100, 78, e 56%, respectivamente, para explantes derivados de hipocótilos e folíolos excisados de plantas germinadas *in vitro* e explantes derivados de folíolos obtidos a partir de plantas mantidas em casa de vegetação (Meijer, 1982).

Mesa et al. (1993) testaram combinações de reguladores de crescimento para explantes derivados de folíolos, hipocótilos e cotilédones de *S. guianensis* cv. CIAT 184. Para indução de calo foram usadas combinações de BAP com NAA ou 2,4 D. Calos formados em NAA responderam melhor ao meio de regeneração que calos formados com 2,4 D. A regeneração foi sempre via organogênese. Hipocótilos foram os explantes mais responsivos.

O potencial de regeneração de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *S. scabra*, extraídos de plântulas germinadas *in vitro* com 10, 20, 30 e 40 dias de idade, foi avaliado por Dornelas et al. (1991). Concluiu-se que hipocótilos foram mais eficientes que cotilédones e que o potencial de regeneração diminui com o aumento de idade do explante, tanto em explantes cotiledonares como em hipocotiledonares. Explantes derivados de hipocótilos com dez dias foram mais eficientes, com 60% apresentando regeneração aos 28 dias em cultura.

A capacidade de regeneração depende do genótipo. Observou-se regeneração em 29 e 58% dos explantes foliares de *S. montevidensis* e *S. macrosoma*, em MS suplementado com combinações de ANA e BAP. No entanto, nas mesmas condições, não ocorreu regeneração em *S. hippocampoides* (Rey et al., 1985).

Cortes histológicos para estudo da organogênese em *S. guianensis* foram feitos por Silva (1991). Em explantes foliolares, a dediferenciação nas regiões de ferimento, principalmente em torno da nervura principal, ocorreu entre o segundo e terceiro dias; o surgimento de

meristemóides em torno do décimo dia em cultura e a presença de gemas caulinares aos 30 dias.

O potencial morfogenético de calos de *S. guianensis* mantem-se por longos períodos (Meijer & Szabados, 1990; Silva, 1991), o que é uma vantagem para obtenção de variantes somaclonais.

3.6. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Stylosanthes*.

A suscetibilidade do *Stylosanthes* ao *Agrobacterium tumefaciens* foi demonstrada por Manners (1987). As linhagens selvagens A281 e C58 provocaram formação de tumor em folíolos de *S. humilis*, *S. hamata*, *S. guianensis* e *S. scabra*. Em *S. guianensis*, a linhagem A281 foi inoculada em quatro diferentes cultivares, e a formação de tumor ocorreu em apenas dois, em frequências de 2% e 8%.

Plantas transgênicas de *S. humilis* contendo gene NPTII foram obtidas por Manners (1988). A inoculação com linhagens desarmadas de *A. tumefaciens* foi feita em folíolos e a seleção em meio contendo kanamicina. A frequência de transformação foi de 0,3% (número de explantes que formaram calos / folíolos inoculados).

Uma frequência mais alta de transformação foi obtida por Manners & Way (1989) com o uso de *Agrobacterium rhizogenes* como vetor, com 86% dos explantes formaram raízes em decorrência da infecção pelo patógeno, e 23% destas regeneraram. Em seis das plantas regeneradas confirmou-se, através da hibridização de seu DNA com sondas adequadas, a presença do DNA exógeno. Uma das plantas obtidas era transformada com o gene repórter, mas não com os oncogenes, enquanto em outras cinco plantas, ambos os DNAs estavam presentes.

Resultados bastante satisfatórios na transformação de *Stylosanthes guianensis* por *A. tumefaciens* foram obtidos por Sarria et al.

(1994). A frequência de transformação variou de 2 a 5%, em três diferentes ensaios.

O bombardeamento de micropartículas com um vetor contendo o gene repórter *uidA* e o gene da albumina 2S da castanha do Pará em *S. guianensis* possibilitou a expressão transiente de GUS, no entanto, não foram obtidas plantas transformadas (Furtado Neto, 1993).

3.7. A METIONINA

Os animais necessitam receber proteínas em seus alimentos de qualidades adequadas, isto é, com balanço em aminoácidos essenciais de acordo com suas necessidades, que são variáveis segundo a espécie ou raça (Andriguetto et al., 1981a).

A metionina é um aminoácido que pode estar em quantidades abaixo das desejadas em rações e a suplementação deste aminoácido em rações, melhorando sua qualidade proteica, pode possibilitar ganho econômico. Por exemplo, a suplementação em metionina e lisina aumenta taxa de crescimento de potros (Andriguetto et al. 1981b).

Em ruminantes, os aminoácidos efetivamente absorvidos pelo intestino delgado são fornecidos pelas proteínas sintetizadas pelos microorganismos simbiotes no rúmem e também por proteínas e aminoácidos não degradados no rúmem, chamados "bypass" (Chalupa, 1975). A proteína fornecida rúmem não é sempre suficiente para suprir os aminoácidos requeridos por animais (Gregoire et al., 1996; Robinson et al. 1995).

A degradabilidade das proteínas ou aminoácidos no rúmem é variável de acordo com a solubilidade da fonte de proteína na fase líquida do rúmem. Para suplementação da dieta em aminoácidos específicos é possível diminuir a degradação do alimento no rúmem através de, por exemplo, tratamento térmico, tratamento químico e encapsulação (Chalupa, 1975).

Para produção de leite, em vacas, lisina e metionina são os aminoácidos que estão em maior deficiência, segundo relato de Robinson et al. (1995). Segundo estes autores, o fornecimento simultâneo de lisina e metionina protegidas da digestão no rúmem aumentou a produção de leite e melhorou sua qualidade.

Segundo Gregoire et al. (1996), a suplementação da dieta com metionina protegida aumenta a produção de lã em carneiros, uma vez que é também o principal aminoácido envolvido na produção de lã.

3.8. A ALBUMINA 2S DA CASTANHA DO PARÁ

Proteínas de reserva são os principais componentes de sementes. Sua classificação pode ser feita de acordo com sua solubilidade, sendo as globulinas aquelas insolúveis em água e as albuminas, proteínas solúveis em água. Em dicotiledôneas, as proteínas de reserva mais abundantes são albuminas de coeficiente de sedimentação 2S.

As proteínas de reserva da castanha do Pará são de especial interesse porque são ricas nos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína (Rotenberg & Iachan, 1975).

As albuminas 2S da castanha do Pará são constituídas por duas subunidades que permanecem ligadas por pontes de enxofre. Ampe et al. (1986) mostraram que a subunidade maior apresentava pelo menos seis diferentes isoformas, e a subunidade menor apenas uma isoforma. Quatro das isoformas da subunidade menor, predominantes, foram sequenciadas. Encontrou-se homeologia com albuminas 2S de *Ricinus communis* (32,5%) e *Brassica napus* (24,8%). As regiões conservadas são responsáveis pela formação da estrutura terciária.

As duas subunidades da proteína são sintetizadas por um único gene, inicialmente na forma de um polipeptídeo de 18kDa, que sofre

processamento pós transcricional, passando sequencialmente para 15kDa, 12kDa e, finalmente, para dois polipeptídeos de 3kDa e 6kDa, que correspondem às subunidades menor e maior da proteína madura. A primeira etapa consiste na remoção de um peptídeo sinal, localizado na porção N-terminal da proteína (Altenbach et al., 1987, Saalbach, 1995). Comparando o sequenciamento de cDNA com o sequenciamento da proteína, Castro et al. (1987) concluíram que as subunidades estavam separadas por uma sequência de 15 bases que não aparecia na proteína processada, sendo este, portanto um sítio de clivagem, permitindo a separação das duas subunidades. O sequenciamento a partir da biblioteca de DNA genômico foi feito por Gander et al. (1991), mostrando a presença de um íntron no gene e a localização do início da transcrição .

Na Tabela 3.1 estão listadas espécies transformadas com a albumina 2S da castanha do Pará.

Tabela 3.1
Espécies transformadas com albumina 2S da castanha do Pará.

Espécie	Referências
<i>Nicotiana tabacum</i>	Altenbach et al. (1989), De Clerc et al (1989), Saalbach et al. (1994).
<i>Arabidopsis thaliana</i>	De Clerq et al. (1990)
<i>Brassica napus</i>	De Clerq et al. (1990), Guerche et al(1990)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Aragão et al.(1992), Aragão et al.(1996)
<i>Vicia narborensis</i>	Saalbach et al.(1994), Saalbach et al.(1995)

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CULTIVARES

Os cultivares de *Stylosanthes guianensis* utilizados foram o Mineirão e Bandeirantes, ambos selecionados por pesquisadores do CPAC/EMBRAPA, que gentilmente forneceu sementes para realização deste estudo.

4.2. LINHAGENS DE *Agrobacterium* UTILIZADAS

As linhagens selvagens utilizadas com sua classificação por tipo de opina sintetizada estão apresentadas na Tabela 4.1. As linhagens desarmadas estão apresentadas na tabela 4.2.

Tabela 4.1
Linhagens selvagens de *Agrobacterium* e sua classificação molecular por tipo de opina sintetizada.

Linhagem	Espécie	Tipo de Opina	Referência
B6S3	<i>A.tumefaciens</i>	octopina	Benetka & Pavingerová, 1995
A208	<i>A.tumefaciens</i>	nopalina, agropina	Montoya et al., 1977
C58	<i>A.tumefaciens</i>	nopalina	Broer et al., 1995
T37	<i>A. tumefaciens</i>	nopalina	Salem & Charlwood, 1995
8196	<i>A. rhizogenes</i>	manopina	Petit et al., 1983
A4	<i>A. rhizogenes</i>	agropina	Gaudin & Jouanin, 1995
A4T	<i>A. rhizogenes</i>	agropina, nopalina	Golds et al,1991

Tabela 4.2
Linhagens desarmadas de *A. tumefaciens*, com origem do cromossomo e plasmídeo Ti desarmado.

Linhagem	Cromossomo	Plasmídeo Ti	Referência
LBA4404	Ach5	pAL4404	Ooms et al., 1982
GV2260	C58	pGV2260	Deblaere et al., 1985
GV3101	C58	pMP90	Koncz & Schell, 1986.

4.3. VETORES BINÁRIOS UTILIZADOS :

- p35S GUS INT: contém o marcador seletivo NPTII, que confere resistência a kanamicina e o gene repórter *uidA*, sob controle do promotor 35S (Vancanneyet et al., 1990).
- pEA24: contém o gene *uidA* sob controle do promotor 35S; o gene da albumina 2S da castanha do Pará controlado pelo promotor 35S do CaMV duplicado e a sequência líder do AMV e o gene NPTII, que confere resistência a kanamicina, sob controle do promotor da nopalina sintetase (Pnos) (Figura 4.1).
- pEA ATS:2S: Contém o gene *uidA* ao qual foi introduzido um íntron (Vancanneyet et al., 1990) sob controle do promotor 35S; o gene NPTII, sob controle do promotor da nopalina sintetase (Pnos) e o gene da albumina 2S da castanha do Pará sob controle do promotor do gene de uma isoforma da enzima Rubisco de *Arabidopsis thaliana* (Almeida et al., 1989), que confere forte expressão em tecidos verdes da planta (Furtado Neto, 1993). Um esquema do plasmídeo pode ser observado na Figura 4.1

Figura 4.1 : Os vetores binários pEA24 e pEA ATS:2S.

Os plasmídeos pEA24 e pEA ATS:2S foram cedidos ao Departamento de Genética da ESALQ, pelo CENARGEN / EMBRAPA, para realização deste estudo.

4.4. GERMINAÇÃO DE SEMENTES

As sementes do cultivar Mineirão foram escarificadas por temperatura (embebição em água a 80°C, por 10 minutos) ou manualmente (com pinça). As sementes do cultivar Bandeirantes foram escarificadas por temperatura.

Para esterilização, as sementes foram embebidas em etanol 70% (v/v) por 40 segundos, a seguir em NaOCl 2% por 8 minutos e então lavadas quatro vezes em água destilada, deionizada e autoclavada.

A germinação de sementes do cultivar Bandeirantes foi feita em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo a metade da concentração original de sais e compostos orgânicos ($\frac{1}{2}$ MS). As sementes do cultivar Mineirão, escarificadas manualmente, germinaram em meio $\frac{1}{6}$ MS, e as escarificadas por temperatura, em $\frac{1}{2}$ MS.

A desinfecção de sementes de *Nicotiana tabacum* cv. SRI foi feita pela lavagem em etanol 90% por 30 segundos e em NaOCl 6%, por 30 minutos. As sementes germinaram em meio MS completo.

4.5. OBTENÇÃO DE EXPLANTES PARA CULTURA DE TECIDOS E TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS

Explantes hipocotiledonares e cotiledonares foram utilizados aos 16 dias após a inoculação das sementes no meio de cultura. Explantes derivados de raízes e folíolos foram utilizados aos 30 dias.

Explantos cotiledonares foram excisados na base enquanto explantes foliares, na base e nas pontas.

Os explantes hipocotiledonares foram cortados ao meio, separando-os em superior e inferior, exceto no caso de inoculação com linhagens selvagens de *Agrobacterium*.

Explantos de raiz derivaram de segmentos de cerca de um centímetro da raiz principal.

Explantos cotiledonares e foliares foram colocados com a superfície abaxial em contato com o meio de cultura, exceto para inoculação com linhagens selvagens de *Agrobacterium*.

4.6. CULTURA DE TECIDOS

Foram usadas, para cada um dos cinco explantes excisados dos dois cultivares, 20 combinações dos reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) e NAA (ácido naftalenoacético). As concentrações utilizadas foram 0,0 ; 0,1; 0,5 e 2,0 mg/l NAA x 0,0 ; 0,1; 0,5 ; 1,0 e 2,0 mg/l BAP. Utilizaram-se frascos com capacidade de 120 ml contendo 25 ml de meio de cultura MS basal ao qual foi adicionada cada uma das combinações dos fitorreguladores. A temperatura foi controlada entre 25 e 28°C e o fotoperíodo foi de 16 horas.

As avaliações foram feitas aos 7 , 14 , 21 e 28 dias. Aos 28 dias os explantes foram pesados individualmente.

4.7. ANTIBIOGRAMAS

4.7.1. Tolerância de explantes hipocotiledonares a cefotaxime e sua eficiência contra o *Agrobacterium*.

Para verificar a tolerância de explantes hipocotiledonares do cultivar Bandeirantes a cefotaxime, foram colocados explantes por dois dias em meio MS completo, simulando o período de cocultivo.

Em seguida estes foram transferidos para meio de regeneração, onde ficaram por 28 dias nas doses de 0, 250 ou 500 mg/l de cefotaxime, ou por 10 dias com dose de 500 mg/l de cefotaxime e os 18 dias seguintes sem o antibiótico.

Para verificar a eficiência de cefotaxime contra o *Agrobacterium* procedeu-se a inoculação dos hipocótilos com LBA4404 (p35S GUS INT). A bactéria foi cultivada em 10 ml de meio MYA (Tepfer & Casse-Delbart, 1987) por 16 horas, centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos e re-suspensa no mesmo volume com NaCl 0,85% (v/v). A suspensão foi colocada por 10 minutos em contato com os explantes os quais foram então transferidos para meio MS para cocultivo.

O cocultivo foi finalizado com lavagem em solução de 500 mg/l de cefotaxime e transferência para meio MS acrescido de 0,5 mg/l BAP, com um dos três diferentes tratamentos de cefotaxime descritos.

Aos 28 dias os explantes de todos os tratamentos foram transferidos para meio ½ MS.

4.7.2. Tolerância de explantes hipocotiledonares e cotiledonares a kanamicina

Explantes derivados de cotilédones e hipocótilos do cultivar Bandeirantes foram colocados em meio de regeneração (selecionado para cada explante nos experimentos de cultura de tecido, conforme tabela 5.13) contendo as dosagens de 0, 19, 39, 59 ou 76 mg/l de kanamicina

(correspondente a doses iguais a 0, 25, 50, 75 ou 100 mg/l do produto comercial) onde foram mantidos por 56 dias. As avaliações foram feitas aos 28 e aos 56 dias.

4.7.3. Resistência de explantes derivados de folha a cefotaxime e a kanamicina.

Explantes derivados de folíolos do cultivar Bandeirantes foram colocados em meio MS + 0,5 mg/l BAP, selecionado para de regeneração de folíolos nos experimentos de cultura de tecido.

A este meio, foram acrescentados os antibióticos kanamicina e cefotaxime. Os tratamentos foram organizados em esquema fatorial, com doses iguais a 0, 25, 50, 75 ou 100 mg/l de kanamicina e 0 ou 250 mg/l de cefotaxime, por 28 dias. Foi feito ainda um tratamento onde ao meio de cultura não se adicionou kanamicina, mas apenas cefotaxime, na dose de 500 mg/l, por 10 dias.

Todos os tratamentos ficaram por 34 dias em meio de regeneração e, a seguir, 16 dias em meio MS.

As avaliações foram feitas aos 28 e aos 56 dias.

4.8. MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS DE *Agrobacterium*

As linhagens foram mantidas em meio MYA (Tepfer & Casse-Delbart, 1987) solidificado com 15 g/l de ágar em placas de petri a 4°C. Para as bactérias desarmadas, foram sempre acrescentados ao meio os respectivos antibióticos seletivos do Ti e do vetor binário, quando presente.

A cada dois meses todas as linhagens foram transferidas para meio fresco. Uma colônia da placa mantida em refrigerador era colocada para crescer em meio MYA líquido sob agitação de 150 rpm a 26 ± 2 °C por cerca de 16 hs. Com alça de platina faziam-se estrias em meio fresco. As placas foram mantidas em B.O.D., a 27°C, por dois ou três dias, e conservadas a 4°C.

4.9. PREPARO DAS CULTURAS BACTERIANAS PARA INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES.

4.9.1. Inoculação em meio líquido

Primeiramente, uma colônia de *Agrobacterium* foi transferida para 10ml de meio MYA líquido, onde cresceram por cerca de 16 horas a 150 rpm, a. $26 \pm 2^\circ\text{C}$

A partir desta cultura foi feita uma subcultura: para isso, uma alíquota de 1ml foi transferida para novos 10 ml de meio líquido, permanecendo nas mesmas condições por 4 a 10 hs, dependendo da linhagem. Com este procedimento, obteve-se uma cultura bacteriana em fase exponencial de crescimento (Mathis & Hinchee, 1994).

Uma alíquota da subcultura foi usada para leitura da sua densidade ótica a 660nm, que permite calcular a concentração de bactérias, dada por :

$$\text{número de bactérias/ml} = 3 \times A_{660\text{nm}} \times 10^9$$

A subcultura foi centrifugada a 4000 rpm por 8 minutos. O precipitado, no caso da inoculação com bactérias selvagens, foi re-suspenso em NaCl 0,85% (p/v) contendo ou não 40 μM de *acetosyringone*. No caso de inoculação de bactérias engenheiradas, o precipitado foi re-suspenso em MS com 40 μM de *acetosyringone*.

O volume de solução NaCl 0,85% ou MS foi sempre aquele adequado para ajustar a concentração final de bactérias para 1×10^9 bactérias/ml.

4.9.2. Inoculação com seringa.

As placas foram obtidas conforme descrito no item 4.5; essas placas foram utilizadas logo após retiradas da B.O.D., ou com um máximo de 5 dias, a 4°C. As bactérias foram coletadas das placas com a mesma seringa usada para ferir os explantes.

4.10. INOCULAÇÃO COM LINHAGENS SELVAGENS.

Nestes ensaios foi utilizado apenas o cultivar Bandeirantes. A suspensão bacteriana em NaCl 0,85%, obtida conforme descrito no item 4.8 foi coletada em seringa e usada para ferir os explantes.

No caso dos explantes controle, não inoculados, foram adotados os mesmos procedimentos usando-se a solução salina, contendo ou não 40 μ M *acetosyringone*, em lugar da suspensão bacteriana.

Explantes cotiledonares e hipocotiledonares foram obtidos conforme descrição feita no item 4.5.

Os explantes cotiledonares foram feridos com seringa na superfície abaxial com três pequenos cortes, feitos de forma a não permitir que a agulha da seringa perfurasse o explante; o excesso de suspensão bacteriana foi seco com papel de filtro. Os explantes inoculados foram colocados em ½ MS, com a superfície inoculada voltada para cima.

Os explantes hipocotiledonares foram inoculados no terço superior com cinco ferimentos feitos com seringa em lados opostos de cada explante; portanto, foram feitos dez ferimentos por explante. O excesso de inóculo foi seco com papel de filtro; a parte basal do explante, assética, foi colocada no meio ½ MS, de forma que os explantes ficassem em posição vertical.

4.11. BROTAÇÃO INDUZIDA POR FERIMENTO

Com o objetivo de avaliar o efeito de ferimentos feitos com seringa em estimular regeneração de brotos, utilizaram-se explantes hipocotiledonares, e procedeu-se da mesma forma que para inoculação destes com linhagens selvagens, conforme descrito no item 4.10, isto é, os explantes, obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro*, feridos com seringa ou não, foram colocados verticalmente em meio MS na metade da concentração original.

Foram feitos os seguintes ensaios:

i) O efeito do ferimento na indução de brotação

Em hipocótilos excisados foram feitos dois tratamentos. No primeiro, não foram feitos ferimentos, além do provocado pela excisão. No segundo, foram feitos dez ferimentos com seringa, no terço superior. Os tratamentos foram avaliados quanto ao número de brotos e quanto ao local de origem do broto.

ii) efeito da inoculação de bactérias desarmadas na indução de brotação

Foi usada a linhagem LBA4404 (p35S GUS INT) para inoculação do explantes usando o método descrito no item 4.7.1. Após a centrifugação, a cultura foi suspensa em solução 0,85% NaCl, ajustando-se a concentração para 5×10^9 bactérias/ml.

As linhagens LBA4404 (p35S GUS INT) e GV3101 (p35S GUS INT) foram inoculadas conforme item 4.7.2.

iii) efeito da kanamicina na indução de brotação

Foram feitos cinco ferimentos com seringa em explantes hipocotiledonares, que em seguida foram colocados verticalmente em $\frac{1}{2}$ MS com dose 0, 250 ou 500 mg/l de kanamicina.

Em outro ensaio, os explantes hipocotiledonares foram inoculados com LBA4404 (p35S GUS INT) conforme item 4.7.2, e colocados em ½ MS contendo 500 mg/l kanamicina.

4.12. CONTROLES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE TRANSFORMAÇÃO

- i) Controle positivo: os explantes excisados permaneceram em MS completo, na ausência de reguladores de crescimento, durante 48 horas, simulando o cocultivo (ou mais, nos casos em que os tratamentos tiveram cocultivo mais longo), e foram transferidos para meio de regeneração, onde ficaram por 30 a 45 dias, período suficiente para início do aparecimento de brotos. Em seguida, foram transferidos para ½ MS.
- ii) Controle com cefotaxime: foi semelhante ao controle positivo, com a diferença de que foi adicionado cefotaxime nas mesmas doses adicionadas aos tratamentos ao meio de regeneração (variando de 100 a 500 mg/l, conforme o cultivar e o ensaio).
- iii) Controle com tetraciclina: foi semelhante ao controle positivo mas, ao final de 48 horas em meio MS, foram feitas três lavagens dos explantes em solução de 50 mg/l de tetraciclina, da mesma forma que para os explantes inoculados.
- iv) Controle negativo: procedeu-se da mesma forma que no controle positivo, mas acrescentou-se ao meio de cultura kanamicina e cefotaxime, nas mesmas doses utilizadas, em cada ensaio, nos explantes tratados, durante todo o período de cultura.

4.13. CULTURA DE EXPLANTES DERIVADOS DE FOLÍOLOS INOCULADOS COM LINHAGENS DESARMADAS

Os experimentos de transformação de explantes derivados de folíolos foram feitos antes da caracterização das linhagens bacterianas através da expressão transiente do gene *uidA*. As linhagens LBA4404 (p35S GUS INT) e GV3101 (p35S GUS INT), mais tarde caracterizadas como não infectivas em tabaco, foram utilizadas nestes ensaios.

Foram feitos quatro ensaios. No primeiro e segundo ensaios, a inoculação dos explantes foi feita com as linhagens LBA4404 (p35S GUS INT) e GV3101 (p35S GUS INT), utilizando a bactéria em meio sólido, conforme descrito no item 4.8 2. No terceiro e quarto ensaios foram testados os dois métodos de inoculação - a partir da bactéria em meio sólido e líquido - utilizando apenas a linhagem LBA4404 (p35S GUS INT).

O cocultivo foi feito em meio MS, no escuro. No primeiro ensaio a duração do cocultivo foi de 60 a 80 horas e, nos demais ensaios, foi de 48 horas. O término do cocultivo deu-se com a transferência dos explantes para meio de regeneração com 500 mg/l de cefotaxime, onde permaneceram por 10 dias, sendo em seguida transferidos para os mesmos meios de regeneração, sem cefotaxime.

O meio de regeneração foi, no primeiro ensaio, MS + 0,1 mg/l de NAA + 0,5 mg/l de BAP, por 28 dias, e MS acrescido de 0,5 mg/l de BAP, nos 30 dias seguintes. Nos demais ensaios o meio de regeneração foi sempre MS + 0,5 BAP.

A kanamicina foi usada durante todo o período de regeneração dos explantes. A concentração adicionada ao meio de cultura foi, no primeiro ensaio, de 75 mg/l no período de permanência em meio de regeneração, por 60 dias. Em seguida, foram transferidos para ½ MS e a concentração de kanamicina foi de 100 mg/l. Esta concentração foi usada nos demais ensaios.

No primeiro ensaio foi feito apenas o controle negativo, e no segundo, terceiro e quarto ensaios, além do controle negativo, foi feito o controle positivo.

Um esquema dos ensaios de transformação de explantes derivados de folíolos pode ser observado na Figura 4.2.

Figura 4.2: Procedimentos utilizados nos quatro ensaios de inoculação de folíolos com a linhagem LBA4404 (p35S GUS INT). Abreviaturas: cefo=cefotaxime, kan=kanamicina, BAP=benzilaminopurina, NAA= ácido naftalenoacético.

4.14. INOCULAÇÃO E COCULTIVO EM TABACO E EM EXPLANTES HIPOCOTILEDONARES DE *Stylosanthes guianensis*

Foram colocados 15 a 20 explantes em frascos com capacidade de 120 ml com 5ml da suspensão bacteriana em MS obtida conforme descrito no item 4.8. Os frascos foram colocados sob agitação de 60 rpm por 4 a 6 horas no caso de *S. guianensis* ou por 1 hora e 30 minutos no caso de tabaco. Retirados dos frascos, o excesso de inóculo foi removido colocando-se os explantes em sanduiche de papel de filtro e colocados em placas de MS para cocultivo, no escuro, por 48 horas, a 24°C, em B.O.D.

O término do cocultivo deu-se com a lavagem dos explantes em solução de 50 mg/l de tetraciclina (50 ml para 15 a 20 explantes), sob agitação de 160 rpm, por 30 minutos, duas vezes, e uma vez em água destilada esterelizada.

O excesso de água foi retirado com papel de filtro e os explantes foram transferidos para o meio de regeneração.

Para explantes foliares de tabaco o meio de regeneração utilizado foi MS com 0,5 mg/l BAP de 500 mg/l de cefotaxime. Para *Stylosanthes*, o meio de regeneração utilizado foi aquele selecionado para cada explante nos experimentos de cultura de tecidos, conforme Tabela 5.13.

4.15. EXPRESSÃO DE GUS

O teste de GUS foi utilizado para verificar a expressão transiente em tabaco e *S. guianensis* e para verificar a expressão estável do gene em plantas que regeneraram de explantes inoculados com linhagens *A. tumefaciens* contendo, no vetor binário, o gene *uidA*.

A expressão transiente do gene *uidA* foi verificada sempre 48 horas após o término do cocultivo. Os explantes foram lavados em água destilada por um minuto, para retirar o excesso de meio de cultura. Para testar a

expressão em plântulas regeneradas nos experimentos de transformação utilizaram-se folíolos ou seções de caule.

O explante ou parte da planta foi colocado em tubo eppendorff e coberto com solução de 100mM Na_2HPO_4 pH7,0 ; 0,5 M EDTA , pH 8,0 ; 1% triton-X ; ferrocianeto de potássio 10 mM ; ferricianeto de potássio 10 mM ; contendo 1,0 mM de X-Gluc - substrato da enzima adequado para ensaio histoquímico.

Os tubos eppendorff foram colocados em banho maria a 37°C por 24 horas. Então, retirou-se a solução contendo X-Gluc e substitui-se por etanol 70% (v/v) para descoloração e conservação dos explantes (Stomp, 1992).

4.16. CULTURA DE EXPLANTES INOCULADOS COM LINHAGENS DE *Agrobacterium* TRANSFORMADAS COM VETORES BINÁRIOS CONTENDO O GENE DA ALBUMINA 2S

Explantes hipocotiledonares dos cultivares Mineirão e Bandeirantes foram inoculados com as linhagens GV2260 (pEA24) e GV3101 (pEA24). Para verificar a eficiência da inoculação, foi feito ensaio de GUS com uma amostra dos explantes.

Em explantes hipocotiledonares do cultivar Bandeirantes inoculados com GV3101 (pEA24) foram usados dois tratamentos, que diferiram entre si quanto ao uso dos antibióticos. No tratamento A, o cefotaxime foi utilizado somente nos primeiros 28 dias de cultura e na concentração de 250 mg/l, a kanamicina foi usada na concentração de 100 mg/l durante todo o período de cultura. No tratamento B, foram usados 100 mg/l de cefotaxime durante todo o período de regeneração. Aos 36 dias os explantes foram transferidos para meio com kanamicina, onde ficaram por 28 dias. Um esquema dos tratamentos utilizados está apresentado na Figura 4.3.

Os explantes hipocotiledonares do cultivar Mineirão inoculados com GV2260 (pEA24) foram submetidos a três tratamentos. No tratamento A, a

kanamicina foi colocada logo após o término do cocultivo. No tratamento B, a kanamicina foi colocada apenas no oitavo dia após o término do cocultivo. No tratamento C não foi usada kanamicina. O cefotaxime foi usado inicialmente na concentração de 250 mg/l por um mês nos casos dos tratamentos A e C, e por sete dias no caso do tratamento B, passando em seguida para 100 mg/l de kanamicina.

Um esquema dos procedimentos usados nos diferentes tratamentos pode ser observado na Figura 4.3.

Figura 4.3: Procedimentos utilizados para inoculação de explantes hipocotiledonares do cultivar Bandeirantes com a linhagem GV3101 (pEA24), nos tratamentos A e B. Concentrações em mg/l. Abreviaturas: cefo = cefotaxime, kan = kanamicina, NAA = ácido indol acético, BAP = benzil-aminopurina.

Figura 4.4 Procedimentos utilizados para inoculação de explantes derivados de hipocotilos do cultivar Mineirão com a linhagem GV2260 (pEA24), em três tratamentos (A, B e C). Concentrações em mg/l/ Abreviaturas: R= meio usado para regeneração de explantes, conforme Tabela 5.13; cefo = cefotaxime, kan = kanamicina.

5. RESULTADOS

5.1. GERMINAÇÃO DE SEMENTES E OBTENÇÃO DE EXPLANTES

Sementes do cv. Mineirão escarificadas manualmente apresentaram anormalidades na germinação em meio $\frac{1}{2}$ MS - entumescimento e formação de calo na base dos hipocótilos. A partir desta observação foram germinadas em meio $\frac{1}{6}$ MS, onde estas anormalidades ocorreram com menor frequência e intensidade. Estes explantes foram usados em cultura de tecidos. Mais tarde um teste mostrou que sementes escarificadas por temperatura forneciam explantes sempre normais quando germinavam em $\frac{1}{6}$ MS ou $\frac{1}{2}$ MS. Explantes obtidos a partir de plântulas germinadas destas sementes foram usados nos experimentos de transformação de plantas.

Os explantes foram obtidos de plantas com idade de 16 dias, contando-se a partir da inoculação das sementes, no caso de hipocótilos e cotilédones, e de plantas com 30 dias, no caso de explantes derivados de folíolos e raízes. Os pesos médios de matéria fresca de cada um dos diferentes explantes por ocasião da excisão podem ser observados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1

Pesos médios de explantes derivados de hipocótilo superior, hipocótilo inferior, folíolo, cotilédone e raiz, segundo o cultivar, e número de repetições, entre parênteses.

explante	Mineirão	Bandeirantes
hipocótilo superior	7 mg (1)	2,1 mg (10)
hipocótilo inferior	11 mg (1)	4,7 mg (10)
cotilédone	6,0 mg (10)	2,0 mg (20)
folíolo	3,5 mg (10)	1,4 mg (20)
raiz	9,0 mg (10)	0,83 mg (12)

5.2. CULTURA DE TECIDOS

Os experimentos de cultura de tecidos tiveram a finalidade de determinar as concentrações dos reguladores de crescimento NAA e BAP que, acrescidas ao meio MS, permitissem resposta mais eficiente nos cinco explantes (hipocótilo superior, hipocótilo inferior, cotilédone, raiz e folíolos) derivados dos dois cultivares (Bandeirantes e Mineirão) de *S. guianensis*. Decorridos 28 dias em cultura, os explantes foram pesados individualmente. As médias dos pesos dos tecidos derivados dos explantes, as proporções observadas de rizogênese, formação de calos, regeneração de brotos e o número médio de brotos por explante estão nas Tabelas 5.2 a 5.11. A Figura 5.1 mostra os explantes após 28 dias em cultura.

Tabela 5.2

Proporção de explantes derivados de hipocótilos superiores que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e brotação (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; após 28 dias em cultura (cultivar Bandeirantes).

Tratamento		Variável				
Nº	NAA-BAP	rizo	calo	broto	medbrot	x
1	0,0 - 0,0	0	0,5	0	0	44,5
2	0,1 - 0,0	0,75	0,5	0	0	94,3
3	0,5 - 0,0	1	0,25	0	0	98,3
4	2,0 - 0,0	1	0	0	0	225,5
5	0,0 - 0,1	0	1	0,5	1,5	432,8
6	0,1 - 0,1	0	1	0,75	5,5	316,0
7	0,5 - 0,1	0	1	0,25	2	555,8
8	2,0 - 0,1	0	1	0	0	651,8
9	0,0 - 0,5	0	1	1	10	295,8
10	0,1 - 0,5	0	1	0,75	2,25	361,5
11	0,5 - 0,5	0	1	0	0	776,0
12	2,0 - 0,5	0	1	0	0	685,8
13	0,0 - 1,0	0	1	0	0	235,3
14	0,1 - 1,0	0	1	0,25	1,25	281,8
15	0,5 - 1,0	0	1	0,5	4,25	520,0
16	2,0 - 1,0	0	1	0	0	843,5
17	0,0 - 2,0	0	1	0,5	1,25	345,0
18	0,1 - 2,0	0	1	0,5	3,25	237,8
19	0,5 - 2,0	0	1	0	0	436,3
20	2,0 - 2,0	0	1	0	0	827,3

*Nota: O número de repetições foi sempre 4.

Tabela 5.3

Proporção de explantes derivados de hipocótilos inferiores que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes, segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; após 28 dias em cultura (cultivar Bandeirantes)*.

Tratamento		Variável				
Nº	NAA-BAP	rizo	calo	broto	medbrot	x
1	0,0 - 0,0	0	0	0	0	30,0
2	0,1 - 0,0	0,25	0	0	0	26,5
3	0,5 - 0,0	1	0,75	0	0	151,8
4	2,0 - 0,0	1	0,5	0	0	397,5
5	0,0 - 0,1	0	1	1	1,25	253,2
6	0,1 - 0,1	0	1	0,25	0,25	477,0
7	0,5 - 0,1	0	1	0,75	1,75	442,0
8	2,0 - 0,1	0	1	0	0	762,8
9	0,0 - 0,5	0	1	0,5	4	328,0
10	0,1 - 0,5	0	1	0,75	5	342,0
11	0,5 - 0,5	0	1	0,5	3	829,2
12	2,0 - 0,5	0	1	0,5	1,5	563,0
13	0,0 - 1,0	0	1	0,25	0,75	284,2
14	0,1 - 1,0	0	1	0,5	2	349,8
15	0,5 - 1,0	0	1	0,25	0,75	594,8
16	2,0 - 1,0	0	1	0,25	1,75	884,8
17	0,0 - 2,0	0	1	0,25	0,5	334,5
18	0,1 - 2,0	0	1	0,75	3,25	252,8
19	0,5 - 2,0	0	1	0	0	566,0
20	2,0 - 2,0	0	1	0	0	848,8

* O número de repetições foi sempre 4. Foi descartado um na combinação 0,1 NAA - 2,0 BAP e dois na combinação 0,5 NAA - 2,0 BAP, devido à contaminação.

Tabela 5.4

Proporção de explantes derivados de cotilédones que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; após 28 dias em cultura (cultivar Bandeirantes)*.

Tratamento		Variável				
Nº	NAA-BAP	rizo	calo	broto	medbrot	x
1	0,0 - 0,0	0,5	0	0	0	10,8
2	0,1 - 0,0	0,5	0	0	0	19,0
3	0,5 - 0,0	1	0	0	0	73,3
4	2,0 - 0,0	1	0	0	0	90,5
5	0,0 - 0,1	0	0,5	0,5	2,33	96,0
6	0,1 - 0,1	0	1	0,5	2,83	180,5
7	0,5 - 0,1	0	1	0	0	353,7
8	2,0 - 0,1	0,67	1	0	0	497,2
9	0,0 - 0,5	0,17	0	0,17	1	39,8
10	0,1 - 0,5	0	0,5	0,33	1	124,3
11	0,5 - 0,5	0	1	0,33	1,17	391,8
12	2,0 - 0,5	0,33	1	0	0	445,3
13	0,0 - 1,0	0	0,5	0	0	44,3
14	0,1 - 1,0	0	0,67	0,67	3,33	184,6
15	0,5 - 1,0	0	0,83	0,33	3	225,3
16	2,0 - 1,0	0,5	1	0	0	562,5
17	0,0 - 2,0	0	0,33	0,33	1,83	76,2
18	0,1 - 2,0	0	0,5	0,5	2,83	84,8
19	0,5 - 2,0	0	1	0,33	1,83	232,0
20	2,0 - 2,0	0	1	0	0	490,3

*O número de repetições foi sempre 6.

Tabela 5.5

Proporção de explantes derivados de raízes que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes, segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; após 28 dias em cultura (cultivar Bandeirantes)*.

Tratamento		Variável				
Nº	NAA-BAP	rizo	calo	broto	medbrot	x
1	0,0 - 0,0	0	0	0	0	2,9
2	0,1 - 0,0	1	0	0	0	13,2
3	0,5 - 0,0	0,44	0,33	0	0	33,9
4	2,0 - 0,0	0,33	0,5	0	0	10,2
5	0,0 - 0,1	0	0,56	0	0	86,7
6	0,1 - 0,1	0	0,56	0	0	162,0
7	0,5 - 0,1	0	0,67	0	0	289,3
8	2,0 - 0,1	0	0,56	0	0	143,9
9	0,0 - 0,5	0	0,22	0	0	93,7
10	0,1 - 0,5	0	0,78	0,11	0,11	434,4
11	0,5 - 0,5	0	1	1	4,56	383,2
12	2,0 - 0,5	0	0,44	0,56	3,11	455,6
13	0,0 - 1,0	0	0,25	0,33	1	104,5
14	0,1 - 1,0	0	0,89	0,22	0,22	204,7
15	0,5 - 1,0	0	0,67	0,33	0,78	325,9
16	2,0 - 1,0	0	0,33	0	0	256,7
17	0,0 - 2,0	0	0,56	0	0	145,8
18	0,1 - 2,0	0	1	0,22	0,78	407,9
19	0,5 - 2,0	0	1	0	0	521,2
20	2,0 - 2,0	0	0,44	0	0	69,9

* O número de repetições foi sempre 9, com exceção das combinações 0,5 NAA - 0,1 BAP e 0,0 NAA - 1,0 BAP, que tiveram 6 e 8 repetições, respectivamente.

Tabela 5.6

Proporção de explantes derivados de folíolos que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média ($\bar{x}$) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; após 28 dias em cultura (cultivar Bandeirantes)*.

Tratamento		Variável				
Nº	NAA-BAP	rizo	calo	broto	medbrot	$\bar{x}$
1	0,0 - 0,0	0,67	0	0	0	12,0
2	0,1 - 0,0	1	0	0	0	38,6
3	0,5 - 0,0	1	0	0	0	87,2
4	2,0 - 0,0	0,89	0	0	0	97,3
5	0,0 - 0,1	0	1	0,33	2,67	135,11
6	0,1 - 0,1	0	1	0,44	5	422,4
7	0,5 - 0,1	0,11	1	0,56	3,33	275,6
8	2,0 - 0,1	0,33	1	0	0	611,0
9	0,0 - 0,5	0	1	1	9,22	210,8
10	0,1 - 0,5	0	0,89	0,44	8,89	485,7
11	0,5 - 0,5	0	1	0,33	2,11	498,7
12	2,0 - 0,5	0	1	0,22	0,89	755,0
13	0,0 - 1,0	0	0,22	0,78	3,22	102,6
14	0,1 - 1,0	0	1	0	0	355,1
15	0,5 - 1,0	0	1	0	0	537,6
16	2,0 - 1,0	0	0,89	0	0	411,4
17	0,0 - 2,0	0	1	0,22	5,56	192,6
18	0,1 - 2,0	0	0,89	0	0	97,8
19	0,5 - 2,0	0	0,89	0	0	251,7
20	2,0 - 2,0	0	0,67	0	0	245,0

* O número de repetições foi sempre 9.

Tabela 5.7

Proporção de explantes derivados de hipocótilos superiores que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; após 28 dias em cultura (cultivar Mineirão) *.

Tratamento		Variável				
Nº	NAA-BAP	rizo	calo	broto	medbrot	x
1	0,0 - 0,0	0	0,67	0,33	5	246,7
2	0,1 - 0,0	0	1	0	0	266,7
3	0,5 - 0,0	0,67	0,67	0	0	234,3
4	2,0 - 0,0	0,67	1	0	0	709,0
5	0,0 - 0,1	0	1	1	20	678,3
6	0,1 - 0,1	0	1	0,67	13,33	557,0
7	0,5 - 0,1	0	1	0,67	2,67	415,7
8	2,0 - 0,1	0	1	0	0	547,0
9	0,0 - 0,5	0	1	1	15	732,7
10	0,1 - 0,5	0	1	0,67	10	749,7
11	0,5 - 0,5	0	1	0,33	0,67	416,7
12	2,0 - 0,5	0	1	0,33	1	723,0
13	0,0 - 1,0	0	1	1	13,33	439,3
14	0,1 - 1,0	0	0,5	0,33	1,67	427,0
15	0,5 - 1,0	0	1	0	0	329,7
16	2,0 - 1,0	0	1	0	0	480,7
17	0,0 - 2,0	0	1	0,67	6,67	158,0
18	0,1 - 2,0	0	1	0	0	401,0
19	0,5 - 2,0	0	1	0	0	391,7
20	2,0 - 2,0	0	1	0	0	732,3

* O número de repetições foi sempre 3.

Tabela 5.8

Proporção de explantes derivados de hipocótilos inferiores que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes, segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; após 28 dias em cultura (cultivar Mineirão) *.

Tratamento		Variável				
Nº	NAA-BAP	rizo	calo	broto	medbrot	x
1	0,0 - 0,0	0	0,67	0,33	1,33	212,0
2	0,1 - 0,0	0,33	0,33	0,33	0	274,0
3	0,5 - 0,0	1	0,33	0	0	240,3
4	2,0 - 0,0	-	-	-	-	-
5	0,0 - 0,1	0	1	1	9,33	515,3
6	0,1 - 0,1	0	1	0,33	2	417,3
7	0,5 - 0,1	0	1	0	0	345,0
8	2,0 - 0,1	-	-	-	-	-
9	0,0 - 0,5	0	1	1	10,67	473,7
10	0,1 - 0,5	0	0,67	1	16,67	463,0
11	0,5 - 0,5	0	1	0,67	1	541,0
12	2,0 - 0,5	0	1	0	0	1330,7
13	0,0 - 1,0	0	1	1	5	226,3
14	0,1 - 1,0	0	1	0	0	367,3
15	0,5 - 1,0	0	1	0,67	7	538,3
16	2,0 - 1,0	0	1	0	0	703,3
17	0,0 - 2,0	0	1	0,67	4,33	478,0
18	0,1 - 2,0	0	1	1	1,67	546,0
19	0,5 - 2,0	0	1	0	0	1060,7
20	2,0 - 2,0	0	1	0	0	578,3

* O número de repetições por tratamento foi sempre 3.

Tabela 5.9

Proporção de explantes derivados de cotilédones que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes, segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; após 28 dias em cultura (cultivar Mineirão)*.

Tratamento		Variável				
Nº	NAA-BAP	rizo	calo	broto	medbrot	x
1	0,0 - 0,0	1	0	0	0	40,7
2	0,1 - 0,0	1	0,5	0	0	67,2
3	0,5 - 0,0	1	0,83	0	0	320,5
4	2,0 - 0,0	1	0,67	0	0	362,5
5	0,0 - 0,1	0	1	0,33	1,33	336,0
6	0,1 - 0,1	0	1	0,67	2,83	338,0
7	0,5 - 0,1	0	1	0	0	437,8
8	2,0 - 0,1	0	1	0	0	513,8
9	0,0 - 0,5	0	0,83	0,33	3	204,5
10	0,1 - 0,5	0	1	0,33	0,83	343,2
11	0,5 - 0,5	0	0,83	0,33	3	478,3
12	2,0 - 0,5	0	1	0,33	1,33	671,0
13	0,0 - 1,0	0	0,83	0,33	1	233,7
14	0,1 - 1,0	0	0,83	0,33	1,33	339,8
15	0,5 - 1,0	0	1	0	0	562,0
16	2,0 - 1,0	0	1	0	0	590,0
17	0,0 - 2,0	0	1	0	0	225,5
18	0,1 - 2,0	0	1	0	0	206,7
19	0,5 - 2,0	0	1	0,17	0,33	279,0
20	2,0 - 2,0	0	1	0,33	1,83	525,3

* O número de repetições foi sempre 6.

Tabela 5.10

Proporção de explantes derivados de raízes que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; após 28 dias em cultura (cultivar Mineirão) *.

Tratamento		Variável				
Nº	NAA-BAP	rizo	calo	broto	medbrot	x
1	0,0 - 0,0	0,17	0,83	0,17	0,67	86,8
2	0,1 - 0,0	1	1	0	0	92,0
3	0,5 - 0,0	1	1	0	0	113,3
4	2,0 - 0,0	1	1	0	0	117,3
5	0,0 - 0,1	0,5	1	0,17	1	115,8
6	0,1 - 0,1	0,17	1	0,17	0,17	224,5
7	0,5 - 0,1	0	1	0	0	458,0
8	2,0 - 0,1	0	1	0	0	546,5
9	0,0 - 0,5	0	1	0	0	61,0
10	0,1 - 0,5	0	1	0,67	2,50	525,5
11	0,5 - 0,5	0	1	0	0	466,3
12	2,0 - 0,5	0	1	0	0	621,3
13	0,0 - 1,0	0	1	0,20	0,20	266,8
14	0,1 - 1,0	0,33	1	0,17	0,83	289,2
15	0,5 - 1,0	0	1	0	0	411,7
16	2,0 - 1,0	0	1	0	0	592,3
17	0,0 - 2,0	0	1	1	2,67	295,2
18	0,1 - 2,0	0	1	0,67	1,33	199,8
19	0,5 - 2,0	0	1	0,17	0,17	267,3
20	2,0 - 2,0	0	1	0	0	733,8

* Foram feitas 6 repetições por tratamento, porém os tratamentos 0,0 NAA - 2,0 BAP e 0,1 NAA - 2,0 BAP tiveram três repetições descartadas e o tratamento 0,0 NAA - 1,0 BAP teve uma repetição descartada.

Tabela 5.11

Proporção de explantes derivados de folíolos que apresentaram rizogênese (rizo), formação de calo (calo) e regeneração (broto); número médio de brotos por explante (medbrot) e média (x) dos pesos dos tecidos derivados dos explantes, segundo a combinação de doses dos reguladores de crescimento NAA e BAP; após 28 dias em cultura (cultivar Mineirão) *.

Tratamento		Variável				
Nº	NAA-BAP	rizo	calo	broto	medbrot	x
1	0,0 - 0,0	0,5	0,5	0	0	30,3
2	0,1 - 0,0	1	1	0	0	58,5
3	0,5 - 0,0	1	1	0	0	189,8
4	2,0 - 0,0	1	1	0	0	344,0
5	0,0 - 0,1	0	1	0	0	162,0
6	0,1 - 0,1	0	1	0	0	171,3
7	0,5 - 0,1	0	1	0	0	334,2
8	2,0 - 0,1	0	1	0	0	742,3
9	0,0 - 0,5	0	1	0	0	316,5
10	0,1 - 0,5	0	1	0	0	262,3
11	0,5 - 0,5	0	1	0	0	527,0
12	2,0 - 0,5	0	1	0	0	597,3
13	0,0 - 1,0	0	0,33	0,33	1,5	96,8
14	0,1 - 1,0	0	1	0	0	303,2
15	0,5 - 1,0	0	1	0	0	498,2
16	2,0 - 1,0	0	1	1	2	118,8
17	0,0 - 2,0	0	1	0	0	102,7
18	0,1 - 2,0	0	1	0	0	60,0
19	0,5 - 2,0	0	1	0	0	401,8
20	2,0 - 2,0	0	1	0	0	319,5

* Foram feitas seis repetições por tratamento, mas foram descartadas três repetições do tratamento 0,0 NAA - 0,0 BAP.

A avaliação dos explantes foi feita aos 7 , 14 , 21 e 28 dias. A idade mínima em que observou-se o aparecimento das primeiras gemas, em pelo menos uma das combinações dos homônios, está na Tabela 5.12.

Tabela 5.12
Idade mínima para a ocorrência de gemas em pelo menos uma das combinações de reguladores de crescimento em função do tipo de explante e cultivar analisado.

tipo de explante	Mineirão	Bandeirantes
raiz	14	21
folíolo	28	21
hipocótilo superior	14	21
hipocótilo inferior	14	21
cotilédone	21	21

Em meio MS, na ausência de reguladores de crescimento, explantes derivados de cotilédones e folíolos de ambos os cultivares apresentaram rizogênese. Os cinco tipos de explante dos dois cultivares apresentaram rizogênese na dose zero de BAP, na presença de NAA. Na presença de BAP em geral não apareceu rizogênese, exceto em cotilédones do cultivar Bandeirantes para as doses 0,1 ; 0,5 e 1,0 mg/l de BAP, em explantes derivados de folíolos do cultivar Bandeirantes para a dose 1,0 mg/l de BAP e em raízes do cultivar Mineirão nas doses 0,1 e 1,0 mg/l.

A rizogênese é freqüentemente direta ou, às vezes, mediada pela formação pouco conspícua de calo. Como pode ser observado na Figura 5.1, nas dosagens crescentes de NAA e na ausência de BAP, a rizogênese é sempre muito mais intensa que a formação de calo. Portanto, nestes tratamentos, o aumento do peso médio dos explantes deve-se ao aumento de formação de raízes.

FIGURA 5.1 Explantes do cultivar Mineirão aos 28 dias de cultura A) Hipocótilo superior (0,1 mg/l NAA; 0,5 mg/l BAP) B) Hipocótilo inferior (0,1 mg/l NAA; 0,1mg/l BAP) C) Raiz (0,1 mg/l NAA; 0,1 mg/l BAP) D) Cotilédones nas 20 diferentes combinações dos reguladores de crescimento.

O peso médio dos explantes aumenta com o aumento da quantidade dos dois reguladores de crescimento. Quando os explantes foram pesados aos 28 dias, os brotos, em geral, mostraram-se pouco desenvolvidos em relação aos calos, e a rizogênese, exceto para os tratamentos com dosagem zero de BAP, era pouco expressiva, como mostra a Figura 5.1. Pode-se então afirmar que o peso dos explantes reflete a formação de calo, que aumenta com o aumento das concentrações de ambos os reguladores de crescimento utilizados.

Em geral, não ocorre regeneração em meio MS na ausência dos reguladores de crescimento. Porém, explantes derivados de raízes e hipocótilos superiores e inferiores do cultivar Mineirão apresentaram regeneração. Nos demais explantes, a adição só de BAP ou de combinações de NAA e BAP provocou aparecimento de brotos, o que não ocorreu na presença de NAA somente.

Os explantes derivados de folíolos foram os mais recalcitrantes em cultura em ambos os cultivares, isto é, apresentaram regeneração só em algumas combinações dos reguladores de crescimento.

Ao contrário, os explantes hipocotiledonares de ambos os cultivares foram aqueles que apresentaram maior número de combinações de reguladores de crescimento com 100% de explantes formando broto. No cultivar Mineirão, aos 28 dias em cultura, explantes derivados de hipocótilos superiores e inferiores do cultivar Mineirão deram origem, em média, a 20 e 16,7 brotos por explante, respectivamente. Os demais explantes apresentaram médias entre 2 e 10 brotos.

A regeneração de brotos foi, normalmente, mediada por formação de calo, mas houve regeneração direta do explante, nos explantes derivados de cotilédones e de hipocótilos superiores e inferiores dos cultivares Mineirão e Bandeirantes. Em explantes derivados de hipocótilos superiores do cultivar Mineirão a regeneração foi com maior frequência direta, e o meio MS

adicionado de 0,1mg/l ou 0,5 mg/l de BAP possibilitou a regeneração de brotos sempre direta de 100% dos explantes.

Por exemplo, a regeneração de brotos foi sempre direta em explantes cotiledonares do cultivar Bandeirantes no meio MS acrescido de 0,1 mg/l de BAP ou da combinação 0,1 mg/l ANA e 0,1 mg/l BAP; em explantes derivados de hipocótilos superiores do cultivar Bandeirantes no meio acrescido de 0,5 mg/l de BAP e em explantes derivados de hipocótilos inferiores do cultivar Mineirão na combinação 0,1mg/l de NAA e 0,5 mg/l de BAP.

O aparecimento das primeiras gemas ocorreu aos 21 dias em cultura para todos os tipos de explante do cultivar Bandeirantes, e para cotilédones do cultivar Mineirão. Para explantes derivados de hipocótilos e de raízes do cultivar Mineirão ocorreu mais cedo, aos 14 dias em cultura, e em explantes derivados de folíolo do cultivar Mineirão, mais tarde, aos 28 dias, como pode ser observado na tabela 5.12.

A combinação em que houve maior número médio de brotos por explante foi a mesma onde ocorreu maior número médio de explantes formando broto, exceto em explantes derivados de hipocótilos inferiores do cultivar Mineirão, onde, no meio de cultura acrescido apenas de 0,1 mg/l de NAA, ocorreu 100% de regeneração, e uma média de 1,25 brotos por explante. Na combinação 0,1 mg/l de NAA e 0,5 mg/l de BAP, a regeneração foi de 75%, e os explantes apresentaram em média 5 brotos.

A escolha da combinação de reguladores de crescimento mais adequada para cada explante envolveu os critérios: maior proporção de explantes formando broto, maior número de brotos por explante, maior desenvolvimento dos brotos aos 28 dias, formação menos expressiva de calo. As combinações escolhidas dos reguladores de crescimento forneceram regeneração sempre direta no caso de explantes derivados de hipocótilos superiores dos cultivares Bandeirantes e Mineirão e de hipocótilos inferiores do cultivar Mineirão.

As combinações escolhidas estão na Tabela 5.13. O aspecto de cada um destes explantes aos 28 dias pode ser observado na Figura 5.1.

Tabela 5.13

Combinações dos reguladores de crescimento adequadas para regeneração de explantes derivados de folíolo, raiz, cotilédone, hipocótilo superior e hipocótilo inferior dos cultivares Mineirão e Bandeirantes de *Stylosanthes guianensis*.

Cultivar	Explante	NAA	BAP
Bandeirantes	Folíolo	0,0 mg /L	0,5 mg /L
	Raiz	0,5 mg /L	0,5 mg/L
	Cotilédone	0,1 mg/L	1,0 mg/L
	Hipocótilo superior	0,0 mg/L	0,5 mg/L
	Hipocótilo inferior	0,0 mg/L	0,5 mg/l
Mineirão	Folíolo	2,0 mg/L	1,0 mg/L
	Raiz	0,1 mg/L	0,5 mg/L
	Cotilédone	0,1 mg/L	0,1 mg/L
	Hipocótilo superior	0,0 mg /L	0,1 mg/L
	Hipocótilo inferior	0,1 mg/L	0,5 mg/L

5.3. ANTIBIOGRAMAS

Explantes hipocotiledonares do cultivar Bandeirantes foram inoculados com LBA4404 , conforme descrito no item 4.13.1, e colocados na presença de diferentes doses de cefotaxime, em um teste preliminar para verificar a eficiência deste antibiótico em descontaminar os explantes. Os tratamentos sem inoculação visaram verificar a tolerância do explante ao antibiótico. Aos 28 dias de cultura, os explantes foram avaliados quanto à formação de calo e de brotos. Os resultados podem ser observados na Tabela 5.14.

Tabela 5.14

Percentual de explantes hipocotiledonares com formação de calo e regeneração de brotos segundo as doses e tempo de permanência em cefotaxime.

	Dose de cefotaxime (mg/l)	Permanência em cefotaxime (dias)	% de explantes com calo	% de explantes com regeneração
Explante inoculado com <i>Agrobacterium</i>	250	28	83	67
	500	10	50	50
	500	28	0,0	0,0
	0		100	83
Explante não inoculado	250	28	67	33
	500	10	100	100
	500	28	0,0	17

Nota: O número de repetições foi 6, exceto para explantes não inoculados e mantidos na dose 500 mg/l de cefotaxime, por 10 dias, onde o número de repetições foi 5.

Pode-se observar na Tabela 5.14 que a dose de 500 mg/l por 28 dias em cefotaxime impediu a formação de calo nos explantes inoculados ou não inoculados com *Agrobacterium*, e foi prejudicial à regeneração de explantes. Os tratamentos com as doses de cefotaxime de 500 mg/l por dez dias ou 250 mg/l por 28 dias permitiram a formação de calo e regeneração de brotos. A porcentagem de explantes com broto foi menor nestes tratamentos que no controle, mas houve regeneração.

Após os 28 dias de cultura em MS, os explantes foram transferidos para ½ MS sem adição de antibiótico, onde permaneceram por 45 dias. Neste período, não se observou crescimento de *Agrobacterium* nos explantes ou no meio de cultura, e concluiu-se que os tratamentos com cefotaxime foram suficientes para eliminar as bactérias.

Em outro experimento, explantes hipocotiledonares e cotiledonares do cultivar Bandeirantes foram submetidos a diferentes concentrações de kanamicina, com o objetivo de eleger a menor dose do antibiótico suficiente para impedir regeneração dos explantes não transformados, visando evitar toxidez para células ou calos transformados. Procedeu-se conforme descrito no item 4.7.2.

O percentual de explantes derivados de cotilédones e hipocótilos com formação de calo e com brotos e o número médio de brotos nos que tiveram regeneração, por época de avaliação e por doses de kanamicina, encontram-se na Tabela 5.15. Observa-se nesta Tabela que, em explantes hipocotiledonares, apenas a dose 100 mg/l de kanamicina foi suficiente para impedir regeneração. Esta dose foi escolhida para uso nos experimentos de transformação deste explante.

Tabela 5.15
Percentual de explantes derivados de cotilédones e hipocótilos com formação de calo e com regeneração de brotos e número médio de brotos nos que tiveram brotação, por época de avaliação e por doses de kanamicina*.

Explante	Idade da cultura (em dias)	Dose de kanamicina	% de explantes com calo	% de explantes com broto	número médio de brotos po explante
Cotilédones	28	0	66,7	0	0
		19	83,3	0	0
		39	16,7	0	0
		59	0	0	0
		76	0	0	0
	56	0	100	0	0
		19	100	33,3	1,2
		39	50	0	0
		59	0	0	0
		76	0	0	0
Hipocótilos	28	0	100	100	-
		19	100	50	-
		39	100	16,7	-
		59	66,7	50	-
		76	16,7	0	-
	56	0	100	100	8,2
		19	100	50	13,8
		39	100	16,7	10
		59	66,7	50	6,7
		76	16,7	0	0

* Nota: o número de repetições foi sempre 6.

Foi utilizado MS acrescido de 0,1 mg/l BAP e 0,1 mg/l NAA para cultivo dos explantes hipocotiledonares, visto que no experimento de cultura de tecidos houve regeneração de 67% dos explantes neste meio. A regeneração praticamente não ocorreu no experimento com kanamicina. A diferença do comportamento dos cotilédones nos dois experimentos pode ser atribuída ao fato de, durante o antibiograma, terem sido feitas transferências quinzenais, resultando em manutenção de uma dose relativamente mais alta dos reguladores de crescimento ao longo do tempo e, devido a isto, maior formação de calo em detrimento da regeneração. Isto impossibilitou o uso da regeneração como critério para selecionar a dose adequada de kanamicina. Alternativamente, observou-se que, utilizando 500 mg/l de kanamicina, a formação de calo diminuía, chegando a zero nas doses de 75 ou 100 mg/l. Esta dose foi usada durante o experimento de transformação deste explante.

Em um terceiro experimento, foi avaliada a tolerância de explantes derivados de folíolos do cultivar Bandeirantes aos antibióticos cefotaxime e kanamicina, procedendo conforme descrito no item 4.7.3. O percentual de explantes derivados de folíolos com formação de calo e com brotos, e o número médio de brotos nos calos que tiveram regeneração, por época da avaliação e por doses de kanamicina e cefotaxime, estão na Tabela 5.16. Pode-se observar nesta tabela que, entre os tratamentos com dose zero de kanamicina, aquele que recebeu, por 28 dias, a dose 250 mg/l de cefotaxime, mostrou, aos 56 dias, 28,6% de explantes formando broto, enquanto o tratamento com a dose de 500 mg/l de cefotaxime, por 10 dias apenas, apresentou 87,5% de explantes formando broto. O segundo tratamento mostrou-se, portanto, mais favorável à regeneração, e foi selecionado para uso nos experimentos de transformação de explantes derivados de folíolos.

Aos 28 dias, não se registrou regeneração para a dose de 25 mg/l ou mais de kanamicina; aos 50 dias, não se registrou regeneração na dose de 75 mg/l ou mais de cefotaxime; ou para dose 25 mg/l ou mais de kanamicina,

com 250 mg/l de cefotaxime. Portanto, 75 mg/l de kanamicina foi sempre suficiente para impedir a regeneração.

Tabela 5.16

Percentual de explantes derivados de folíolos com formação de calo e com regeneração de brotos e número médio de brotos nos que tiveram brotação, por época de avaliação e por doses de kanamicina e cefotaxime.

Idade da cultura (em dias)	Dose de Cefotaxime (mg/l)	Dose de Kanamicina	% de explantes com calo	% de calos com broto	número médio de brotos por explante
28 DIAS	0	0	100	25,0	3,5
		25	100	0	0
		50	50	0	0
		75	0	0	0
		100	12,5	0	0
	250	0	75,0	12,5	3
		25	62,5	0	0
		50	50	0	0
		75	12,5	0	0
		100	0	0	0
	500	0	75,0	37,5	5
56 DIAS	0	0	100	75,0	6,7
		25	100	25,0	6,5
		50	62,5	25,0	2
		75	12,5	0	0
		100	0	0	0
	250	0	100	28,6	6
		25	62,5	0	0
		50	62,5	0	0
		75	12,5	0	0
		100	0	0	0
	500	0	100	87,5	7,1

Nota: o número de repetições foi 8, exceto para a dose 250 mg/l de cefotaxime e 25 mg/l de kanamicina, onde número de repetições foi 7.

5.4. CAPACIDADE DE INFECÇÃO DAS LINHAGENS SELVAGENS

5.4.1. Primeiro ensaio

No primeiro ensaio de inoculação de linhagens selvagens em explantes hipocotiledonares, foram utilizadas as linhagens A4, 8196 e A4T de *A. rizhogenes* e T37, A208, e C58 de *A. tumefaciens*.

Nesse ensaio, a cultura líquida bacteriana em 10 ml de meio MYA cresceu "overnight" e foi precipitada por centrifugação por 8 minutos a 4000 rpm e re - suspensa no mesmo volume, com NaCl

FIGURA 5.2 Resposta do cultivar Bandeirantes à inoculação com linhagens selvagens. A) Tumores em hipocótilo inoculado com a linhagem A208; B) Brotos partindo dos locais de ferimento com seringa, em hipocótilo inoculado com a linhagem 8196; C) Hipocótilo inoculado com a linhagem 8196, mostrando tumor e um broto desenvolvido; D) Plântula excisada de hipocótilo inoculado com a linhagem A4 e mantida em meio $\frac{1}{2}$ MS, mostrando sintoma semelhante a tumor.

0,85%. Esta suspensão foi coletada com seringa para inoculação, conforme descrito em Material e Métodos. A avaliação aos 20 dias da inoculação mostrou, nos locais da inoculação, início de formação de brotos, inclusive nos explantes controle, onde foram feitos ferimentos com solução salina, na ausência de bactérias.

Estes explantes foram mantidos em ½ MS e, aos 72 dias da inoculação, observou-se que estavam bastante desenvolvidos, de forma que puderam ser excisados e colocados em ½ MS. Estas plântulas foram mantidas em ½ MS por cerca de um ano. Neste período observaram-se nestas plantas anormalidades como superbrotção e formação de calos ou raízes na parte aérea (ver Figura 5.2), semelhantes aos sintomas esperados da inoculação com *A.tumefaciens* ou *A. rizhogenes*, o que surteria que estas plantas fossem regeneradas a partir de células geneticamente transformadas pelos plasmídeos selvagens. Estas plantas apresentaram também crescimento reduzido em relação às plantas controle. Este fato levou a realização de experimentos similares com linhagens engenheiradas.

5.4.2. Segundo e terceiro ensaios com explantes hipocotiledonares

No segundo e terceiro ensaios o preparo das bactérias foi feito conforme descrito no item 4.9.1. As linhagens utilizadas, com o respectivo período de crescimento da subcultura, leitura da densidade ótica a 660 nm e a idade da cultura em que foi feita a avaliação estão nas Tabelas 5.17 e 5.18.

Tabela 5.17
Segundo ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens de *Agrobacterium*: período de crescimento da subcultura (T), leitura de absorbância a 660 nm (A_{660}) e data da avaliação, em dias.

linhagem	T	A_{660}	avaliação
controle	-	-	41
T37	7hs	0,15	41
B6S3	5hs	0,55	42
A208	6hs	0,36	42
8196	16hs	1,18	34

Tabela 5.18

Terceiro ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens de *Agrobacterium*: período de crescimento da subcultura (T) , leitura de absorbância a 660 nm (A_{660}) e data da avaliação, em dias.

linhagem	T	A_{660}	avaliação
controle	-	-	30
controle-Asy	-	-	30
A4	4hs	0,36	30
A4-Asy	6 hs	0,75	31
C58	6hs	0,37	30
C58-Asy	6hs	0,37	31
A4T	6hs	0,66	42
A4T-Asy	4 hs	0,6	43

Decorridos 30 a 40 dias após a inoculação, os explantes foram avaliados em lupa. Esta avaliação permitiu diferenciar a formação de tumores presentes em hipocótilos inoculados com *Agrobacterium* do início de formação de brotos, presente também nos explantes controle.

Foram contados o número de tumores e o número de brotos em cada explante. O número de repetições e os números médios de tumores e brotos, com os respectivos desvios padrões em cada ensaio, encontram-se nas Tabelas 5.19 a 5.22.

Tabela 5.19

Número de repetições (n) , média (x) e desvio padrão (s) do número de tumores, de acordo com o tratamento, no segundo ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens

	controle	T37	B6S3	A208	8196
n	20	13	9	18	21
x	0,00	1,69	1,89	3,89	3,19
s	0,00	0,692	0,735	0,727	0,555

Tabela 5.20

Número de repetições (n) , média (x) e desvio padrão (s) do número de brotos, de acordo com o tratamento, no segundo ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens .

	controle	T37	B6S3	A208	8196
n	20	13	9	18	21
x	1,10	1,38	1,11	1,33	1,95
s	0,298	0,549	0,588	0,457	0,475

Tabela 5.21

Número de repetições (n) , média (x) e desvio padrão (s) do número de tumores, de acordo com o tratamento, no terceiro ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens.

	controle	controle-Asy	A4	A4-Asy	C58	C58-Asy	A4T	A4T-Asy
n	36	40	8	6	9	20	10	20
x	0,00	0,00	1,25	0,833	0,333	0,400	1,20	0,75
s	0,00	0,00	0,559	0,833	0,333	0,168	0,592	0,239

Tabela 5.22

Número de repetições (n) , média (x) e desvio padrão (s) do número de brotos, de acordo com o tratamento, no terceiro ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens .

	controle	controle-Asy	A4	A4-Asy	C58	C58-Asy	A4T	A4T-Asy
n	36	40	8	6	9	20	10	20
x	1,80	2,30	4,50	3,33	1,00	3,55	0,60	2,45
s	0,392	0,332	1,165	1,145	0,553	0,505	0,267	0,654

O número de tumores e o número de brotos em cada explante foi, com frequência, igual a zero, e, portanto, os dados apresentaram distribuição assimétrica à direita. O uso de análise de variância nestes casos é discutível, porque o valor do teste F é apenas aproximado, isto é, o nível de significância do teste é maior do que o apresentado na Tabela, com os mesmos graus de liberdade. Por esta razão, optou-se por proceder a um teste não paramétrico. As

comparações múltiplas entre os tratamentos do segundo e terceiro ensaio encontram-se, respectivamente, nas Tabelas 5.23 e 5.24.

Tabela 5.23

Comparações múltiplas, através de teste não paramétrico, ao nível de 5% de significância, do número de tumores e do número de brotos, de acordo com o tratamento, no segundo ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens.

Tratamentos	Tumor	Broto
cntrl x T37	*	ns
cntrl x B6S3	ns	ns
cntrl x A208	*	ns
cntrl x 8196	*	ns
T37 x B6S3	ns	ns
T37 x A208	ns	ns
T37 x 8196	ns	ns
B6S3 x A208	ns	ns
B6S3 x 8196	ns	ns
A208 x 8196	ns	ns

Os resultados apresentados na Tabela 5.23 permitem afirmar que as linhagens T37, A208 e 8196 foram diferentes do controle quanto a capacidade de induzir formação de tumores, avaliada pelo número de tumores por explante. Da mesma forma, a análise da Tabela 5.24 mostra que a linhagem A4 e a linhagem A4T, com ou sem 40 μ M de *acetosyringone*, diferiram dos controles quanto ao número de tumores formados por explante.

Tabela 5.24

Comparações múltiplas, através de teste não paramétrico, ao nível de 5% de significância, do número de tumores e do número de brotos, de acordo com o tratamento, no terceiro ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens.

Tratamentos	Tumor	Broto
cntrl x cntrl-Asy	ns	ns
cntrl x A4	*	ns
cntrl x A4-Asy	ns	ns
cntrl x C58	ns	ns
cntrl x C58-Asy	ns	*
cntrl x A4T	*	ns
cntrl x A4T-Asy	*	ns
cntrl-Asy x A4	*	ns
cntrl-Asy x A4-Asy	ns	ns
cntrl-Asy x C58	ns	ns
cntrl-Asy x C58-Asy	ns	ns
cntrl-Asy x A4T	*	ns
cntrl-Asy x A4T-Asy	*	ns
A4 x A4-Asy	ns	ns
A4 x C58	ns	ns
A4 x C58-Asy	ns	ns
A4 x A4T	ns	ns
A4 x A4T-Asy	ns	ns
A4-Asy x C58	ns	ns
A4-Asy x C58-Asy	ns	ns
A4-Asy x A4T	ns	ns
A4-Asy x A4T-Asy	ns	ns
C58 x C58-Asy	ns	*
C58 x A4T	ns	ns
C58 x A4T-Asy	ns	ns
C58-Asy x A4T	ns	*
C58-Asy x A4T-Asy	ns	ns
A4T x A4T-Asy	ns	ns

O número médio de brotos por explante não foi maior nos explantes tratados com as linhagens selvagens que nos controles, no segundo ensaio (Tabela 5.23). No terceiro ensaio (Tabela 5.24), os explantes inoculados com a linhagem C58 com 40 μ M de *acetosyringone*, mostrou número médio de brotos por explante significativamente maior que o controle sem *acetosyringone*, que a mesma linhagem C58 sem o *acetosyringone* ou que a linhagem A4T.

5.4.3. Inoculação de cotilédones com linhagens selvagens

As linhagens utilizadas para inoculação de cotilédones foram A4 e C58 contendo ou não 40 μ M de *acetosyringone* e os controles, conforme mostrado na Tabela 5.25. Os períodos de crescimento utilizados e a densidade ótica observada são as mesmas indicadas para o terceiro ensaio de inoculação de hipocótilos com linhagens selvagens, e podem ser observados na Tabela 5.17.

No caso de cotilédones, não se conseguiu identificar nenhum aspecto morfológico nos explantes inoculados com *Agrobacterium* que diferisse dos explantes controle e que pudesse ser interpretado como um sinal da transferência genética: tanto nos explantes inoculados como nos explantes controle houve aparecimento de raízes e formação de calo, no local onde foram feitos ferimentos para inoculação da bactéria e no local de excisão do explante. O número de repetições, a proporção de cotilédones com calo no local de excisão ou no local de ferimento e a proporção de cotilédones com raízes no local de excisão ou no local de ferimento, segundo o tratamento, podem ser observados na Tabela 5.25.

Tabela 5.25

Número de repetições (n), proporção de cotilédones com calo no local de excisão (%CE), calo no local de ferimento (%CF), raízes no local de excisão (%RE) e raízes no local de ferimento (%RF), segundo o tratamento.

Tratamentos	n	%CE	%CF	%RE	%RF
cntrl	30	0,83	0,00	0,87	0,27
cntrl-Asy	20	0,85	0,25	0,95	0,15
A4	15	0,93	0,07	0,73	0,20
A4-Asy	5	1,00	0,20	0,60	0,20
C58	9	0,56	0,22	0,89	0,44
C58-Asy	4	1,00	0,00	1,00	0,00

Como mostra a Tabela 5.25, a formação de calo ou raízes foi sempre alta (60% a 100%) no local de excisão do cotilédono, e sempre baixa (0% a 44%) nos locais onde foram feitos os ferimentos com seringa. As proporções observadas são semelhantes quando se comparam os explantes controle com os tratados com *Agrobacterium*.

Uma dificuldade adicional para o uso de cotilédones para verificar a infectividade de linhagens selvagens é a alta frequência com que ocorre contaminação do meio de cultura, mesmo tomando-se o cuidado de não perfurar os explantes quando se faz o ferimento - o que foi verificado com lupa por ocasião das avaliações - e de remover o excesso de inóculo com papel de filtro.

5.5. BROTAÇÃO INDUZIDA POR FERIMENTO

i) Efeito do ferimento no aparecimento de brotos.

Foram feitos ferimentos com seringa esterilizada no terço superior de 20 hipocótilos, sendo dez ferimentos por explante e, em seguida, estes foram colocados em posição vertical em ½ MS. Em outros 20 hipocótilos, não foram feitos ferimentos. Decorridos 43 dias foi feita avaliação, com lupa, observando a presença de brotos e local de origem destes brotos. A Tabela 5.26 apresenta dados relativos à porcentagem de hipocótilos com brotação nos locais de excisão (ápice), ou nos locais onde foi feito ferimento com seringa (terço superior), ao número médio de brotos nos explantes que apresentaram brotação (excluindo-se brotos menores que 1mm) e ao tamanho médio dos brotos com 1mm ou mais. Nos explantes em que não foi feito ferimento com seringa, os brotos formaram-se principalmente nos sítios de excisão dos explantes.

Tabela 5.26

Porcentagem de hipocótilos com brotação nos locais de excisão (ápice), ou nos locais onde foi feito ferimento com seringa (terço superior), número médio de brotos nos explantes que apresentaram brotação (med.broto), e tamanho médio dos brotos, em centímetros, segundo o tratamento.

Explante	Ápice	Terço Superior	Med. broto	Tamanho
Com ferimento	20%	65%	1,50	1,30
Sem ferimento	70%	15%	2,05	1,86

ii) efeito da inoculação de bactérias

Observou-se formação de brotos em hipocótilos inoculados com as linhagens LBA4404 (p35S GUS INT) e GV3101 (p35S GUS INT), aos 28 dias após a inoculação. O número de explantes inoculados e o número de explantes controle em cada ensaio, a porcentagem de explantes com broto, o número médio de brotos nos explantes com brotação e o tamanho médio dos brotos encontram-se na Tabela 5.27.

Tabela 5.27

Número de repetições (n); porcentagem de explantes com broto (%brotos); número médio de brotos nos hipocótilos com brotação (med. broto) e tamanho médio dos brotos, em centímetros, decorridos 28 dias após a inoculação, segundo a linhagem, o método de preparo de bactérias e o tratamento.

linhagem	Método	Tratamento	n	% brotos	Med. Broto	Tamanho
LBA4404 (p35S GUS INT)	líquido	inoculado	72	96	1,88	0,89
		controle	12	92	1,91	0,49
LBA4404 (p35S GUS INT)	sólido	inoculado	48	83	1,89	0,84
		controle	20	75	2,33	0,88
GV3101 (p35S GUS INT)	sólido	inoculado	30*	50	1,80	0,76
		controle	20	80	2,31	1,02

* inicialmente foram inoculados 89 explantes, posteriormente 59 foram descartados devido a contaminação

Pode-se observar na Tabela 5.27 que o espectro da porcentagem de explantes formando broto foi de 50 a 96. Estas frequências são altas, e semelhantes àquelas obtidas em cultura de tecidos.

O número médio de brotos por explante inoculado ficou entre 1,88 e 2,33. Nos experimentos de cultura de tecidos nas melhores combinações de reguladores de crescimento, o número médio de brotos por explante foi de 10 e 5 para explantes derivados de hipocótilos superiores e inferiores, respectivamente, no cultivar Bandeirantes. Portanto, o número médio de brotos por explante é maior em cultura de tecidos. No entanto, o desenvolvimento de brotos foi mais rápido quando os brotos foram induzidos por fermento. Com este método, como mostra a Tabela 5.25, os brotos tinham, em média 0,49 a 1,02 cm. Os que tinham 2cm ou mais puderam ser excisados e desenvolveram-se em ½ MS.

Assim, no ensaio em que foi feita a inoculação com a linhagem LBA4404 (p35S GUS INT) em suspensão em NaCl, 55 plântulas (42% dos brotos) puderam ser excisadas dos 30 aos 60 dias, e colocadas em ½ MS contendo 200 mg/l de kanamicina. Da mesma forma, no ensaio em que foi usada a linhagem LBA4404 (p35S GUS INT) em placa, 27 plântulas (36% dos brotos) puderam ser excisadas dos 30 aos 60 dias, e foram transferidas para ½ MS contendo 300 mg/l de kanamicina. Dos explantes inoculados com GV3101 (p35S GUS INT), 13 plântulas (48% dos brotos) foram excisadas e transferidas para ½ MS com 200 mg/l kanamicina.

Os brotos excisados, colocados em ½ MS contendo 200 ou 300 mg/l de kanamicina, apresentavam, 90 dias após a permanência na presença do agente seletivo, graus variáveis de necrose (que aparecia em uma ou mais folhas, no ápice, ou na planta toda) ou de clorose. As plântulas não enraizaram na presença de kanamicina.

Plântulas sem necrose, geralmente com clorose muito suave, foram selecionadas como possíveis transformantes, e com elas foi feito teste de GUS. O teste foi feito com 4 plântulas selecionadas no ensaio em que se

inoculou LBA4404 (p35S GUS INT) em meio líquido e com 5 plântulas selecionadas no ensaio de inoculação de LBA4404(p35S GUS INT) em placa. Os resultados do teste GUS foram negativos.

iii) efeito da kanamicina na brotação

No primeiro ensaio para verificar o efeito da presença de kanamicina no meio de cultura sobre o aparecimento de brotos, foram feitos cinco ferimentos em hipocótilos, que foram colocados em posição vertical em ½ MS contendo kanamicina nas concentrações 0 , 250 ou 500 mg/l. Na avaliação, feita aos 30 dias após terem sido feitos os ferimentos, a porcentagem de explantes com broto foi de 82%, em 28 repetições, quando a concentração de kanamicina foi zero; de 33%, em 12 repetições, quando a dose de kanamicina foi de 250 mg/l; e de 8,3%, em 12 repetições, quando a dose de kanamicina foi de 500 mg/l. Os brotos derivados de hipocótilos que estavam na presença de kanamicina apresentaram clorose.

Em um segundo ensaio, foi feita inoculação da linhagem LBA4404 (p35S GUS INT) com seringa. Todos os 46 explantes inoculados foram colocados em ½ MS contendo 500 mg/l de kanamicina e não houve regeneração.

5.6. CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DESARMADAS DE *Agrobacterium* ATRAVÉS DA EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GUS EM TABACO.

As linhagens GV3101, LBA4404 e GV2260, contendo vetores binários que contêm o gene *uidA*, foram utilizadas para inoculação de tabaco e verificação da expressão transiente de β -glucuronidase, com o objetivo de caracterizar estas linhagens quanto à sua infectividade e confirmar a presença do vetor binário.

A inoculação foi realizada conforme descrito em Material e Métodos. Terminada a lavagem em tetraciclina, os explantes foram transferidos

para meio MS contendo 0,5 mg/l BAP e 500 mg/l de cefotaxime. As linhagens utilizadas, o período de crescimento da subcultura, a leitura da densidade ótica e os resultados do teste de GUS, realizados 48 horas após o término do cocultivo, encontram-se na Tabela 5.28. A Figura 5.3 mostra explantes inoculados com a linhagem GV2260 sem vetor cointegrado, como controle, e com as linhagens GV2260 (pEA24) e GV3101 (pEA24), mostrando a expressão de GUS.

Tabela 5.28

Linhagens desarmadas caracterizadas através da expressão de GUS em tabaco, com o período de crescimento da subcultura (T), a leitura da densidade ótica (A_{660nm}) e resultado do teste de GUS em tabaco.

Linhagem	T	A_{660nm}	Teste de GUS
GV3101 (p35S GUS INT)	10 horas*	0,30	-
GV2260 (p35S GUS INT)	10 horas*	0,35	+
LBA4404 (p35S GUS INT)	6 horas	1,17	-
GV3101 (pEA24)	6 horas	0,87 e 0,98	+
GV2260 (pEA24)	10 horas*	0,41 e 0,36	+
GV2260 (pEA ATS:2S)	6 horas	0,22	+

* O período de crescimento e a leitura da densidade ótica referem-se a cultura *overnight*, que foi utilizada para a inoculação, sem ter sido feita a subcultura.

As linhagens GV3101 e GV2260 contendo os vetores binários pEA-24 e pEA:ATS 2S foram infectivas em tabaco (ver figura 5.3).

A expressão de GUS em tabaco inoculado com GV2260 (p35S GUS INT) foi muito mais baixa que aquela observada quando utilizou-se a linhagem GV2260 (pEA ATS:2S). Ambos os plasmídeos têm o gene GUS íntron, controlado pelo promotor 35S. A baixa expressão pode ser interpretada como sendo devido a perda de infectividade desta linhagem, possivelmente facilitada pelo método de manutenção utilizado.

As linhagens LBA4404 (p35S GUS INT) e GV3101 (p35S GUS INT) não foram infectivas. Nestas linhagens, deve ter ocorrido perda de plasmídeos, apesar de terem sido mantidas na presença de kanamicina, que é marcador seletivo deste plasmídeo.

5.7. EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GUS EM *Stylosanthes*.

Para verificar a eficiência do método de inoculação de *Agrobacterium* nos diferentes explantes de *Stylosanthes*, foi feita inoculação de explantes derivados de raízes, folíolos e hipocótilos do cultivar Bandeirantes e hipocótilos do cultivar Mineirão, com as linhagens GV3101 (pEA24), GV2260 (pEA:ATS 2S) e GV2260 (pEA24). Explantes derivados de folíolos e raízes do cultivar Bandeirantes tinham 40 dias na data de inoculação; explantes hipocotiledonares do cultivar Bandeirantes, 18 dias; e explantes hipocotiledonares do cultivar Mineirão, 16 dias ou 4 dias. Explantes derivados de hipocótilos e raízes foram seccionados antes de serem colocados no substrato. Os resultados podem ser observados na Tabela 5.29.

Tabela 5.29
Número de explantes ou meio explantes com pontos azuis e total de explantes inoculados, entre parênteses.

Linhagem	Folíolo Bandeirantes	Raiz* Bandeirantes	Hipocótilo* Bandeirantes	Hipocótilo Mineirão (16 dias)*	Hipocótilo Mineirão (4 dias)*
GV2260 (pEA24)	0 (1)	4 (4)	1 (6)	2 (6)	-
GV3101 (pEA24)	4 (4)	6 (6)	2 (4)	0 (6)	-
GV2260 (pEA-ATS 2S)	0 (3)	0 (7)	0 (6)	1 (12)	2(4)

Nota: O asterisco indica meio-explantes, ou seja, os explantes foram seccionados ao meio antes de serem colocados no substrato.

Nos explantes derivados de folíolos, a expressão de GUS foi em pequenas regiões e nunca nos locais onde foi feita a excisão do explante. Em explantes derivados de raízes e hipocótilos, foi mais alta. Em hipocótilos e raízes, os pontos azuis ficaram mais concentrados nos locais de excisão, que são as regiões de ferimento de onde se inicia a regeneração (ver Figura 5.3).

Pelos dados mostrados na Tabela 5.29, elegeu-se a linhagem GV3101 para ser usada nos experimentos de transformação do cultivar Bandeirantes, e a linhagem GV2260 para ser usada no cultivar Mineirão.

FIGURA 5.3 Expressão transiente de GUS A) Tabaco inoculado com as linhagens GV3101 (pEA24), GV2260 (pEA24) e GV2260 sem o vetor binário B) Explante derivado de raiz do cultivar Bandeirantes inoculado com a linhagem GV3101 (pEA24) C) Explante hipocotiledonar do cultivar Mineirão de 4 dias inoculado com a linhagem GV2260 (pEA ATS:2S) D) Explante hipocotiledonar do cultivar Mineirão de 16 dias, inoculado com a linhagem GV2260 (pEA ATS:2S).

FIGURA 5.4 Expressão transiente de GUS em explantes hipocotiledonares de 16 dias, durante os ensaios de transformação A) Cultivar Mineirão inoculados com a linhagem GV2260 (pEA24) B) Cultivar Bandeirantes inoculado com a linhagem GV3101 (pEA24).

5.8. ENSAIOS DE TRANSFORMAÇÃO DE EXPLANTES DERIVADOS DE FOLÍOLOS DO CULTIVAR BANDEIRANTES.

Nos ensaios em que se utilizou a linhagem GV3101 (p35S GUS INT) para a inoculação de explantes derivados de folíolos, os dez dias em 500 mg/l de cefotaxime não foram suficientes para matar a bactéria: todos os 113 explantes inoculados no primeiro ensaio e 82 dos 84 explantes inoculados no segundo ensaio apresentaram crescimento da bactéria quando transferidos para meio de cultura sem cefotaxime. No primeiro ensaio, alguns dos explantes foram transferidos novamente para cefotaxime, mas não se conseguiu descontaminação. Os ensaios foram descartados.

Nos explantes derivados de folíolos inoculados com a linhagem LBA4404 (p35S GUS INT), ao contrário, os dez dias em 500 mg/l de cefotaxime foram suficientes. No primeiro ensaio houve contaminação de 8% dos explantes com bactéria, possivelmente *Agrobacterium*. Nos três ensaios seguintes não houve contaminação com bactérias.

Observou-se formação de calo e de brotos em explantes derivados de folíolos inoculados com a linhagem LBA4404 (p35S GUS INT), não infectiva em tabaco. As porcentagens de calos verdes (sem escurecimento) e de explantes com brotos nas avaliações feitas aos 28, 56 ou 84 dias , em cada ensaio, estão na Tabela 5.30.

Tabela 5.30

Número de explantes inoculados, e porcentagem de calos de explantes com regeneração em explantes derivados de folíolos aos 28, 56 e aos 84 dias de cultura, segundo o ensaio, o método de inoculação e o tratamento utilizado.

Ensaio	Método de inoculação	Tratamento	Número de explantes	% calo 28 dias	% calo 56 dias	% broto 28 dias	% broto 56 dias
primeiro	placa	inoculado	172	56	28	7	5
		controle -	15	47	7	0	0
segundo	placa	inoculado	96	21	9	0	0
		controle +	12	75	63	8	13
		controle -	12	8	8	0	0
terceiro	placa	inoculado	36	47	26	0	3
		controle +	18	29	12	35	35
	líquido	inoculado	36	19	0	0	0
		controle +	18	21	8	14	31
		controle -	18	0	17	0	0
quarto	placa	inoculado	144	8	8	1	2
		controle +	16	25	19	31	44
		controle -	16	25	25	0	0
	sólido	inoculado	144	4	2	0	2
		controle +	16	44	60	19	60
		controle -	16	17	17	0	0

As porcentagens foram calculadas em relação ao número de explantes avaliados, ou seja, descontando-se, do número total de explantes inoculados, as perdas por contaminação.

Observa-se na Tabela 5.30 que a porcentagem de explantes com regeneração dos controles de regeneração ficou entre 8 e 35%, bem mais baixa que o esperado para estas combinações de reguladores de crescimento no experimento de cultura de tecidos.

Não se registrou regeneração nos controles negativos, e, nos explantes inoculados, a porcentagem de regeneração foi de 0 a 1% nos primeiros 28 dias de cultura, e de 0 a 3% em explantes com 56 dias de cultura. Estes resultados não são diferentes dos controles negativos.

Aparentemente, não houve prejuízo dos explantes provocado pela inoculação de *Agrobacterium*, uma vez que a formação de calo ou regeneração foi semelhante nos controles negativos e nos explantes inoculados.

No primeiro ensaio foi feito teste de GUS para um a três brotos de cada um dos nove calos que regeneraram. Foram utilizados folíolos intactos ou macerados na presença de tampão, conforme descrito no item 4.15. Do terceiro ensaio, apenas um broto foi analisado. Do quarto ensaio, quatro. Os resultados do teste de GUS foram sempre negativos.

5.9. ENSAIOS DE TRANSFORMAÇÃO DE EXPLANTES HIPOCOTILEDONARES DOS CULTIVARES MINEIRÃO E BANDEIRANTES

Os explantes derivados de hipocótilos foram considerados como os explantes mais eficientes em cultura de tecidos e suscetíveis a *Agrobacterium* nos ensaios de expressão transiente do gene repórter *uidA*. Por isso foram usados apenas explantes hipocotiledonares nos experimentos de transformação. Foram feitos tratamentos que diferiam entre si quanto a época de aplicação e quanto às doses dos antibióticos kanamicina e cefotaxime. Para cada tratamento foi feito um ensaio de expressão transiente de GUS, com uma amostra aleatória dos explantes inoculados, 48 horas após a inoculação. O número total de explantes utilizado e o número de explantes positivos para GUS, estão na Tabela 5.31. Os resultados do teste de GUS mostraram que o método de inoculação permitiu a transferência genética, pois 100% dos explantes foram positivos para GUS, exceto explantes derivados de hipocótilos superiores do cultivar Mineirão inoculados com GV2260 (pEA24), nos quais observou-se 80% dos explantes com pontos azuis.

A cada transferência, para decidir se o cefotaxime seria adicionado ao meio, uma amostra de três explantes ou pedaços de calo foi colocada em 10 ml de meio MYA líquido, sob agitação a 150 rpm. Com este procedimento, em explantes derivados de hipocótilos do cultivar Bandeirantes inoculados com GV3101 (pEA24), 28 dias foram suficientes para limpar os explantes; no tratamento B, onde a dose de cefotaxime foi 100 mg/l, esse teste foi feito quando os explantes tinham 12 semanas de cultura e mostrou que a bactéria já

havia sido eliminada. Nos tratamentos A e B do cultivar Mineirão inoculados com a linhagem GV2260 (pEA24) quando, aos 28 e 56 dias, uma amostra dos explantes foi colocada em meio MYA, houve crescimento da bactéria, e os explantes foram continuamente mantidos em meio de regeneração contendo 100 mg/l de cefotaxime. Mesmo na presença do antibiótico, com 11 semanas em cultura, houve crescimento de *Agrobacterium* sobre os explantes. A contaminação foi de 5% no tratamento A, e 9% no tratamento B. No tratamento C, os explantes foram mantidos por 60 dias em meio de cultura com 250 mg/l de kanamicina, quando foram transferidos para meio sem o antibiótico.

Tabela 5.31
Número de explantes e meio explantes positivos para GUS e número de explantes amostrados em cada ensaio, entre parêntesis.

Cultivar x Linhagem	Tratamento	Hipocótilo	Número de explantes GUS+
Bandeirantes x GV3101 (pEA24)	B	superior	4 (4)
		inferior	4 (4)
Mineirão x GV2260 (pEA24)	A e B	superior	8 (10)*
		inferior	10 (10)*
Mineirão x GV2260 (pEA24)	C	superior	3 (3)

*indica meio explantes, ou seja, os explantes foram seccionados ao meio antes de serem colocados no substrato.

Os explantes foram avaliados aos 28 e 56 dias quanto à formação de calo e brotos. O número de explantes inoculados e porcentagem de explantes com calo ou regeneração de brotos segundo o cultivar e o tratamento, encontram-se na Tabela 5.32.

Os controles com cefotaxime e com tetraciclina foram comparados aos controles positivos, com o objetivo de verificar se a adição de cefotaxime ao meio de cultura ou a lavagem em tetraciclina prejudicaram a formação de calo ou a regeneração. O controle com tetraciclina foi feito apenas para os tratamentos A e B do cultivar Bandeirantes e para o tratamento C do cultivar

Mineirão. Nos três casos não houve qualquer perda na porcentagem de explantes formando calo ou regenerando, em relação aos controles positivos.

Em explantes hipocotiledonares do cultivar Bandeirantes, o tratamento A incluía, nos 28 dias iniciais de cultura, 250 mg/l de cefotaxime. Esta dose do antibiótico não prejudicou a formação de calo, que foi de 100% tanto no controle positivo como no controle com cefotaxime mas prejudicou a regeneração que, aos 28 dias, era de 66% dos explantes derivados de hipocótilos superiores ou inferiores nos controles positivos, e de 0% dos mesmos explantes do controle com cefotaxime. Aos 28 dias, os explantes puderam ser transferidos para meio de cultura sem o antibiótico, uma vez que demonstrou-se que o *Agrobacterium* já havia sido eliminado. A capacidade de regeneração foi parcialmente recuperada, passando, aos 56 dias, a 66 e 33% de explantes com brotos, respectivamente, em explantes derivados de hipocótilos superiores e inferiores.

Devido à perda de regeneração causada pelo de cefotaxime no ensaio seguinte com o mesmo cultivar (tratamento B) foi utilizada uma concentração mais baixa de cefotaxime (100 mg/l). A regeneração no controle com cefotaxime no tratamento B foi mais favorável e, aos 28 dias de cultura, 60% dos explantes derivados de hipocótilos superiores e 40% dos explantes derivados de hipocótilos inferiores regeneraram.

Quando explantes hipocotiledonares do cultivar Bandeirantes foram colocados logo após o cocultivo em kanamicina (tratamento A), não houve formação de calo ou regeneração.

Tabela 5.32

Número de explantes (n) derivados de hipocótilos superiores(S) e inferiores(I) inoculados e porcentagem de explantes com calo ou regeneração de brotos aos 28 e 56 dias em cultura, segundo o cultivar e o tratamento.

Cultivar	Tratamento	Linhagem		n	% calo 28 dias	% calo 56 dias	%broto 28 dias	%broto 56 dias
Bandeirantes	A	GV3101 (pEA24)	S	45	0	0	0	0
			I	45	0	0	0	0
		controle positivo	S	3	66	100	66	100
			I	3	66	100	66	33
		controle em tetraciclina	S	3	100	100	66	100
			I	3	33	100	66	0
	B	controle em cefotaxime	S	3	100	100	0	66
			I	3	33	66	0	33
		controle negativo	S	3	0	0	0	0
			I	3	0	0	0	0
		GV3101 (pEA24)	S	108	64	66	42	33
			I	105	60	54	30	26
Mineirão	A	controle positivo	S	10	90	80	80	60
			I	10	90	80	40	50
		controle em tetraciclina	S	10	90	90	70	90
			I	10	80	80	40	60
		controle em cefotaxime	S	10	90	80	60	50
			I	10	70	90	40	40
	B	controle negativo	S	10	70	50	20	30
			I	10	100	80	50	40
		GV2260 (pEA24)	S	111	0,9	0	0	0
			I	107	9,3	5,6	1,9	1,9
		controle positivo	S	10	100	100	100	100
			I	10	100	100	90	70
	C	controle em cefotaxime	S	10	100	100	90	70
			I	10	100	100	80	60
		controle negativo	S	10	30	30	0	0
			I	10	40	40	0	0
		GV2260 (pEA24)	S	105	66	42	9,5	2,2
			I	108	69	60	12	17
	C	controle negativo	S	10	80	70	60	50
			I	10	90	60	0	10
		GV2260 (pEA24)	S	159	98	94	62	47
			I	163	100	100	67	51
		controle positivo	S	5	100	100	60	75
			I	10	90	100	90	80
	C	controle em tetraciclina	S	10	100	100	70	60
			I	10	80	100	80	80
	C	controle em cefotaxime	S	7	100	100	71	86
			I	10	100	100	70	80

Nos explantes hipocotiledonares do cultivar Bandeirantes, em que os explantes ficaram inicialmente sem o agente seletivo (tratamento B), na primeira semana de cultura após a inoculação, notou-se que os explantes inoculados tinham menor formação de calo que os controles negativos (estes dados não aparecem na Tabela). Isto foi interpretado como sendo devido a um prejuízo causado aos explantes pelo *Agrobacterium*. Este prejuízo reflete-se na formação de calo, aos 28 dias de cultura, mais baixa nos explantes inoculados (64 e 60% em explantes derivados de hipocótilos superiores e inferiores, respectivamente), que nos controles negativos (70 e 100% em hipocótilos superiores e inferiores, respectivamente). Este prejuízo não ocorreu, no entanto, quando se analisou a proporção de regeneração dos mesmos explantes nos primeiros 28 dias de cultura (42 e 30 % para explantes derivados de hipocótilos superiores e inferiores respectivamente, nos explantes inoculados e 20 e 50% para explantes derivados de hipocótilos superiores e inferiores, respectivamente, nos controles negativos).

No cultivar Mineirão, o uso de 250 mg/l de cefotaxime por 28 dias (tratamento A) permitiu a regeneração de 90% dos explantes derivados de hipocótilos superiores e 80% dos explantes derivados de hipocótilos inferiores. No tratamento C, 60 dias em cefotaxime não prejudicaram a regeneração. Este cultivar foi, portanto mais tolerante ao cefotaxime que o cultivar Bandeirantes.

Conforme demonstrado, a concentração de 100 mg/l de kanamicina foi capaz de impedir a regeneração em explantes não transformados do cultivar Bandeirantes. Para o cultivar Mineirão, quando adicionada ao meio desde o início da cultura (tratamento A), impediu a regeneração. Porém, quando foi adicionada somente a partir do oitavo dia (tratamento B), não impediu totalmente a regeneração, embora tenha reduzido a porcentagem de explantes formando broto em relação ao controle positivo.

Para o cultivar Mineirão, no tratamento B, a formação de calo (66 e 69%, respectivamente, para hipocótilos superiores e inferiores) e a regeneração (9,5 e 12%, respectivamente, para hipocótilos superiores e

inferiores) foram mais freqüentes que no tratamento A. No entanto, apesar da regeneração no tratamento B ser, no início, relativamente alta, os brotos inicialmente formados, ficando continuamente na presença de kanamicina, apresentaram clorose e necrose, não se desenvolvendo o bastante para que pudessem ser excisados. Com 12 semanas de cultura, os explantes foram transferidos para meio de cultura sem o agente seletivo, mas poucos recuperaram-se.

Além disso, em parte dos explantes do tratamento B, apareceu crescimento de *Agrobacterium*, mesmo na presença de 100 mg/l de cefotaxime. Isto resultou em um pequeno número de explantes disponível para o teste de GUS.

Para o tratamento B do cultivar Bandeirantes foram avaliadas para GUS 128 plântulas, originadas de cinco calos diferentes.

Dos hipocótilos do cultivar Mineirão no tratamento B foram avaliadas sete plântulas; no tratamento C, 301. Os resultados do teste de GUS foram sempre negativos.

Em explantes derivados de hipocótilos inferiores do cultivar Mineirão, no tratamento A, dois explantes desenvolveram-se. Um deles, sem formar calo, desenvolveu um broto. Ainda não excisado do explante que lhe deu origem, o frasco foi contaminado com fungo, e, por isso, o broto foi excisado e colocado em substrato para o teste de GUS, mostrando-se fortemente azul, mas não de maneira uniforme. Não se pode afirmar se tratava-se de uma planta transgênica, quimérica, ou se havia contaminação com *Agrobacterium* ou outra bactéria GUS positiva, embora nenhuma colônia fosse visível no frasco.

Outro explante derivado de hipocótilo superior do cultivar Mineirão que desenvolveu-se em kanamicina formou calo, com formação inicial de brotos, e foi contaminado com *Agrobacterium*. Colocado no substrato, mostrou expressão fraca e não uniforme de GUS. Da mesma forma, não se pode afirmar se a expressão de β -glucuronidase é derivada do explante ou do *Agrobacterium*.

6. DISCUSSÃO

Os reguladores de crescimento mais utilizados para cultura *in vitro* de *Stylosanthes* são NAA e BAP (Meijer e Szabados, 1990). No presente trabalho foi mais uma vez comprovada a eficiência destes reguladores, pois eles permitiram a regeneração dos cinco explantes (hipocótilos superiores e inferiores, folíolos, raízes e cotilédones) dos dois cultivares estudados. A resposta à auxina na ausência da citocinina formando rizogênese, a resposta à adição conjunta dos dois reguladores de crescimento formando calo e a formação de brotos em resposta à adição de citocinina correspondem ao que ocorre com outras espécies. Este padrão morfogenético é considerado de fácil interpretação e serve como modelo de comparação em estudos de cultura *in vitro* (Fukuda & Komamine, 1985).

A frequência de regeneração medida pela porcentagem de explantes com regeneração foi semelhante ou maior que aquelas relatadas para *S. guianensis* (Meijer & Broughton, 1981; Mesa et al., 1993). Explantes hipocotiledonares foram os mais responsivos, como já indicado por trabalhos com *S. humilis* (Meijer, 1982), *S. guianensis* (Mesa et al., 1993) e *S. scabra* (Dornelas et al., 1991).

A regeneração foi via organogênese. Esta via é a mais frequente nas diferentes espécies de *Stylosanthes* (Meijer & Szabados, 1990), embora já tenha sido relatada embriogênese somática com o uso de 2,4D em *S. scabra* (Dornelas et al., 1992).

A organogênese em espécies de *Stylosanthes* normalmente ocorre via calo (Dornelas et al., 1992; Meijer & Szabados, 1990; Silva, 1991). Neste trabalho, foi relatada a regeneração direta de brotos em explantes derivados de cotilédones, hipocótilos inferiores e superiores. A regeneração deve ser preferencialmente direta em cultura de tecidos visando transformação genética, uma vez que a passagem por fase de calo favorece a variação somaclonal, sendo portanto indesejável no processo de obtenção de plantas transgênicas.

Para obtenção de plantas transgênicas é necessário que, em seguida à infecção, ocorra regeneração dos explantes. A idade e condições de obtenção do tecido vegetal influenciam na capacidade de infecção (Schläppi & Hohn, 1992; Torres et al., 1993; Van der Graaff & Hooykaas, 1996) e na capacidade de regeneração (Dornelas et al., 1991). Assim, utilizaram-se, para transformação, hipocótilos excisados de plantas germinadas *in vitro*, nas mesmas condições e idade que aqueles utilizados em cultura de tecido.

A eficiência de transformação de plantas mediada por *Agrobacterium* depende da compatibilidade da linhagem utilizada com a espécie que se visa transformar. A compatibilidade patógeno hospedeiro foi demonstrada para as linhagens T37, A208 de *A. tumefaciens* e 8196, A4 e A4T de *A. rhizogenes*, que provocaram aparecimento de tumor em *Stylosanthes guianensis*. A infecção por *Agrobacterium* foi a causa da ocorrência de tumores, uma vez que estes não ocorreram nas plantas controle.

A formação de tumor é provocada pela ação conjunta de genes da biossíntese de auxina e citocinina em *Agrobacterium tumefaciens*. O sintoma esperado após a inoculação com *A. rhizogenes* é a formação de raízes em cabeleira, em consequência da atuação dos genes *rolA*, *rolB* e *rolC*, cujo papel ao nível bioquímico permanece obscuro e, também, dos genes *iaaM* e *iaaH*, que estão envolvidos na biossíntese de auxina (Weising & Kahl, 1996). É possível

que o sintoma de tumor observado em *S. guianensis* causado após a inoculação de linhagens de *A. rhizogenes* deva-se à associação do teor endógeno de citocinina com a ação dos genes *iaaM* e *iaaH*.

Em plantas transformadas com o gene *ipt* de *A. tumefaciens*, em que existe superexpressão de citocinina, ocorre formação espontânea de brotos nos locais de ferimento (Binns, 1994). Neste trabalho, quando provocaram-se ferimentos em hipocótilos dos cultivares Bandeirantes e Mineirão, excisados de plântulas germinadas *in vitro*, formaram-se brotos. Essa formação de brotos é provavelmente explicada pelo alto teor endógeno de citocinina. Esta hipótese é reforçada pela observação, em experimentos de cultura de tecidos, de que hipocótilos do cultivar Bandeirantes, em meio MS sem reguladores de crescimento, formaram calo; hipocótilos do cultivar Mineirão, formaram calo e brotos. Da mesma forma, nas espécies de cerrado *Mandevilla illustris* e *M. velutina*, ocorre a formação de gemas adventícias e surge-se que a potencialidade de formação de novas gemas esta relacionada com teor elevado de citocinina (Appezato-da-Glória & Estelita, 1995).

O *Agrobacterium tumefaciens* causa tumores pela expressão, no hospedeiro, dos genes bacterianos que codificam enzimas da biossíntese de auxinas (Inzé et al., 1984; Schröder et al., 1984) e da biossíntese de citocininas (Buchmann et al., 1985). Linhagens mutantes que não expressam os genes *aux* causam, ao invés de formação de tumor, brotos (Garfinkel et al., 1981). Raramente, *A. rhizogenes* estimula a formação de brotos (Damgaard & Rasmussen, 1991). No presente trabalho, a inoculação com *Agrobacterium* não foi causa de aparecimento de brotos, uma vez que estes ocorreram também nos controles. Porém, mas a inoculação com a linhagem C58 na presença de *acetosyringone* 40µM, aumentou significativamente o número de brotos por explante.

O uso da brotação induzida pela inoculação de linhagens selvagens de *Agrobacterium* tem sido apontada como vantajosa em relação aos métodos tradicionalmente usados de transformação que requerem passagem

por cultura de tecidos (Brasileiro, 1992). A mesma vantagem pode ser apontada para a utilização da brotação induzida por ferimentos em hipocótilos de *S. guianensis*. A brotação em locais de ferimento pode ser usada simultaneamente com a inoculação de linhagens desarmadas de *Agrobacterium* visando a obtenção de plantas transformadas com estes genes. Ficou demonstrado que a adição de kanamicina ao meio de cultura nas doses de 250 ou 500 mg/l reduz drasticamente a formação de brotos e, possivelmente, possa ser usado como agente seletivo.

Alguns dos brotos formados a partir de explantes hipocotiledonares inoculados com linhagens selvagens de *Agrobacterium* mostraram, quando excisados, formação de calos ou raízes nas partes aéreas, associados a enraizamento reduzido *in vitro* ou modificação de arquitetura por superbrotamento e redução de altura de planta. Estas alterações não ocorreram em plantas não inoculadas com linhagens selvagens e podem ser atribuídas a atuação de oncogenes, uma vez que são semelhantes àquelas relatadas em outras espécies transformadas com linhagens selvagens (Frugis et al., 1995; Benetka & Pavingerová, 1995). A formação de plantas transformadas com oncogenes já foi relatada em *Stylosanthes* (Manners, 1987), no entanto os brotos não enraizaram.

Os plasmídeos utilizados continham o gene *nptII* e então, nos primeiros experimentos de transformação, a kanamicina foi utilizada como agente seletivo. Foram feitos ensaios com um intervalo de alguns dias entre o término do cocultivo e a adição de kanamicina ao meio de cultura, uma vez que este procedimento pode aumentar a frequência de transformação (Archilitti et al., 1995). A kanamicina foi ineficaz como agente seletivo no cultivar Mineirão porque permitiu a formação de brotos não transformados e teve uma ação não uniforme, isto é, formaram-se brotos verdes não transgênicos e brotos necróticos muito próximos, em um mesmo calo.

A kanamicina foi utilizada em experimentos transformação de *S. humilis* durante todo o período de cultura por Manners (1988), que obteve uma frequência de transformação de 0,3%. Sarria et al. (1994) obtiveram uma frequência de transformação em *S. humilis* bem mais alta, de 2 a 5%, em diferentes ensaios. Para obter esta frequência foi necessário reduzir o período de aplicação de kanamicina, uma vez que foi constatada toxidez em *Stylosanthes*.

Em outras leguminosas, como amendoim (McKently et al., 1995) e soja (Di et al, 1996), a kanamicina não tem sido considerada um agente seletivo satisfatório. Neste trabalho, optou-se por realizar a seleção de transformantes com o teste de GUS, sem utilização de agente seletivo (McKently et al., 1995). Isto foi feito em apenas um ensaio, com o cultivar Mineirão.

O cefotaxime nas doses de 100 ou 250 mg/l diminuiu eficiência de regeneração de explantes hipocotiledonares do cultivar Bandeirantes. O cefotaxime atua em cultura de modo similar à uma auxina (Sarma et al., 1995), e a isto pode ser atribuído seu efeito tóxico (Lin et al, 1995).

Em experimentos de transformação de plantas via *Agrobacterium*, a capacidade de regeneração também pode ser prejudicada pelo cocultivo, decorrente do conjunto de respostas do tecido vegetal à infecção (Jong et al., 1993; Perl et al., 1996). Em um dos ensaios de transformação com o cultivar Bandeirantes observou-se menor formação de calos a partir dos explantes inoculados em relação ao controle em consequência do contato com o *Agrobacterium*. Entretanto, o potencial de regeneração não foi alterado.

A expressão transiente de GUS, 48 horas após o término do cocultivo, mostrou eficiência da linhagem GV2260 transformada com o plasmídeo pEA 24. A expressão de GUS foi menos frequente que quando foi utilizada a mesma linhagem bacteriana transformada com o plasmídeo pEA ATS:2S. No plasmídeo pEA ATS:2S, o gene *uidA* contém um intron de forma a

impedir expressão do gene pela bactéria (Vancanneyet et al., 1990). Possivelmente, no caso da inoculação com linhagens que contêm o plasmídeo pEA24, parte da expressão de GUS deva-se à contaminação dos explantes com *Agrobacterium*.

As plântulas regeneradas a partir dos ensaios de transformação utilizando-se hipocótilos foram avaliadas para a presença de GUS, num total de 128 para o cultivar Bandeirantes e 310 para o cultivar Mineirão. A não obtenção de planta transgênica pode ser atribuída à etapa de cultura de tecido, onde não houve indução de regeneração das células transformadas. Isto tem sido demonstrado em outras espécies, como arroz (Hiei et al., 1994) e milho (Ishida et al, 1996), onde verificou-se que a proporção de explantes GUS positivos observada após algumas semanas em cultura não corresponde àquela verificada logo após o cocultivo. Portanto, a seleção com base na expressão do gene repórter é mais segura quando feita também após algumas semanas de cultura.

O monitoramento destes fenômenos - regeneração e transformação - por análises histológicas, deverá contribuir para maior eficiência do processo de obtenção de plantas transgênicas via *Agrobacterium*.

7. CONCLUSÕES

- Todos os explantes avaliados podem ser usados para transformação, sendo explantes hipocotiledonares do cultivar Mineirão os mais favoráveis, do ponto de vista da capacidade de regeneração.
- Explantes hipocotiledonares dos cultivares Bandeirantes e Mineirão caracterizam-se pela regeneração sem passagem por fase conspícua de calo.
- Ferimentos induzem formação de brotos adventícios em hipocótilos de *Stylosanthes guianensis*.
- A linhagem C58 de *Agrobacterium tumefaciens*, na presença de 40 μ M de acetosyringone, estimula a formação de brotos em hipocótilos derivados de *S. guianensis* cv. Bandeirantes.
- As linhagens T37, A208, A4, A4T, e 8196 de *Agrobacterium* são virulentas em *S. guianensis* cv. Bandeirantes.
- O número de tumores por hipocótilo causado pela inoculação de linhagens selvagens de *Agrobacterium* não é alterado pela adição de acetosyringone 40 μ M à suspensão bacteriana.

- O cefotaxime quando utilizado em cultura de tecido tem efeito semelhante a uma auxina sobre os explantes de *S. guianensis*.
- A kanamicina é um agente seletivo ineficaz em experimentos de transformação de *S. guianensis* pois permite a seleção de brotos não transformados, tendo inclusive uma ação não uniforme sobre brotos do mesmo calo.
- O procedimento de cocultivo da linhagem desarmada de *Agrobacterium* GV2260 (pEA ATS:2S) com explantes hipocotiledonares do cultivar Mineirão permite a transferência do gene *uidA*, cuja expressão é demonstrada pelo teste de GUS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E.R.P. ; GOSSELE, V. ; MULLER, C.G. ; DOCKX, D. ; REYNAERTS, A. ; BOTTERMANN, J.; KREBBERS, E. ; TIMKO, M.P. Transgenic expression of two markers genes under control of an *Arabidopsis rbcS* promoter : sequences encoding the Rubisco transit peptide increase the expression levels. **Molecular and General Genetics**, v. 218, p. 78-86, 1989.
- ◉ALTABELLA, T.; ANGEL, E.; BIONDI, S.; PALAZÓN, J.; BAGNI, N.; PIÑOL, M.T. Effect of the *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* on polyamine metabolism in tobacco roots. **Physiologia Plantarum**, v.95, p.479-85, 1995.
- ◉ALTAMURA, M. M.; CAPITANI, F.; GAZZA, L.; CAPONE, I.; COSTANTINO, P. The plant oncogene *rolB* stimulates the formation of flower and root meristemoids in tobacco thin cell layers. **New Phytologist**, v.126, p.283-93, 1994.
- ALTENBACH, S. B ; KUO, C. ; STARACI, L. C. ; PEARSON, K. W.; WAINWRIGHT, C.; GEORGESCU, A.; TOWNSEND, J. Accumulation of Brazil nut albumin in seeds of transgenic canola results in enhanced levels of seed protein in methionine. **Plant Molecular Biology**, v.18, p. 235-45, 1992.
- ALTENBACH, S.B. A ; PEARSON, K.W. ; LEUNG, F.W.; SUM, S.S.M. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a Brazil nut protein

exceptionally rich in metionine. **Plant Molecular Biology**, v.8, p.239-50, 1987.

ALTENBACH, S.B. ; PEARSON, K.W. ; MEEKER, G. ; STARACI, L.C.; SUN, S.S.M. Enhancement of the metionine content of seed proteins by the expression of a chimeric gene encoding a metionine -rich protein in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v. 13, p.513-22, 1989.

AMPE, C. ; VAN DAMME, J. ; CASTRO, L. A.B. ; SAMPAIO, M. J. A. M. ; VAN MONTAGU, M.; VANDEKERCKHOVE, J. The amino- acid sequence of the sulfur- rich proteins from seeds of Brasil nut (*Bertholletia excelsa* H.B. K.) **European Journal of Biochemistry**. v. 159, p.597-604, 1986.

ANDRIGUETO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; FLEMING, J.S.; GEMAEL, A.; SOUZA,G.A.; BONA FILHO, A. As proteínas na nutrição animal. In:_____. **Nutrição Animal**. 2 ed. São Paulo: Nobel, 1981a. v.1, cap. 6.3, p.110-134.

ANDRIGUETO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; FLEMING, J.S.; GEMAEL, A.; SOUZA ,G.A.; BONA FILHO, A. Equínos. In:_____. **Nutrição Animal**. São Paulo: Nobel, 1981b. v.2, cap. 6, p.299-324.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA,B.; ESTELITA,M.E.M. Caracteres anatômicos da propagação vegetativa de *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson e de *M. velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson - Apocynaceae. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 9, Ilhabela, 1992. **Anais**. São Paulo: SBSP,1995. p. 5-13.

ARAGÃO, F.J.L. ; GROSSI de SÁ, M.F.; ALMEIDA, E.R. Particle bombardment-mediated transient expression of a Brazil nut metionine - rich

albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Plant Molecular Biology**, v. 20, p. 357-9, 1992.

ARAGÃO, F.J.L.; BARROS, L.M.G.; BRASILEIRO, A.C.M.; RIBEIRO, G.; SMITH, F.D.; SANFORD, J.C.; FARIA, J.C.; RECH, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.142-50, 1996.

ARCHILLETI, T.; LAURI, P.; DAMIANO, C. *Agrobacterium*-mediated transformation of almond leaf pieces. **Plant Cell Reports**, v.14, p.267-72, 1995.

• BARON, C.; ZAMBRYSKI, P.C. Notes from the underground: highlights from plant-microbe interactions. **Trends in Biotechnology**, v.13, p.356-62, 1995.

BENETKA, V. ; PAVINGEROVÁ, D. Phenotypic differences in transgenic plants of chrysanthemum. **Plant Breeding**, v.114, p.169 - 73, 1995.

• BIDNEY, D.; SCELONGE, C.; MARTICH, J. ; BURRUS, M.; SIMS, L.; HUFFMAN, G. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, v.18, p.301-13, 1992.

BINNS, A. Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic, and molecular approaches. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.45, p.173-96, 1994.

BRASILEIRO, A. C. M. Caracterisation de la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* 82.139 et son utilisation pour la transformation genetique du

peuplier (*Populus x canescens*). Orsay, 1992. 139p. Thèse (Doctorat)-
Universite de Paris-Sud, Centre d'Orsay.

- BRASILEIRO, A. C. M. Biologia de *Agrobacterium* sp. **ACTP Noticias**, v.20, p.2-6, 1993.
- BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. The role of bacterial motility, chemotaxis, and attachment in bacteria - plant interactions. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.8, p. 800 -10, 1995.
- BROER,I; DRÖGE-LASER,W.; BARKER, R.F.; NEUMANN,K.; KLIPP,W.; PÜHLER,A. Identification of the *Agrobacterium tuelfaciens* C58 T-DNA genes e and f and their impact on crown gall tumor formation. **Plant Molecular Biology**, v.27, p.41-57, 1995.
- BUCHMANN, I.; MARNER, F.J.; SCHRÖDER, G.; WAFFENSCHMIDT, S.; SCHRÖDER, J. Tumor genes in plants: T-DNA encoded cytokinin biosynthesis. **EMBO Journal**, v.4, p.853 - 9, 1985.
- CASTRO, L. B. A. ; LACERDA, Z. ; ARAMAYO, R.A. ; SAMPAIO, M.J.A.M.; GANDER, E.S. Evidence for a precursor molecule of Brasil nut 2S seed proteins from biosynthesis and cDNA analysis. **Molecular and General Genetics** , v.206, p.338-43, 1987.
- CHAKRABORTY, S.; PETTITT, A.N.; LOW CHOY, S.; BOLAND, R.M. Spacial dependence in antracnose development in mixtures of *Stylosanthes scabra*. **Journal of Phytopatology**, v.143, p.693-9, 1995.
- CHALUPA, W. Rumen bypass and protection of protein and amino acids. **Journal of Dairy Science**, v.58, p.1198-218, 1975.

- CHEN,F.C.; KUEHNLE,A.R. Obtaining transgenic *Anthurium* through *Agrobacterium*-mediated transformatios of etiolated internodes. **Journal of American Society of Horticultura Science**, v.121, p.47-51, 1996.
- CITOVSKY, V.; ZUPAN, J.; WARNICK, D.; ZAMBRINSKI, P. Nuclear localization of *Agrobacterium* VirE2 protein in plant cells. **Science**, v.256, p.1802-5, 1992.
- DAMGAARD, O.; RASMUSSEN, O. Direct regeneration of transformed shoots in *Brassica napus* from hypocotyl infections with *Agrobacterium rhizogenes*. **Plant Molecular Biology**, v.17, p.1-8, 1991.
- De CLERCQ, A.D. ; VANDEWIELE, M. ; VAN DAMME, J. ; GUERCHE, P. ; VAN MONTAGU, M.; KREBBERS, E. Stable accumulation of modified 2S albumin seed storage proteins with higher metionine contents in transgenic plants. **Plant Physiology** , v.94, p. 970 - 9, 1990.
- DEBLAERE,R.; BYTEBIER,B.; DE GREVE,H.; DEBOECK,F.; SHELL,J.; VAN MONTAGU,M.; LEEMANS,J. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. **Nucleic Acidds Research**, v.13, p. 4777 - 89, 1985.
- DI, R.; PURCELL, V.; COLLINS, G.B.; GHABRIAL, S.A. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. **Plant Cell Reports**, v.15, p.746 - 50, 1996.
- DORNELAS,M.C.; VIEIRA, M.L.C.; APPEZATO-DA-GLÓRIA,B. Histological Analysis of organogenesis and somatic embriogenesis induced in immature tissues of *Stylosanthes scabra*. **Annals of Botany**, v.70, p.477 - 82, 1992.
- DORNELAS,M.C.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA JÚNIOR, C.L. Fonte de explante, radiação luminosa e combinações de NAA e BAP na indução de calos em

Stylosanthes scabra Vog. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, p.1901-9, 1991.

FERNANDES, A.T.F.; FERNANDES, C.D.; GROF, B. Reação de acessos de *Stylosanthes capitata* a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Pasturas Tropicales**, v. 15, p.23-6, 1993.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados./ Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte. **Recomendações para estabelecimento e utilização do *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão**. Planaltina, 1993. 6p. (Comunicado Técnico, 67).

FRUGIS, G; CARETTO, S.; SANTINI, L.; MARIOTTI, D. *Agrobacterium rhizogenes* rol genes induce productivity-related phenotypical modification in "creeping-rooted" alfalfa types. **Plant Cell Reports**, v. 14, p. 488-92, 1995.

FUKUDA, H.; KOMAMINE, A. Cytodifferentiation. In:VASIL, I.K. **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants**. London: Academic Press, 1985. v.2, cap. 5, p.150-212.

FURTADO NETO, A. Estabelecimento de metodologia para transformação genética de *Stylosanthes guianensis*. Brasília, 1993. 124p. Tese (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

GANDER, E.S. ; HOLMSTROEM, K.O. ; De PAIVA, G.R. ; De CASTRO, L.A.B.; CARNEIRO, M.; GROSSI de SÁ, M.F. Isolation, characterization and expression of a gene coding for 2S albumin from *Bertholletia excelsa* (Brazil nut). **Plant Molecular Biology** , v.16, p.437-48, 1991.

- ◊ GARFINKEL, D.J.; SIMPSON, R.B.; REAM, L.W.; WHITE, F.F.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site direct mutagenesis. **Cell**, v.27, p.143-53, 1981.
- ◊ GAUDIN, V.; JOUANIN, L. Expression of *Agrobacterium rhizogenes* auxin biosynthesis genes in transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, v.28, p. 123-36, 1995.
- GHISI, O.M.A.; ALMEIDA, A.R.P.; ALCANTARA, V.B.; SANCHEZ, M.J.F.; MECELIS, N.R. Estudo morfológico e agrônômico de quatro acessos de *Sylosanthes guianensis* sob três alturas de corte e sob pastejo animal. **Boletim de Indústria Animal**, v.50, p. 69-78, 1993.
- GOLDS, T.J.; LEE, J.Y.; HUSNAIN, T.; GHOSE, T.K.; DAVEY, M.R. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformations of the forage legumes *Medicago sativa* and *Onobrychis viciifolia*. **Journal of Experimental Botany**, v.42, p.1147-57, 1991.
- GRÉGOIRE, R.J.; FAHMY, M.H.; BOUCHER, J.M.; TREMBLAY, A.; MERCIER, J. Effects of four protein supplements on growth, feed conversion, mohair production, fibre characteristics and blood parameters of Angora goats. **Small Ruminant Research**, v.19, p.121-30, 1996.
- GUERCHE, P. ; De ALMEIDA, E.R.P. ; SCHWARZTEIN, M.A. ; GANDER, E. ; KREBBERS, E.; PELLETIER, G. Expression of 2S albumin from *Bertholletia excelsa* in *Brassica napus*. **Molecular and General Genetics**, v.221, p.306-14, 1990.
- HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oriza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* sequences analyses of the boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal**, v.6, p.271-82, 1994.

HOOYKAAS, P.J.J.; BEIJERSBERGEN, A.G.M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.157-79, 1994.

• HORSCH, R.B. ; FRY, J.E. ; HOFFMANN, N.L. ; EICHHOLTZ, D. ; ROGERS, S.G. ; FRALEY, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, v.227, p.1229-31, 1985.

HOPKINSON, J.M.; WALKER, B. Seed production of *Stylosanthes* cultivars in Australia. In: STACE, H.M.; EDYE, L.A., ed. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sydney: Academic Press, 1984. cap.21, p.433-50.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, H.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Bio/technology**, v.14, p.745-50, 1996.

• INZÉ, D.; FALLIN, A.; VANLIJSEBETTENS, M; SIMOENS, C.; GENETELLO, C.; VAN MONTAGU, M.; SCHEL, J. Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*, further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. **Molecular and General Genetics**, v.194, p.265-74, 1984.

JIN, S.; PRUSTI, R. K.; ROITSCH, T.; ANKENBAUER, R. G.; NESTER, E. W. Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of Vir G. **Journal of Bacteriology**, v.172, p.4945-50, 1990.

JONG, L.; RADEMAKER, W.; WORDRAGEN, M.F. Restoring adventitious shoot formation on chrysanthemum leaf explants following cocultivation with

Agrobacterium tumefaciens. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.263-70, 1993.

KOCZ,C.; SCHELL,J. The promoter of T_L- DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. **Molecular and General Genetics**, v.204, p. 383-6, 1986.

LANGEVELD,S.A.; GERRITS,M.M.; DERKS,A.F.L.M.; BOONEKAMP,P.M.; BOL,J.F. Transformation of lily by *Agrobacterium*. **Euphytica**, v.85, p. 97-100, 1995.

• LEE, K.; DUDLEY, M.J.; HESS, K.M.; LYNN, D.G.; JOERGER, R.D.; BINNS, A.N. Mechanism of activation of *Agrobacterium* virulence genes: identification of phenol-binding proteins, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 8666-70, 1992.

• LEEMANS, J.; DEBLAERE, R.; WILLMITZER, L.; DE GREVE, H.; HERNALSTEENS, J.P.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Genetic identification of function of T_L-DNA transcripts in octopine crown galls. **The EMBO Journal**, v.1, p.147-52, 1982.

• LESSI, M. ; LANKA, E. Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. **Cell**, v.77, p.321-4, 1994.

LI, X.Q. ; LIU, C.N. ; RITCHIE, S.W. ; PENG, J.; GELVIN, S.B.; HODGES, T.K.; Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *gusA* in rice. **Plant Molecular Biology**, v.20, p. 1037-48, 1992.

- ✱ LIN, J.; ASSAD-GARCIA, N.; KUO, J. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. **Plant Science**, v.109, p. 171-7, 1995.
- ✱ LIPP-NISSINEN, K. H. Molecular and cellular mechanisms of *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Ciência e Cultura**, v.45, p.104-11, 1993.
- MANNERS, J.M. Transformation of *Stylosanthes* spp. using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v.6, p.204-7, 1987.
- MANNERS, J.M. Transgenic plants of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*. **Plant Science**, v. 55, p.61-8, 1988.
- MANNERS, J.M.; WAY, H. Efficient transformation with regeneration of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis* using *Agrobacterium rhizogenes* and a Ti plasmid-binary vector system. **Plant Cell Reports**, v.8, p.341-5, 1989.
- MANNETJE, L. Considerations on the taxonomy of the genus *Stylosanthes*. In: STACE, H.M.; EDYE, L.A., ed. **The Biology and Agronomy of *Stylosanthes***. Sydney: Academic Press, 1984. cap.1, p.1-22.
- MATHIS, N.L.; HINCHEE, M. A. W. *Agrobacterium* inoculation techniques for plant tissues. In: GELVIN, S.B.; SCHILPEROORT, R.A. **Plant Molecular Biology Manual**. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. B6/1-9.
- ✱ MAY, G.D.; AFZA, R.; MASON, H.S.; WIECKO, A.; NOVACK, F.N.; ARNTZEN, C.J. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via

- Agrobacterium*-mediated transformation. **Bio/technology**, v.13, p. 486-92, 1995.
- McKENTLY, A.H.; MOORE, G.A.; DOOSTDAR, H.; NIEDZ, R.P. *Agrobacterium*-mediated transformation of peanut (*Arachis hypogea* L.) embryo axes and development of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v.14, p.699-703, 1995.
- MEIJER, E.G. High- frequency plant regeneration from hypocotyl- and leaf-derived tissue cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*. **Physiologia Plantarum**, v.56, p. 381-5, 1982.
- MEIJER, E.G.M.; BROUGHTON, W.J. Regeneration of whole plants from hypocotyl-, root-, and leaf derived tissue cultures of the pasture legume *Stylosanthes guianensis*. **Physiologia Plantarum**, v.52, p.280-4, 1981.
- MEIJER, E.G.M. ; SZABADOS, L. Cell and Tissue Culture of *Stylosanthes* spp. In: BAJAJ, Y.P.S. ed. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. London, Springer-Verlag, 1990. Vol.10, p.313-21.
- MESA, A.R.; LAJONCHERE, G.; PRIETO, M.; TORAL, O. Organogenesis en *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 184. **Pastos y Forrajes**, v.16, p.207-10, 1993.
- MONTOYA, A.L.; CHILTON, M.D.; GORDON, M.P.; SCIAKY, D.; NESTER, E.W. Octopine and nopaline metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumor cells: role of plasmid genes. **Journal of Bacteriology**, n.129, p.101-7, 1977.
- *MUKHOPADHYAY, A.; ARMUGAM, N.; NANDAKUMAR, P.B.A.; PRADHAN, A.K.; GUPTA, V.; PENTAL, D. *Agrobacterium*-mediated genetic

transformation of oilseed *Brassica campestris* : transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. **Plant Cell Reports**, v.11, p. 506-13, 1992.

MURASHIGE, T. ; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-97, 1962.

OOMS,G.; HOOYKAAS,P.J.J.; VAN VEEN,R.J.M.; VAN BEELEN,P.; REGENSBURG-TUÏNK,T.J.G.; SCHILPEROORT,R.A. Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of T-region. **Plasmid**, v.7, p.15-29, 1982.

PARK, Y.D.; RONIS, D.H.; BOE, A.A.; CHENG, Z.M. Plant regeneration from leaf tissues of four North Dakota genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). **American Potato Journal**, v.72, p.329-38, 1995.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUAREZ, A.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v.14, p.616-9, 1995.

° PERL, A.; LOTAN, O.; ABU-ABIED, M.; HOLLAND, D. Establishment of an *Agrobacterium* -mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera*): the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. **Bio/technology**, v.14, p.624-8, 1996.

PETIT, A.; DAVID, C.; DAHL.G.A.; ELLIS, J.G.; GUYON, P. Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. **Molecular and General Genetics**, v.190, p.204-14, 1983.

PIZARRO, E.A.; AYARZA, M.A.; SPAIN, J.M.; CARVALHO, M.A.; SOUSA, M.A.
Efecto de la irrigación en la producción de semillas de *Stylosanthes guianensis*
cv. Mineirão. **Pasturas tropicales**, v.15, p.27-8, 1993.

◦ PRINSEN, E.; CHRIQUI, D.; VILAINE, F.; TEPFER, M.; VAN ONCKELEN, H.
Endogenous phytohormones in tobacco plants transformed with
Agrobacterium rhizogenes pRi TL-DNA genes. **Journal of Plant**
Physiology, v.144, p. 80-5, 1994.

RASHID, H.; YOKOI, S.; TORIYAMA, K.; HINATA, K. Transgenic plant
production mediated by *Agrobacterium* in *Indica* rice. **Plant Cell Reports**,
v.15, p.727-30, 1996.

REY, H.Y.; BOVO, O.A.; MROGINSKI, L.A. Cultivo *in vitro* de tejidos de tres
especies de *Stylosanthes* (Leguminosae). **Agronomie**, v.5, p.819-24, 1985.

ROBINSON, P.H.; FREDEEN, A.H.; CHALUPA, W.; JULIEN, W.E.; SATO, H.;
FUJIEDA, T.; SUZUKI, H. Ruminally protected lysine and methionine for
lactating dairy cows fed a diet designated to meet requirements for microbial
and post-ruminal protein. **Journal of Dairy Science**, V.78, p.582-94, 1995.

RODRIGUES, J.D.; RODRIGUES, S.D.; DELACHIAVE, M.E.A.; PEDRAS, J.F.;
BOARO, C.S.F. Influência de diferentes níveis de cálcio em plantas de
Stylosanthes (*Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.Cv. Cook), avaliados
através de alguns parâmetros fisiológicos. **Scientia Agricola**, v.50, p. 45-
57, 1993.

◦ ROITSCH, T.; WANG, H.; JIN, S.; NESTER, E.W. Mutational analysis of the
VirG protein, a transcriptional activator of *Agrobacterium tumefaciens*
virulence genes. **Journal of Bacteriology**, v.172, p.6054-60, 1990.

ROTENBERG, B.; IACHAN, A. Estudo da proteína da castanha do Pará. **Informativo do Instituto Nacional de Tecnologia**, v.8, p. 22-4, 1975.

SAALBACH, I. ; PICKARDT, T. ; MACHEMEHL., F. ; SAALBACH, G. ; SCHIEDER, O. ; MUNTZ, K. A chimeric gene encoding the metionine-rich 2S albumin of the Brasil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) is stably expressed and inherited in transgenic grain legumes. **Molecular and General Genetics**,. v.242, p.226-36, 1994.

SAALBACH, I. ; PICKARDT, T.; WADDELL, D.R.; HILLMER, S.;SCHIEDER, O.; MÜNTZ, K. The sulphur-rich Brazil nut 2S albumin is specifically formed in transgenic seeds of the grain legume *Vicia narbonensis*. **Euphytica**, v.85, p.181-92, 1995.

SALEM, K. M. S. A.; CHARLWOOD,B.V. Accumulation of essencial oils by *Agrobacterium tumefaciens*- transformed shoot cultures of *Pimpinella anisum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 40, p. 209-15, 1995.

* SARMA, K.S.; EVANS, N.E.; SELBY, C. Effect of carbenicillin and cefotaxime on somatic embriogenesis of Sitka spruce (*Picea sitchensis* Bong.) Carr.). **Journal of Experimental Botany**, v.46, p.1779-81, 1995.

SARMENTO, G.G.; ALPERT, K.; TANG, F.A.; PUNJA, Z.K. Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and expression of kanamycin resistance in pickling cucumber. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.31, p.185-93, 1992.

SARRIA, R. ; CALDERÓN, A. ; THRO, A.M. ; TORRES, E. ; MAYER, J.E. ; ROCA, W.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Stylosanthes*

guianensis and production of transgenic plants. **Plant Science**, v.96, p.119-27, 1994.

SCHÄFER, W.; GÖRZ, A.; GÜNTER, K. T-DNA Integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium*. **Nature**, v.327, p.529-32, 1987).

• SCHEIFFELE, P.; PANSERGRAU, W.; LANKA, E. Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA processing. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.1269-76, 1995.

→ SCHLÄPPI, M.; HOHN, B. Competence of immature maize embryos for *Agrobacterium*-mediated gene transfer. **The Plant Cell**, v.4, p.7-16, 1992.

SCORZA, R.; CORDTS, J.M.; RAMMING, D.W.; EMERSHAD, R.L. Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgênic plants. **Plant Cell Reports**, v.14, p.589-92, 1995.

SHEN, W.; ESCUDERO, J.; SCHLÄPPI, M.; RAMOS, C.; HOHN, B.; KOUKOLÍKOVÁ- NICOLA T-DNA transfer to maize cells: histochemical investigation of β -glucuronidase activity in maize tissues. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p. 1488-92, 1993.

SCHRÖDER, G.; WAFFENSCHMIDT, S.; WEILER, W.; SCHRÖDER, J. The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. **European Journal of Biochemistry**, v.138, p.387-91, 1984.

SILVA, B. A. Cultura de tecidos de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Cv. IRI 1022: estudo morfogenético e histológico. Piracicaba, 1991. 168p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo.

• SPENA, A.; SCHMÜLLING, T.; KONCZ, Z.; ; SCHELL, J. Independent and synergistic activity of *rolA*, B and C loci in stimulating abnormal growth in plants. **The EMBO Journal**, v.6, p.3891-9, 1987.

• STACHEL, S.E.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, v.318, p. 624-9, 1985.

STACHEL, S.E.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRINSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, v.318, p.624-9, 1985.

• STEPHENS, K.M.; ROUSH, C.; NESTER, E. *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 protein requires a consensus nucleotide-binding site for function in virulence. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.27-36, 1995.

STOMP, A.M. Histochemical localization of β -glucuronidase. In: GALLAGHER, S.R., ed. **GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression**. San Diego: Academic Press, 1992. cap.7, p.103-13.

SUN, S.S.M. , ALTENBACH, S. B. ; LEUNG, F. W. Properties, biosynthesis and processing of a sulfur-rich protein in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) **European Journal of Biochemistry**, v.162 , p.447 - 83, 1987.

- TEPFER, M.; CASSE-DELBART, F. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. **Microbiological Sciences**. v.4, p.24-8, 1987.
- TORRES, A.C.; CANTLIFFE, D.J.; LAUGHNER, B.; BIENIEK, M.; NAGATA, R.; ASHRAF, M.; FERL, R.J. Stable transformation of lettuce cultivar South Bay from cotyledon explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.34., p.279-85, 1993.
- TUOMINEN, H.; SITBON, F.; JACOBSON, C.; SANDEBERG, G.; OLSSON, O.; SUNDBERG, B. Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid aspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indolacetic acid-biosynthetic genes. **Plant Physiology**, v.109, p. 1179-89, 1995.
- ULRICH, C.; VERA, R .R.; WENINGER, J.H. Producción de leche con vacas de doble propósito en pasturas solas y asociadas com leguminosas. **Pasturas Tropicales**, v. 16, p.27-30, 1994.
- VAN DER GRAAF, E.; HOOYKAAS, P. J. J. Improvements in the transformation of *Arabidopsis thaliana* C24 leaf discs by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v.15, p.572-77, 1996.
- VANCANNEYET, G.; SCHMIDT, R.; O'CONNOR-SANCHEZ, A.; WILLMITZER, L.; ROCHA-SOSA, M. Construction of an intron containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium* mediated plant transformation. **Molecular and General Genetics**, v. 220, p. 245-50, 1990.

➤ WEISING, K.; KAHL, G; Natural genetic engineering of plant cells: the molecular biology of crown gall and hairy root disease. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.12, p.27-51, 1996.

WILLIAMS,M.J.; CHAMBLISS,C.G; BROLMANN, J.B. Dry matter Partitioning in a true vs. facultative annual forage legume. **Agronomy Journal**, v.87, p.1216-20, 1995.

⊗ WILMITZER, L.; DHAESE, P.; SCHREIER, P. H.; SCHMALENBACH, W.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Size, location and polarity of T-DNA-encoded transcripts in nopaline crown gall tumors; common transcripts in octopine and nopaline tumors. **Cell**, v.32, p.1045-56, 1983.

ZAMBRYSKI,P. Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. **Annual Review of Genetics**, v.22, p.1-30, 1988.