TRANSFERÊNCIA DIRETA DE GENES PARA PLANTAS

DE *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.

VERA MARIA QUECINI
Engenheiro Agrônomo

Orientadora : Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de
Concentração : Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Junho - 1999

ERRATA

página	linha	onde se lê ...	leia-se ...
xix	15	250 m.V ⁻¹	250 V.cm ⁻¹
xxi	11	250 m.V ⁻¹	250 V.cm ⁻¹
1	11	(Souza Costa e Ferreira, 1984)	(Souza Costa & Ferreira, 1984)
2	11	(Souza Costa e Ferreira, 1984)	(Souza Costa & Ferreira, 1984)
4	22	as plantas tem...	as plantas têm...
7	7	cistationa- α -sintase	cistationa- γ -sintase
9	1	as proteínas de reserva tem ...	as proteínas de reserva têm ...
12	11-12	ou a vesículas recobertas, ...	ou as vesículas recobertas, ...
13	19	estas vesículas seja ...	estas vesículas sejam ...
18	1	leguminosas transformadas ...	leguminosas estável ou transientemente transformadas ...
19	15	avanços recentes ...	avanços ...
20	10	Matzke & Matzke (1995)	Matzke & Matzke, 1995)
20	21	e conseqüentemente, o aumente ...	e conseqüentemente, aumente ...
21	27	(ii) que um tiro tem capacidade ...	(ii) capacidade de atingir muitas células com um tiro, (iii) ...
27	10	1300 psi de pressão de hélio, ...	1200 psi de pressão de hélio, ...
28	23	isolamento de DNA por PCR ...	isolamento de DNA para análise por PCR ...
30	3	$\uparrow$ - glucuronidase	β - glucuronidase
33	1	foram pré-hibridizado ...	foram pré-hibridizados ...
33	26	foram pré-hibridizado ...	foram pré-hibridizados ...
36	20	Microplate Reader?	Microplate Reader™
59	9	cuvetas de eletroporação (d).	cubetas de eletroporação (d).
63	3		Aumento 400 X .
65	5	em uma eficiência ...	em uma porcentagem ...
74	18	Quantidade de DNA aplicada ...	quantidade de DNA involuntariamente aplicada ...

página	linha	onde se lê ...	leia-se ...
85	9		e distância de voo da membrana macrocarreadora de 10 a 20 mm.
139		MÊS	MES
141		ácido $\rightarrow$ -aminobenzóico	ácido <i>p</i> -aminobenzóico
143	2	(filtro nitrocelulose 0,2 $\mp$ m)	(filtro nitrocelulose 0,2 μ m)
143	6	(filtro nitrocelulose 0,2 $\mp$ m)	(filtro nitrocelulose 0,2 μ m)
147		20 $\mp$ L	20 μ L
150		$\uparrow$ - glucuronidase	β - glucuronidase

As legendas corretas são :

Figura 20 – Análise por PCR das plantas de *S. guianensis* transformadas por biobalística com o plasmídeo pEA ats:2S. As plantas estão indicadas sobre as canaletas, S- : *S. guianensis* não transformado; C+ : *Bertholletia excelsa* (castanheiro do Pará); p+ : DNA plasmidial do pEA ats:2S; MW : marcador de tamanho molecular (100 bp DNA ladder, GIBCO-BRL).

Figura 22 – Análise por PCR das plantas de *S. guianensis* transformadas por eletroporação com o plasmídeo pEA ats:2S. As plantas estão indicadas sobre as canaletas, S- : *S. guianensis* não transformado; C+ : *Bertholletia excelsa* (castanheiro do Pará); p+ : DNA plasmidial do pEA ats:2S; MW : marcador de tamanho molecular (100 bp DNA ladder, GIBCO-BRL).

Figura 28 – Isolamento de vacúolos de protoplastos de *S. guianensis* (V) e SDS – 8 a 18 % PAGE e análise por Western blot (G) das proteínas intracelulares (fração p), secretadas (fração m) e vacuolares (fração v) das plantas transgênicas 1 e 16 de *S. guianensis*, MW : marcador de tamanho molecular (SDS-PAGE low range, Sigma).

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

Quecini, Vera Maria

Transferência direta de genes para plantas de *Stylosantes guianensis* (Aubl.)
Sw. / Vera Maria Quecini. - - Piracicaba, 1999.
172 p. : il.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
Bibliografia.

1. Estilosante 2. Leguminosa forrageira 3. Melhoramento genético vegetal 4.
Transferência de gene 5. Transformação genética I. Título

CDD 633.39

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O Autor"

A ciência é diferente de muitos outros empreendimentos humanos - evidentemente não pelo fato de seus profissionais sofrerem influência da cultura em que se criaram, nem pelo fato de ora estarem certos, ora errados (o que é comum a toda atividade humana), mas pela sua paixão de formular hipóteses testáveis, pela sua busca de experimentos definitivos que confirmem ou neguem as idéias, pelo vigor de seu debate substantivo e pela sua disposição a abandonar as idéias que foram consideradas deficientes. Porém, se não tivéssemos consciência de nossas limitações, se não procurássemos outros dados, se não nos recusássemos a executar experimentos controlados, se não respeitássemos a evidência, teríamos muito pouca força em nossa busca da verdade. Por oportunismo e timidez, poderíamos ser então fustigados por qualquer brisa ideológica, sem nenhum elemento de valor duradouro a que nos agarrar.

Carl Sagan

"O mundo assombrado pelos demônios : a ciência vista como uma vela no escuro"

Para

Rosamaria e José Quecini

Vanda, Vânia e Valda

AGRADECIMENTOS

Às seguintes instituições que tornaram possível a realização do curso e desenvolvimento deste trabalho de tese :

- Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, bolsa de estudos processo nº. 141294/97-3.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, auxílio a pesquisa processo nº. 98/11270-7.

À minha orientadora Profª. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira pela sua contribuição à minha formação científica com sua orientação, colaboração e estímulo.

Aos professores do Departamento de Genética da ESALQ / USP pelos conhecimentos transmitidos e pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos pesquisadores Dr. Elíbio L. Rech e Dr. Francisco J. L. Aragão da Área de Biologia Celular e Dr. Eugen S. Gander e Dra. Elionor R. de Almeida da Área de Biologia Molecular do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia / EMBRAPA.

À Profª. Dra. Anete P. de Souza e a Suzy Ferraz do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética / UNICAMP.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

Aos funcionários de atendimento da Biblioteca Central e da Biblioteca Setorial do Departamento de Genética da ESALQ / USP.

Às pessoas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

À minha família e amigos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xvii
RESUMO	xviii
SUMMARY	xx
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1.O gênero <i>Stylosanthes</i>	3
2.2.Metabolismo do enxofre em plantas e as albuminas 2S	4
2.3.Aminoácidos sulfurados na nutrição animal	14
2.4.Transformação genética em leguminosas	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1.Material vegetal	23
3.2.Explantes vegetais e indução de calos	23
3.3.Isolamento e cultivo de protoplastos.....	24
3.4.Plasmídios.....	24
3.5.Transformação por biobalística	27
3.6.Transformação por eletroporação	28
3.7.Ensaio histoquímico de GUS.....	30
3.8.Análise pela reação em cadeia da polimerase (PCR).....	30
3.9.Preparo e marcação da sonda para hibridação de ácidos nucleicos	30
3.10.Southern blot.....	32

3.11. Northern blot.....	33
3.12. Isolamento de albuminas de <i>Bertholletia excelsa</i> e <i>Stylosanthes guianensis</i>	34
3.13. Produção de anticorpos policlonais contra a albumina 2S de <i>Bertholletia excelsa</i>	35
3.14. Ensaio imunossorvente associado a enzimas (ELISA).....	36
3.15. Western blot.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1.Otimização dos parâmetros para transformação por biobalística ...	38
4.2.Otimização dos parâmetros para transformação por eletroporação	49
4.3.Transformação genética por biobalística.....	65
4.4.Transformação genética por eletroporação	68
4.5.Número e estrutura dos insertos	74
4.6.Expressão do gene <i>BE2SI</i>	78
5. CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
APÊNDICE 1	134
APÊNDICE 2	136
APÊNDICE 3	144
APÊNDICE 4	148
APÊNDICE 5	151

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

[α - ^{32}P]dATP - desoxiadenosina trifosfato marcada com ^{32}P

A, mA – Ampere, miliampere

A₂₆₀, A₂₈₀ – absorbância a comprimento de onda de 260, 280 nm

ATP – adenosina trifosfato

ATPase – adenosina trifosfatase

BCIP – 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

BSA – albumina do soro bovino

C - capacitância

CPAC – Centro de Pesquisas Agropecuárias do Cerrado

cv. - cultivar

DEPC – Dietil pirocarbonato

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxinucleotideo trifosfato

ϵ - energia

E.C. – código enzimático

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

EF – intensidade de campo elétrico

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

F, μF – faraday, microfaraday

g, mg, μg , ng – grama, miligrama, micrograma, nanograma

GFP – proteína fluorescente verde

GUS – β -glucuronidase

h – hora(s)

IgG – imunoglobulina do tipo G

kb – kilobase(s)

kDa – kilodalton(s)

L, mL μ L – litro, mililitro, microlitro

M, mM, μ M, nM – molar, milimolar, micromolar e nanomolar

MES – ácido 2 (N-morfolino) etano-sulfônico

min – minuto(s)

mJ - milijoule

mm, μ m, nm – milímetro, micrometro, nanometro

mmHg – milímetros de mercúrio

MOPS – ácido 3 (N-morfolino) propano-sulfônico

mRNA – RNA mensageiro

ms – milissegundo(s)

NBT – nitroblue tetrazólio

$^{\circ}$ C – graus centígrados

p/p – peso / peso

p/v – peso / volume

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

pb – par(es) de base

PBS – solução salina tamponada com fosfato

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – cologarítmo da concentração hidrogeniônica

psi – libra(s) por polegada quadrada

q – quantidade de carga que um capacitor armazena

R – resistência de um circuito elétrico

R_0 – transformante primário

RNA – ácido ribonucléico

rubisco – 1,5-ribulose biscofosfato carboxilase oxigenase

S – coeficiente de sedimentação de Svedberg

s – segundo(s)

SDS – dodecil sulfato de sódio

se – erro padrão

SSC – cloreto de sódio- citrato de sódio

SSPE – cloreto de sódio - fosfato de sódio - EDTA

τ – constante de decaimento do pulso elétrico entre dois eletrodos paralelos

TAE – tampão Tris – acetato - EDTA

TBE – tampão Tris – borato - EDTA

TBS – solução salina tamponada com Tris

TBST – TBS contendo 0,05% (v/v) de detergente Tween 20

T-DNA – DNA transferido

TE – tampão Tris-EDTA

Tris – tris-(hidroximetil)-aminometano

tRNA – RNA transportador

U – unidade(s) de enzima

UV - ultravioleta

V, mV – volt(s), milivolt(s)

v/v – volume / volume

Ω - ohm

LISTA DE FIGURAS

- 1 Representação esquemática das principais reações do metabolismo do enxofre em plantas e sua localização subcelular (adaptado de Hell, 1997)..... 8
- 2 Representação esquemática do cDNA de *Bertholletia excelsa* contendo o gene BE2S1, suas regiões regulatórias e sítios de processamento transcricional e pós-transcricional..... 11
- 3 Representação esquemática dos cassetes de expressão dos plasmídios pBI 426 (8,7 kb), pCambia 1301 (11,8 kb), pCambia 1304 (12,4 kb) e pEA ats:2S (16,3 kb), seus principais sítios de restrição, localização dos iniciadores de PCR e indicação do fragmento usado como sonda para hibridização de ácidos nucléicos..... 26
- 4 Expressão transiente de GUS em função da fonte de explante. Condições de bombardeamento : 1000 psi de pressão de hélio, 65 mmHg de vácuo na câmara, 10 mm de distância de voo do macrocarreador, 10 mm de distância do gerador de onda de choque até ao macrocarreador e 12,5 cm de distância de voo das micropartículas. As barras indicam se..... 39
- 5 Efeito da fonte de explante sobre a expressão transiente de GUS. (A) hipocótilo, (B)folha, (C) cotilédone e (E) calo 30 dias. As barras indicam 1 mm 40

- 6 Expressão transiente de GUS em calos organogênicos de *S. guianensis* em função da interação entre a pressão de hélio (psi) e a distância do alvo (cm). Condições de bombardeamento : 65 mmHg de vácuo na câmara, 10 mm de distância do gerador de onda de choque ao macrocarreador, calos de 30 dias. As barras indicam se 44

- 7 Expressão transiente de GUS em calos organogênicos de *S. guianensis* em função da interação entre a pressão de hélio (psi) e a distância de vôo do macrocarreador (cm). Condições de bombardeamento : 65 mmHg de vácuo, calos de 30 dias. As barras indicam se..... 46

- 8 Expressão transiente de GUS em calos organogênicos de *S. guianensis* em função da interação entre a pressão de hélio (psi) e a distância entre o gerador de onda de choque e o macrocarreador (cm). Condições de bombardeamento: 65 mmHg de vácuo, calos de 30 dias. As barras indicam se 47

- 9 Expressão de GUS em tecidos íntegros eletroporados em função da fonte de explante. (A) Frequência de explantes GUS positivos. Distribuição dos explantes na escala arbitrária de nível de expressão de 0 a 5 para cotilédone (B), hipocótilo (C) e folha e (D). Condições controle de eletroporação : C = 900 μ F, EF = 100 V.cm⁻¹, R = 20 Ω , tampão I (Fromm), 10 μ g de DNA plasmidial circular e ausência de tratamento osmótico. As barras indicam se e as letras minúsculas, diferenças significativas (P < 0,05) 50

- 10 Expressão transiente de GUS em tecidos íntegros de *S. guianensis* após eletroporação. (A)cotilédone, (B)hipocótilo e (C)folha.As barras indicam 2 mm 51

- 11 Expressão de GUS em tecidos íntegros eletroporados em função da intensidade de campo elétrico. (A) Frequência de explantes GUS positivos, (B) Nível de expressão de GUS, avaliado por escala arbitrária de 0 a 5, sob campos elétricos de intensidades crescentes. Condições de eletroporação : C= 900 μ F, R = 20 Ω , tampão I, 10 μ g de DNA plasmidial circular e ausência de tratamento osmótico. As barras indicam se e as letras minúsculas, diferenças significativas ($P < 0,05$) 53
- 12 Expressão de GUS em tecidos íntegros eletroporados em função do tampão de eletroporação. (A) Frequência de explantes GUS positivos. Nível de expressão com tampão I (B), II (C) e III (D). Condições de eletroporação: C=900 μ F, EF=100 V.cm⁻¹, R=20 Ω (tampão I e III) e R=50 Ω (tampão II), 10 μ g de DNA plasmidial circular e ausência de tratamento osmótico. As barras indicam se..... 55
- 13 Expressão de GUS em tecidos íntegros eletroporados em função da forma do DNA. (A) Frequência de explantes GUS positivos. Nível de expressão empregando-se plasmídeo linear (B) e circular (C). Condições de eletroporação: C=900 μ F, EF =100 V.cm⁻¹, R = 20 Ω , tampão I, e ausência de tratamento osmótico. As barras indicam se e as letras minúsculas, diferenças significativas ($P < 0,05$) 56
- 14 Expressão de GUS em tecidos íntegros eletroporados em função do tratamento osmótico. (A) Frequência de explantes GUS positivos. Nível de expressão para 0 M manitol (B), 0,2 M manitol (C), 0,8 M manitol e 1,6 M manitol. Condição de eletroporação: C=900 μ F, EF=100 V.cm⁻¹, R=20 Ω tampão I e 10 μ g de DNA plasmidial circular. As barras indicam se e as letras minúsculas, diferenças significativas ($P < 0.05$) 57
- 15 Expressão de GFP em protoplastos eletroporados em função da força elétrica. (A) energia acrescentada ao sistema e (B) intensidade de campo elétrico. Condições de eletroporação: tampão I (Fromm et al., 1987), 10 μ g de DNA plasmidial circular e R = 20 Ω 60

- 16 Expressão de GFP em protoplastos eletroporados de *S. guianensis*. Condições de eletroporação: 10 µg de DNA plasmidial circular, campo elétrico de 125 V.cm⁻¹ em um circuito com capacitor de 400 µF (500 mJ)..... 62
- 17 Expressão transiente de GFP em protoplastos de *S. guianensis* eletroporados (A) tampão II e (B) tampão I e não eletroporados (C) incubados com 10 µg de DNA plasmidial circular por 45 min no gelo..... 63
- 18 Expressão de GFP em protoplastos eletroporados de *S. guianensis*. Condições de eletroporação : 10 µg de DNA plasmidial, tampão I, EF=125 V.cm⁻¹ em um circuito com capacitor de 400 µF (500 mJ) 65
- 19 Expressão estável de GUS nos R₀ de *S. guianensis* cv. Mineirão. (A) 3/1.26, (B) 7/2.41 e (C) 3/1.16 69
- 20 Análise por PCR das plantas de *S. guianensis* transformadas por biobalística com o plasmídeo pEA ats:2S. As plantas estão indicadas sobre as canaletas, S- : *S. guianensis* não transformado; C- : ausência de DNA molde; C+ : DNA plasmidial do pEA ats: 2S; MW : marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder, GIBCO-BRL)..... 70
- 21 Expressão estável de GUS nos R₀ de *S. guianensis* cv. Mineirão. (A) 8, (B) 13 e (C) 16..... 72
- 22 Análise por PCR das plantas transformadas por eletroporação com o plasmídeo pEA ats:2S. As plantas estão indicadas sobre as canaletas, S- : *S. guianensis* não eletroporado incubado com DNA; C- : ausência de DNA molde; C+ : DNA plasmidial do pEA ats: 2S; MW : marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, GIBCO-BRL)..... 73

- 23 Análise por Southern blot das plantas transformadas por biobalística. As plantas estão indicadas sobre as canaletas, S- : *S. guianensis* não transformado; C+ : DNA plasmidial do pEA ats: 2S correspondente a 1 cópia do transgene por genoma haplóide de *Stylosanthes guianensis*; MW : marcador de peso molecular (λ Hind III, GIBCO-BRL)..... 76
- 24 Análise por Southern blot das plantas transformadas por eletroporação. As plantas estão indicadas sobre as canaletas, S- : *S. guianensis* não-transformado; C+ : DNA plasmidial do pEA ats: 2S correspondente a 1 cópia do transgene por genoma haplóide de *Stylosanthes guianensis*; MW : marcador de peso molecular (λ Hind III, GIBCO-BRL)..... 77
- 25 Análise por Northern blot das plantas transformadas por biobalística. As plantas estão indicadas sobre as canaletas, S- : *S. guianensis* não transformado; MW : marcador de peso molecular (RNA marker 0,28–6,58 kb, Promega)..... 80
- 26 Análise por Northern blot das plantas transformadas por eletroporação. As plantas estão indicadas sobre as canaletas, S- : *S. guianensis* não-transformado; MW : marcador de peso molecular (RNA marker 0,28-6,58 kb, Promega)..... 80
- 27 SDS- 8 a 18 % PAGE e análise por Western blot das proteínas totais de folhas de plantas transgênicas de *S. guianensis*. As plantas estão indicadas sobre as canaletas. (A) plantas obtidas por eletroporação e (B) por biobalística. S- : *S. guianensis* não transformado; MW : marcador de peso molecular (SDS-PAGE low range, Sigma) 82

- 28 (A) Isolamento de vacúolos de protoplastos de *S. guianensis* e (B) SDS- 8 a 18 % PAGE e análise por Western blot das proteínas intracelulares (fração p), secretadas (fração m) e vacuolares (fração v) das plantas transgênicas 1 e 16 de *S. guianensis*, S- : *S. guianensis* não transformado; MW : marcador de peso molecular (SDS-PAGE low range, Sigma) 83
- 29 Plantas transgênicas de *S. guianensis* cv. Mineirão em sala de cultura e casa de vegetação 84

LISTA DE TABELAS

1	Requerimentos de aminoácidos sulfurados (AAS) e de metionina (Met) para animais de importância econômica (adaptada de Andrigueto et al., 1988).....	15
2	Espécies de leguminosas transformadas por <i>Agrobacterium</i> , tipo de explante utilizado, gene introduzido e referência bibliográfica.....	18
3	Sequência de oligonucleotídeos iniciadores nas análises de PCR.....	31
4	Tipo de tecido-alvo e culturas transformadas por biobalística	41
5	Dados dos experimentos independentes de biobalística empregando calos de 30 dias de <i>S. guianensis</i> cv. Mineirão e o vetor de transformação pEA ats:2S. Os resultados da análise de PCR referem-se a iniciadores específicos para amplificação de um fragmento do gene <i>BE2S1</i>	66
6	Dados dos experimentos independentes de eletroporação empregando protoplastos de <i>S. guianensis</i> cv. Mineirão e o vetor de transformação pEA ats:2S. Os resultados da análise de PCR referem-se a iniciadores específicos para amplificação de um fragmento do gene <i>BE2S1</i>	68

TRANSFERÊNCIA DIRETA DE GENES PARA PLANTAS DE

***Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.**

Autora : VERA MARIA QUECINI

Orientadora : Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo otimizar as condições físicas, químicas e biológicas envolvidas na transformação direta de plantas de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão, uma leguminosa forrageira tropical. Foram estudadas a transformação genética por bombardeamento de micropartículas e por eletroporação de tecidos íntegros e protoplastos visando à introdução de um gene quimérico que codifica a albumina 2S do castanheiro do Pará (*Bertholletia excelsa*) dirigido pelo promotor *atsI A* da subunidade menor da rubisco de *Arabidopsis thaliana*, restringindo a expressão a tecidos clorofilados.

A fonte de explante, a pressão de gás hélio, a distância de vôo das micropartículas, a distância entre o gerador de onda de choque até a tela de retenção e distância de vôo da membrana macrocarreadora foram os parâmetros avaliados na transformação por biobalística. A análise da expressão transiente do gene repórter *uid A* foi usada para verificar a eficiência de transformação nos explantes bombardeados. Calos organogênicos 30 a 45 dias após a indução foram os explantes que promoveram níveis mais elevados de expressão transiente. As frequências mais elevadas

de transformação foram observadas utilizando-se :1200 psi de gás hélio, 12, 5 cm de distância de vôo dos microprojéteis, 10 a 20 mm de distância entre a membrana macrocarreadora e a tela de retenção e 10 a 20 mm de distância entre a membrana de ruptura e o macrocarreador.

A eficiência de transformação por eletroporação de tecidos intactos foi igualmente avaliada pela expressão de GUS. A fonte de explante e a intensidade do campo elétrico foram os fatores que tiveram influência mais decisiva sobre a eficiência de transformação, sendo que o melhor explante foi cotilédone e campos elétricos de 100 a 250 V.cm⁻¹ promoveram alta frequência de explantes GUS positivo. O uso de tampão de eletroporação sem íons cloreto, de DNA plasmidial linearizado e o pré-tratamento dos explantes com 1,6 M de manitol como agente osmótico aumentaram, porém de forma não significativa, a expressão de GUS. O gene *mgfp 5*, que codifica a proteína fluorescente verde (GFP) foi empregado como repórter *in vivo* para a eletroporação de protoplastos de *S. guianensis*. Capacitores de 1000 µF descarregando campos elétricos de 100 a 250 m.V⁻¹ à suspensão de protoplastos em tampão sem íons cloreto promoveram níveis mais altos de expressão transiente de GFP. O uso de DNA plasmidial linearizado também promoveu um aumento na eficiência de transformação.

Transformantes estáveis de *S. guianensis* cv. Mineirão foram obtidos via eletroporação de protoplastos e biobalística. A eficiência de transformação, de 3,47 % e 36 % para biobalística e eletroporação de protoplastos, respectivamente, pode ser considerada elevada quando comparada aos valores relatados para a transformação de leguminosas.

A inserção estável do transgene foi confirmada por hibridização de ácidos nucléicos utilizando sonda específica para a unidade de transcrição na planta do vetor de transformação pEA ats:2S. A expressão do transgene foi confirmada pela detecção de transcritos do *BE2SI* por análise de Northern blot e por imunodeteção da proteína 2S em tecidos foliares de estilosantes.

Há evidências de que a albumina 2S de *B. excelsa* é corretamente processada e transportada para corpos protéicos de armazenamento em folhas de plantas transgênicas de *S. guianensis*.

DIRECT GENE TRANSFER TO PLANTS OF *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.

Author : VERA MARIA QUECINI

Adviser : MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

SUMMARY

The main objective of the present work was to optimize physical, chemical and biological parameters involved in direct gene transfer to *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão plants, a tropical forage legume. Microparticle bombardment, intact tissue and protoplast electroporation were assayed in order to transfer a methionine-rich 2S albumin gene from Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) driven by rubisco small subunit gene promoter *ats1 A* from *Arabidopsis thaliana*, inducing chlorophyll-biosynthesis dependent-expression.

Explant source, helium pressure, microparticles flight distance, distance between shock wave generator and macrocarrier and gap distance between macrocarrier and stop screen were the parameters evaluated for biolistic transformation. Transient reporter gene *uid A* expression was used to test transformation efficiency. Organogenic calli 30 a 45 days after induction were the explants that promoted higher levels of transient expression. The highest transformation levels were found employing : 1200

psi of helium pressure, 12.5 cm microprojectiles flight distance, 10 to 20 mm distance between macrocarrier membrane and stopping screen and, 10 to 20 mm gap distance between shock wave generator and macrocarrier.

Intact tissue electroporation was also evaluated employing the GUS system. Explant source and electric field strength were the parameters that had greater influence on transformation efficiency. Cotyledons and electric field strength of 100 to 250 V.cm⁻¹ promoted higher frequencies of GUS positive explants. Electroporation buffers lacking chloride ions, linear plasmid DNA and 1.6 M mannitol pretreatment increased GUS expression, but non-significantly. The gene *mgfp 5*, coding for green fluorescent protein (GFP) was utilized as *in vivo* reporter in *S. guianensis* protoplast electroporation. Capacitors of 1000 µF discharging 100 to 250 m.V⁻¹ electric fields to protoplast suspension in chloride-free electroporation buffers promoted higher GFP expression. Linear plasmid DNA also contributed to higher transformation efficiencies. Stable transformants of *S. guianensis* cv. Mineirão were obtained from electroporation and biolistic transformation employing the fore mentioned conditions. Transformation frequencies, of 3.47 % and 36.00 % for biolistics and protoplast electroporation respectively, were considered high when compared to reported values of transformation efficiency for legumes in general. Stable transgene insertion was confirmed by Southern blot utilizing a plant transcription unit specific probe from transformation vector pEA ats:2S. Transgene expression was assessed by detection of *BE2SI* transcripts by Northern blot and by 2S albumin immunological detection in leaf tissues from *Stylosanthes*. There are evidences that *B. excelsa* 2S albumin is correctly processed and transported to storage protein bodies in the leaves of transgenic *S. guianensis* plants.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Stylosanthes* (família Leguminosae, subfamília Papilionoidae, tribo Stylosanthinae) compreende aproximadamente 50 espécies e subespécies predominantemente herbáceas encontradas nas regiões tropicais e subtropicais das Américas, Ásia, África e Austrália, sendo seu centro de origem localizado no Brasil Central e Nordeste.

Devido a seu crescimento vigoroso, formação de raízes profundas e alta resistência a estresses nutricionais e climáticos, espécies do gênero, principalmente *S. guianensis* e *S. humilis*, têm sido utilizadas como pastagem consorciada com gramíneas, banco de proteína e adubo verde. Outras espécies apresentam características desejáveis, como resistência a queimadas e a solos ácidos em *S. scabra* (Edye, 1984) e tolerância à antracnose em *S. macrocephala* (Souza Costa e Ferreira, 1984).

Embora a rusticidade das espécies de *Stylosanthes* seja altamente vantajosa para condições de pastagens tropicais e subtropicais a quantidade e principalmente a qualidade protéica impedem seu uso como única fonte de proteína para criações extensivas e intensivas.

Atualmente, o comportamento *in vitro* de *Stylosanthes*, seja em cultura de células e de tecidos, é bem conhecido (Cônoli et al., 1996; Dornelas et al., 1992; Dornelas et al., 1991; Vieira et al., 1990), sendo uma das leguminosas menos recalcitrantes em termos de regenerabilidade (Meijer & Szabados, 1990), o que viabiliza a aplicação da tecnologia do DNA recombinante como auxiliar ao melhoramento genético da cultura.

A albumina 2S proveniente de sementes de castanha do Pará possui um alto teor de aminoácidos sulfurados, sendo que os resíduos de metionina representam 18% do total de seus resíduos aminoacil (Gander et al., 1991). Dois genes da família multigênica que codifica esta proteína (*BE2S1* e *BE2S2*) foram sequenciados e clonados (Gander et al., 1991), possibilitando o seu uso, via transformação de plantas, visando a correção dos baixos teores de enxofre nas proteínas produzidas por leguminosas.

Embora a regeneração de plantas a partir de protoplastos de três espécies de *Stylosanthes* (Vieira et al., 1990) e a partir de calos provenientes de diversos explantes (revisão em Meijer & Szabados, 1990) tenha sido relatada, até o momento somente *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes* foram utilizados para transformação genética (Manners, 1987; Manners, 1988; Manners & Way, 1989), sendo que plantas transgênicas foram obtidas apenas recentemente (Sarria et al., 1994). Este método, dependente das complexas interações planta-patógeno, resulta em eficiência de transformação muito baixa em leguminosas, quer devido a não serem hospedeiras preferenciais desta bactéria (Atkins & Smith, 1996; Ankenbauer & Nester, 1993; Yang, 1993; Gheysen et al., 1992), quer devido a problemas na seleção dos transformantes (Chabaud et al., 1988).

O presente trabalho tem como objetivo a obtenção de plantas de *Stylosanthes guianensis* transformadas com o gene *BE2S1* de castanha do Pará, usando métodos de transferência direta de genes, nominalmente biobalística e eletroporação de protoplastos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Stylosanthes*

O gênero *Stylosanthes* compreende aproximadamente 50 espécies e subespécies que são preferencialmente herbáceas. A taxonomia do gênero é complexa e ainda persistem dúvidas quanto à sua filogenia (Curtis et al., 1995; Gillies & Abbott, 1996; Glover et al., 1994; Jansen & Edye, 1996; Liu et al., 1996; Vander Stappen et al., 1998; Vieira et al., 1997).

O gênero é nativo da América Central e do Sul e da África, mas espécies de *Stylosanthes* podem ser também encontradas em outras áreas tropicais e subtropicais das Américas, África, Ásia e principalmente Austrália, onde foi introduzido (Meijer & Szabados, 1990). O Brasil é o maior centro de diversidade do gênero, sendo que a maioria das espécies são encontradas no país, principalmente no centro e no nordeste (Souza Costa e Ferreira, 1984).

As espécies do gênero *Stylosanthes* são as leguminosas forrageiras mais persistentes e produtivas quando cultivadas em condições rústicas de semi-árido e em solos de baixa fertilidade (Partridge, 1996).

O crescimento vigoroso, produção de raízes profundas, adaptabilidade a diferentes condições edáficas e considerável resistência a estresses ambientais e nutricionais são características encontradas em todas as espécies do gênero, fazendo com que sejam amplamente utilizadas como pastagem, adubo verde para conservação do solo e como cobertura vegetal. As espécies mais importantes economicamente são : *S. guianensis*, *S. capitata*, *S. erecta*, *S. gracilis* e *S. humilis* (Meijer & Szabados, 1990).

O uso de pastagens de gramíneas consorciadas com *Stylosanthes* faz com que o teor protéico do alimento fornecido aos animais seja maior (Coates, 1996; Rai & Verma, 1995; Ulrich et al., 1994), além de melhorar as características físicas e químicas do solo (Botrel et al., 1994; Tarawali & Peters, 1996; Urquiaga et al., 1995).

A regenerabilidade *in vitro* é uma característica imprescindível para a utilização da engenharia genética no melhoramento vegetal (Potrykus, 1990). Plantas transgênicas apenas podem ser obtidas a partir de células competentes à regeneração e à transformação integrativa, simultânea ou sequencialmente (Potrykus, 1991). Meijer & Szabados (1990) apresentam uma revisão sobre os principais trabalhos de regeneração de plantas de *Stylosanthes* a partir de protoplastos e de calos obtidos de vários explantes. Juntamente com o gênero *Medicago*, *Stylosanthes* é menos recalcitrante no que se refere ao cultivo *in vitro* do que as leguminosas de sementes grandes, soja e feijão, por exemplo. Portanto, é promissor o uso de transformação genética para o melhoramento de espécies pertencentes a estes gêneros.

2.2 Metabolismo do enxofre em plantas e as albuminas 2S

2.2.1 Fixação de sulfato inorgânico e biossíntese dos aminoácidos sulfurados

O sulfato inorgânico é a forma de enxofre mais frequentemente disponível no ambiente para a utilização pelos organismos vivos. As plantas utilizam sulfato como fonte de enxofre para a síntese de muitos compostos essenciais para seu metabolismo. A maior parte destes compostos, incluindo cisteína, metionina e glutathione reduzida (GSH), contém enxofre com número de oxidação -2 , enquanto no sulfato inorgânico este é $+6$. Portanto, as plantas tem que realizar a redução do sulfato, de modo que este seja aceptor de 8 elétrons. A redução do sulfato pelas plantas, equivale quantitativamente à quase totalidade da fixação biológica do enxofre e é importante para o fornecimento de aminoácidos sulfurados aos organismos incapazes de usar sulfato como fonte de enxofre, por exemplo, animais monogástricos.

A absorção de sulfato pelas células vegetais e pelas raízes das plantas é dependente da temperatura, impedida por inibidores da respiração, agentes de desacoplamento protéico e N, N'-diciclohexilcarbodiimida; um inibidor de ATPase (Anderson, 1980). Esta absorção, como a de outros ânions, ocorre contra um gradiente de potencial eletroquímico, possui um componente de alta afinidade, regulado pelo nível endógeno de enxofre, e um componente de baixa afinidade (Smith et al., 1995a; Smith et al., 1995b). O fornecimento de L-cist(e)ína e de L-homocist(e)ína exógena, e em menor grau, de L-metionina e GSH também regulam negativamente a absorção de sulfato, indicando dependência de síntese protéica. Estas características indicam a presença de atividade transportadora de sulfato, como já caracterizada em fungos (Ketter et al., 1991), leveduras (Smith et al., 1995b) e mamíferos (Bissig et al., 1994).

Utilizando a complementação em levedura mutante, sem a atividade do transportador de SO_4^- , Smith et al. (1995b) clonaram e caracterizaram três cotransportadores de H^+/SO_4^- do alotetraplóide *Stylosanthes hamata* cv. Verano. Dois deles são transportadores de alta afinidade, com ativação induzida e responsáveis pela absorção de S pelas raízes e, o outro é de baixa afinidade por S, sendo responsável pelo transporte entre compartimentos celulares e subcelulares. Estes transportadores, altamente conservados em eucariotos, são filogeneticamente próximos à NOD, uma proteína específica de nódulos rizobianos (Kouchi & Hata, 1993).

Depois de absorvido, o sulfato é ativado em adenosina 5'-fosfosulfato (APS), um composto altamente energético de anidrido de sulfato e fosfato, pela ATP sulfurilase (E.C. 2.7.7.4). Entretanto a redução do sulfato inorgânico em plantas permanece desconhecida (Hell, 1997). Duas hipóteses, não mutualmente exclusivas, são as mais aceitas :

a) via SO_3^- livre (presente em fungos e leveduras) $\rightarrow$ APS é convertido a 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) pela APS quinase e este é reduzido a SO_3^- livre pela PAPS redutase, e posteriormente a S_2 pela sulfeto redutase (Schwenn, 1994).

b) via do carregador de $\text{SO}_3^- \rightarrow$ o SO_3^- de APS é transferido para um carregador pela APS sulfotransferase, e posteriormente, o S_2 é liberado pela tiosulfonato redutase (Anderson, 1990; Schiff et al., 1993).

Gutierrez-Marcos et al. (1996) caracterizaram uma proteína com atividade PAPS redutase, cuja preferência de substrato é por APS e que possui um domínio semelhante à tiorredoxina, sugerindo a possibilidade de utilização direta do APS sem sua ativação para PAPS. Uma proteína com características enzimáticas semelhantes foi caracterizada por Setya et al. (1996), possuindo também atividade independente de tiorredoxina.

Acredita-se que a redução do sulfato ocorre nos cloroplastos, onde os elétrons com o potencial redox necessário são fornecidos pela tiorredoxina e ferredoxina (Anderson, 1980) ou APS sulfurilases com domínios tiorredoxina (Gutierrez-Marcos et al., 1996; Setya et al, 1996). O poder redutor necessário é provavelmente fornecido pela oxidação de carboidratos, como o ciclo oxidativo das pentoses-fosfato.

Posteriormente, o sulfeto é transferido para o acceptor *O*-acetilserina (*OAS*) em uma reação catalisada pela cisteína sintase (E.C. 4.2.99.8). A *OAS* é proveniente da reação entre L-serina e acetil-Coenzima A (acetil-CoA) catalisada pela enzima serina acetiltransferase (E.C. 2.3.1. 30) produzindo *OAS* e CoA (Giovanelli et al., 1980).

A maior parte do sulfato inorgânico assimilado e reduzido pelas plantas aparece definitivamente na cisteína e na metionina. Estes aminoácidos contêm aproximadamente 90% do enxofre total das plantas (Giovanelli et al., 1980), sendo que os mesmos se localizam preferencialmente nas proteínas. A síntese *de novo* de metionina e cisteína é uma das reações mais importantes na biologia, comparável em importância à redução do carbono na fotossíntese (Allaway & Thompson, 1966). Isto se deve ao fato de todos os animais monogástricos necessitarem de uma fonte de metionina ou de seu precursor, homocisteína, na dieta.

A cisteína é o precursor de cisteína protéica, de GSH e de compostos sulfurados para a biossíntese de metionina nas plantas, sendo portanto, a principal fonte de enxofre orgânico reduzido. As plantas necessitam de metionina principalmente para três funções :

(i) como componente de proteínas, (ii) como componente do metionil tRNA (em eucariotos) e formilmetionil tRNA (em mitocôndrias, cloroplastos e procariotos) e (iii) como um componente de (S)-S-adenosil-L-metionina (AdoMet), o principal doador biológico de grupos metil. Em alguns tecidos vegetais a metionina também funciona como precursor na biossíntese de etileno (Adams & Yang, 1977).

O-fosfohomoserina, um precursor da biossíntese do aspartato, reage com a cisteína produzindo cistationa em uma reação catalisada pela cistationa- α -sintase. A presença de metionina regula negativamente esta reação e sua ausência, positivamente.

A cistationa é clivada por uma β -liase (cistationa- β -liase, E.C. 4.4.1.8.), através de reações diferentes em plantas e animais (Lea, 1993), produzindo homocisteína, que é o precursor imediato de metionina. O ^5N -metiltetrahydrofolato, um derivado triglutamílico, fornece o grupo metil à homocisteína para a formação da metionina, em uma reação catalisada por uma enzima independente de cobalamina, a tetrahydropteroiltriglutamato metiltransferase (E.C. 2.1.1.14). Posteriormente, a metionina reage com ATP, via metionina adenosiltransferase (E.C. 2.5.1.6.) originando AdoMet.

A localização subcelular e a regulação das etapas envolvidas na biossíntese dos aminoácidos sulfurados e seus derivados são descritas detalhadamente em Lea (1993), Anderson (1980) e Giovanelli et al. (1980).

As principais reações e compostos do metabolismo do enxofre em plantas estão esquematizadas na Figura 1.

Figura 1 – Representação esquemática das principais reações do metabolismo do enxofre em plantas e sua localização subcelular (adaptado de Hell, 1997).

2.2.2 Proteínas de reserva ricas em aminoácidos sulfurados

Embora sejam estruturalmente diferentes, as proteínas de reserva tem características comuns : (i) são sintetizadas em altos níveis em tecidos específicos a determinados estágios de desenvolvimento, (ii) presença em compartimentos subcelulares de armazenamento, os corpos protéicos e (iii) apresentam componentes polimórficos dentro de um mesmo genótipo e entre genótipos de uma mesma espécie (Shewry et al., 1995), decorrente da presença de famílias multigênicas e de processos proteolíticos e de glicosilação.

As proteínas de reserva de sementes são tradicionalmente divididas em classes de acordo com sua solubilidade em diferentes solventes (Osborne, 1924). As globulinas são insolúveis em água, mas solúveis em soluções salinas diluídas, as albuminas são solúveis em água, as prolaminas em soluções de álcool e água e as glutelinas em soluções diluídas de ácido e água ou base e água.

As albuminas 2S possuem baixo peso molecular e coeficiente de sedimentação de 2S (Youle & Huang, 1976; Youle & Huang, 1981) e são amplamente distribuídas entre as dicotiledôneas. Em geral, são sintetizadas como um precursor único que é proteoliticamente clivado com perda de um peptídeo de ligação e de pequenos peptídeos nas extremidades N e C (De Castro et al., 1987; De Clerq et al., 1990b; Guerche et al., 1990; Krebbers et al., 1988; Shewry et al., 1995).

Frequentemente, estas proteínas apresentam composição rica em cisteína (Youle & Huang, 1978a; Youle & Huang, 1978b; Youle & Huang, 1981). São proteínas globulares compactas e embora não haja evidência experimental, sugere-se que a estrutura seja composta de α -hélices fortemente empacotadas, semelhante ao sugerido para as zeínas, com ausência total ou quase total de β -planos (Chrispeels, 1991).

A albumina 2S de *Bertholletia excelsa* (castanheiro do Pará) exibe níveis extraordinariamente altos de metionina, além dos altos teores de cisteína (Youle & Huang, 1976; Youle & Huang, 1981). O valor nutritivo elevado desta proteína,

especialmente para animais monogástricos incapazes de realizar a síntese *de novo* de metionina, fez com que ela fosse isolada e sequenciada (Ampe et al., 1986), e o gene que a codifica fosse clonado (Altenbach et al., 1987; De Castro et al., 1987; Gander et al., 1991). Posteriormente, proteínas de reserva com características semelhantes foram descobertas em outras espécies arbóreas, e os genes que as codificam clonados (Damme & Peumans, 1996).

As albuminas 2S da castanha do Pará são codificadas por dois genes, *BE2S1* e *BE2S2*, que pertencem à uma família multigênica (Gander et al., 1991), sendo que um deles, *BE2S1*, codifica a isoforma dominante da 2S. A proteína é sintetizada como um polipeptídeo precursor que é maior do que ambas as subunidades da proteína madura (Altenbach et al., 1987, De Castro et al., 1987). O precursor passa por três processos proteolíticos consecutivos durante os quais é clivado em peptídeos menores de 9 e 3 kDa (Altenbach et al., 1987) (Figura 2). A composição de aminoácido das proteínas 2S tem direcionado o estudo destas albuminas para o seu uso na engenharia genética (Müntz et al., 1998; Yamauchi & Minamikawa, 1998).

Várias espécies vegetais foram geneticamente transformadas com genes de albuminas 2S visando melhorar seu valor nutritivo, como *Brassica napus* (Denis et al., 1995), *Vicia narbonensis* (Saalbach et al., 1994; Saalbach 1995a; Saalbach et al., 1995b), *Phaseolus vulgaris* (Aragão et al., 1996; Aragão et al., 1993; Aragão et al., 1992), *Glycine max* (Nordlee et al., 1996a; Nordlee et al., 1996b; Nordlee et al., 1996c), *Trifolium subterraneum* (Khan et al., 1996), *Arachis hypogea* (Lacorte et al., 1997) e *Lupinus angustifolius* (Molvig et al., 1997).

A expressão de albuminas 2S em sistemas heterólogos levou a aumentos significativos nos teores de metionina em sementes de *Arabidopsis*, *Brassica napus* (De Clerq et al., 1990a, De Clerq et al., 1990b), *Nicotiana tabacum* (De Clerq et al., 1990b; Altenbach et al., 1989) e na leguminosa *Lupinus angustifolius* (Molvig et al., 1997). Entretanto, mesmo com o emprego de promotores constitutivos, Denis et al. (1995), Denis et al. (1996), Jung et al. (1993) não conseguiram níveis suficientes para melhoria na qualidade nutricional em *Brassica napus* e *Vicia narbonensis*, respectivamente.

Figura 2 – Representação esquemática do cDNA de *Bertholletia excelsa* contendo o gene *BE2S1*, suas regiões regulatórias e sítios de processamento transcricional e pós-transcricional.

Hoffman et al. (1988) relataram a síntese, processamento e posterior degradação de uma proteína de reserva em plantas transgênicas. Tu et al. (1998) utilizaram mutações na sequência da região variável da albumina 2S de *Bertholletia excelsa* para aumentar a quantidade de metionina em batata transgênica, obtendo altos níveis de expressão e melhoria na qualidade nutricional.

2.2.3. Direcionamento vacuolar das proteínas de reserva

As proteínas de reserva são transportadas para os corpos protéicos, compartimentos subcelulares semelhantes aos vacúolos especializados em armazenamento, pela via secretória (Chrispeels, 1976; Hara-Nishimura et al., 1985; Herman & Larkins, 1999). O sistema secretório em células vegetais compreende o retículo endoplasmático liso e rugoso, o complexo de Golgi, a rede *trans*-Golgi ou a vesículas recobertas, as vesículas secretórias, os vacúolos, o tonoplasto e as membranas plasmáticas (Chrispeels, 1991; Vitale & Denecke, 1999).

Embora, alguns mecanismos do tráfego de proteínas sejam conservados em eucariotos, o direcionamento vacuolar em plantas é um processo único e altamente complexo, possivelmente devido à natureza distinta dos vacúolos na maioria das células vegetais, compartimento de armazenamento e lítico (Herman & Larkins, 1999).

Primeiramente, as proteínas destinadas aos vacúolos entram na via secretória pelo retículo endoplasmático, onde sofrem glicosilações e modificações pós-traducionais (Chrispeels, 1991; Miller & Anderson, 1999; Sanderfoot & Raikhel, 1999a). Proteínas corretamente montadas prosseguem na via secretória, enquanto polipeptídeos incorretamente dobrados ou processados permanecem no retículo endoplasmático e são alvos de degradação proteolítica (Pedrazzini et al., 1997; Vitale & Denecke, 1999). A separação entre as proteínas secretadas e aquelas destinadas ao vacúolo é, provavelmente, devida à formação de agregados densos nos sítios de síntese (Müntz, 1998). A partir do complexo de Golgi, dois mecanismos estão implicados no transporte de proteínas em plantas, um utilizando vesículas cobertas de clatrina (CCV) e outro

usando vesículas lisas e densas, que parece ser específico para proteínas de reserva (Hohl et al., 1996; Sanderfoot & Raikhel, 1999b).

Uma proteína de membrana do tipo I, BP-80, isolada de cotilédones de ervilha tem inúmeras características indicando que seja um receptor de direcionamento vacuolar (Kirsh et al., 1994; Paris et al., 1997). BP-80 possui um domínio luminal que apresenta alta afinidade por vários peptídeos de direcionamento vacuolar, está localizada na rede *trans*-Golgi e em membranas dos compartimentos pré-vacuolares e endossomais (Kirsch et al., 1996) e sua ligação aos sinais de direcionamento é dependente de pH, sendo consistente com o carregamento das proteínas no Golgi e sua posterior liberação no ambiente mais ácido dos vacúolos.

Em mamíferos e leveduras, a associação de proteínas vacuolares aos seus receptores de direcionamento específicos na rede *trans*-Golgi facilita sua captura por vesículas. Um complexo adaptador é responsável pelo empacotamento das proteínas nas vesículas e posteriormente, pelo recrutamento de clatrina (Sanderfoot & Raikhel, 1999a, Sanderfoot & Raikhel, 1999b). Embora, as vesículas recobertas por clatrina também estejam envolvidas na endocitose na membrana plasmática, o complexo adaptador responsável por seu recrutamento na rede *trans*-Golgi é diferente (AP-1) (da Silva Conceição et al., 1997; Sanderfoot et al., 1998). Uma vez que as proteínas tenham sido concentradas e empacotadas em vesículas é essencial que estas vesículas seja entregues e fundam-se com a organela-alvo apropriada. Esta especificidade é determinada por proteínas chamadas SNAREs (“soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor attachment protein receptors”). Assim, as organelas são marcadas pela presença de SNAREs específicas, t-SNAREs (“target membrane SNAREs”) que interagem com uma SNARE correspondente associada à vesícula, v-SNARE (“vesicle-associated SNAREs”) (Miller & Anderson, 1999; Sanderfoot & Raikhel, 1999b). Entretanto, a presença de múltiplas isoformas de v- e t-SNAREs sugerem que o sistema secretório em plantas é altamente complexo (Sanderfoot & Raikhel, 1999a; Sanderfoot & Raikhel, 1999b).

Sabe-se que informação específica e positiva é necessária para o direcionamento vacuolar (revisão em Chrispeels, 1991; Herman & Larkins, 1999), entretanto não há

consenso quanto à forma desta informação e à sua localização no propeptídeo ou na proteína madura (Nakamura & Matsuoka, 1993; Saalbach et al., 1991).

O sinal de direcionamento da albumina 2S da castanha do Pará está localizado na extremidade carboxila, sendo essencial a presença do propeptídeo C-terminal (Saalbach et al., 1996). Embora apresente homologia com a albumina 2S de *Arabidopsis thaliana*, nenhum dos propeptídeos da última é necessário para o direcionamento vacuolar (D'Hondt et al., 1993). A associação do provável receptor para direcionamento vacuolar BP-80 (Kirsch et al., 1994) com o sinal da 2S foi observada em ensaios *in vivo* (Saalbach et al., 1996).

Devido aos mecanismos de controle de qualidade durante o transporte (Frigerio et al., 1998; Pedrazzini et al., 1997; Vitale & Denecke, 1999) e armazenamento (Hoffman et al., 1988), é importante que as proteínas de reserva expressas em sistemas heterólogos sejam corretamente processadas, montadas e direcionadas (Altenbach et al., 1989; De Clerq et al., 1990a; De Clerq et al., 1990b).

2.3 Aminoácidos sulfurados na nutrição animal

O organismo animal necessita receber aminoácidos essenciais, os quais devem estar presentes no intestino delgado onde serão absorvidos (Andriguetto et al., 1988). Os aminoácidos sulfurados não sofrem síntese *de novo* no aparelho digestivo dos animais (Anderson, 1980; Giovanelli et al., 1980) tendo, portanto, que ser fornecidos na dieta a partir de vegetais ou microrganismos.

Os ruminantes possuem microrganismos no rúmen que têm a capacidade de sintetizar aminoácidos essenciais a partir de fontes não-protéicas de nitrogênio e de esqueletos carbônicos provenientes da glicólise. Porém, animais de alta capacidade genética de produção, principalmente vacas leiteiras, podem apresentar exigências nutricionais de aminoácidos superiores aqueles fornecidos pela proteína microbiana (Andriguetto et al., 1988).

Frequentemente, mesmo forrageiras com alto teor de proteína bruta fornecem quantidades insuficientes de aminoácidos essenciais (Chalupa & Sniffen, 1996), devido à degradação pelos microrganismos do rúmen, sendo que lisina e metionina são os aminoácidos mais críticos nas dietas (Baker et al., 1996; Hurtaud & Rulquin, 1994). A fim de evitar estas perdas, tem sido usada a adição de aminoácidos protegidos (Colin-Schoellen et al., 1995; Jurjanz et al., 1996; Overton et al., 1996; Piepenbrink et al., 1996; Sklan & Tinsky, 1996) e a infusão pós-ruminal (Pisulewski et al., 1996) e duodenal (Guinard & Rulquin, 1995) dos aminoácidos limitantes. Entretanto, a resposta econômica devido à suplementação, principalmente com metionina, nem sempre é compensatória. Patton (1996) afirma ser mais vantajoso o aumento no teor de metionina disponível no rúmen juntamente com uma suplementação protegida para vacas leiteiras.

Animais não-ruminantes possuem uma necessidade mais crítica de aminoácidos sulfurados, devido à inexistência da síntese protéica microbiana (Anderson, 1980; Giovannelli et al., 1980).

Os requerimentos de aminoácidos sulfurados e metionina para vários animais não-ruminantes de importância econômica estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Requerimentos de aminoácidos sulfurados (AAS) e de metionina (Met) para animais de importância econômica .

Categoria	% da ração *	
	AAS	Met
aves	0,60	0,34
coelhos	0,09	0,05
peixes	0,80	0,75
suínos	0,50	n.f.

Fonte : adaptada de Andriguetto et al.. (1988)

* valores médios para os diferentes estágios de desenvolvimento

n.f. = valor não fornecido

A adição de lisina, metionina e treonina promoveu um efeito positivo no desempenho reprodutivo de suínos (Nonn et al., 1996) e o uso de uma dieta com qualidade protéica menos elevada, ou seja, com teores menores de metionina e lisina, prejudicou o desenvolvimento de animais em terminação (Esteve-Garcia et al., 1995).

A tendência para melhor desempenho quando teores mais elevados de metionina são fornecidos na dieta, também foi observada na quantidade e qualidade da carne em frangos (Schutte & Jong, 1996) e no desempenho de matrizes poedeiras (Gorman & Balnave, 1995; Schutte & Pack, 1995).

Em coelhos, o teor de aminoácidos sulfurados na dieta afetou a produção de leite, o intervalo entre partos, a velocidade de crescimento, a qualidade da carcaça e a eficiência da conversão alimentar (Berchiche & Lebas, 1994; Taboada et al., 1996). A suplementação com metionina também elevou a eficiência reprodutiva e o peso inicial da progênie.

Portanto, o fornecimento de proteína mais rica em aminoácidos sulfurados em geral, e de metionina em particular, é altamente benéfico para não-ruminantes, que não possuem proteína microbiana de alta qualidade disponível. Para ruminantes de alto potencial para produção leiteira isto também ocorre (Andriguetto et al., 1988; Patton, 1996).

2.4 Transformação Genética em Leguminosas

2.4.1 Transformação Indireta

Os principais vetores para introdução do DNA exógeno em plantas são as bactérias gram-negativas *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*. No entanto, para plantas leguminosas a eficiência de infecção é altamente dependente da linhagem bacteriana, da espécie hospedeira e até do genótipo utilizado (Atkins & Smith, 1996; Yang, 1993).

O principal problema quando se deseja desenvolver um sistema de transformação via *Agrobacterium*, é fazer com que a bactéria tenha acesso às células capazes de desdiferenciação e posterior regeneração (Potrykus, 1990; Potrykus, 1991). Alguns tecidos vegetais são hipersensíveis à infecção e simplesmente morrem após uma exposição curta ao *Agrobacterium* (Draper & Scott, 1994).

Os estudos de explantes para transformação via *Agrobacterium* requerem condições para que a eficiência de transformação seja máxima : (i) células periféricas de tecidos foliares em cultivo *in vitro* formem calo rapidamente e (ii) a regeneração de plantas a partir dos calos seja muito eficiente (Horsch et al., 1985). A multibrotação surgida a partir do calo representa a situação ideal, pois é originada de tecido ferido e portanto, susceptível ao *Agrobacterium*. Em *Fabaceae* isto não ocorre, sendo que apenas recentemente foram estabelecidos protocolos para a regeneração *de novo* (Atkins & Smith, 1996; Christou, 1995; Christou, 1997). As leguminosas apresentam severa especificidade para as várias linhagens de *Agrobacterium* (Brasileiro et al., 1996).

Leguminosas forrageiras como alfafa, estilosantes, trevo, etc foram transformadas por *Agrobacterium*, embora a frequências muito baixas. Atkins & Smtih (1996) apresentam uma lista das leguminosas forrageiras transformadas, incluindo o método de transformação, o tipo de explante utilizado e os genes introduzidos. Samac (1995) relata a transformação de alfafa após extensa investigação quanto às cultivares e linhagens apropriadas de bactéria a fim de otimizar o processo.

Assim, apesar da eficiência de transformação ser relativamente baixa, o uso de *Agrobacterium tumefaciens* e de *A. rhizogenes* como vetores para a introdução de DNA exógeno em leguminosas tem sido frequente. Isto é devido, principalmente, à facilidade do método. A fim de complementar as listas de leguminosas transformadas por este método apresentadas por Atkins & Smith (1996) e Yang (1993), a Tabela 2 foi elaborada e é apresentada a seguir.

Tabela 2 . Espécies de leguminosas transformadas por *Agrobacterium*, tipo de explante utilizado, gene introduzido e referência bibliográfica. Esta relação é complementar às elaboradas por Atkins & Smith (1996) e Yang (1993).

Espécie	Explante	Gene introduzido	Referência
<i>Glycine</i>			
<i>G. clandestina</i>	hipocótilo	<i>nptII</i> , GUS	Rech et al., 1988a
<i>G. canescens</i>	hipocótilo	<i>nptII</i> , GUS	Rech et al., 1989
<i>G. max</i>	cotilédones	<i>nptII</i> , GUS, ESPS	Hinchee et al., 1988
<i>Phaseolus</i>			
<i>P. vulgaris</i>	cotilédone, hipocótilo	<i>nptII</i>	McClellan et al., 1991
<i>P. vulgaris, Bicuifolius</i>	vários explantes	<i>nptII</i> , GUS	Brasileiro et al., 1996
<i>Pisium</i>			
<i>P. sativum</i>	merist. cotiledonares	<i>nptII</i> , GUS	Davies et al., 1993
<i>P. sativum</i>	cotilédones imaturos	<i>nptII</i> , bar	Grant et al., 1995
<i>Arachis</i>			
<i>A. hypogaea</i>	eixos embrionários	<i>nptII</i> , GUS	McKently et al., 1995
<i>Medicago</i>			
<i>M. sativa</i>	tecido foliar	Mn-P, α -amilase	Austin et al., 1995
<i>M. sativa</i>	caule, meristemas	GUS	Samac, 1995
<i>M. truncatula</i>	tecido foliar	GUS, prom. indutivo	Chabaud et al., 1996
<i>Vigna</i>			
<i>V. narbonensis</i>	hipocótilo	<i>nptII</i> , GUS, 2S	Saalbach et al., 1995a
<i>V. mungo</i>	folhas primárias	<i>nptII</i>	Karthikeyan et al., 1996
<i>Outros</i>			
<i>Cicer arietinum</i>	-	-	Fontana et al., 1993
<i>Stylosanthes humilis</i>	-	-	Wordragen & Dons, 1992

A utilização de bombardeamento com microprojéteis para aumentar a eficiência da transformação via *Agrobacterium*, devido à indução de macro e microferimentos no tecido, liberando compostos fenólicos que mobilizam a transferência do T-DNA para a célula hospedeira, deu origem a uma técnica de transformação chamada **Agrobiobalística** (Alves et al., 1999; Bidney et al., 1992; Brasileiro et al., 1996). De acordo com os autores, esta técnica tem como vantagem aumentar a frequência de transformantes, uma vez que os microferimentos não prejudicam a célula vegetal e são suficientes para a indução da transferência do T-DNA.

2.4.2 Transformação Direta de Leguminosas :

Entende-se por transformação direta, os métodos que não envolvem vetores para a introdução de DNA em células vegetais, sendo estes métodos apenas dependentes de condições e forças físico-químicas aplicadas.

A frequência de transformação direta tem sido sempre menor do que a transferência de genes via *Agrobacterium*. Entretanto, Shillito & Potrykus (1987) destacam que avanços recentes e novas metodologias têm proporcionado um grande aumento nas frequências obtidas.

A principal vantagem destes métodos é a universalidade, ou seja, independência de inter-relações complexas entre patógeno-hospedeiro (Potrykus, 1990) que estão envolvidas na transferência de genes via *Agrobacterium*. A possibilidade de introdução de RNA (Fromm et al., 1987; Langridge et al., 1987) também faz com que esta seja uma alternativa interessante à transformação indireta.

No entanto, como não existem relações biológicas envolvidas, apenas os parâmetros físicos coordenam a entrada do gene na célula-alvo (Fromm et al., 1987; Langridge et al., 1987; Potrykus, 1990; Sanford, 1988; Shillito & Potrykus, 1987), fazendo com que este processo seja totalmente aleatório e, conseqüentemente o número de insertos seja inconstante, e frequentemente maior do que o obtido por transformação

indireta (Finnegan & McElroy, 1994). Devido à associação observada entre o número de cópias inseridas do transgene e eventos de silenciamento do mesmo e/ou de seu homólogo endógeno (Brusslan et al., 1993; Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990;) e à presença de sequências duplicadas no DNA (Flavell, 1994, Neuhuber et al., 1994), Finnegan & McElroy (1994) sugerem que não sejam usados métodos de transformação direta.

Atualmente, quando se busca uma estabilidade maior do transgene e de sua expressão, as plantas com menor número de cópias são preferencialmente selecionadas, independentemente do método de transformação utilizado (Finnegan & McElroy, 1994; Matzke & Matzke (1995).

Existem inúmeros métodos propostos de transformação direta, como : imersão de explantes em soluções de DNA, macroinjeções, transporte de DNA via tubo polínico, microlaser, eletroforese de DNA em tecidos íntegros, fusão de lipossomos contendo DNA com células e com protoplastos, etc, mas muitos não apresentam repetibilidade e eficiência prática (revisão em Potrykus, 1990, Potrykus, 1991). Entretanto, outros mostram-se bastante promissores para um grande espectro de culturas, como eletroporação de protoplastos e biobalística (Potrykus, 1990, Potrykus, 1991).

a) eletroporação de protoplastos

Quando membranas biológicas compostas de bicamadas lipídicas são submetidas a um campo elétrico, as regiões hidrofóbicas dos fosfolipídios tornam-se polarizadas, fazendo com que aumente a repulsão entre elas e consequentemente, o aumento o momento dipolo da membrana no sentido do campo elétrico (Neumann et al., 1982), levando a uma quebra dielétrica e à formação transiente de poros na membrana (Kinosita & Tsong, 1977; Neumann et al., 1982; Neumann et al., 1996). A eletroporação baseia-se nestas características físico-químicas.

A eficiência de transformação, para protoplastos vegetais eletroporados, é máxima quando a intensidade do campo elétrico é suficiente para provocar o surgimento

de poros de diâmetro grande, que permaneçam abertos por períodos longos, mas que não causem extravasamento do conteúdo celular, conforme discutido por Fromm et al. (1987) e Langridge et al. (1987).

A principal vantagem deste método apontada por Fromm et al. (1987); Langdrige et al. (1987) e Potrykus (1990) é a independência do espectro de hospedeiros de *Agrobacterium* para a transformação. A rapidez e facilidade na avaliação da eficiência do processo, por ensaios *in vivo* (Niedz et al., 1995) ou *in vitro* (Jefferson, 1987), são altamente vantajosas. Entretanto, a regeneração de plantas a partir de protoplastos é um processo longo, trabalhoso e não estabelecido para todas as culturas (Potrykus, 1991).

Para as leguminosas em geral há grande limitação ou até inviabilidade de regeneração de plantas a partir de protoplastos (Christou, 1995; Potrykus, 1990), exceto para gêneros menos recalcitrantes com *Medicago* (Gilmour et al., 1989) e *Stylosanthes* (Vieira et al., 1990).

b) biobalística

O processo de **biobalística** consiste no bombardeamento de micropartículas recobertas por DNA aceleradas a velocidades supersônicas (± 1500 km/h) em direção a um tecido-alvo, de modo que a velocidade destas partículas faça com que elas penetrem no tecido e promovam uma integração estável do DNA (Christou, 1990; Klein et al., 1987; Klein et al., 1988a; Klein et al., 1988b; Klein et al., 1988c; Klein et al., 1992; Rech et al., 1991).

Os equipamentos de aceleração de partículas mais eficientes e seguros são aqueles que utilizam gás hélio a alta pressão (Klein et al., 1987) tal como aqueles descritos por Sanford (1990), Kikkert, (1993) e Sautter (1993) ou elétricos apresentados em Christou et al. (1988), Christou et al. (1989), Christou (1990), Rech et al. (1991) e McCabe & Christou (1993).

Segundo Potrykus (1990) as principais vantagens da biobalística são : (i) a facilidade de manuseio, (ii) que um tiro tem capacidade de atingir muitas células, (iii) a

universalidade do tecido-alvo e (iv) a capacidade das partículas atingirem até as camadas de células mais profundas. No entanto, as taxas de expressão integrativa estável dos transgenes são relativamente baixas, apesar de alta frequência de expressão transiente.

O tipo de explante a ser utilizado depende da regenerabilidade da espécie *in vitro* : em plantas recalcitrantes, como feijão e soja, o alvo para o bombardeamento é o meristema apical (Aragão et al., 1996; Christou, 1995; Christou, 1997) de embriões sexuais. As leguminosas que apresentam regeneração de plantas a partir de um estágio indiferenciado como calo, oferecem condições mais favoráveis para a transformação por biobalística (Pereira & Erickson, 1995). Atualmente, considera-se que o método mais eficiente de transformação de leguminosas é a biobalística (Christou, 1995; Potrykus, 1990; Yang, 1993).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Sementes de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão, gentilmente cedidas pelo CPAC / EMBRAPA (Brasília - DF), foram multiplicadas em casa de vegetação (luminosidade $79 \pm 5,8 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e temperatura $25 \pm 7,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e cultivadas em substrato autoclavado composto de vermiculita (Plantmax) e areia (1:1).

As sementes foram escarificadas (EMBRAPA, comunicado técnico, CPAC nº 67; CNPGC nº 49, outubro / 1993) e a seguir imersas em solução de etanol 75% (v/v), superficialmente esterilizadas com hipoclorito de cálcio 2% (v/v) por 15 minutos, e lavadas abundantemente com água esterilizada. A germinação foi feita em meio MS (Murashige & Skoog) contendo metade da concentração original de sais e vitaminas (MS/2), 1,5% de sacarose (p/v) e 0,18% de Phytigel (Sigma) sob 16 horas de luz ($65 \pm 3,0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e temperatura de $25 \pm 2,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 Explantes vegetais e indução de calos

Para os experimentos de transformação por eletroporação de tecidos íntegros foram utilizados explantes provenientes de plântulas axênicas: cotilédones, hipocótilo e folhas. Para biobalística foram empregados estes mesmos explantes e calos induzidos a partir de folhas completamente expandidas.

A indução de calos foi realizada em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de $2,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP), conforme descrito por Dornelas

et al.(1991). Calos com 10, 20, 30 e 45 dias foram usados nos experimentos de bombardeamento. Os meios empregados para a cultura de tecidos vegetais estão apresentados no Apêndice 2.

3.3 Isolamento e cultivo de protoplastos

Protoplastos foram isolados a partir de cotilédones completamente expandidos excisados de plântulas 7 a 8 dias após a germinação, conforme descrito por Vieira et al. (1990b).

Os protoplastos foram ressuspensos diretamente no tampão de eletroporação a uma concentração de $2,0 \cdot 10^6$ protoplastos.mL⁻¹, transferidos para cubetas com capacidade para 800 µL (Bio-Rad) e distância de 0,4 cm entre os eletrodos, as quais foram mantidas no gelo por 10 minutos antes do pulso elétrico. Foram empregados os tampões descritos por Fromm et al. (1987) - **tampão I**, Tada et al. (1990) - **tampão II** e Walbot (1993) - **tampão III**.

Após a eletroporação, os protoplastos foram imediatamente retirados das cubetas e mantidos no gelo por 30 minutos. Posteriormente, foram cultivados em meio líquido à densidade de $1,0 \cdot 10^6$ protoplastos.mL⁻¹ conforme descrito por Vieira et al. (1990b).

3.4 Plasmídios

Durante a etapa de otimização dos parâmetros usados na transformação por **biobalística**, foi utilizado o vetor pBI 426 (W. Crosby, Plant Biotechnology Institute, Saskatoon, Canadá), cujo cassete de expressão está representado na Figura 3. Este vetor carrega a fusão *uidA::neo* (Datla et al., 1991), entre o gene repórter (*uidA* - β-glucuronidase) (Jefferson et al., 1987) e o marcador de seleção (*neo* - resistência a canamicina) (Bevan, 1984), sob controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) duplicado e adicionado da região 5' não traduzida do vírus do

mosaico da alfafa (AMV), tendo o terminador do gene da nopalina sintase (NOS-T) de *Agrobacterium tumefaciens*.

Durante a otimização dos parâmetros para a transformação por **eletroporação** de tecidos íntegros e de protoplastos, foram utilizados os plasmídios pCambia 1301 e 1304 (Cambia GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Austrália) respectivamente, cujos cassetes de expressão estão representados na Figura 3.

O vetor pCambia 1304 contém uma fusão entre os genes repórteres *uidA* (GUS - β -glucuronidase) e *mgfp5* (GFP – “green fluorescent protein”), enquanto pCambia 1301 contém apenas *uidA* contendo um íntron de 198 pb (Vancanniet et al., 1990), a fim de impedir sua expressão em sistemas procariotos. Em ambos os plasmídios, os genes repórteres estão sob controle do promotor 35S e do sinal de terminação do gene da nopalina sintase e possuem o marcador de seleção *hpt II*, que confere resistência à higromicina, dirigido pelas sequências promotoras e terminadoras 35S do CaMV.

O gene de interesse, codificando a albumina 2S da castanha do Pará - *BE2S1* (Gander et al., 1991), encontra-se no vetor de transformação pEA ats : 2S, dirigido pelo promotor da subunidade pequena da ribulose 1,6-bisfosfato carboxilase oxigenase de *Arabidopsis thaliana* (*ats1 A*) (De Almeida et al., 1989). Além deste gene, o plasmídio também contém o gene repórter *uid A* com íntron sob controle do promotor 35S do CaMV e o gene marcador de seleção *neo* dirigido pelo promotor da nopalina sintase (Figura 3).

Os plasmídios foram independentemente transferidos (Dower et al., 1988) para *E. coli* JM 109 (Yanisch-Perron et al., 1985) ou DH5 α (Hanahan, 1983) e purificados em gradiente de cloreto de cério (Sambrook et al., 1989). A concentração de DNA plasmidial foi determinada espectrofotometricamente e confirmada em géis de agarose 0,8% (p/v) TBE 1X que foram corados com brometo de etídeo (10 mg.mL⁻¹) e visualizados sob luz UV. Os meios de cultura para bactérias e as soluções para ácidos nucléicos empregadas encontram-se nos Apêndices 1 e 3, respectivamente.

Os vetores pCambia foram linearizados por digestão completa com *EcoRI* (GIBCO BRL) para experimentos de eletroporação.

pBI 426 **pCambia 1301** **pCambia 1304** **pEA ats:2S**

Figura 3 – Representação esquemática dos cassetes de expressão dos plasmídios pBI 426 (8,7 kb), pCambia 1301 (11,8 kb), pCambia 1304 (12,4 kb) e pEA ats:2S (16,3 kb), seus principais sítios de restrição, localização dos iniciadores de PCR e indicação do fragmento usado como sonda para hibridização de ácidos nucléicos.

3.5 Transformação por Biobalística

Foi utilizado o equipamento PDS 1000 / HeTM (Bio Rad), detalhadamente descrito por Sanford et al. (1991) e Kikkert (1993), empregando gás hélio à alta pressão como gerador de onda de choque para aceleração das micropartículas.

A fim de estabelecer as condições mais adequadas para a transformação de *Stylosanthes* foram realizados experimentos preliminares, de acordo com o recomendado por Sanford (1993). Parâmetros físicos, pressão de hélio, distância de voo das micropartículas e distância de voo do macrocarreador, e biológicos, fonte e idade de explante, foram avaliados para a expressão transiente de GUS. As condições que resultaram em níveis mais elevados de expressão transiente foram empregadas nos experimentos posteriores de transformação, nominalmente : 1300 psi de pressão de hélio, 12,5 cm de distância do alvo, 0,1 cm de distância de voo do macrocarreador, 0,1 cm de distância do gerador de onda de choque até o macrocarreador e explantes do tipo calo com 30 dias de idade.

A precipitação do DNA sobre as micropartículas de tungstênio M10 (Sylvania) foi realizada pelo método CaCl₂/espermidina detalhadamente descrito em Smith et al. (1992) e Aragão et al. (1996). A umidade relativa do ar no laboratório de biobalística foi mantida inferior a 40 % e o vácuo na câmara do aparelho superior a 65 mm de Hg.

Os explantes foram posicionados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo 2 mg.L⁻¹ de BAP e 0,7% de Phytigel (Sigma) para o bombardeamento. Posteriormente, os calos foram transferidos para meio MS sem reguladores de crescimento, a fim de induzir a elongação dos brotos. Brotações com 2 a 4 cm de comprimento foram excisadas na base do caule e transferidas para meio de enraizamento (MS contendo 1% de sacarose – MS1S) para “screening” . Cada brotação individualizada foi analisada por ensaio histoquímico de GUS (Jefferson et al., 1987) e/ou PCR com iniciadores específicos para o gene da albumina 2S (Tabela 3). As plantas com resultados positivos para os testes anteriores foram gradativamente aclimatadas e

mantidas em casa de vegetação, visando a confirmação molecular da integração do gene exógeno.

3.6 Transformação por Eletroporação

3.6.1 Tecido Íntegro

O equipamento comercial Gene Pulser II™ (Bio Rad) com Extensão de Capacitância foi empregado para criar campos elétricos de 50 a 250 V. cm⁻¹, através da descarga de um capacitor de 900 µF em cubetas com distância de 0,4 cm entre os eletrodos, contendo 10 explantes nos tampões de eletroporação I (Fromm et al., 1987), II (Tada et al., 1990) ou III (Walbot, 1993). Os explantes foram classificados de acordo com tamanho e forma para que o preenchimento das cubetas fosse semelhante. Dez µg de DNA plasmidial foram adicionados às cubetas, que permaneceram no gelo por 10 minutos antes do eletrotratamento.

A resistência das amostras foi de 20 Ω (tampão I e III) e 50 Ω (tampão II), conforme determinado por leituras realizadas pelo aparelho. O tempo, expresso como a constante de decaimento do pulso, é dado por $\tau = RC$ nos sistemas geradores de campo elétrico de ondas exponenciais. Como foi empregado um capacitor de descarga constante ($C = 900 \mu F$), as descargas de energia fornecidas pelos pulsos foram dependentes da voltagem ($\epsilon = \frac{1}{2} CV^2$), variando de 180 mJ (50 V.cm⁻¹) a 8820 mJ (350 V.cm⁻¹).

Após o tratamento elétrico, os explantes permaneceram no gelo por 30 minutos, e a seguir foram cultivados em meio MS3S por dois dias até a realização de ensaios histoquímicos para a detecção de GUS. Amostras aleatórias dos explantes eletroporados permaneceram no meio MS3S por sete dias para o isolamento de DNA por PCR com iniciadores específicos para o gene *uid A*.

3.6.2 Protoplastos

Cubetas de 0,4 cm de distância entre os eletrodos, contendo 800 μL de protoplastos ($2 \cdot 10^6$ protoplastos. mL^{-1}) nos tampões I (Fromm et al., 1987), II (Tada et al., 1990) e III (Walbot, 1993) receberam 10 μg de DNA plasmidial linearizado ou circular e foram mantidas no gelo por 10 minutos. Pulsos de decaimento exponencial foram aplicados pelo equipamento Gene Pulser II[™] (Bio Rad) com Extensão de Capacitância.

Foram analisadas descargas elétricas provenientes de capacitores de 400, 800, 900 e 1000 μF associados a campos elétricos de intensidade 125, 200, 250 e 300 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$, liberando descargas energéticas de 500, 1280, 2000, 2880 mJ (capacitor 400 μF), 1000, 2560, 4000, 5760 mJ (capacitor 800 μF), 1125, 2880, 4500, 6480 mJ (capacitor 900 μF) e 1250, 3200, 5000, 7200 mJ (capacitor 1000 μF).

Após a eletroporação, os protoplastos foram removidos das cubetas, mantidos no gelo por 30 minutos e cultivados conforme descrito por Vieira et al. (1990), em meio líquido à densidade de $1,0 \cdot 10^6$ protoplastos. mL^{-1} . Para os ensaios de expressão transiente de GFP, os protoplastos foram mantidos em meio líquido K8P (Kao, 1977), modificado por Gilmour et al. (1989) durante 48 horas a 4°C e observados em microscópio de fluorescência a um comprimento de onda (λ) de 395 nm.

Os calos organogênicos derivados dos protoplastos eletroporados foram transferidos para meio MS solidificado com 0,2 % (p/v) de Phytigel (Sigma), sem reguladores de crescimento para promover a elongação dos brotos. Brotações com 2 a 4 cm de altura foram removidas dos calos por excisão basal e transferidas para meio MS/2 com 1% (p/v) de sacarose para enraizamento. A análise dos brotos individualizados e aclimação foram feitas conforme descrito para os experimentos de biobalística.

A seleção dos transformantes com o gene marcador *neo*, que confere resistência a canamicina, não foi empregada devido ao seu efeito prejudicial sobre o desenvolvimento das plantas em geral (Colby & Meredith, 1990) e das leguminosas em particular (Chabaud et al., 1988, Hoffmann, 1996).

3.7 Ensaio histoquímico de GUS

Os explantes foram analisados para detecção histoquímica da atividade da enzima β -glucuronidase de acordo com o descrito por Jefferson et al. (1987). O tecido foi infiltrado a vácuo durante 5 min com o tampão de reação contendo o substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronídeo (X-Gluc) (McCabe et al., 1988) adicionado de 20 % de metanol (v/v) a fim de suprimir a atividade de β -glucuronidases endógenas (Kosugi et al., 1990). Após incubação por 24 horas a 37 °C, os pigmentos do tecido foram removidos por lavagens sucessivas com etanol 80% (v/v) e os explantes observados sob estereomicroscópio. Este procedimento foi adotado para ensaios de expressão transiente nos explantes bombardeados e tecidos intactos eletroporados e também para verificar a expressão estável nos regenerantes provenientes da transformação por biobalística e eletroporação de protoplastos.

A eficiência da transformação estável foi inferida a partir dos ensaios de expressão transiente. Áreas coradas por GUS foram avaliadas visualmente recebendo notas de acordo com a intensidade e frequência de pontos azuis por explante.

3.8 Análise pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação específica do transgene foi realizada em tecidos intactos eletroporados para verificar se a coloração azul não foi resultante de atividade residual de β -glucuronidases endógenas e também para confirmar o estado transgênico das brotações regeneradas provenientes dos experimentos de biobalística e eletroporação de protoplastos.

O DNA genômico foi isolado do tecido eletroporado e de brotações individuais conforme descrito em Edwards et al. (1991) e submetido à reação de amplificação.

Cada mistura de reação (25 μ L) continha 20 ng de DNA genômico, 10 mM TRIS-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2,0 mM $MgCl_2$, 160 μ M de cada dNTP, 1,0 U de *Taq* polimerase (GIBCO BRL) e 200 nM de cada iniciador específico para o gene *BE2S1* ou

uid A (Figura 3 e Tabela 3). A mistura foi coberta com óleo mineral esterilizado e submetida à desnaturação (5 min a 95°C) seguida de 35 ciclos de amplificação (1 min a 95°C, 1 min a 55°C e 2,5 min a 72°C) ou 25 ciclos de amplificação (1 min a 94°C, 1 min a 45°C e 1,5 min a 72°C) e à uma extensão final (7 min a 72°C) para *BE2SI* (35 ciclos) ou *uid A* (25 ciclos) em termociclador (Perkin Elmer Cetus). Os produtos das reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,4% (p/v) TBE 1X corado com brometo de etídeo (1 mg . 100 mL⁻¹) sob luz UV.

Tabela 3. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores nas análises de PCR.

Gene	Posição	Sequência (5' → 3')	Produto (pb)
<i>BE2SI</i>	145	CAC AGT GGT GGA GGA GGA GAA	373
	518c	TCG GCC AGC CTC ATC ATC CTT	
<i>uid A</i>	28	CCT GTA GAA ACC CCA CAA CG	743
	717c	TGC AGC GCT ACC TAA GGC CG	

3.9 Preparo e marcação da sonda para hibridações de ácidos nucléicos

Cem µg do vetor de transformação pEA ats:2S foram completamente digeridos com *Eco* RI (GIBCO BRL), liberando um fragmento de aproximadamente 4,3 kb. Este fragmento contendo a unidade de transcrição na planta (sequência promotora, codificadora e terminadora do gene de interesse – Figura 3) foi visualizado em géis de agarose 1% (p/v) TBE 1X e eletroeluído por 45 min a 10 mA/tubo no equipamento Electro Eluter Modelo 422™ (Bio Rad). O produto eletroeluído foi lavado com 400 µL de clorofórmio : álcool isoamílico na proporção 24 : 1 (v/v) e precipitado com etanol absoluto. O pelete resultante foi ressuspensionado em TE pH 8,0 e quantificado espectrofotometricamente em A₂₆₀ e em géis de agarose 0,8 % (p/v) TBE 1X, em comparação com padrões de DNA íntegro de fago λ (GIBCO BRL).

A sonda de fita dupla foi radioativamente marcada com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$, pelo método dos iniciadores aleatórios (Feinberg & Volgelstein, 1983; Feinberg & Volgelstein, 1984) (Prime-a-gene, Promega) conforme recomendado pelo fabricante. Os nucleotídeos não incorporados foram removidos por passagem em minicoluna de Sephadex G-50 (Gene clean™, Quiagen).

Imediatamente antes do uso, a sonda marcada foi desnaturada por 5 min a 100 °C e mantida no gelo por pelo menos 5 min.

3.10 Southern Blot

O número e a complexidade de insertos estáveis foram estabelecidos por hibridização de DNA genômico da geração R_0 (transformantes primários) digerido com *Eco* RI, sítio de restrição que flanqueia a unidade de transcrição completa (Register III, 1997), com sonda específica (Bronstein et al., 1993; Southern et al., 1975; Wahl et al., 1987).

O DNA genômico total dos regenerantes primários expressando GUS e PCR positivos para a amplificação do gene *BE2S1* foi isolado conforme descrito por Dellaporta et al. (1983). O RNA presente na amostra foi eliminado por tratamento com ribonuclease I “A” (Pharmacia) livre de desoxirribonucleases, a 0,18 U (2 μL do estoque 1 mg.mL⁻¹) para cada 200 μL de DNA em suspensão em TE pH 8,0. Empregou-se 2,0 g de tecido foliar jovem e o rendimento médio de DNA total foi de 20 $\mu\text{g.g}^{-1}$, conforme estimado por espectrofotometria a 260 nm e também por comparação com padrões de DNA íntegro de fago λ (GIBCO BRL) em gel de agarose 0,8% (p/v) TBE 1X, corado com brometo de etídeo (1 mg .100 mL⁻¹), sob luz UV.

Quinze μg de DNA total foram digeridos por *Eco* RI (GIBCO BRL), os produtos da digestão resolvidos em gel de agarose 0,9% (p/v) TAE 1X e transferidos para membrana de nylon positivamente carregada (Hybond N⁺, Amersham), sob condições neutras, conforme descrito em Sambrook et al. (1989).

Cada 100 cm² de membrana foram pré-hibridizado com 50 mL de solução de pré-hibridização (SSC 5X, solução de Denhardt 5X, SDS 0,1%, DNA de esperma de salmão 20 µg/mL e formamida deionizada 50%) a 42 °C por quatro horas. Metade da solução de pré-hibridização foi retirada e aos 25 mL restantes foi adicionada a sonda (20 ng/mL de solução de hibridização). As membranas foram hibridizadas por 16 a 18 horas a 42°C, lavadas duas vezes à temperatura ambiente (300 mL/100 cm² de membrana de SSC 1X SDS 0,1%), duas vezes a 42°C (300 mL/100 cm² de membrana de SSC 0,1X SDS 0,1%) sob leve agitação e expostas a filme autorradiográfico por 36 horas a -70°C.

As soluções empregadas para ácidos nucleicos estão descritas no Apêndice 3.

3.11 Northern Blot

A estabilidade transcricional do transgene foi investigada pela detecção do acúmulo de mRNAs específicos do *BE2SI* por Northern blot (Alwine et al, 1977; Register III, 1997). A atividade do promotor *atsI A* está associada à biossíntese de clorofila (De Almeida et al., 1989) estando, portanto, restrita aos tecidos verdes da planta. A expressão tecido-específica do transgene foi verificada pelo isolamento e hibridização de RNAs provenientes das folhas, caules e raízes.

O RNA total dos transformantes primários foi isolado de acordo com Jones et al. (1985), a partir de 2 g de tecido jovem. O rendimento médio de RNA total foi de 25 µg.g⁻¹ de tecido de folha, 10 µg.g⁻¹ de tecido de raiz e 7,5 µg.g⁻¹ de tecido de caule. A quantidade de RNA foi determinada por leitura em espectrofotômetro a 260 nm e a sua integridade foi avaliada em géis desnaturantes (2,2 M de formaldeído) de agarose 1,25% (p/v) MOPS 1X (Sambrook et al., 1989).

Dez µg de RNA total foram separados por tamanho em gel de eletroforese desnaturante e transferidos para membrana de nylon positivamente carregada (Hybond N⁺, Amersham), conforme descrito em Sambrook et al. (1989).

Cada 100 cm² de membrana foram pré-hibridizado com 50 mL de solução de pré-hibridização (SSPE 5X, solução de Denhardt 5X, SDS 0,1%, DNA de esperma de

salmão 20 µg/mL e formamida deionizada 50%) a 42 °C por quatro horas. Metade da solução de pré-hibridização foi retirada e aos 25 mL restantes foi adicionada a sonda (20 ng/mL de solução de hibridização). As membranas foram hibridizadas por 16 a 18 horas a 42°C, lavadas duas vezes à temperatura ambiente (300 mL/100 cm² de membrana de SSPE 1X SDS 0,1%), duas vezes a 42°C (300 mL/100 cm² de membrana de SSPE 0,1X SDS 0,1%) sob leve agitação e expostas a filme autorradiográfico por 98 horas a -70°C.

As soluções empregadas para ácidos nucleicos estão descritas no Apêndice 3.

3.12 Isolamento de albuminas de *Bertholletia excelsa* e *Stylosanthes guianensis*

Foram isoladas proteínas de reserva de *B. excelsa* (castanheiro do Pará) para a produção de anticorpos policlonais monoespecíficos contra a albumina 2S. Embriões completos de castanha foram desgordurados com hexano (2 mL por 250 mg de castanha moída) durante 1 hora. O solvente orgânico foi evaporado à temperatura ambiente, a farinha desgordurada resultante foi triturada sob nitrogênio líquido e extraída de acordo com DeClerq et al. (1990a) para enriquecimento em albuminas 2S.

O extrato protéico cru foi submetido à ultracentrifugação a 65000 x g por 2 horas em gradiente contínuo de sacarose (0 – 20 %) para promover a separação das albuminas de acordo com seu coeficiente de sedimentação (Martin & Ames, 1961). A banda formada pelas proteínas de menor coeficiente de sedimentação (2S - 6S) foi retirada e submetida a SDS-PAGE em gradiente de 8 – 18% (v/v) de poliacrilamida.

A isoforma predominante da albumina 2S de *B. excelsa* corresponde à uma banda de 12 kDa, que foi cortada do gel e eletroeluída (Electro Eluter™ Modelo 422, Bio Rad) a 10 mA/tubo durante 5 h a 4 °C. O rendimento típico de eletroeluição foi $2,26 \pm 0,02$ mg por banda. A proteína recuperada foi quantificada pelo método de Bradford (1969) e utilizada para a produção de anticorpos policlonais monoespecíficos em camundongos.

As albuminas de tecidos foliares de *S. guianensis* foram isoladas de acordo com DeClerq et al. (1990a) e quantificadas pelo método de Bradford (1969).

Protoplastos do mesófilo dos regenerantes primários foram isolados conforme descrito no item 3.3, cultivados por 48 horas em meio K8P (Kao, 1977) modificado por Gilmour et al. (1989) e empregados para o isolamento de vacúolos usando-se o procedimento descrito por Glund et al. (1984). As albuminas intracelulares (fração protoplasto), secretadas (fração meio de cultura) e da fração vacuolar foram extraídas (DeClerq et al., 1990a) e quantificadas conforme descrito acima, exceto que foram dialisadas por 24 h a 4°C, sob agitação, contra o tampão de extração para a remoção do manitol utilizado como osmótico no meio de cultivo dos protoplastos. A pureza das frações foi avaliada por observação ao microscópio para a presença de organelas contaminantes.

As soluções empregadas para proteínas estão descritas no Apêndice 4.

3.13 Produção de anticorpos policlonais contra albumina 2S de *Bertholletia excelsa*

Dois camundongos fêmea da linhagem BALB/C com aproximadamente 30 dias de idade foram imunizados com a albumina 2S, eletropurificada a partir de SDS-PAGE. A primeira imunização foi linfonodal nos membros anteriores e posteriores e após 15 dias iniciaram-se as sete imunizações subsequentes, realizadas a intervalos de 15 dias, através de injeções intraperitoneais. Foram aplicadas 5 e 10 µg de proteína em PBS 1X contendo adjuvante Freund (Sigma) completo na primeira imunização e sem adjuvante nas demais aos camundongos 1 e 2, respectivamente.

Antes de cada imunização, aproximadamente 500 µL de sangue foram retirados, incubados a 37°C por uma hora e centrifugados a 5000 x g por 5 min para precipitação do plasma. O soro foi empregado para avaliação, por teste ELISA, da cinética de resposta imune, que corresponde ao aumento de células B contendo anticorpos superficiais específicos para o antígeno inoculado.

Quando altos títulos de anticorpos foram atingidos, o “boost” foi realizado com a aplicação de 20 µg de proteína em ambos os animais e o soro com título mais alto de IgG

anti-2S (camundongo 2) foi purificado em coluna de Sepharose-proteína A conforme descrito por Oi & Herzenberg (1980), fornecendo 139 mg IgG anti-2S.

As soluções empregadas para proteínas estão descritas no Apêndice 4.

3.14 Ensaio imunossorvente associado a enzimas (ELISA)

A cinética de produção de IgG anti-2S foi avaliada pelo ensaio de ELISA indireto, no qual um anticorpo secundário conjugado a uma enzima permite a avaliação quantitativa e qualitativa do anticorpo específico (Engvall & Perlman, 1971).

O extrato protéico contendo 0,5 µg, 1,0 µg, 2,5 µg e 5,0 µg de albumina 2S purificada foi adicionado de PBS 1X até completar 50 µL e incubado por 1 hora a 37°C em microplacas. Após este período, a microplaca foi lavada três vezes com água destilada deionizada e os sítios de ligação remanescentes na placa foram bloqueados por PBS 1X 1% BSA por 14 horas a 37°C em câmara úmida. Após lavagem por três vezes conforme descrito anteriormente, 50 µL de anticorpo primário (diluição 1 : 100) foram adicionados e incubados por 1 hora a 37°C. A placa foi novamente lavada, 50 µL de anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Sigma) (diluição 1:5000) foram acrescentados e a microplaca foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Após três lavagens, a atividade da peroxidase foi revelada empregando-se o substrato cromogênico aminoetilcarbazole (AEC) seguindo protocolo descrito por Harlow & Lane (1988).

A análise quantitativa foi realizada em leitor de microplacas (Benchmark Microplate Reader[®], Bio Rad) a um comprimento de onda (λ) de 450 nm.

3.15 Western blot

Trinta µg de proteínas totais foram resolvidas em SDS-PAGE gradiente 8-18% (v/v) de poliacrilamida e imediatamente transferidas para membranas de nitrocelulose

0,2 μ m (Hybond-C, Amersham) empregando-se o sistema de transferência elétrica semi-seca (Towbin et al., 1979) com TransBlot SD™ (Bio Rad) a 10 V por 60 min.

A eficiência da transferência e a posição dos marcadores de peso molecular foram determinadas pela coloração temporária das membranas com uma solução ácida de Ponceau S segundo Ausubel et al. (1990).

Os sítios inespecíficos foram bloqueados com TBS 1X acrescido de 3 % (p/v) BSA por 2 horas, sob agitação, à temperatura ambiente. A incubação com anticorpo primário (diluição 1: 20) foi realizada por 4 ou 16 horas sob as mesmas condições. Após três lavagens com TBST 1X de 15 minutos cada, o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Promega) foi adicionado, na diluição 1:15000 em TBS 1X, durante 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação.

Após três lavagens de 5 minutos com TBST 1X, a atividade da enzima foi revelada com solução 122 μ M NBT/ 577 μ M BCIP (Calbiochem), sob agitação, por aproximadamente 30 minutos. A reação foi finalizada com a adição de PBS 1X acrescido de 20 mM EDTA.

As soluções empregadas para proteínas estão descritas no Apêndice 4.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização dos parâmetros para transformação por biobalística

4.1.1 Parâmetros biológicos

Neste estudo, foram empregados explantes hipocotiledonares, cotiledonares, foliares e calos com idade de 10, 20, 30 e 45 derivados destes explantes. Foram realizados três experimentos independentes compostos de 12 placas, contendo 10 explantes, para cada alvo biológico avaliado.

Hipocótilos e folhas apresentaram frequências muito baixas de expressão do gene repórter (< 50%) nos três experimentos. O número e a intensidade dos pontos azuis também foram baixos (Figuras 4A e 5A). Além disto, para se conseguir grande número de brotações a partir destes explantes, é necessário que passem pelo estado de calo, que implica em desdiferenciação celular, isto poderia facilitar o aparecimento de plantas quiméricas e/ou clones provenientes de um mesmo evento de transformação (Christou, 1990; Christou et al., 1989).

A frequência e o nível de expressão de GUS nos cotilédones, calos com 10 e 20 dias foi intermediária (Figuras 4B e 5B), porém os cotilédones possuem a mesma desvantagem dos explantes anteriormente citados e, nos calos recém-induzidos a presença simultânea de células diferenciadas e desdiferenciadas favorece o surgimento de indivíduos quiméricos.

Aproximadamente 100 % dos calos com 30 e 45 dias apresentaram pontos de expressão de GUS, sendo este nível de expressão mais elevado que aquele observado nos demais explantes avaliados (Figuras 4C e 5C).

Figura 4 – Expressão transiente de GUS em função da fonte de explante. Condições de bombardeamento : 1000 psi de pressão de hélio, 65 mmHg de vácuo na câmara, 10 mm de distância de vôo do macrocarreador, 10 mm de distância do gerador de onda de choque até ao macrocarreador e 12,5 cm de distância de vôo das micropartículas. As barras indicam se.

Figura 5 – Efeito da fonte de explante sobre a expressão transiente de GUS. (A) hipocótilo, (B) folha, (C) cotilédono e (E) calo 30 dias. As barras indicam 1 mm.

A transformação por biobalística apresenta alta eficiência quando o explante bombardeado tem a capacidade de dar origem a um grande número de plantas, como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Tipo de tecido-alvo e culturas transformadas por biobalística.

Tecido-alvo	Cultura	Referência
Embriões zigóticos	feijão	Aragão et al., 1996
		Russell et al., 1993
		Smith et al., 1992
	soja	Christou et al., 1988
		Christou et al., 1989
		McCabe et al., 1988
	algodão	Finer & McMullen, 1993
		McCabe & Martinell, 1993
células desdiferenciadas	solanáceas	Morikawa et al., 1988
		Stöger et al., 1995
		Tomes et al., 1990
	cana-de-açúcar	Birch & Franks, 1991
		Chowdhury & Vasil, 1992
		Franks & Birch, 1991
		Gallo-Meagher & Irvine, 1993
	milho	Dupuis & Pace, 1993
		Hunhold et al., 1994
		Klein et al., 1988
		Klein et al., 1988
		Klein et al., 1989
	arroz	Sivamani et al., 1996
		Wünn et al., 1996

Tecido-alvo	Cultura	Referência
células desdiferenciadas	cevada	Karthä et al., 1989
		Mendel et al., 1989
	trigo	Barcelo et al., 1994
		Becker et al., 1994
		Nehra et al., 1994
	gramados	Hartman et al., 1994
		Zhong et al., 1993
	arbóreas	Bommineni et al., 1993
		Kikkert et al., 1996
		Li et al., 1994
		Serres et al., 1992
		Walter et al., 1994
	ornamentais e olerícolas	Fitch et al., 1990
		Tanaka et al., 1995
		van Eck et al., 1995
		Yepes et al., 1995
	leguminosas forrageiras	Chabaud et al., 1996
		Pereira & Erickson, 1995

Em *Stylosanthes guianensis*, calos organogênicos podem ser obtidos a partir de hipocótilos, cotilédones e mesófilos (Dornelas et al., 1991; Dornelas et al., 1992).

A uniformidade da superfície-alvo, a presença apenas de células desdiferenciadas, a rapidez na regeneração de plantas e os altos níveis de expressão transiente do gene repórter GUS fizeram com que calos de 30 dias fossem utilizados para os experimentos posteriores de otimização dos parâmetros físicos e de transformação estável de *S. guianensis* cv. Mineirão por biobalística.

4.1.2 Parâmetros físicos

Foram avaliadas três pressões de gás hélio (1000, 1300 e 1600 psi) em combinação com duas distâncias de vôo (12,5 e 5,0 cm). Maiores frequências de explantes expressando GUS foram obtidas empregando-se a combinação 1300 psi a 12,5 cm de distância, na qual aproximadamente 100 % dos explantes tiveram mais de 50 pontos azuis (Figura 6C). Altas pressões combinadas com ambas as distâncias de vôo das micropartículas resultaram em intenso dano ao tecido e consequentemente, baixa frequência de explantes expressando o gene repórter (Figuras 6A e 6B).

Assim, pressões de gás hélio em torno de 1300 e distâncias de 12,5 cm de vôo das micropartículas foram mais favoráveis para a transformação de calos organogênicos de estilosantes.

Na transformação por biobalística de sistemas vegetais, a interação entre condições físicas e biológicas são específicas (Sanford et al., 1993). Em feijão (Aragão et al., 1996) e soja (Christou & Swain, 1989), 1200 psi de pressão de hélio e 8 cm de distância do tecido-alvo à tela de retenção foram os parâmetros físicos adotados. Condições semelhantes foram empregadas na obtenção de plantas transgênicas a partir de calos embriogênicos de *Saccharum* sp. (Franks & Birch, 1991), trigo e outros cereais (Nehra et al., 1994; Barcelo et al., 1994) e de calos organogênicos de *Medicago sativa* (Pereira & Erickson, 1995). Sanford et al. (1993) relataram que pressões de gás hélio próximas a 1000 psi são ótimas ou quase ótimas para a maioria das aplicações, pois pressões menores não provocam aceleração suficiente para que as micropartículas penetrem nas células e atinjam o núcleo e pressões superiores causam danos irreversíveis no tecido a ser transformado.

A interação entre a pressão de hélio e a distância de vôo da membrana macrocarreadora também interfere na velocidade das micropartículas e, consequentemente, na eficiência de transformação (Sanford et al., 1993). No presente estudo, foram avaliadas as seguintes combinações entre pressões de hélio (psi) e distância de vôo do macrocarreador (cm) : 1000 – 0,1, 1000 – 0,2, 1300 – 0,1, 1300 – 0,2, 1600 – 0,1 e 1600 – 0,2.

Figura 6 – Expressão transiente de GUS em calos organogênicos de *S. guianensis* em função da interação entre a pressão de hélio (psi) e a distância do alvo (cm). Condições de bombardeamento : 65 mmHg de vácuo na câmara, 10 mm de distância do gerador de onda de choque ao macrocarreador, calos de 30 dias. As barras indicam se.

A maior parte das combinações resultou em elevadas frequências de expressão transiente do gene *uid A* (Figuras 7C e 8C), exceto aquelas com pressões de hélio mais elevadas (Figuras 7A, 7B, 8A e 8B).

A distância de voo da membrana macrocarreadora e o espaço entre a câmara geradora de onda de choque e a tela de ruptura têm efeito sobre a aceleração das micropartículas e sua dispersão no alvo (Sanford et al., 1993). Menores distâncias provocam maiores acelerações, porém também aumentam a variação entre as trajetórias de voo e a dispersão para fora do centro das micropartículas tornando mais difícil o estabelecimento de uma região ótima para a transformação na placa-alvo. Micropartículas com trajetórias de voo irregulares reduzem o aproveitamento do DNA na transformação efetiva do tecido-alvo.

Geralmente, distâncias de 6 a 12 mm são adequadas para uma transferência eficiente de energia para as micropartículas com variação mínima (Sanford et al., 1993) em diversos sistemas vegetais.

Efeitos mais marcantes destes parâmetros são observados com pressões elevadas de hélio, como observado nas Figuras 7A e 8A.

A velocidade com que as micropartículas atingem o tecido-alvo é função de sua força de aceleração, da distância de voo destas partículas e da desaceleração provocada pelo atrito durante o tempo de voo (Sanford et al., 1991). A eficiência de transformação é dependente da interação destes parâmetros (Christou, 1997; Christou, 1995; Sanford et al., 1993).

Micropartículas recobertas de DNA podem ser aceleradas a velocidades supersônicas por sistemas empregando explosão química (Sanford et al., 1988), explosão elétrica de uma gota de água (Christou et al., 1988, McCabe et al., 1988, Rech et al., 1991) e vários tipos de gases, como ar comprimido (Morikawa et al., 1989) e hélio sob alta pressão (Sanford et al., 1991). Outros sistemas empregam a aceleração direta das micropartículas, sem a membrana macrocarreadora, na forma de aspersão sobre o alvo (Finer et al., 1992; Oard, 1993; Sautter et al., 1991; Takeuchi et al., 1992).

Figura 7 – Expressão transiente de GUS em calos organogênicos de *S. guianensis* em função da interação entre a pressão de hélio (psi) e a distância de voo do macrocarreador (cm). Condições de bombardeamento : 65 mmHg de vácuo, calos de 30 dias. As barras indicam se.

Figura 8 – Expressão transiente de GUS em calos organogênicos de *S. guianensis* em função da interação entre a pressão de hélio (psi) e a distância entre o gerador de onda de choque e o macrocarreador (cm). Condições de bombardeamento : 65 mmHg de vácuo, calos de 30 dias. As barras indicam se.

O dano primário sofrido pelo tecido é o trauma físico provocado pela explosão do gás e pelo choque acústico gerado dentro do equipamento (Russell et al., 1992), ambos diretamente relacionados à pressão de gás hélio. Entretanto, sistemas que empregam gases mais reativos ou ar comprimido são mais prejudiciais do que sistemas de aceleração com gás hélio (Sanford et al., 1993).

O sistema empregando gás hélio sob alta pressão apresenta como vantagens : (i) segurança, uma vez que a pressão de saída do gás pode ser facilmente controlada; (ii) limpeza, equipamentos que empregam pólvora geram gases tóxicos e produzem debris dentro do aparato; (iii) menor dano ao tecido devido à natureza praticamente inerte deste gás; (iv) maior facilidade na obtenção de velocidades supersônicas, pois o baixo peso molecular do hélio faz com que seja um gás de fácil e rápida compressão; (v) campo de transformação maior e mais uniforme, devido à capacidade de induzir velocidades maiores por toda a área-alvo combinada com uma melhor dispersão de partículas (Sanford et al., 1991). A maioria das plantas transgênicas obtidas por aceleração de micropartículas é resultante de sistemas que empregam gás hélio sob alta pressão.

Neste trabalho, não foram investigados os efeitos do tipo de microprojétil e do método para precipitação do DNA sobre estes, pois há inúmeros relatos da eficiência de partículas de tungstênio de 0,2 a 1,5 μm de diâmetro (Russell et al., 1992; Klein et al., 1988) e do uso de cálcio e espermidina na precipitação (Aragão et al., 1996; Klein et al., 1987; Russell et al., 1992). Embora a toxicidade do tungstênio a células vegetais tenha sido demonstrada (Russell et al., 1992), a presença de um espectro maior de diâmetros de partículas favorece a transformação de diversos tipos de células presentes no calo. O posicionamento dos explantes fora da zona de morte (Klein et al., 1988) e a precipitação com cálcio/espermidina reduzem o efeito tóxico do tungstênio. Além disto, o menor custo e a disponibilidade de diâmetros distintos são vantagens do emprego de partículas de tungstênio para a transformação por biobalística em plantas.

4.2 Otimização dos parâmetros para transformação por eletroporação

4.2.1 Tecido íntegro

4.2.1.1 Efeito do tipo de explante na expressão de GUS

Os cotilédones apresentaram maior frequência e maiores níveis de expressão de GUS independentemente do tipo de tampão, forma de DNA, tratamento osmótico e intensidade de campo elétrico (Figuras 9A e 10A). A frequência e o nível de expressão foram significativamente menores nas folhas, nunca ultrapassando 50 % dos explantes eletroporados e 2 pontos na escala arbitrária de nível de expressão (Figuras 9B e 10B). Explantes hipocotiledonares tiveram comportamento intermediário (Figuras 9C e 10C). Sequências específicas do vetor de transformação foram amplificadas por PCR em todos os tecidos eletroporados 7 dias após o tratamento elétrico (Quecini & Vieira, 1999).

Os baixos níveis de expressão nas folhas são provavelmente devidos às pequenas porções de áreas em crescimento presentes em folhas completamente expandidas em plântulas de 14-15 dias após a germinação. Nestas condições, a maior parte do tecido é constituída de células que já cessaram o crescimento e conseqüentemente, apresentam deposição de parede secundária, impedindo o aumento de volume da célula (Rieter, 1998, Cosgrove, 1997).

Em plantas superiores, a parede celular segue o plano arquitetônico das estruturas responsáveis pela forma das células de fungos, artrópodes e animais, ou seja, um material fibroso embebido em uma matriz amorfa (Rieter, 1998). Neste caso, os componentes fibrosos são fibrilas de celulose em um arranjo complexo (Delmer, 1998; Ha et al., 1998, Rose & Bennett, 1999) enquanto a matriz é composta de hemicelulose e pectina (Showalter, 1993). Além da parede secundária, as folhas são recobertas de cera, cutícula e tricomas, constituindo uma barreira ao movimento das macromoléculas.

Áreas de crescimento intenso, com hipocótilos e cotilédones possuem regiões muito menores com a presença da parede celular secundária (Wojtaszek & Bolwell, 1995; Cosgrove, 1997).

Figura 9 – Expressão de GUS em tecidos íntegros eletroporados em função da fonte de explante. (A) Frequência de explantes GUS positivos. Distribuição dos explantes na escala arbitrária de nível de expressão de 0 a 5 para cotilédone (B), hipocótilo (C) e folha e (D). Condições controle de eletroporação : C = 900 μ F, EF = 100 V.cm⁻¹, R = 20 Ω , tampão I (Fromm), 10 μ g de DNA plasmidial circular e ausência de tratamento osmótico. As barras indicam se e as letras minúsculas, diferenças significativas (P < 0,05).

Figura 10 – Expressão transiente de GUS em tecidos íntegros de *S. guianensis* após eletroporação. (A) cotilédone, (B) hipocótilo e (C) folha. As barras indicam 2 mm.

4.2.1.2 Otimização da intensidade do campo elétrico

Tecidos cotiledonares e hipocotiledonares apresentaram aproximadamente o mesmo comportamento, com os valores de expressão mais altos situados em intensidade de campo de 150 a 250 V.cm⁻¹ (Figura 11A), sendo semelhantes aos valores relatados por Dillen et al. (1995) para eixos embrionários de feijão. Dekeyser et al.(1990) relataram que campos elétricos de 375 V.cm⁻¹ levaram à morte do tecido e, consequentemente, ausência de expressão de GUS; sob as condições usadas neste estudo isto foi observado a 350 V.cm⁻¹ (Figura 11B). Explantes foliares não atingiram altos níveis de expressão do gene repórter, nem altas frequências de explantes transformados de forma transiente em nenhuma das condições (Figuras 11A e 11B).

Foi empregado um capacitor de descarga fixa ($C = 900 \mu\text{F}$) num circuito RC, portanto, a energia é dependente da voltagem aplicada ($\epsilon = \frac{1}{2} CV^2$), variando de 180 mJ (a 50 V.cm⁻¹) até 8820 mJ (a 350 V.cm⁻¹). A intensidade do campo elétrico promove a abertura de poros nas membranas biológicas (Kinosita & Tsong 1977; Neumann et al., 1982), altera a viscosidade da estrutura gelatinosa da homogalacturana (Zabackis et al., 1995) e afeta as interações iônicas entre as cargas positivas dos resíduos de lisina e histidina das extensinas e as cargas negativas do ácido urônico da pectina (Showalter, 1993; Rieter, 1998) permitindo a migração de macromoléculas através desta estrutura.

4.2.1.3 Efeito do tampão de eletroporação

Não foram observadas diferenças estatísticas ($P < 0.05$) nos explantes eletroporados com os tampões I, II e III (Figura 12A). Entretanto, a frequência de explantes transformados foi aparentemente mais elevada nos tampões sem íons Cl⁻, conforme relatado anteriormente para protoplastos de arroz (Tada et al., 1990). Os tampões sem cloreto (II e III) evitaram a formação do gás tóxico Cl₂ durante a descarga elétrica. Um número maior de explantes foram classificados nas classes de expressão 4 e 5 quando eletroporados com tampão II (Figura 12B). A presença de Ca⁺² induz

alterações na viscosidade do gel da pectina e na propriedades reológicas da parede celular vegetal (Showalter, 1993; Cosgrove, 1997).

Figura 11–Expressão de GUS em tecidos íntegros eletroporados em função da intensidade de campo elétrico. (A) Frequência de explantes GUS positivos, (B) Nível de expressão de GUS, avaliado por escala arbitrária de 0 a 5, sob campos elétricos de intensidades crescentes. Condições de eletroporação : C= 900 μ F, R = 20 Ω , tampão I, 10 μ g de DNA plasmidial circular e ausência de tratamento osmótico. As barras indicam se e as letras minúsculas, diferenças significativas ($P < 0,05$).

4.2.1.4 Influência da forma do DNA

O DNA linear foi mais eficientemente introduzido em tecidos íntegros de *Stylosanthes* (Figura 13A), como descrito para outras Fabaceae (Akella & Lurquin, 1993; Dillen et al., 1995). Maiores frequências de transformação empregando DNA plasmidial linearizado foram relatadas para bactérias (Rittich & Spanova, 1996), leveduras e fungos filamentosos (Kwon-Chung et al. 1998), protoplastos vegetais (Lin et

al. 1997) e tecidos intactos (Akella & Lurquin, 1993; Dillen et al. 1995; Lin et al. 1997; Sabri et al. 1996; Saunders et al. 1995; Xu & Li, 1994).

A natureza transitória dos poros na membrana e das alterações estruturais na parede induzidas por campo elétrico impõem restrições conformacionais às macromoléculas a serem introduzidas (Neumann et al., 1982).

Macromoléculas movimentam-se mais facilmente através de poros quando estão na forma linear, pois estruturas terciárias e quaternárias tornam o seu volume maior (Tanaka, 1988) e reduzem a uniformidade de polarização superficial induzida pelo campo elétrico (Neumann et al., 1982; Neumann et al., 1996).

Quanto aos níveis de expressão, observou-se um pequeno aumento com o emprego de DNA linearizado (Figuras 13B e 13C), porém sem diferença significativa ($P < 0.05$).

4.2.1.5 Influência do pré-tratamento osmótico

Não observou-se aumento significativo ($P < 0.05$) nas frequências de explantes expressando o gene repórter (Figura 14A) mas 0,8 M e 1,6 M de manitol aumentaram o número e a intensidade de pontos azuis, avaliados pela escala arbitrária de nível de expressão (Figuras 14D e 14E). Molaridades menores de manitol não provocaram alterações na frequência de explantes expressando o gene repórter tampouco alteraram a classe de expressão a que os explantes foram atribuídos.

Figura 12 - Expressão de GUS em tecidos íntegros eletroporados em função do tampão de eletroporação. (A) Frequência de explantes GUS positivos. Nível de expressão com tampão I (B), II (C) e III (D). Condições de eletroporação: $C=900\mu F$, $EF=100\text{ V.cm}^{-1}$, $R=20\ \Omega$ (tampão I e III) e $R=50\ \Omega$ (tampão II), $10\ \mu g$ de DNA plasmidial circular e ausência de tratamento osmótico. As barras indicam se.

Figura 13 – Expressão de GUS em tecidos íntegros eletroporados em função da forma do DNA. (A) Frequência de explantes GUS positivos. Nível de expressão empregando-se plasmídeo linear (B) e circular (C). Condições de eletroporação: $C=900 \mu F$, $EF=100 V.cm^{-1}$, $R=20 \Omega$, tampão I, e ausência de tratamento osmótico. As barras indicam se e as letras minúsculas, diferenças significativas ($P < 0,05$).

Figura 14 - Expressão de GUS em tecidos íntegros eletroporados em função do tratamento osmótico. (A) Frequência de explantes GUS positivos. Nível de expressão para 0 M manitol (B), 0,2 M manitol (C), 0,8 M manitol e 1,6 M manitol. Condição de eletroporação: $C=900\mu F$, $EF=100 \text{ V.cm}^{-1}$, $R=20 \Omega$, tampão I e 10 μg de DNA plasmidial circular. As barras indicam se e as letras minúsculas, diferenças significativas ($P < 0.05$).

O tratamento osmótico do tecido-alvo foi responsável pelo aumento de 7 a 10 vezes nas taxas de transformação em microrganismos (Armaleo et al. 1990; Shark et al. 1991) e células vegetais (Nandadeva et al., 1999; Russell et al. 1992; Vain et al. 1993). O aumento na distância entre a parede celular e o citoplasma torna as células plasmolisadas menos susceptíveis a danos nas organelas e extravasamento de citoplasma quando submetidas a um campo elétrico. Este efeito é intenso em células provenientes de cultivos em suspensão (Jain et al., 1996; Russell et al., 1992; Vain et al., 1993; Ye et al., 1997), entretanto, em tecidos íntegros seu efeito não foi notável. É possível que concentrações mais elevadas de osmótico sejam necessárias para que se observe um aumento significativo nas frequências de transformação e nos níveis de expressão em tecidos intactos.

Outros carboidratos são frequentemente utilizados como agentes osmóticos para células vegetais (Nandadeva et al., 1999). É necessário que sejam avaliados quanto a sua capacidade de induzir aumento nas taxas de transformação devido à plasmólise.

4.2.2 Protoplastos

4.2.2.1 Efeito da força elétrica

A expressão transiente do gene que codifica a proteína fluorescente verde (GFP) (Chalfie et al., 1994) foi utilizada na avaliação *in vivo* da eficiência da transformação de protoplastos de *S. guianensis* por eletroporação.

A frequência de transformantes aumentou com a aplicação de até 3000 mJ de energia no sistema (Figura 15A). Os capacitores com maior capacidade de armazenagem de carga (900 e 1000 μF) provocaram maiores frequências de transformação (< 50 %) desde 2000 até 4000 mJ de energia (Figura 15A). Os capacitores de baixa capacitância (400 e 800 μF) causaram a morte de aproximadamente 70 % dos protoplastos.

Níveis máximos de expressão transiente têm sido relatados sob campos elétricos que causam redução de mais de 50 % na viabilidade de protoplastos (Fromm et al., 1985; Hauptmann et al., 1987; Oard et al., 1989). O emprego de capacitores de alta retenção de cargas também favorece o aumento do tempo de decaimento exponencial dos pulsos (Fromm et al., 1987).

A capacitância (C) representa a quantidade de carga elétrica (q) que um capacitor pode armazenar a uma determinada voltagem aplicada.

$$C = q.V^{-1} \quad (I)$$

O campo elétrico (EF) é dependente da voltagem aplicada e da distância entre os eletrodos nas cuvetas de eletroporação (d). As cargas migram do polo positivo para o polo negativo, fazendo com que EF seja uma grandeza vetorial.

$$EF = V.d^{-1} \quad (II)$$

Campos elétricos de 250 V.cm^{-1} , provenientes de capacitores de 900 e $1000 \mu\text{F}$, foram mais eficientes na transformação transiente de protoplastos de *S. guianensis* (Figura 15B). Campos elétricos menos intensos foram ineficientes para promover a transformação de mais de 20% dos protoplastos eletroporados (Figura 15B) e intensidades maiores de campo causaram danos irreparáveis à membrana plasmática, levando a alta incidência de morte celular.

A aplicação de campos elétricos a membranas biológicas promove a abertura temporária de poros em sua estrutura (Kinosita & Tsong, 1977; Neumann et al., 1982). As regiões hidrofílicas dos fosfolípidios que compõem as bicamadas do mosaico fluido polarizam-se devido ao campo elétrico, levando a um aumento no momento dipolo da membrana no sentido do campo elétrico. Isto faz com que haja uma quebra dielétrica altamente localizada abrindo poros transientes na estrutura bilipídica (Kinosita & Tsong, 1977). O aumento do potencial elétrico transmembrana é o mecanismo geral para a

abertura de poros temporários para diferentes espécies (Fromm et al., 1985; Kinosita & Tsong, 1977).

A alteração do potencial elétrico capaz de induzir a abertura de poros na membrana de protoplastos vegetais está situada entre 200 e 250 mV (Langridge et al., 1987). Entretanto, campos elétricos intensos e pulsos longos levam à lise celular devido à formação de poros irreversíveis, que provocam o extravasamento do conteúdo citoplasmático (Shillito & Potrykus, 1987). Forças elétricas com intensidades 2 a 6 vezes maiores que a do ponto de quebra dielétrica levam à morte celular (Langridge et al., 1987).

Figura 15 - Expressão de GFP em protoplastos eletroporados em função da força elétrica. (A) energia acrescentada ao sistema e (B) intensidade de campo elétrico. Condições de eletroporação: tampão I (Fromm et al., 1987), 10 μ g de DNA plasmidial circular e $R = 20 \Omega$.

4.2.2.2 Efeito do tampão de eletroporação

As frequências de expressão transiente de GFP foram significativamente mais elevadas ($P < 0,01$) quando o tampão II (Tada et al., 1990) foi empregado (Figura 17A). A presença de íons cloreto no tampão I (Fromm et al., 1987) promoveu a formação do gás tóxico Cl_2 com o tratamento elétrico, levando à redução na viabilidade dos protoplastos eletroporados (Figura 16). O tratamento elétrico no meio II, e em menor escala no meio III (Walbot, 1993), foi menos prejudicial (Figura 16).

O número de protoplastos danificados e/ou mortos após o tratamento elétrico também foi menor com a utilização do tampão II (Tada) (Figuras 17A e 17B). Protoplastos incubados com DNA sob as mesmas condições (10 μg DNA plasmidial circular no gelo por 45 min) não apresentaram expressão de GFP (Figura 17C), ao contrário do descrito por Senaratna et al. (1991).

O máximo de expressão transiente de genes repórteres em protoplastos eletroporados situa-se entre 12 e 48 horas após o tratamento elétrico (Guerche et al., 1987; Sagi et al., 1994). Entretanto, a frequência de transformação estável é menor do que o esperado a partir de ensaios de expressão transiente (Hain et al., 1985; Shillito et al., 1985). Provavelmente, protoplastos danificados ainda retêm alguma capacidade de expressão dos genes repórteres em períodos de tempo inferiores a 72 horas. Isto foi observado nos ensaios de expressão transiente de GFP em protoplastos eletroporados de *S. guianensis*.

Nos sistemas de campo elétrico de onda exponencial, a voltagem decai exponencialmente no meio de eletroporação entre os eletrodos e a energia introduzida no sistema é função da voltagem inicial aplicada para uma determinada capacidade de armazenamento de carga (Neumann et al., 1982). Neste tipo de circuito, a constante temporal (τ) é função da resistência elétrica do circuito (R) e da capacitância (C).

$$\tau = RC \quad (\text{III})$$

Para um determinado capacitor (C), a energia aplicada ao sistema (ϵ) depende diretamente da voltagem inicial (V).

$$\epsilon = \frac{1}{2} C V^2 \quad (IV)$$

Assim, considerando-se um determinado capacitor fixo ($C = \text{constante}$) soluções de eletroporação com força iônica reduzida oferecem resistência menor ao movimento das cargas no circuito e conseqüentemente, de acordo com a equação I, o tempo de decaimento do pulso é maior. Kinosita & Tsong (1977) demonstram que pulsos de maior duração promovem maior permeabilidade de membrana devido ao alargamento dos poros. Portanto, a eficiência dos tampões II e III de baixa força iônica é provavelmente devida à facilidade de alargamento dos poros sob pulsos de longa duração e a ausência do gás tóxico Cl_2 no meio.

Figura 16-Expressão de GFP em protoplastos eletroporados de *S. guianensis*. Condições de eletroporação: 10 μg de DNA plasmidial circular, campo elétrico de 125 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ em um circuito com capacitor de 400 μF (500 mJ).

Figura 17 – Expressão transiente de GFP em protoplastos de *S. guianensis* eletroporados (A) tampão II e (B) tampão I e não eletroporados (C) incubados com 10 μg de DNA plasmidial circular por 45 min no gelo.

4.2.2.3 Efeito da forma do DNA

O DNA linear foi significativamente mais eficiente na transformação de protoplastos de *Stylosanthes* (Figura 18). Maiores frequências de transformação empregando DNA plasmidial linearizado foram relatadas para bactérias (Rittich & Spanova, 1996), leveduras e fungos filamentosos (Kwon-Chung et al. 1998), protoplastos vegetais (Ballas et al., 1988; Lin et al. 1997; Negrutuiu et al., 1987; Shillito et al., 1985) e tecidos intactos (Akella & Lurquin, 1993; Dillen et al. 1995; Lin et al. 1997; Sabri et al. 1996; Saunders et al. 1995).

O DNA plasmidial linearizado apresenta mobilidade maior quando submetido a um campo elétrico (Courey & Wang, 1983) devido à torção interna na molécula e à ausência de distorções impostas à estrutura da dupla hélice (Drew et al., 1988). Macromoléculas movimentam-se mais facilmente através de poros quando estão na forma linear, pois estruturas terciárias e quaternárias tornam o seu volume maior (Tanaka, 1988) e reduzem a uniformidade de polarização superficial induzida pelo campo elétrico (Neumann et al., 1982). Isto pode contribuir para a maior eficiência de transformação observada com plasmídios linearizados. Nandadeva et al. (1999) demonstram que a estrutura física desnaturada do DNA é mais favorável à transformação do que a linearização. Os autores afirmam que isto é provavelmente devido à facilidade de transporte de moléculas desnaturadas. Entretanto, alta eficiência de transformação tem sido conseguida com plasmídios circulares (Bates et al., 1990; Oard et al., 1989; Fromm et al., 1985).

Figura 18- Expressão de GFP em protoplastos eletroporados de *S. guianensis*. Condições de eletroporação : 10 μg de DNA plasmidial, tampão I, $\text{EF}=125 \text{ V.cm}^{-1}$ em um circuito com capacitor de 400 μF (500 mJ).

4.3 Transformação genética por biobalística

Calos organogênicos de *S. guianensis* cv. Mineirão 30 dias após sua indução foram submetidos a 12 experimentos independentes (Tabela 5) de bombardeamento empregando o vetor pEA ats:2S (Figura 3). O número de plantas transgênicas obtidas (30) dividido pelo número total de calos bombardeados (864) resultou em uma eficiência de transformação de 3,47 %.

Tabela 5. Dados dos experimentos independentes de biobalística empregando calos de 30 dias de *S. guianensis* cv. Mineirão e o vetor de transformação pEA ats:2S. Os resultados da análise de PCR referem-se a iniciadores específicos para amplificação de um fragmento do gene *BE2S1*.

Experimento	No explantes bombardeados	Regenerantes	Regenerantes Transgênicos		Total
			GUS +	PCR +	
1	72	12	0	0	0
2	72	342	2	2	2
3	72	53	0	0	0
4	72	223	3	3	3
5	72	388	8	8	8
6	72	91	0	0	0
7	72	202	0	0	0
8	72	349	0	0	0
9	72	396	1	1	1
10	72	596	10	10	10
11	36	132	0	0	0
12	108	204	6	6	6
Total	864	2990			30

Os transformantes primários (R_0) apresentaram características não-quiméricas com relação à expressão do gene repórter (Figura 19). Todos os regenerantes apresentaram amplificação por PCR do fragmento de 373 pb com iniciadores específicos para o gene *BE2S1* de *Bertholletia excelsa* (Figura 20).

A eficiência de transformação obtida foi de 3,47% e pode ser considerada elevada quando comparada às frequências próximas de 1% relatadas para experimentos de transformação por biobalística de outras leguminosas como soja (McCabe & Christou, 1993) e feijão (Aragão et al., 1996; Smith et al., 1992).

O principal problema apresentado pelo sistema de regeneração na ausência de agente seletivo é que permite o crescimento de regenerantes não-transformados, reduzindo a eficiência na identificação das plantas transgênicas. Assim, se considerarmos a eficiência de transformação como sendo o número de plantas transgênicas obtidas (30) dividido pelo número de brotações analisadas (2990), a eficiência cai para 1,0%. O grande número de regenerantes reduziu a eficiência de detecção dos transgênicos nestas condições.

A eficiência geral de transformação para Fabaceae tem sido relatada como situando-se entre 0,1 a 5,0% (Atkins & Smith, 1996). Embora seja difícil a comparação de desempenho entre técnicas distintas de transformação (Potrykus, 1991), o sistema de bombardeamento com micropartículas tem sido responsável pelas taxas mais elevadas (Christou, 1995). Atkins & Smith (1996) afirmam que a eletroporação de tecidos íntegros, alcançando 13 a 25% de expressão transiente de GUS (Chowira et al., 1995; Chowira et al., 1996), é o método mais promissor na transformação de leguminosas. Entretanto, não há relatos de obtenção de plantas transformadas com a mesma eficiência.

A ausência de um sistema eficiente de seleção de transformantes em leguminosas, quer devido à sua resistência aos antibióticos empregados (Dekeyser et al., 1989) quer devido a seu efeito prejudicial na regeneração (Colby & Meredith, 1990; Hoffmann, 1996), contribui para a redução da eficiência de transformação, pois a identificação dos regenerantes carregando o transgene torna-se mais difícil.

A eficiência de transformação em cereais e algumas leguminosas foi grandemente aumentada com o emprego de genes de resistência a herbicidas como marcadores de seleção (McElroy & Bretetll, 1994; Sarria et al., 1994; Schroeder et al., 1993; Vasil et al., 1993;). Porém, a preocupação com a transferência horizontal dos genes de resistência a antibióticos para microrganismos associados à planta (Kidwell, 1993; Schlüter et al., 1995), dos genes de resistência a herbicida para plantas invasoras

(Rogers & Parkes, 1995) ou do aumento na pressão de seleção para resistência (Schulz et al., 1990) favorece o emprego da regeneração na ausência de agente seletivo.

4.4 Transformação genética por eletroporação

Foram realizados quatro experimentos independentes de transformação por eletroporação, cada um deles constituído de quatro cubetas. Conforme determinado nos experimentos de otimização, foram aplicados campos elétricos de 250 V.cm^{-1} através da descarga de um capacitor de $1000 \mu\text{F}$ a cubetas de $0,4 \text{ cm}$ de distância entre os eletrodos contendo uma suspensão de $2,0 \cdot 10^6$ protoplastos $\cdot \text{mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g}$ de DNA plasmidial circular no tampão de eletroporação (Tada et al., 1990). O tempo, expresso como a constante de decaimento do pulso, medido pelo equipamento foi $\tau = 12,5 \pm 2,3 \text{ ms}$.

Tabela 6. Dados dos experimentos independentes de eletroporação empregando protoplastos de *S. guianensis* cv. Mineirão e o vetor de transformação pEA ats:2S. Os resultados da análise de PCR referem-se a iniciadores específicos para amplificação de um fragmento do gene *BE2S1*.

Experimento	Protoplastos Eletroporados	Regenerantes	Regenerantes		Total
			Transgênicos		
			GUS +	PCR +	
1	8.10 ⁶	23	8	8	8
2	8.10 ⁶	17	4	4	4
3	8.10 ⁶	5	5	5	5
4	8.10 ⁶	5	1	1	1
Total	3,2.10 ⁷	50	18	18	18

Figura 19 – Expressão estável de GUS nos R_0 de *S. guianensis* cv. Mineirão. (A) 3/1.26, (B) 7/2.41 e (C) 3/1.16.

Figura 20 –Análise por PCR das plantas de *S. guianensis* transformadas por biobalística com o plasmídeo pEA ats:2S. As plantas estão indicadas sobre as canaletas, S- : *S. guianensis* não transformado; C- : ausência de DNA molde; C+ : DNA plasmidial do pEA ats: 2S; MW : marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder, GIBCO-BRL).

A eficiência de transformação de 36%, considerando-se o número de plantas (18) transgênicas obtidas em relação ao número total de regenerantes (50), é considerada elevada quando comparada aos valores de 0,1 a 5% obtidos na transformação de leguminosas em geral (Atkins & Smith, 1996).

A transformação direta de protoplastos tem sido progressivamente mais eficiente devido ao emprego de eletroporação (Shillito et al., 1985), ausência de agente seletivo (Zhang et al., 1988); aperfeiçoamento de tampões de eletroporação (Tada et al., 1990) e emprego de DNA linearizado (Lin et al., 1997; Rodenburg et al., 1989). Entretanto, valores superiores a 25% têm sido raramente encontrados (Zhang et al., 1988).

É provável que a alta eficiência observada neste trabalho para *S. guianensis* seja devida a : (i) eficiência da regeneração de plantas completas a partir de protoplastos; (ii) ausência de antibiótico como agente seletivo durante a regeneração e (iii) os calos derivados de protoplastos serem menos prolíficos que os induzidos por fitormônios, facilitando a identificação dos regenerantes transformados.

Embora tenha sido relatado que a eletroporação seja capaz de estimular a divisão celular (Rech et al., 1987), a regeneração de plantas a partir de protoplastos (Chand et al., 1988; Ochatt et al., 1988) e a síntese de DNA (Rech et al., 1988b), não se observou aumento na capacidade de regeneração em relação ao tempo de cultura de protoplastos eletroporados de *S. guianensis* quando comparada a de protoplastos não-eletroporados relatada por Vieira et al.(1990).

A ausência de agente seletivo no início de regeneração favorece o aparecimento de indivíduos quiméricos (Fromm et al., 1985; Vieira, 1990), pois podem ocorrer fusões entre as células transformadas e não transformadas presentes no meio. Características quiméricas foram observadas em 22,2% (4) das plantas regeneradas. Em *Stylosanthes*, é possível regenerar plantas completas de brotações laterais com mais de 2 cm de comprimento (Dornelas et al., 1992). Assim, indivíduos uniformemente transgênicos foram obtidos a partir de quimeras.

Figura 21 – Expressão estável de GUS nos R_0 de *S. guianensis* cv. Mineirão. (A) 8, (B) 13 e (C) 16.

Figura 22 – Análise por PCR das plantas transformadas por eletroporação com o plasmídeo pEA ats:2S. As plantas estão indicadas sobre as canaletas, S- : *S. guianensis* não eletroporado incubado com DNA; C- : ausência de DNA molde; C+ : DNA plasmidial do pEA ats: 2S; MW : marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, GIBCO-BRL).

4.5 Número e estrutura dos insertos

Foi detectada pelo menos uma cópia do transgene estavelmente inserida no genoma das plantas de *S. guianensis* transformadas por biobalística (Figura 23) e por eletroporação (Figura 24). As plantas não submetidas à transformação não apresentaram sinal de hibridização com a sonda correspondente à unidade de transcrição na planta.

A análise do número de cópias e da complexidade de integração foi realizada empregando-se como sonda o fragmento *Eco* RI de 4,3 kb (Figura 23) que corresponde à sequência codificadora do gene *BE2SI* e suas sequências regulatórias. O DNA genômico dos transformantes primários também foi digerido com *Eco* RI.

Todos os transformantes primários parecem carregar múltiplas cópias do gene quimérico inserido no genoma, conforme determinado por comparação densitométrica (Gel Doc 2000™, Bio Rad) da intensidade do sinal de hibridização. Nos transformantes obtidos por eletroporação, a planta 17 tem o maior número de cópias (aproximadamente 5 por genoma diplóide), enquanto as plantas 5, 8, 9 (1), 9 (2) e 16 possuem uma a três cópias. As plantas 3/1.16, 3/1.27 e 7/2.36 provenientes do bombardeamento com microprojéteis apresentam duas a três cópias do transgene inserido em seu genoma, enquanto 3/1.26 provavelmente carrega uma a duas cópias. O sinal mais intenso obtido na planta 3/1.27 é provavelmente devido à maior quantidade de DNA aplicada (Figura 23). O tamanho do genoma de *Stylosanthes guianensis* foi relatado por Arumuganathan & Earle (1991).

A maioria dos transformantes primários analisados (90%) apresenta mais de uma cópia do transgene. A inserção de múltiplas cópias do transgene é frequentemente associada à transformação direta (Matzke & Matzke, 1995a; Matzke & Matzke, 1995b; Christou et al., 1989).

Os transformantes 16 e 17 provenientes de eletroporação de protoplastos e todos os obtidos por biobalística apresentam uma banda de aproximadamente 4,0 kb e outra de 2,8 kb homólogas ou parcialmente homólogas à sonda. É provável que estes fragmentos correspondam a genes endógenos de albuminas de reserva de baixo coeficiente de sedimentação, pois estas são altamente conservadas em diferentes espécies (Guerche et

al., 1990; Youle & Huang, 1981; Youle & Huang, 1978b) e frequentemente fazem parte de famílias multigênicas (Krebbes et al., 1988). O mesmo sinal de 4,0 kb é observado na hibridização de DNA genômico de castanheiro do Pará (*Bertholletia excelsa*) com o fragmento de 4,3 kb correspondente ao gene quimérico.

A integração parcial do vetor de transformação e a fragmentação do DNA plasmidial durante do processo de transformação (De Block, 1993) também podem ser responsáveis pelo aparecimento destes fragmentos, embora seja menos provável devido à sua detecção em *B. excelsa*.

Embora considere-se que a via organogênica de regeneração siga um padrão multicelular, Christou (1990) e Christou et al. (1989) sugerem que plantas completas podem ser derivadas de um única célula transformada que passou por intensiva multiplicação celular, resultando em uma população de células uniformemente transformadas a partir das quais a organogênese se inicia, explicando a natureza clonal dos transformantes primários. Os resultados obtidos por eletroporação de protoplastos e por bombardeamento com micropartículas de calos com 30 dias de *S. guianensis* sugerem que as plantas transgênicas obtidas são provenientes de uma única célula transformada que posteriormente originou uma população de células a partir das quais o processo organogênico foi iniciado.

A análise molecular e genética da progênie dos regenerantes primários pode fornecer mais informações sobre a estrutura dos insertos (Aragão et al., 1996; Christou, 1995; Yang, 1993).

A técnica de Southern blot (Southern, 1975) foi utilizada na estimativa do número de cópias do transgene inserido e na determinação de sua estrutura por sua capacidade de detectar moléculas específicas em amostras biológicas de alta complexidade (Memelink et al., 1994) e pelo grande número de informações obtidas, dependendo do sítio de restrição da endonuclease empregada.

Figura 23 – Análise por Southern blot das plantas transformadas por biobalística. As plantas estão indicadas sobre as canaletas, S- : *S. guianensis* não transformado; pEA ats: 2S correspondente a 1 cópia do transgene por genoma haplóide de *Stylosanthes guianensis*; C : *Bertholletia excelsa*; MW : marcador de peso molecular (λ Hind III, GIBCO-BRL).

Figura 24 – Análise por Southern blot das plantas transformadas por eletroporação. As plantas estão indicadas sobre as canaletas, S- : *S. guianensis* não-transformado; pEA ats: 2S correspondente a 1 cópia do transgene por genoma haplóide de *Stylosanthes guianensis*; C : *Bertholletia excelsa*; MW: marcador de peso molecular (λ Hind III, GIBCO-BRL).

4.6. Expressão do gene *BE2SI*

4.6.1. Expressão transcricional

Foram detectados mRNAs específicos do gene *BE2SI* em folhas de estilosantes transgênicos (Figuras 25 e 26). Em outros órgãos da planta (raízes e caules), não foram encontrados níveis detectáveis de RNA correspondente ao transgene inserido.

O promotor *ats1 A*, usado na construção empregada neste estudo, é derivado do promotor regulado pela luz da subunidade menor da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase de *Arabidopsis thaliana* (De Almeida et al., 1989; Dedonder et al., 1993; Herrera-Estrella et al., 1984; Morelli et al., 1985).

É importante que proteínas de interesse sejam expressas sem prejuízo ao desenvolvimento das plantas nos sistemas heterólogos (Fhlur & Chua, 1989). Assim, o uso de promotores induzidos e específicos evita o desvio de intermediários metabólicos para a produção de uma proteína exógena quando esta não é necessária e/ou desejada (Benfey & Chua, 1989).

Em plantas transgênicas com gene repórter dirigido pelo promotor *ats1 A*, observou-se que a especificidade por tecido variou entre os transformantes individuais, estímulo da expressão pela luz e ausência da resposta de indução típica por fitocromo (De Almeida et al., 1989). Nas plantas transgênicas de *Stylosanthes*, o RNA correspondente à albumina 2S da castanha do Pará foi detectado exclusivamente em folhas (Figura 25 e 26). As quantidades foram pequenas para plantas provenientes de ambos os métodos de transformação, pois os tempos de exposição para a detecção de sinal foram muito longos, embora tenha-se utilizado condições intermediárias de estringência na hibridização e na lavagem das membranas (Sambrook et al., 1989).

A regulação da transcrição gênica pela luz em plantas é mediada por elementos regulatórios localizados, em sua maioria, *in cis* (Terzaghi & Cashmore, 1995). A especificidade da resposta conferida (Anderson et al., 1994; Kehoe et al., 1994), sua localização ubíqua (Menkens et al., 1995) e sua interação com diversos fatores de transcrição (Fuglevand et al., 1996) sugerem que estes elementos sejam compostos, isto

é, agregados de sequências cognatas que interagem para regular a expressão gênica (Argüello-Astorga & Herrera-Estrella, 1996; Terzaghi & Cashmore, 1995). Chory (1997) e Gilmartin et al. (1990) apresentam revisões recentes sobre os efeitos da luz na regulação da transcrição em plantas. As vias de transdução de sinais envolvidas são complexas e apenas recentemente começaram a ser elucidadas (Wei & Deng, 1999; Jarillo & Cashmore, 1998).

A transcrição e o acúmulo de mRNAs específicos do gene quimérico *BE2SI* podem estar sendo regulados ou modulados pela luz de forma ainda não esclarecida, levando aos baixos níveis detectáveis destes transcritos primários.

4.6.2 Expressão traducional

Apesar da observação de baixos níveis de transcritos do gene *BE2SI*, a albumina 2S foi detectada nas folhas de todas as plantas transgênicas (Figuras 25 e 26), os teores desta proteína foram semelhantes, conforme análise densitométrica (Gel Doc 2000™, Bio Rad).

A quantidade de proteína imunologicamente detectada não teve relação perceptível com o número de cópias do transgene, nem com a expressão do gene repórter, mantendo-se praticamente constante entre os transformantes individuais (Figuras 23 e 24).

Os peptídeos encontrados em todas as plantas testadas apresentaram o mesmo tamanho ($\cong$ 12 kD) em SDS-PAGE sob condições não redutoras (Ampe et al., 1986; Altenbach et al., 1987), onde a ponte dissulfeto, que mantém a subunidade menor de 3 kD ligada à maior de 9 kD, não é reduzida (Figura 27). Aparentemente, o processamento proteolítico da albumina 2S é semelhante em todos os indivíduos testados, pois não foram identificados polipeptídeos de tamanhos diferentes imunologicamente relacionados.

Figura 25 – Análise por Northern blot das plantas transformadas por eletroporação. As plantas estão indicadas sobre as canaletas, S- : *S. guianensis* não transformado; MW : marcador de peso molecular (RNA marker 0,28–6,58 kb, Promega).

Figura 26 – Análise por Northern blot das plantas transformadas por biobalística. As plantas estão indicadas sobre as canaletas, S- : *S. guianensis* não-transformado; MW : marcador de peso molecular (RNA marker 0,28–6,58 kb, Promega).

O propeptídeo de 18 kD não foi detectado nestes ensaios, embora uma banda mais fraca de maior tamanho tenha sido verificada nos ensaios de fracionamento celular (Figura 28). Saalbach et al. (1994) e Saalbach et al. (1995a) também detectaram apenas uma banda de aproximadamente 12 kD em plantas transgênicas de *Vicia narbonensis* expressando a albumina 2S do castanheiro do Pará.

As proteínas de reserva são transportadas para os corpos protéicos, compartimentos subcelulares semelhantes aos vacúolos especializados em armazenamento, pela via secretória (Chrispeels, 1985, Herman & Larkins, 1999). É importante que as proteínas de reserva expressas em sistemas heterólogos sejam corretamente processadas, montadas e direcionadas (Altenbach et al., 1989; De Clerq et al., 1990b; De Clerq et al., 1990a) devido aos mecanismos de controle de qualidade durante o transporte (Frigerio et al., 1998; Pedrazzini et al., 1997; Vitale & Denecke, 1999) e armazenamento (Hoffman et al., 1988). Neste estudo, foram realizados experimentos de fracionamento celular para a identificar o compartimento subcelular em que as albuminas 2S de *Bertholletia excelsa* expressas em *S. guianensis* acumulam-se.

O sinal de direcionamento da albumina 2S da castanha do Pará está localizado na extremidade carboxila, sendo essencial a presença do propeptídeo C-terminal (Saalbach et al., 1996). A associação do provável receptor para direcionamento vacuolar BP-80 (Kirsch et al., 1994) com o sinal da 2S foi observada em ensaios *in vivo* (Saalbach et al., 1996).

Observou-se que aproximadamente 66,7% do total das albuminas 2S detectadas se encontram na fração vacuolar (Figura 28A), enquanto que na fração contendo o restante das organelas não foram identificadas proteínas semelhantes. Portanto, há indicações de que a quase totalidade da albumina 2S é corretamente processada e direcionada em folhas de estílosantes.

Entretanto, estes resultados não são definitivos pois : (i) a contaminação entre as frações foi avaliada sem a utilização de ensaios com enzimas marcadoras (Houri et al., 1992; Saunders & Gillespie, 1984); (ii) as proteínas provenientes da fração vacuolar e secretada foram dialisadas, favorecendo a perda de moléculas pequenas; (iii) apenas três plantas foram analisadas. Análises de imunolocalização sob microscopia eletrônica de

transmissão podem definir o direcionamento das albuminas 2S para corpos protéicos em estilosantes transgênicos.

Os teores de metionina solúvel e protéica e bioensaios avaliando a resposta nutricional às plantas transgênicas podem vir a fornecer mais informações sobre o efeito dessa proteína exógena nas plantas de *S. guianensis*.

Figura 27 – SDS- 8 a 18 % PAGE das proteínas totais de folhas de plantas transgênicas de *S. guianensis*. As plantas estão indicadas sobre as canaletas. (E) plantas obtidas por eletroporação e (M) por biobalística. S- : *S. guianensis* não transformado; MW : marcador de peso molecular (SDS-PAGE low range, Sigma).

v

1

16

Figura 28 – (V) Isolamento de vacúolos de protoplastos de *S. guianensis* e (G) SDS- 8 a 18 % PAGE e análise por Western blot das proteínas intracelulares (fração p), secretadas (fração m) e vacuolares (fração v) das plantas transgênicas 1 e 16 de *S. guianensis*, S- : *S. guianensis* não transformado; MW : marcador de peso molecular (SDS-PAGE low range, Sigma).

Figura 29 - Plantas transgênicas de *S. guianensis* cv. Mineirão em sala de cultura e casa de vegetação.

5 CONCLUSÕES

Os estudos realizados neste trabalho permitiram que se chegasse às seguintes conclusões :

1) Métodos diretos de transformação genética, nominalmente eletroporação de protoplastos e biobalística, podem ser empregados para a obtenção de transformantes estáveis de *S. guianensis* cv. Mineirão de forma eficiente e reproduzível.

2) As condições mais adequadas para a transformação por biobalística incluíram o uso de : calos de 30 a 45 dias após a indução como explantes, pressão de gás hélio de 1200 psi, distância de vôo das micropartículas de 12, 5 cm e distância entre o gerador de onda de choque e a tela de retenção entre 10 e 20 mm.

3) A transformação por eletroporação de protoplastos foi mais eficiente com o emprego de tampão sem íons cloreto, DNA plasmidial linearizado e campo elétrico com intensidade de 250 V.cm^{-1} , descarregado por capacitor de $1000 \mu\text{F}$.

4) A eletroporação de tecidos íntegros é uma técnica promissora para a transformação genética de *S. guianensis* cv. Mineirão. O tipo de explante e a intensidade de campo têm efeito decisivo sobre a expressão transiente de genes repórteres nos tecidos eletroporados. A forma do DNA, o tipo de tampão de eletroporação e pré-tratamento com agentes osmóticos também influem, porém em menor extensão.

5) O gene quimérico da albumina 2S de *Bertholletia excelsa*, dirigido pela sequência promotora da subunidade menor da rubisco *ats1 A* e pela sequência terminadora da nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*, pode ser integrado de forma estável no genoma de plantas transgênicas de *S. guianensis* cv. Mineirão.

6) O gene quimérico da albumina 2S de *Bertholletia excelsa*, dirigido pela sequência promotora da subunidade menor da rubisco *ats1 A* e pela sequência terminadora da nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*, é expresso ao nível transcricional e traducional em plantas transgênicas de *S. guianensis* cv. Mineirão.

7) Há indicações que a albumina de reserva 2S de *Bertholletia excelsa* é corretamente processada e direcionada para corpos protéicos em *S. guianensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.A; YANG, S.F. Methionine metabolism in apple tissue : implications of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Plant Physiology**, v.60, n.6, p.892-896, 1977.
- AKELLA, V.; LURQUIN, P.F. Expression in cowpea seedlings of chimeric transgenes after electroporation into seed-derived embryos. **Plant Cell Reports**, v.12, p.110-117, 1993.
- ALLAWAY, W.H.; THOMPSON, J.F. Sulfur in the nutrition of plants and animals. **Soil Science**, v.101, n.4, p.240-247, 1966.
- ALTENBACH, S.B.; PEARSON, K.W.; LEUNG, F.W.; SUN, S.M.S.M. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a Brazil nut protein exceptionally rich in methionine. **Plant Molecular Biology**, v.8, n.3, p.239-250, 1987.
- ALTENBACH, S.B.; PEARSON, K.W.; MEEKER, G.; STARACI, L.C.; SUN, S.S.M. Enhancement of the methionine content of seed proteins by the expression of a chimeric gene encoding a methionine-rich protein in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v.13, n.5, p.513-522, 1989.
- ALVES, A.C.; QUECINI, V.M.; VIEIRA, M.L.C. Plant transformation : advances and perspectives. **Scientia Agricola**, v.56, n.1, p.1-7, 1999.

- ALWINE, J.C.; KEMP, D.J.; STARK, G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.74, p.5350-5354, 1977.
- AMPE, C.; DAMME, J. van; CASTRO, L.A.B.de; SAMPAIO, M.J.A.M.; MONTAGU, M.van; VANDEKERCKHOVE, J. The amino acid sequence of the 2S sulphur-rich proteins from seeds of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **European Journal of Biochemistry**, v.159, n.3, p.597-604, 1986.
- ANDERSON, J.W. Assimilation of inorganic sulphate in cysteine. In : STUMPF, P.K.; CONN, E.E. (Eds.) **The biochemistry of plants : a comprehensive treatise**. MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. (Eds.) Amino Acids and Derivatives. vol. 5. New York : Academic Press, 1980. cap.5, p.203-23.
- ANDERSON, S.L.; SOMERS, D.E.; MILLAR, A.J.; HANSON, K.; CHORY, J.; KAY, S.A. Attenuation of phytochrome A and B signaling pathways by the *Arabidopsis* circadian clock. **Plant Cell**, v.9, n.10, p.1727-1743, 1997.
- ANDRIGUETTO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMMING, J.S.; SOUZA, G.A. de; BONA FILHO, A. **Nutrição Animal : as bases e fundamentos da nutrição animal**. 4^a. ed. São Paulo : Nobel, 1988. 395p., vol. I.
- ANKENBAUER, R.G.; NESTER, E.W. The *Agrobacterium* Ti plasmid and crown gall tumorigenesis : A model for signal transduction in host-pathogen interactions. In : NESTER, E.W (Ed.) **Signal Transduction : Prokaryotic and Simple Eukaryotic Systems**. New York : Academic Press Inc., 1993. cap.4, 67-104.

- ARAGÃO, F.J.L.; BARROS, L.M.G.; BRASILEIRO, A.C.M.; RIBEIRO, S.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.152, n.3, p. 120-134, 1996.
- ARAGÃO, F.J.L.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; ALMEIDA, E.R.; GANDER, E.S.; RECH, E.L. Particle bombardment-mediated transient expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Plant Molecular Biology**, v.20, n.32, p.357-359, 1992.
- ARAGÃO, F.J.L.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; DAVEY, M.R.; BRASILEIRO, A.C.M.; FARIA, J.C.; RECH, E.L. Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an electrical particle acceleration device. **Plant Cell Reports**, v.12, n.9, p. 483-490, 1993.
- ARGÜELLO-ASTORGA, G.R.; HERRERA-ESTRELLA, L.R. Ancestral multipartite units in light responsive plant promoters have structural features correlating with specific phototransduction pathways. **Plant Physiology**, v.112, n.3, p.1151-1166, 1996.
- ARMALEO, D. ; YE, G.-N.; KLEIN, T.M.; SHARK, K.B.; SANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Current Genetics**, v.17, p.97-103, 1990.
- ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.9, n.10, p.208-218, 1991.
- ATKINS, C.A.; SMITH, P.M.C. Genetic transformation and regeneration of legumes. submetido, 1996.

- AUSTIN, S.; BINGHAM, E.T.; MATHEWS, D.E.; SHAHSAN, M.N.; WILL, J.; BURGESS, R.R. Production and field performance of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) expressing alpha-amylase and manganese-dependent lignin peroxidase. **Euphytica**, v.85, n.1/3, p.381-393, 1995.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: Greene Publishing Associates/Wiley –Interscience, 1990. 2v.
- BAKER, M.J.; AMOS, H.F.; NELSON, A.; WILLIAMS, C.C.; FROETSCHER, M.A. Undegraded intake protein : effects on milk production and amino acid utilization by cows fed wheat silage. **Canadian Journal of Animal Science**, v.76, n.3, p.367-76, 1996.
- BALLAS, N.; ZAKAI, N.; FRIEDBERG, D.; LOYTER, A. Linear forms of plasmid are superior to supercoiled structures as active templates for gene expression in plant protoplasts. **Plant Molecular Biology**, v.11, p.517-527, 1988.
- BARCELO, P.; HAGEL, C.; BECKER, D.; MARTIN, A.; LÖRZ, H. Transgenic cereal (tritordeum) plants obtained at high efficiency by microparticle bombardment of inflorescence tissue. **Plant Journal**, v.5, n.4, p.583-592, 1994.
- BATES, G.W.; CARLE, S.A.; PIASTUCH, W.C. Linear DNA introduced into carrot protoplasts by electroporation undergoes ligation and recircularization. **Plant Molecular Biology**, v.14, p.899-908, 1990.
- BECKER, D.; BRETTSCHEIDER, R.; LÖRZ, H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. **Plant Journal**, v.5, n.2, p.299-307, 1994.

- BENFEY, P.N.; CHUA, N.-H. Regulated genes in transgenic plants. **Science**, v.244, p.174-181, 1989.
- BERCHICHE, M.; LEBAS, F. Methionine supplementation of a diet based on horse bean : effects on growth rate, slaughter rate and carcass composition in rabbit. **World Rabbit Science**, v.2, n.4, p.135-40, 1994.
- BEVAN, M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. **Nucleic Acid Research**, v.12, n.22, p.8711-21, 1984.
- 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, n.3, p. 301-13, 1992.
- BIRCH, R.G.; FRANKS, T. Development and optimisation of microprojectile systems for plant genetic transformation. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.453-469, 1991.
- BISSIG, M.; HAGENBUCH, B.; STEIGER, B.; KOLLER, T.; MEIER, P.J. Functional expression cloning of the canalicular sulfate transport system of rat hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p.3017-3021, 1994.
- BOLLER, T.; KENDE, H. Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. **Plant Physiology**, v.63, p.1123-1132, 1979.
- BOMMINENI, V.R.; CHIBBAR, R.N.; DATLA, R.S.S.; TSANG, E.W.T. Transformation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos by microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports**, v.13, n.1, p.17-23, 1993.

- BOTREL, M. de A.; ALVIM, M.J.; XAVIER, D.F.; SALVATI, J.A. Evaluation of forage species in two areas of Campo das Vertentes, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.23, n.2, p.189-96, 1994.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRASILEIRO, A.C.M.; ARAGÃO, F.J.L.; ROSSI, S.; DUSI, D.M.A.; BARROS, L.M.G.; RECH, E.L. Susceptibility of common and tepary beans to *Agrobacterium* spp. strains and improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation using microprojectile bombardment. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.121, n.5, p.810-815, 1996.
- BRONSTEIN, I.; VOYTA, J.C.; MURPHY, O.J.; TIZARD, R.; EHRENFELS, C.W.; CATE, R.L. Detection of DNA in Southern Blots with chemiluminescence. **Methods in Enzymology**, v.217, p.398-414, 1993.
- BRUSSLAN, J.A.; KARLIN-NEUMANN, G.A.; HUANG, L.; TOBIN, E.M. An *Arabidopsis* mutant with a reduced level of *cab140* RNA is a result of cosuppression. **The Plant Cell**, v.5, n.6, p.667-77, 1993.
- CHABAUD, M.; LARSONNEAU, C.; MARMOUGET, C.; HUGUET, T. Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the *MtENOD12* nodulin promoter fused to the *gus* reporter gene. **Plant Cell Reports**, v.15, n.5, p.305-310, 1996.

- CHABAUD, M.; PASSIATORE, J.E.; CANNON, F.; WOLLASTON-BUCHANAN, V. Parameters affecting the frequency of kanamycin resistant alfalfa obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. **Plant Cell Reports**, v.7, n.7, p.512-516, 1988.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W.W.; PRASHER, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v.263, p.802-805, 1994.
- CHALUPA, W.; SNIFFEN, C.J. Protein and amino acid nutrition of lactating dairy cattle : today and tomorrow. **Animal Feed Science and Technology**, v. 58, n. 1-2, p.65075, 1996.
- CHAND, P.K.; OCHATT, S.J.; RECH, E.L.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Electroporation stimulates plant regeneration from protoplasts of the woody medicinal species *Solanum dulcamara* L. **Journal of Experimental Botany**, v.39, n.206, p.1267-1274, 1988.
- CHORY, J. Light modulation of vegetative development. **Plant Cell**, v.9, n.7, p.1225-1234, 1997.
- CHOWDHURY, M.K.U.; VASIL, I.K. Stably transformed herbicide callus of sugarcane via microprojectile bombardment of cell suspension cultures and electroporation of protoplasts. **Plant Cell Reports**, v.11, n.10, p.494-498, 1992.
- CHOWIRA, G.M.; AKELLA, V.; FUERST, P.E.; LURQUIN, P.F. Transgenic grain legumes obtained by in plant electroporation-mediated gene transfer. **Molecular Biotechnology**, v.5, n.2, p.85-96, 1996.

- CHOWIRA, G.M.; AKELLA, V.; LURQUIN, P.F. Electroporation-mediated gene transfer into intact nodal meristems *in planta* : generation of transgenic plants without *in vitro* tissue culture. **Molecular Biotechnology**, v.3, p.17-23, 1995.
- CHRISPEELS, M.J. Biosynthesis, intracellular transport and secretion of extracellular molecules. **Annual Review of Plant Physiology**, v.27, p.19-38, 1976.
- CHRISPEELS, M.J. Sorting of proteins in the secretory system. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.42, p.21-53, 1991.
- CHRISTOU, P. Biotechnology applied to grain legumes. **Field Crop Research**, v.53, n.1-3, p.83-97, 1997.
- CHRISTOU, P. Soybean transformation by electric discharge particle acceleration. **Physiologia Plantarum**, v.79, n.1, p.163-167, 1990.
- CHRISTOU, P. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. **Euphytica**, v.85, n.1-3, p.13-27, 1995.
- CHRISTOU, P.; McCABE, D.E.; SWAIN, W.F. Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. **Plant Physiology**, v.87, n.3, p.671-674, 1988.
- CHRISTOU, P.; SWAIN, W.F.; YANG, N.S.; McCABE, D.E. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.86, p.7500-7504, 1989.

- COATES, D.B. Diet selection by cattle grazing *Stylosanthes*-grass pastures in the seasonally dry tropics : effect of year, season, stylo species and botanical composition. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.36, n.7, p.781-9, 1996.
- COLBY, S.M.; MEREDITH, C.P. Kanamycin sensitivity of cultured tissues of *Vitis* sp. **Plant Cell Reports**, v.9, n.5, p.237-240, 1990.
- COLIN-SCHOELLEN, O.; LAURENT, F.; VIGNON, B.; ROBERT, J.C.; SLOAN, B. Interations of ruminally protected methionine and lysine with protein source or energy level in the diet of cows. **Journal of Dairy Science**, v.78, n.12, p.2807-18, 1995.
- CÔNSOLI, L. VEIRA, M.L.C.; SOUZA Jr., C.L.de; GARCIA, A.A.F. Tissue culture effects on quantitative traits in *Stylosanthes guianensis* (Leguminosae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, n.3, p.469-74, 1996.
- COSGROVE, D.J. Relaxation in a high-stress environment : the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. **Plant Cell**, v.9, p.1031-1041, 1997.
- COUREY, A.J.; WANG, J.C. Cruciform formation in a negatively supercoiled DNA may be kinetically forbidden under physiological conditions. **Cell**, v.33, p.817-829, 1983.
- CURTIS, M.D.; CAMERON, D.F.; MANNERS, J.M. Molecular evidence that diploid *Stylosanthes humilis* and diploid *Stylosanthes hamata* are progenitors of allotetraploid *Stylosanthes hamata* cv. Verano. **Genome**, v. 38, n.2, p.344-348, 1995.

- D'HONDT, K.; DAMME, J.van; BOSSCHE, C.van den; LEEJEERAJUMNEAN, S.; RYKE, R.de; DERKSEN, J.; VANDEKERCKHOVE, J.; KREBBERS, E. Studies of the role of the propeptides of the *Arabidopsis thaliana* 2S albumin. **Plant Physiology**, v.102, n.2, p.425-33, 1993.
- Da SILVA CONCEIÇÃO, A.; MARTY-MAZARS, D.; BASSHAM, D.C.; SANDERFOOT, A.A.; MARTY, F.; RAIKHEL, N.V. The syntaxin homolog AtPEP12p resides on a late post-Golgi compartment in plants. **Plant Cell**, v.9, p.571-582, 1997.
- DAMME, E.J.M.van; PEUMANS, W.J. Molecular cloning of two classes of Em-like proteins from the seeds of leguminous tree *Robinia pseudoacacia*. **Tree Physiology**, v.16, n.10, p.841-5, 1996.
- DATLA, R.S.; HAMMERLINDL, J.K.; PELCHER, L.E.; CROSBY, W.L.; SELVARAJ, G. A bifunctional fusion between beta-glucuronidase and neomycin phosphotransferase : a broad-spectrum marker enzyme for plants. **Gene**, v.101, p.239-246, 1991.
- DAVIES, D.R.; HAMILTON, J.; MULLINEAUX, P. Transformation of peas. **Plant Cell Reports**, v.12, n.3, p.180-183, 1993.
- De ALMEIDA, E.R.; GOSSELE, V.; MULLER, C.G.; DOCKX, J.; REYNAERTS, A.; BOTTERMAN, J.; KREBBERS, E.; TIMKO, M.P. Transgenic expression of two marker genes under the control of an *Arabidopsis rbcS* promoter : Sequences encoding the Rubisco transit peptide increase expression levels. **Molecular and General Genetics**, v.218, n.1, p.78-86, 1989.
- De BLOCK, M. The cell biology of transformation : current state, problems, prospects and the implication for the plant breeding. **Euphytica**, v.71, p.1-14, 1993.

- De CASTRO, L.A.B.; LACAVA, Z.; ARAMAYO, R.A.; SAMPAIO, M.J.; GANDER, E.S. Evidence for a precursor molecule of Brazil nut 2S seed protein from biosynthesis and cDNA analysis. **Molecular and General Genetics**, v.206, p.338-343, 1987.
- De CLERQ, A.; VANDEWIELE, M.; DAMME, J. van; GUERCHE, P.; MONTAGU, M. van; VANDEKERCKHOVE, J.; KREBBERS, E. Stable accumulation of modified 2S albumin seed storage proteins with higher methionine contents in transgenic plants. **Plant Physiology**, v.94, n.3, p.970-979, 1990a.
- De CLERQ, A.; VANDEWIELE, M.; De RYCKE, R.; DAMME, J. van; MONTAGU, M. van; KREBBERS, E.; VANDEKERCKHOVE, J. Expression and processing of an *Arabidopsis* 2S albumin in transgenic tobacco. **Plant Physiology**, v.92, n.4, p.899-907, 1990b.
- DEDONDER, A.; RETHY, R.; FREDERICK, H.; MONTAGU, M. van; KREBBERS, E. *Arabidopsis* rbcS genes are differentially regulated by light. **Plant Physiology**, v.101, n.3, p.801-808, 1993.
- DEKEYSER, R.; CLAES, B.; MARICHAL, M.; MONTAGU, M. van; CAPLAN, A. Evaluation of selectable markers for rice transformation. **Plant Physiology**, n.90, p.217-223, 1989.
- DEKEYSER, R.A.; CLAES, R.; DE RYCKE, R.M.U.; HABETS, M.U.; VAN MONTAGU, M.C.; CAPLAN, A.B. Transient gene expression in intact and organized rice tissues. **Plant Cell**, v.2, p.591-602, 1990
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep : version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, n.1, p.19-21, 1983.

- DELMER, D. A hot mutant for cellulose synthesis. **Trends in Plant Science**, v.3, p. 164-165, 1998.
- DENIS, M.; KREBBERS, E.; RENARD, M. Effect of sulphur levels on transgenic double-low *Brassica napus* plants expressing a seed-specific gene encoding a methionine-rich 2S albumin. **Plant Breeding**, v.115, n.3, p.145-151, 1996.
- DENIS, M.; VLIET, A. van; LEYSN, F.; KREBBERS, E.; RENARD, M. Field evaluation of transgenic *Brassica napus* lines carrying a seed-specific chimeric 2S albumin gene. **Plant Breeding**, v.114, n.2, p.97-107, 1995.
- DILLEN, W.; ENGLER, G.; VAN MONTAGU, M.; ANGENON, G. Electroporation-mediated DNA delivery to seedling tissues of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean). **Plant Cell Reports**, v.15, p.119-124, 1995.
- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis induced in immature tissues of *Stylosanthes scabra*. **Annals of Botany**, v.70, n.5, p.477-482, 1992.
- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA Jr. C.L.de Fonte e idade de explante, radiação luminosa e combinações de NAA e BAP na indução de calos em *Stylosanthes scabra* Vog. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, n.11/12, p.1901-9, 1991.
- DOWER, W.J.; MILLER, J.F.; RAGSDALE, C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high-voltage electroporation. **Nucleic Acid Research**, v.16, p.6127-6145, 1988.

- DRAPER, J. & SCOTT, R. Gene transfer to plants. In : GRIERSON, D.(Ed.) **Plant Genetic Engineering**. 2^a ed. London: Blackie Academic and Professional, 1994. cap.2, p.38-81. (Plant Biotechnology Series)
- DREW, H.R.; McCALL, M.J.; CALLADINE, C.R. Recent studies of DNA in the crystal. **Annual Review of Cell Biology**, v.4, p.1-20, 1988.
- DUPUIS, I.; PACE, G.M. Gene transfer to maize male reproductive structure by particle bombardment of tassel primordia. **Plant Cell Reports**, v.12, n.11, p.607-611, 1993.
- ECK, J. M. van; BLOWERS, A.D.; EARLE, E.D. Stable transformation of tomato cells cultures after bombardment with plasmid and YAC DNA. **Plant Cell Reports**, v.14, n.5, p.299-304, 1995.
- EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acid Research**, v.19, p.1349, 1991.
- EDYE, L.A. Agronomic variation and potential utilization of Stylosanthes. In : STACE, H.M.; EDYE, L.A. (Eds.) The biology and agronomy of Stylosanthes. Sydney : Academic Press, 1984. cap.5, p.547-570.
- ENGVALL, E.; PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) : quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v.8, p.871-879, 1971.
- ESTEVE-GARCIA, F.; BRUFAU, J.; ANGULO, F.; TUTOUR, L. le Substituiton of soybean meal by amino acids and barley in diets for growing and finishing pigs. **Investigación Agraria, Producción y Sanidad Animales**, v.10, n.3, p.189-99, 1995.

- FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Analytical Biochemistry**, v.132, p.6-13, 1983.
- FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. Addendum : a technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Analytical Biochemistry**, v.137, p.266-267, 1984.
- FINER, J.J.; McMULLEN, M.D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v.8, n.10, p.586-589, 1990.
- FINER, J.J.; VAIN, P.; JONES, M.W.; McMULLEN, M.D. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. **Plant Cell Reports**, v.11, p.323-328, 1992.
- FINNEGAN, J. & McELROY, D. Transgene inactivation : plants fight back ! **Bio/technology**, v.12, n.9, p.883-8, 1994.
- FITCH, M.M.M.; MANSHARDT, R.M.; GONSALVES, D.; SLIGHTOM, J.L.; SANFORD, J.C. Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports**, v.9, n.4, p.189-194, 1990.
- FLAVELL, B.R. Inactivation of gene expression in plants as consequence of specific sequence duplication. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.91, n.9, p.3490-6, 1994.
- FLUHR, R.; CHUA, N.-H. Developmental regulation of two genes encoding ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit in pea and transgenic *Petunia* plants : Phytochrome response and blue light induction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.83, p.2358-2362, 1986.

- FONTANA, G.S.; SANTINI, L.; CARETTO, S.; FRUGIS, G.; MARIOTTI, D. Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L. (chickpea). **Plant Cell Reports**, v.12, p.194-198, 1993.
- FRANKS, T.; BIRCH, R.G. Gene transfer into intact sugarcane cells using microprojectile bombardment. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.471-480, 1991.
- FRIGERIO, L.; VIRGILIO, M. de; PRADO, A.; FAORO, F.; VITALE, A. Sorting of phaseolin to the vacuole is saturable and requires a short C-terminal peptide. **Plant Cell**, v.10, n.6, p.1031-1042, 1998.
- FROMM, M.; CALLIS, J.; TAYLOR, L.P.; WALBOT, V. Electroporation of DNA and RNA into plant protoplasts. **Methods in Enzymology**, v.153, p.351-365, 1987.
- FROMM, M.E.; TAYLOR, L.P.; WALBOT, V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.82, p.5824-5828, 1985.
- FUGLEVAND, G.; JACKSON, J.A.; JENKINS, G.I. UV-B, UV-A, and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.8, n.12, p.2347-2357, 1996.
- GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J.E. Effects of tissue type and promoter strength on transient GUS expression in sugarcane following particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v.12, n.12, p.666-670, 1993.

- GANDER, E.S.; HOLMSTROEM, K.O.; PAIVA, G.R. de; CASTRO, L.A.B.de; CARNEIRO, M.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Isolation, characterization and expression of a gene coding for a 2S albumin from *Bertholletia excelsa* (Brazil nut). **Plant Molecular Biology**, v.16, n.3, p.437-48, 1991.
- GHEYSEN, G.; ANGENON, G.; MONTAGU, M. van Transgenic plants : *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and its use for crop improvement. In : MURRAY, J.A.H. (Ed.) **Transgenesis : Applications of Gene Transfer**. Chichester : John Wiley and Sons Publisher, 1992. cap.8, p.187-232.
- GILLIES, A.C.M.; ABBOTT, R.J. Phylogenetic relationships in the genus *Stylosanthes* (Leguminosae) based upon chloroplast DNA variation. **Plant Systematics and Evolution**, v.200, n.3-4, p.193-211, 1996.
- GILMARTIN, P.M.; SAROKIN, L.; MEMELINK, J.; CHUA, N.-H. Molecular light switches for plant genes. **Plant Cell**, v.2, n.5, p.369-378, 1990.
- GILMOUR, D.M.; DAVEY, M.R.; COCKING, E.C. Production of somatic hybrid tissues following chemical and electrical fusion of protoplasts from albino cell suspensions of *Medicago sativa* and *M. borealis*. **Plant Cell Reports**, v.8, n.1, p.29-32, 1989.
- GIOVANELLI, J.; HARVEY MUDD, S.; DATKO, A.H. Sulphur amino acids in plants. In : STUMPF, P.K.; CONN, E.E. (Eds.) **The biochemistry of plants : a comprehensive treatise**. MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. (Eds.) Intermediary Nitrogen Metabolism. vol. 16. New York : Academic Press, 1980. cap.12, p.453-505.
- GLOVER, B.J.; GILLIES, A.C.M.; ABBOTT, R.J. Use of polymerase chain reaction to investigate the delimitation of two agronomically important species of *Stylosanthes* (Aubl.) Sw. **Botanical Journal of Scotland**, v.47, n.1, p.83-96, 1994.

- GLUND, K.; TEWES, A.; ABEL, S.; LEINHOS, V.; WALTHER, R.; REINBOTHE, H. Vacuoles from cell suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*) – Isolation and characterization. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, v.113, p.151-161, 1984.
- GORMAN, I.; BALNAVE, D. The effect of dietary lysine and methionine concentrations on the growth characteristics and breast meat yields of Australian broiler chickens. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.46, n.8, p.1569-77, 1995.
- GRANT, J.E.; COOPER, P.A.; McARA, A.E.; FREW, T.J. Transformation of peas (*Pisium sativum* L.) using immature cotyledons. **Plant Cell Reports**, v.15, n.3-4, p.254-258, 1995.
- GUERCHE, P.; CHARBONNIER, M.; JOUANIN, L.; TOURNEUR, C.; PASZKOWSKI, J.; PELLETIER, G. Direct gene transfer by electroporation in *Brassica napus*. **Plant Science**, v.52, p.111-116, 1987.
- GUERCHE, P.; TIRE, C.; GROSSI DE SA, F.; De CLERQ, A.; MONTAGU, M. van; KREBBERS, E. Differential expression of the *Arabidopsis* 2S albumin genes and the effect of increasing gene family size. **Plant Cell**, v.2, n.5, p.469-478, 1990.
- GUINARD, J.; RULQUIN, H. Effects of graded amounts of duodenal infusions of methionine on the mammary uptake of major milk precursors in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.78, n.10, p.2196-2207, 1995.

- GUTIERREZ-MARCOS, J.F.; ROBERTS, M.A.; CAMPBELL, E.T.; WRAY, J.L.
Three members of a novel small gene family from *Arabidopsis thaliana* able to complement functionally and *Escherichia coli* mutant defective in PAPS reductase activity encode proteins with thioredoxin-like domain and “APS reductase” activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.93, n.23, p.13377-13382, 1996.
- HA, M.-A.; APPERLEY, D.C.; EVANS, B.W.; HUXHAM, I.M.; GORDON JARDINE, W.; VIËTOR, R.J.; REIS, D.; VIAN, B.; JARVIS, M.C. Fine structure in cellulose microfibrils : NMR evidence from onion and quince. **Plant Journal**, v.16, p.183-190, 1998.
- HAIN, R.; STABEL, P.; CZERNILOFSKY, A.P.; STEIBIB, H.H.; HERRERA-ESTRELLA, L.; SCHELL, J. Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene by plant protoplasts. **Molecular and General Genetics**, v.199, p.161-168, 1985.
- HANAHAN, D. Studies on the transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v.166, p.557-580, 1983.
- HARA-NISHIMURA, I.; NISHIMURA, M.; AKAZAWA, T. Biosynthesis and intracellular transport of 11S globulin in developing pumpkins cotyledons. **Plant Physiology**, v.77, n.3, p.747-752, 1985.
- HARA-NISHIMURA, I.; SHIMADA, T.; HATANO, K.; TAKEUCHI, Y.; NISHIMURA, M. Transport of storage proteins to protein storage vacuole is mediated by large precursor-accumulating vesicles. **Plant Cell**, v.10, p.825-836, 1998.

- HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies : a laboratory manual**. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Publishers, 1988. 471p.
- HARTMAN, C.L.; LEE, L.; DAY, P.R.; TUMER, N.E. Herbicide resistant turfgrass (*Agrotis palustris* Huds.) by biolistic transformation. **Bio/Technology**, v.12, n.9, p.919-923, 1994.
- HAUPTMANN, R.M.; OZIAS-AKINS, P.; VASIL, V.; TABAEIZADEH, Z.; ROGERS, S.G.; HORSCH, R.B.; VASIL, I.K.; FRALEY, R.T. Transient expression of electroporated DNA in monocotyledonous and dicotyledonous species. **Plant Cell Reports**, v.6, p.265-270, 1987.
- HELL, R. Molecular physiology of plant sulfur metabolism. **Planta**, v.202, n.2, 138-148, 1997.
- HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. Protein storage bodies and vacuoles. **Plant Cell**, v.11, n.4, p.601-613, 1999.
- HERRERA-ESTRELLA, L.R.; BROECK, G. van den; MAENHAUT, R.; MONTAGU, M. van; SCHELL, J.; TIMKO, M.; CASHMORE, A. Light-inducible and chloroplast-associated expression of a chimaeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti-plasmid vector. **Nature**, v.310, p.115-120, 1984.
- HINCHEE, M.; CONNOR-WARD, D.V.; NEWELL, C.A.; McDONNELL, R.E.; SATO, S.J.; GASSER, C.S.; FISCHHOFF, D.A.; RE, D.B.; FRALEY, R.T.; HORSCH, R.B. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Bio/Technology**, v.6, p.915-922, 1988.

- HOFFMAN, L.M.; DONALDSON, D.D.; HERMAN, E.M. A modified storage protein is synthesized, processed and degraded in the seeds of transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v. 11, p.717-729, 1988.
- HOFFMANN, L.V. Regeneração de plantas e expressão transiente de GUS em *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. via *Agrobacterium*. Piracicaba, 1996. 109p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- HOHL, I.; ROBINSON, D.G.; CHRISPEELS, M.J.; HINZ, G. Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without a chlatrin coat. **Journal of Cell Science**, v.109, p.2539-2550, 1996.
- HORSCH, R.B. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Bio/Technology**, v.6, n.8, p.923-926, 1988.
- 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, n.4635, p.1229-1231, 1985.
- HOURI, J.J.; OGIER-DENIS, E.; BAUVY, C.; AUBERY, M.; SAPIN, C.; TRUGNAN, G.; CODOGNO, P. Swainsonine is a useful tool to monitor the intracellular traffic of N-linked glycoproteins as a function of the state of enterocytic differentiation of HT-29 cells. **European Journal of Biochemistry**, v.205, n.3, p.1169-1174, 1992.
- HUNOLD, R.; BRONNER, R.; HAHNE, G. Early events in microprojectile bombardment : cell viability and particle location. **Plant Journal**, v.5, n.4, p.593-604, 1994.

- HURTAUD, C.; RULQUIN, H. Effect of the amino acid content of protein concentrates on milk composition and suitability for cheesemaking. In : RENCONTRES AUTOUR DES RECHERCHES SUR LES RUMINANTS, 1., Paris, 1994. **Resumés**. Paris : Institut de l'Elevage, 1994. p.109-112.
- JAIN, R.K.; JAIN, S.; WANG, B.; WU, R. Optimization of biolistic method for transient gene expression and production of agronomically useful transgenic Basmati rice plants. **Plant Cell Reports**, v.15, p.963-968, 1996.
- JANSEN, P.I.; EDYE, L.A. Variations within *Stylosanthes* spp. aff. *scabra* and comparison with its closest allies, *S. scabra* and *S. hamata*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.47, n.6, p.985-96, 1996.
- JARILLO, J.A.; CASHMORE, A.C. Enlightenment of the COP1-HY5 complex in photomorphogenesis. **Trends in Plant Science**, v.3, n.5, p.161-163, 1998.
- JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.W. GUS fusion : the β -glucuronidase as sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **Embo Journal**, v.6, p.3301-3307, 1987.
- JONES, J.D.G.; DUNSMUIR, P.; BEDBROOK, J. High level expression of introduced chimeric genes in regenerated transformed plants. **Embo Journal**, v.4, n.10, p.2411-2418, 1985.
- JUNG, R.; SAALBACH, G.; NIELSEN, N.C.; MÜNTZ, K. Site-specific limited proteolysis of legumin chloramphenicol acetyl transferase fusions *in vitro* and in transgenic tobacco seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.44, p.343-349, 1993.

- JURJANZ, S.; COLIN-SHOELLEN, O.; LAURENT, F. Effect of the starch nature of the energy concentrate and of a methionine supply on the rearing performance of dairy cows. **Annales de Zootechnie**, v.45, n.5, p.467-76, 1996.
- KAO, N. Chromosomal behaviour of somatic hybrids of soybean x *Nicotiana glauca*. **Molecular and General Genetics**, v.150, p.225-230, 1977.
- KARTHA, K.K.; CHIBBAR, R.N.; GEORGES, F.; LEUNG, N.; CASWELL, K.; KENDALL, E.; QURESCHI, J. Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports**, v.8, n.8, p.429-432, 1989.
- KARTHIKEYAN, A.S.; SARMA, K.S.; VELUTHAMBI, K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Vigna mungo* (L.) Hepper. **Plant Cell Reports**, v.15, n.5, p.328-331, 1996.
- KEHOE, D.M.; DEGENHARDT, J.; WINICOV, I.; TOBIN, E.M.; Two 10-bp regions are critical for phytochrome regulation of a *Lemna gibba* *Lhcb* gene promoter. **Plant Cell**, v.6, p.1123-1134, 1994.
- KETTER, J.S.; JARAI, G.; FU, Y.H.; MARZLUF, G.A. Nucleotide sequence, messenger RNA stability, and DNA recognition elements of *cys-14*, the structural gene for sulfate permease II in *Neurospora crassa*. **Biochemistry**, v.30, n.1780-1787, 1991.
- KHAN, M.R.I.; CERIOTTI, A.; TABE, L.; ARYAN, A.; McNABB, W.; MOORE, A.; CRAIG, S.; SPENCER, D.; HIGGINS, T.J.V. Accumulation of sulphur-rich seed albumin from sunflower in the leaves of transgenic subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). **Transgenic Research**, v.5, n.3, p.179-85, 1996.

- KIDWELL, K. Lateral gene transfer in natural populations of eukaryotes. **Annual Review of Genetics**, v.27, p.235-356, 1993.
- KIKKERT, J. The Biolistic® PDS-1000/HE device. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.33, n.3, p.221-226, 1993.
- KIKKERT, J.R.; HÉRBERT-SOULÉ, D.; WALLACE, P.G.; STRIEM, M.J.; REISCH, B.I. Transgenic plantlets of “Chancellor” grapevine (*Vitis* sp.) from biolistic transformation of embryogenic cell suspensions. **Plant Cell Reports**, v.15, n.5, p.311-316, 1996.
- KINOSITA, K.; TSONG, T.Y. Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.471, n.2, p.227-242, 1977.
- KIRSCH, T.; PARIS, N.; BUTLER, J.M.; BEEVERS, L.; ROGERS, J.C. Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.91, p.3403-3407, 1994.
- KIRSCH, T.; SAALBACH, G.; RAIKHEL, N.V.; BEEVERS, L. Interaction of a potential vacuolar targeting receptor with amino- and carboxyl-terminal targeting determinants. **Plant Physiology**, v.111, n.2, p.469-474, 1996.
- KLEIN, T.M.; ARENTZEN, R.; LEWIS, P.A.; FITZPATRICK-McELLIGOTT, S. Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. **Bio/Technology**, v.10, n.3, p.286-291, 1992.

- KLEIN, T.M.; FROMM, M.E.; WEISSINGER, A.; TOMES, D.; SCHAAF, S.; SLETTEN, M.; SANFORD, J.C. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.85, p.4305-4309, 1988a.
- KLEIN, T.M.; GRADZIEL, T.; FROMM, M.E.; SANFORD, J.C. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. **Bio/Technology**, v.6, p.559-563, 1988b.
- KLEIN, T.M.; HARPER, E.C.; SVAB, Z.; SANFORD, J.C.; FROMM, M.E.; MALIGA, P. Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.85, p.8502-8505, 1988c.
- KLEIN, T.M.; ROTH, B.A.; FROMM, M.E. Regulation of anthocyanin genes introduced into intact maize tissues by microprojectiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.86, p.6681-6685, 1989.
- KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R.; SANFORD, J.C. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, v.327, n.1, p.70-3, 1987.
- KOSUGI, S.; OHASHI, Y.; NAKAJIMA, K.; ARAI, Y. An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells : methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. **Plant Science**, v.70, p.133-140, 1990.
- KOUCHI, H.; HATA, S. Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed in early stages of soybean nodule development. **Molecular and General Genetics**, v.238, p.106-119, 1993.

- KREBBERS, E.; HERDIES, L.; DeCLERQ, A.; SEURINK, J.; LEUMANS, J.; DAMME, J. van; SEGURA, M.; GHEYSEN, G.; MONTAGU, M. van; VANDEKERCKHOVE, J. Determination of the processing sites of an *Arabidopsis* 2S albumin and characterization of the complete gene family. **Plant Physiology**, v.87, n.4, p.859-866, 1988.
- KWON-CHUNG, K.J.; GOLDMAN, W.E.; KLEIN, B.; SZANISZLA, P.J.; POLONELLI, L.; WALSH, T.J. Fate of transforming DNA in pathogenic fungi. **Medical Mycology**, v. 36, p.38-44, 1998.
- LACORTE, C.; ARAGÃO, F.J.L.; ALMEIDA, E.R.; MANSUR, E.; RECH, E.L. Transient expression of GUS and 2S albumin gene from Brazil nut in peanut (*Arachis hypogea* L.) seed explants using particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v.16, n.9, p.619-623, 1997.
- LANGRIDGE, W.H.R.; LI, B.J.; SZALAY, A.A. Uptake of DNA and RNA into cells mediated by electroporation. **Methods in Enzymology**, v.153, p.336-50, 1987.
- LEA, P.J. Nitrogen metabolism. In : LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C. (Eds.) **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. Chichester : John Wiley and Sons Ltd., 1993. cap. 7, p.155-80.
- LI, Y.H.; TREMBLAY, F.M.; SÉGUIN, A. Transient transformation of pollen and embryogenic tissues of white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) resulting from microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports**, v.13, n.12, p.661-665, 1994.
- LIN, C.H.; XIAO, L.; HOU, B.H. Optimization of electroporation conditions for expression of GUS activity in electroporated protoplasts and intact cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.35, p.959-968, 1997.

- LINDSEY, J.; JONES, M.G.K. The permeability of electroporated cells and protoplasts of sugar beet. **Planta**, v.172, p.346-355, 1987.
- LIU, C.J.; MUSIAL, J.M.; SMITH, F.W. Evidence for a low level of genomic specificity of sequence-tagged sites in *Stylosanthes*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, n. 5-6, p.864-8, 1996.
- MANNERS, J.M. Transformation of *Stylosanthes* spp. using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v.6, n.3, p.204-7, 1987.
- MANNERS, J.M. Transgenic plants of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*. **Plant Science**, v.55, n.1, 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, n.6, p.341-5, 1989.
- MARTIN, R.G.; AMES, B.N. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes : application to protein mixtures. **Journal of Biological Chemistry**, v.236, n.5, p.1372-1379, 1961.
- MATZKE, M.A.; MATZKE, A.J. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants : what does it really tell us? **Trends in Genetics**, v.11, n.1, p.1-3, 1995a.
- MATZKE, M.A.; MATZKE, J.A. How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? **Plant Physiology**, v.107, n.3, p.679-685, 1995b.
- McCABE, D.E.; CHRISTOU, P. Direct DNA transfer using electric discharge particle acceleration (ACCELL TM technology). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.33, n.3, p.227-236, 1993.

- McCABE, D.E.; MARTINELL, B.J. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. **Bio/Technology**, v.11, n.5, p.596-598, 1993.
- McCABE, D.E.; SWAIN, W.F.; MARTINELL, B.J.; CHRISTOU, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. **Bio/Technology**, v.6, n.8, p.923-926, 1988.
- McCLEAN, P.; CHEE, P.; HELD, B.; SIMENTAL, J.; DRONG, R.F.; SLIGHTOM, J. Susceptibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Agrobacterium* infection : transformation of cotyledonary and hypocotyl tissues. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.24, n.2, p.131-138, 1991.
- McELROY, D.; BRETELL, R.I.S. Foreign genes expression in transgenic cereals. **Trends in Biotechnology**, v.12, n.2, p.62-68, 1994.
- McKENTLY, A.H.; MOORE, G.A.; DOOSTDAR, H.; NIEDZ, R.P. *Agrobacterium*-mediated transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) embryo axes and the development of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v.14, n.11, p.699-703, 1995.
- MEIJER, E.G.M.; SZABADOS, L. Cell and tissue culture of *Stylosanthes* spp. In : BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry. Legumes and Oilseed crops, vol. 10**. Heidelberg : Springer-Verlag, 1990. cap. III.4, p.312-22.
- MEMELINK, J.; SWORDS, K.M.M.; STAEHELIN, L.A.; HOGE, H.C. Southern, Northern and Western blot analysis. In : GELVIN, S.B.; SCHILPERRORT, R.A. (Eds.) **Plant molecular biology manual**. Dordrecht : Kluwer Academic Press, 1994. Section F1. p1-23.

- MENDEL, R.R.; MÜLLER, B.; SCHULZE, J.; KOLESNIKOV, V.; ZELENIN, A. Delivery of foreign genes to intact barley cells by high-velocity microprojectiles. **Theoretical and Applied Genetics**, v.78, n.1, p.31-34, 1989.
- MENKENS, A.E.; SCHINDLER, U.; CASHMORE, A.R. The G-box : a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by GBF family of bZIP proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v.20, p.506-510, 1995.
- MILLER, E.A.; ANDERSON, M.A. Uncoating the mechanisms of vacuolar protein transport. **Trends in Plant Science**, v.4, n.2, p.46-48, 1999.
- MOLVIG, L.; TABE, L.M.; EGGUM, B.O.; MOORE, A.E.; CRAIG, S.; SPENCER, D.; HIGGINGS, T.J.V. Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.94, n.14, p.8393-8398, 1997.
- MORELLI, G.; NAGY, F.; FRALEY, R.T.; ROGERS, S.G.; CHUA, N.-H. A short conserved sequence is involved in the light-inducibility of a gene encoding ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit of pea. **Nature**, v.315, p.200-204, 1985.
- MORIKAWA, H.; IIDA, A.; YAMADA, Y. Transient expression of foreign genes in plant cells and tissues obtained by a simple biolistic device (particle-gun). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.31, n.3, p.320-322, 1989.
- MÜNTZ, K. Deposition of storage proteins. **Plant Molecular Biology**, v.38, n.1, p.77-99, 1998.

- MÜNTZ, K.; CHRISTOV, V.; SAALBACH, G. Genetic engineering for high methionine grain legumes. *Nahrung*, v.42, n.3-4, p.125-127, 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- NAKAMURA, K.; MATSUOKA, K. Protein targeting to the vacuole in plant cells. *Plant Physiology*, v.101, n.1, p.1-5, 1993.
- NANDADEVA, Y.L.; LUPI, C.G.; MEYER, C.S.; DEVI, P.S.; POTRYKUS, I.; BILANG, R. Microprojectile-mediated transient and integrative transformation of rice embryogenic suspension cells : effects of osmotic cell conditioning and of the physical configuration of plasmid DNA. *Plant Cell Reports*, v.18, n.6, p.500-504, 1999.
- NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimaeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *The Plant Cell*, v.2, n.4, p.279-89, 1990.
- NEGRUTIU, I.; SHILLITO, R.; POTRYKUS, I.; BIASINI, G.; SALA, F. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. *Plant Molecular Biology*, v.8, p.363-373, 1987.
- NEHRA, N.S.; CHIBBAR, R.N.; LEUNG, N.; CASWELL, K.; MALLARD, C.; STEINHAEUER, L.; BAGA, M.; KARTHA, K.K. Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct constructs. *Plant Journal*, v.5, n.2, p.285-297, 1994.

- NEUHUBER, F.; PARK, Y.D.; MATZKE, A.J.M.; MATZKE, M.A. Susceptibility of transgene *loci* to homology-dependent gene silencing. **Molecular and General Genetics**, v.244, n.3, p.230-241, 1994.
- NEUMANN, E.; KAKORIN, S.; TSONEVA, I. Calcium-mediated DNA adsorption to yeast cells and kinetics of cell transformation by electroporation. **Biophysics Journal**, v.71, p.868-877, 1996.
- NEUMANN, E.; SCHAEFER-RIDDER, M.; WANG, Y.; HOFSCHEIDER, P.H. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **Embo Journal**, v.1, n.7, p.841-845, 1982.
- NIEDZ, R.P.; SUSSMAN, M.R.; SATTERLEE, J.S. Green fluorescent protein : an *in vivo* reporter of plant gene expression. **Plant Cell Reports**, v.14, n.7, p.403-406, 1995.
- NONN, H.; PASLER, U.; JEROCH, H. Reduction of nitrogen excretion in piglet production by supply of required protein and supplementation of amino acids in cow feeding. **Archiv fur Tierzucht**, v.39, n.6, p.597-612, 1996.
- NORDLEE, J.A.; TAYLOR, S.L.; TOWNSEND, J.A.; THOMAS, L.A.; BEACH, L.R.; Transgenic soybean containing Brazil nut 2S storage protein : issues regarding allergenicity. In : EISENBRAND, G.; AULEPP, H.; DAYAN, A.D.; ELIAS, P.S.; GRINOW, W.; RING, J. SCHLATTER, J. (Eds.) FOOD ALLERGICS AND INTOLERANCES, 1., Johnston, 1996a. **Symposium**. Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1996. p.196-202.
- NORDLEE, J.A.; TAYLOR, S.L.; TOWNSEND, J.A.; THOMAS, L.A.; BUSH, R.K. Identification of a Brazil nut allergen in transgenic soybeans. **New England Journal of Medicine**, v.334, n.11, p.688-92, 1996b.

- NORDLEE, J.A.; TAYLOR, S.L.; TOWSEND, J.A.; THOMAS, L.A.; TOWSEND, R. Investigations of the allergenicity of Brazil nut 2S seed storage protein in transgenic soybean. In : FOOD SAFETY EVALUATION WORKSHOP, 1., Oxford, 1994. **Proceedings**. Paris : Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), 1996c. p.151-5.
- OARD, J. Development of an airgun device for particle bombardment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, n.3, p.247-250, 1993.
- OARD, J.H.; PAIGE, D.; DVORAK, J. Chimeric gene expression using maize intron in cultured cells of breadwheat. **Plant Cell Reports**, v.8, p.156-160, 1989.
- OARD, J.H.; PAIGE, D.F.; SIMMONDS, J.A.; GRADZIEL, T.M. Transient gene expression in maize, rice and wheat cells using an airgun apparatus. **Plant Physiology**, v.92, n.2, p.334-339, 1990.
- OCHATT, S.J.; CHAND, P.K.; RECH, E.L.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Electroporation-mediated improvement of plant regeneration from colt cherry (*Prunus avium x pseudocerasus*) protoplasts. **Plant Science**, v.54, p.165-169, 1988.
- OI, V.T.; HERZENBERG, L.A. Antibody purification : protein A-sepharose column chromatography. In : MISHELL, B.B.; SHIGI, S.M. (Eds.) **Selected methods in cellular immunology**. 1^a. ed. San Francisco : Freeman, 1980. p.368-370.
- OSBORNE, T.B. **The vegetable proteins**. London : Longman's Green Publishers, 1924. 2^a.ed. 312p.
- OVERTON, T.R.; LaCOUNT, D.W.; CICELA, T.M.; CLARK, J.H. Evaluation of a ruminally protected methionine product for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.4, p.631-8, 1996.

- PARIS, N.; ROGERS, S.W.; JIANG, L.W.; KIRSCH, T.; BEEVERS, L.; PHILLIPS, T.E.; ROGERS, J.C. Molecular cloning and further characterization of a probable plant vacuolar sorting receptor. **Plant Physiology**, v.111, n.1, p.29-39, 1997.
- PARTRIDGE, I. Protecting stylos from anthracnose. **Rural Research**, v.171, p.29-32, 1996.
- PATTON, R.A. Methionine nutrition in dairy cows remains difficult. **Feedstuffs**, v.68, n.11, p.13-4, 1996.
- PEDRAZZINI, E.; GIOVINAZZO, G.; BIELLI, A.; VIRGILIO, M. de; FRIGERIO, L.; PESCA, M.; FAORO, F.; BOLLINI, R.; CERIOTTI, A.; VITALE, A. Protein quality control along the route to the plant vacuole. **Plant Cell**, v.9, n.10, p.1869-1880, 1997.
- PEREIRA, L.R.; ERICKSON, L. Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v.14, n.5, p.290-293, 1995.
- PIEPENBRINK, M.S.; OVERTON, T.R.; CLARK, J.H. Response of cows fed a low crude protein diet to ruminally-protected methionine and lysine. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.9, p.1638-46, 1996.
- PISULEWSKI, P.M.; RULQUIN, H.; PEYRAUD, J.L.; VERITE, R. Lactational and systemic responses of dairy cows to postruminal infusions of increasing amounts of methionine. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n.10, p.1781-91, 1996.
- POTRYKUS, I. Gene transfer to plants : assessment and perspectives. **Physiologia Plantarum**, v.79, n.1, p.125-134, 1990.

- POTRYKUS, I. Gene transfer to plants : assessment of published approaches and results. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.42, p.205-225, 1991.
- RAI, P.; VERMA, N.C. Studies on evaluation of *Dichanthium annulatum* pasture with and without legume (*Stylosanthes hamata*) for sheep production. **Range Management and Agroforestry**, v.16, n.1., p.61-4, 1995.
- RECH, E.L.; GOLDS, T.J.; HAMMATT, N.; MULLIGAN, B.J.; DAVEY, M.R. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of the wild soybeans *Glycine canescens* and *G. clandestina* : production of transgenic plants of *G. canescens*. **Journal of Experimental Botany**, v.39, n.206, p.1275-1285, 1988a.
- RECH, E.L.; GOLDS, T.J.; HUSNAIN, T.; VAINSTEIN, M.H.; JONES, B.; HAMMATT, N.; MULLIGAN, B.J.; DAVEY, M.R. Expression of a chimeric kanamycin resistance gene into the wild soybean *Glycine canescens* using a cointegrated Ri plasmid vector. **Plant Cell Reports**, New York, **8** (1) : 8-33, 1989.
- RECH, E.L.; OCHATT, S.J.; CHAND, P.K.; DAVEY, M.R.; MULLIGAN, B.J.; POWER, J.B. Electroporation increases DNA synthesis in cultured plant protoplasts. **Bio/Technology**, v.6, p.1091-1093, 1988b.
- RECH, E.L.; OCHATT, S.J.; CHAND, P.K.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Electro-enhancement of division of plant protoplast-derived cells. **Protoplasma**, v.141, p.169-176, 1987.
- RECH, E.L.; VAINSTEIN, M.H.; DAVEY, M.R. An electrical particle acceleration gun for gene transfer into cells. **Technique**, v.3, n.1, p.143-9, 1991.

- REGISTER III, J.C. Approaches to evaluating the transgenic status of transformed plants. **Trends in Biotechnology**, v.15, n.4, p.141-146, 1997.
- REITER, W.-D. The molecular analysis of cell wall components. **Trends in Plant Science**, v. 3, p.27-32, 1998.
- RITTICH, B.; SPANOVA, A. Electrotransformation of bacteria by plasmid DNAs : statistical evaluation of a model quantitatively describing the relationship between the number of electrotransformants and DNA concentration. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v.40, p.233-238, 1996.
- RODENBURG, K.W.; DEGROOT, M.J.A.; SCHILPEROORT, R.A.; HOOYKAAS, P.J.J. Single stranded DNA used as an efficient new vehicle for transformation of plant protoplasts. **Plant Molecular Biology**, v.13, p.711-720, 1989.
- ROGERS, H.J; PARKES, H.C. Transgenic plants and the environment. **Journal of Experimental Botany**, v.46, p.467-488, 1995.
- ROSE, J.K.C.; BENNETT, A.B. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls : parallels between cell expansion and fruit ripening. **Trends in Plant Science**, v.4, n.5, p.176-183, 1999.
- RUSSELL, J.A.; ROY, M.K.; SANFORD, J.C. Major improvements in biolistic transformation of suspension-cultured tobacco cells. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v.28P, p.97-105, 1992a.
- RUSSELL, J.A.; ROY, M.K.; SANFORD, J.C. Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. **Plant Physiology**, v.98, n.3., p.1050-1056, 1992b.

- SAALBACH, G.; JUNG, R.; KUNZE, G.; SAALBACH, I.; ADLER, K.; MÜNTZ, K. Different legumin protein domains act as vacuolar targeting signals. **Plant Cell**, v.3, p.695-708, 1991.
- SAALBACH, G.; ROSSO, M.; SCHUMANN, U. The vacuolar targeting signal of the 2S albumin from Brazil nut resides at the C-terminus and involves the C-terminal propeptides as an essential element. **Plant Physiology**, v.112, n.3, p.975-985, 1996.
- SAALBACH, I.; PICKARDT, T.; MACHEMHEL, F.; SAALBACH, G.; SCHIEDER, O.; MUNTZ, K. A chimeric gene encoding the methionine-rich 2S albumin of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) is stably expressed and inherited in transgenic grain legumes. **Molecular and General Genetics**, v.242, n.2, p.226-36, 1994.
- SAALBACH, I.; PICKARDT, T.; WADDELL, D.R.; HILLMER, S.; SCHIEDER, O.; MÜNTZ, K. The sulphur-rich Brazil 2S albumin is specifically formed in transgenic seeds of grain legume *Vicia narbonensis*. **Euphytica**, v.85, n.1-3, p.181-192, 1995a.
- SAALBACH, I.; WADDELL, D.; PICKARDT, T.; SCHIEDER, O.; MUNTZ, K. Stable expression of the sulphur-rich 2S albumin gene in transgenic *Vicia narbonensis* increases the methionine content of seeds. **Journal of Plant Physiology**, v.145, n.5-6, p.674-81, 1995b.
- SABRI, N.; PELISSIER, B.; TEISSIE, J. Transient and stable electrotransformation of intact black Mexican sweet maize cells are obtained after preplasmolysis. **Plant Cell Reports**, v.15, p.924-928, 1996.

- SAGI, L.; REMY, S.; PANIS, B.; SWENNEN, R.; VOLCKAERT, G. Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cv. Bluggoe, ABB group) protoplasts isolated from regenerable embryogenetic cell suspension. **Plant Cell Reports**, v.13, p.262-266, 1994.
- SAMAC, D.A. Strain specificity in transformation of alfalfa by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.43, n.3, p.271-277, 1995.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning** : a laboratory manual, 2^a ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 v.
- SANDERFOOT, A.A.; AHMED, S.U.; MARTY-MAZAR, D.; RAPOPORT, I.; KIRCHHAUSEN, T.; MARTY, F.; RAIKHEL, N.V. A putative vacuolar cargo receptor partially colocalizes with AtPEP12p on a prevacuolar compartment in *Arabidopsis* roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.95, p.9920-9925, 1998.
- SANDERFOOT, A.A.; RAIKHEL, N.V. ...response : Uncoating the pathway to the vacuole in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, v.4, n.2, p.49, 1999a.
- SANDERFOOT, A.A.; RAIKHEL, N.V. The specificity of vesicle trafficking : coat proteins and SNAREs. **Plant Cell**, v.11, n.4, p.629-641, 1999b.
- SANFORD, J.C. The biolistic plant transformation. **Physiologia Plantarum**, v.79, n.1, p.206-9, 1990.
- SANFORD, J.C. The biolistic process. **Trends in Biotechnology**, v.6, n.12, p.299-302, 1988.

- SANFORD, J.C.; DEVIT, M.J.; RUSSELL, J.A.; SMITH, F.D.; HARPENDING, P.R.; ROY, M.K.; JOHNSTON, S.A. An improved, helium-driven biolistic device. **Technique**, v.3, n.1, p.3-16, 1991.
- SANFORD, J.C.; SMITH, F.D.; RUSSELL, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzymology**, v.217, p.483-509, 1993.
- 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, n.1-2, p.119-27, 1994.
- SAUNDERS, J.A.; GILLESPIE, J.M.; Localization and substrate specificity of glycosidases in vacuoles of *Nicotiana rustica*. **Plant Physiology**, v.76, n.4, p.885-888, 1984.
- SAUNDERS, J.A.; LIN, C.H.; HOU, B.H. Rapid optimization of electroporation conditions for plant cells, protoplasts and pollen. **Molecular Biotechnology**, v.3, p.181-190, 1995.
- SAUTTER, C. Development of a microtargeting device for particle bombardment of plant meristems. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.33, n.3, p.251-257, 1993.
- SAUTTER, C.; WALDNER, H.; NEUHAUS, U.R.L.; GALLI, G.; NEUHAUS, G.; POTRYKUS, I. Micro-targeting : high-efficiency gene transfer using a novel approach for the acceleration of micro-projectiles. **Bio/Technology**, v.9, p.1080-1085, 1991.

- SCHIFF, J.A.; STERN, A.I.; SAIDHA, T.; LI, J. Some molecular aspects of sulfate metabolism in photosynthetic organisms. In : DeKOK, L.J.; STULEN, I.; RENNENBERG, H.; BRUNOLD, C.; RAUSER, W.E. (Eds.) **Sulfur nutrition and assimilation in higher plants. Regulatory, agricultural and environmental aspects.** The Hague : SPB Academic Publishers, 1993. p.21-36.
- SCHLÜTER, K.; FÜTTERE, J.; POTRYKUS, I. "Horizontal" gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Ervwinia chrysanthemi*) occurs – if at all – at an extremely low frequency. **Bio/Technology**, v.13, p.1094-1098, 1995.
- SCHROEDER, H.E.; SCHOTZ, A.H.; WARDLEY-RICHARDSON, T.; SPENCER, D.; HIGGINS, T.J.V. Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisium sativum* L.). **Plant Physiology**, v.101, n.3, p.751-757, 1993.
- SCHULZ, A.; WENGENMAYER, F.; GOODMAN, H.M. Genetic engineering of herbicide resistance in higher plants. **Critical Reviews in Plant Science**, v.9, 1-15, 1990.
- SCHUTTE, J.B.; JONG, J. de Biological efficacy of DL-methionine hydroxy analog free acid compared to DL-mehionine in broiler chicks as determined by performance and breast meat yield. **Agrobiological Research**, v.49, n.1, p.74-82, 1996.
- SCHUTTE, J.B.; PACK, M. Effects of dietary sulphur-containing amino acids on performance and breast meat deposition of broiler chicks during the growing and finishing phases. **British Poultry Science**, v.36, n.5, p.747-762, 1995.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D.; KASHA, K.J.; PROCUNIER, J.D. Direct DNA uptake during the imbibition of cells. **Plant Science**, v.79, p.223-228, 1991.

- SERRES, R.; STANG, E.; McCABE, D.; RUSSELL, D.; MAHR, D.; McCOWN, B. Gene transfer using electric discharge particle bombardment and recovery of transformed cranberry plants. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.117, n.1, p.174-180, 1992.
- SETYA, A.; MURILLO, M.; LEUSTEK, T. Sulfate reduction in higher plants : molecular evidence for a novel 5'-adenylylsulfate reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.93, n.23, p.13383-13388, 1996.
- SHARK, K.D.; SMITH, F.D.; HAPENDING, P.R.; RASMUSSEN, J.L.; SANFORD, J.C. Biolistic transformation of a prokaryote, *Bacillus megaterium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.480-485, 1992.
- SHEWRY, P.R.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A.S. Seed storage proteins : Structures and biosynthesis. **Plant Cell**, v.7, p.945-956, 1995.
- SHILLITO, R.D. ; POTRYKUS, I. Direct gene transfer to protoplasts of dicotyledonous and monocotyledonous plants by a number of methods, including electroporation. **Methods in Enzymology**, v.153, p.313-35, 1987.
- SHILLITO, R.D.; SAUL, M.W.; PASZKOWSKI, J.; MÜLLER, M.; POTRYKUS, I. High efficiency direct gene transfer to plants. **Bio/Technology**, v.3, n.12, p.1099-1103, 1985.
- SHIMOGAWARA, K.; FUJIWARA, S.; GROSSMAN, A. High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. **Genetics**, v.148, p.1821-1828, 1998.
- SHOWALTER, A.M. Structure and function of plant cell wall proteins. **Plant Cell**, v.5, p.9-23, 1993.

- SCHWENN, J.D. Photosynthetic sulphate reduction. **Zeitschrift fur Naturforsch**, v.49c, p.531-539, 1994.
- SIVAMANI, E.; SHEN, P.; OPALKA, N.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. Selection of large quantities of embryogenic calli from indica rice seeds for production of fertile transgenic plants using the biolistic method. **Plant Cell Reports**, v.15, n.5, p.322-327, 1996.
- SKLAN, D.; TINSKY, M. Production response of high producing cows fed rumen bypass DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid coated with calcium soaps of fatty acids. **Livestock Production Science**, v.45, n.2-3, p.149-54, 1996.
- SMITH, F.D.; JOFRE-GARCIAS, A.; L, SANFORD, J.C. Transformation of bean apical dome cells by microprojectile bombardment. **Phytopathology**, v.82, n.10, p.1167, 1992.
- SMITH, F.W.; EARLING, P.M.; HAWKESFORD, M.J.; CLARKSON, D.T. Plant members of a family of sulfate transporters reveal function subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, n.20, p.9373-9377, 1995a.
- SMITH, F.W.; HAWKESFORD, M.J.; PROSSER, I.M.; CLARKSON, D.T. Isolation of a cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high affinity sulphate transporter at the plasma membrane. **Molecular and General Genetics**, v.247, n.6, p.709-715, 1995b.

- SONGSTAD, D.D.; HALAKA, F.G.; DEBOER, D.L.; ARMSTRONG, C.L.; HINCHEE, M.A.W.; FORD-SANTINO, C.G.; BROWN, S.M.; FROMM, M.E.; HORSCH, R.B. Transient expression of GUS and anthocyanin constructs in intact maize immature embryos following electroporation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, p.195-201, 1993.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v.98, n.3, p.503-17, 1975.
- SOUZA COSTA, N.M.; FERREIRA, M.B. Some Brazilian species of *Stylosanthes*. In : STACE, H.M.; EDYE, L.A. (Eds.) The biology and agronomy of *Stylosanthes*. Sydney : Academic Press, 1984. cap.2, p.23-48.
- STÖGER, E.; FINK, C.; PFOSSER, M.; HEBERLE-BORS, E. Plant transformation by particle bombardment of embryogenic pollen. **Plant Cell Reports**, v.14, n.5, p.273-278, 1995.
- TABOADA, F.; MENDEZ, J.; BLAS, J.C.de The response of highly productive rabbits to dietary sulphur amino acid content for reproduction and growth. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.36, n.2, p.191-203, 1996.
- TADA, Y.; SAKAMOTO, M.; FUJIMURA, T. Efficient gene introduction into rice by electroporation and analysis of transgenic plants : use of electroporation buffer lacking chloride ions. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.475-480, 1990.
- TAKEUCHI, Y.; DOTSON, M.; KEEN, N.T. Plant transformation : a simple particle bombardment device based on flowing helium. **Plant Molecular Biology**, v.18, p.835-839, 1992.
- TANAKA, T.; Gels. **Scientific American**, v.244, n.1, p.124-138, 1981.

- TANAKA, T.; NISHIHARA, M.; SEKI, M.; SAKAMOTO, A.; TANAKA, K.; IRIFUNE, K.; MORIKAWA, H. Successful expression in pollen of various plant species of *in vitro* synthesized mRNA introduced by particle bombardment. **Plant Molecular Biology**, v.28, n.2, p.337-341, 1995.
- TARAWALI, S.A.; PETERS, M. The potential contribution of selected forage legume pastures to cereal production in crop-livestock farming systems. **Journal of Agricultural Science**, v.127, n.2, p.175-82, 1996.
- TERZAGHI, W.B.; CASHMORE, A.R. Light-regulated transcription. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.46, p.445-474, 1995.
- TOMES, D.T.; WEISSINGER, A.K.; ROSS, M.; HIGGINS, R.; DRUMMOND, B.J.; SCHAAF, S.; MALONE-SCHONEBERG, J.; STAEBELL, M.; FLYNN, P.; ANDERSON, J.; HOWARD, J. Transgenic tobacco plants and their progeny derived by microprojectile bombardment of tobacco leaves. **Plant Molecular Biology**, v.14, n.2, p.261-268, 1990.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.76, p.4350-4354, 1979.
- TU, H.M.; GODFREY, L.W.; SUN, S.S.M. Expression of the Brazil nut methionine-rich protein and mutants with increased methionine in transgenic potato. **Plant Molecular Biology**, v.37, n.5, p.829-838, 1998.

- ULRICH, C.; VERA, R.R.; WENIGER, J.H. Milk yield from dual-purpose cows grazed on grass or mixed grass-legume pastures. **Pasturas Tropicales**, v.16, n.3, p.27-30, 1994.
- URQUIAGA, S.; GILLER, K.F.; MIRANDA, C.; CADISH, G.; COOK, H.F.; LEE, H.C. Tracing mechanisms of nitrogen transfer from legume to grass in tropical pastures. In : INTERNATIONAL CONFERENCE ON SUSTAINABLE AGRICULTURE, 3., London, 1993. **Proceedings**. Ashford : Wye College Press, 1995. p.104-112.
- VAIN, P.; KEEN, N.; MURILLO, J.; RATHUS, C.; NEMES, C.; FINER, J.J. Development of the particle inflow gun. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, n.3, p.237-246, 1993.
- VAIN, P.; McMULLEN, M.D.; FINER, J.J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cell Reports**, v.12, p.84-88, 1993.
- VAN DER KROL, A.R.; MUR, L.A.; BELD, M.; MOL, J.N.M.; STUITJE, A.R. Flavonoid genes in petunia : addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **The Plant Cell**, v.2, n.4, p.291-9, 1990.
- VANCANNEYT, 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.245-250, 1990.

- VANDER STAPPEN, J. ; VAN CAMPENHOUT, S.; LOPEZ, S.G. Sequencing of the internal transcribed spacer region ITS1 as a molecular tool detecting variation in the *Stylosanthes* species complex. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, n.6-7, p.869-877, 1998.
- VARNER, J.E.; LIN, L.-S. Plant cell wall architecture. **Cell**, v.52, p.231-239, 1989.
- VASIL, V.; SRIVASTAVA, V.; CASTILLO, A.M.; FROMM, M.E.; VASIL, I.K. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. **Bio/technology**, v.11, p.1553-1558, 1993.
- VIEIRA, M.L.C. Protoplastos vegetais. In : ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 7., Piracicaba, 1990. **Anais**. Piracicaba : FEALQ, 1990. p.19-23.
- VIEIRA, M.L.C.; FUNGARO, M.H.P.; JUBIER, M.F.; LEJEUNE, B. Determination of taxonomic relationships among Brazilian taxa of *Stylosanthes* SW., Leguminosae, using RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.3, p.305-310, 1997.
- VIEIRA, M.L.C.; JONES, B.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R. Plant regeneration from protoplasts isolated from seedling cotyledons of *Stylosanthes guianensis*, *S. macrocephala* and *S. scabra*. **Plant Cell Reports**, v.9, n.5, p.289-92, 1990.
- WAHL, G.M.; MEINKOTH, J.L.; KIMMEL, A.R. Northern and Southern Blots. **Methods in Enzymology**, v. 152, p.572-581, 1987.
- WALBOT, V. **Gene pulser[®] electroprotocols**. Hercules : Bio-Rad Laboratories, 1993. survey number 181, 882p.

- WALTER, C.; SMITH, D.R.; CONNETT, M.B.; GRACE, L.; WHITE, D.W.R. A biolistic approach for the transfer and expression of a *gusA* reporter gene in embryogenic cultures of *Pinus radiata*. **Plant Cell Reports**, v.14, n.2/3, p.69-74, 1994.
- WANG, Y.C.; KLEIN, T.M.; FROMM, M.; CAO, J.; SANFORD, J.C.; WU, R. Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. **Plant Molecular Biology**, v.11, n.4, p.433-439, 1988.
- WEI, N.; DENG, X.-W. Making sense of the COP9 signalosome : a regulatory protein complex conserved from *Arabidopsis* to human. **Trends in Genetics**, v.15, n.3, p.98-103, 1999.
- WOJTASZEK, P.; BOLWELL, G.P. Secondary cell-wall-specific glycoprotein(s) from French bean hypocotyls. **Plant Physiology**, v.108, p.1001-1012, 1995.
- WORDRAGEN, M.F. van; DONS, H.J.M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of recalcitrant crops. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.10, p.12-36, 1992.
- WÜNN, J.; KLÖTI, A.; BURKHARDT, P.K.; GHOSH BISWAS, G.C.; LAUNIS, K.; IGLESIAS, V.A.; POTRYKUS, I. Transgenic indica rice breeding line IR 58 expressing a synthetic *cryIA (b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. **Bio/Technology**, v.14, p.171-176, 1996.
- XU, X.; LI, B. Fertile transgenic Indica rice plants obtained by electroporation of the seed embryo cells. **Plant Cell Reports**, v.13, p.237-242, 1994.

- YAMAUCHI, D.; MINAMIKAWA, T. Improvement of the nutritional quality of legume seed storage proteins by molecular breeding. **Journal of Plant Research**, v.111, n.1101, p.1-6, 1998.
- YANG, N.S. Transgenic plants from legumes. In : KUNG, S.D. & WU, R. (Eds.) **Transgenic Plants**. San Diego: Academic Press, 1993. cap.5, p.79-102 / vol.2.
- YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J.; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains : nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC 19 vectors. **Gene**, v.33, p.103-119, 1985.
- YE, X.; WANG, Z. -Y, WU, X., POTRYKUS, I., SPANGENBERG, G. Transgenic italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. **Plant Cell Reports**, v. 16, p.379-384, 1997.
- YEPES, L.M.; MITTAK, V.; PANG, S.Z.; GONSALVES, C.; SLIGHTOM, J.L.; GONSALVES, D. Biolistic transformation of chrysanthemum with the nucleocapsid gene of tomato spotted wilt virus. **Plant Cell Reports**, v.14, n.11, p.694-698, 1995.
- YOULE, R.J.; HUANG, A.H.C. Albumin storage proteins in the protein bodies of castor bean. **Plant Physiology**, v. 61, n.1, p.13-16, 1978a.
- YOULE, R.J.; HUANG, A.H.C. Evidence that the castor bean allergens are the albumin storage proteins in the protein bodies of castor bean. **Plant Physiology**, v.61, n.6. p.1040-1042, 1978b.
- YOULE, R.J.; HUANG, A.H.C. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. **American Journal of Botany**, v.68, n.1, p.44-8, 1981.

YOULE, R.J.; HUANG, A.H.C. Protein bodies from the endosperm of castor bean : subfractionation, protein components, lectins and changes during germination. **Plant Physiology**, v.58, n.6, p.703-709, 1976.

ZABLACKIS, E.; HUANG, J.; MÜLLER, B.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant Physiology**, v.107, p.1129-1138, 1995.

•
ZHANG, S.; CHEN, L.; QU, R.; MARMEY, P.; BEACHY, R.; FAUQUET, C. Regeneration of fertile transgenic indica (group I) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells. **Plant Cell Reports**, v.15, p.465-469, 1996.

•
ZHONG, H.; BOLYARD, M.G.; SRINIVASAN, C.; STICKLEN, M.B. Transgenic plants of turfgrass (*Agrotis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. **Plant Cell Reports**, v.13, n.1, p.1-6, 1993.

APÊNDICE 1

MEIOS DE CULTURA PARA *Escherichia coli*

1. Meio LB

componente	quantidade para preparo de 1 L (g)
Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	10

- completar o volume com água deionizada para 1 L
- ajustar o pH do meio para 7,5 com NaOH 0,1 N
- autoclavar por 20 minutos a 121 °C

2. Meio LB sólido

componente	quantidade para preparo de 1 L (g)
Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	10
ágar	16

- completar o volume com água deionizada para 1 L
- ajustar o pH do meio para 7,5 com NaOH 0,1 N
- autoclavar por 20 minutos a 121 °C
- esfriar a 45°C, adicionar o(s) antibiótico(s) necessário(s)
- verter 12 mL por placa de Petri descartável ou 20 mL para placa de vidro

APÊNDICE 2

MEIOS PARA CULTIVO DE PLANTAS *IN VITRO*

1. Meio MS (Murashige & Skoog, 1972)

Categoria		Quantidade (p/ 1 L)
Macronutrientes (g)	NH ₄ NO ₃	1,650
	KNO ₃	1,900
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,440
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,370
	KH ₂ PO ₄	0,170
Micronutrientes (mg)	ZnSO ₄	8,600
	H ₃ BO ₃	6,200
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,300
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	KI	0,830
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Fe EDTA (mg)	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,800
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,300
Vitaminas (mg)	inositol	100,000
	ácido nicotínico	0,500
	piridoxina-HCl	0,500
	tiamina-HCl	0,100
	glicina	2,000
Fonte de Carbono	sacarose	3 % (p/v)
agente solidificante	Phytigel (Sigma)	0,18% (p/v)
pH		5,8

- preparar soluções-estoque 1 M para cada macronutriente
- preparar soluções-estoque 10 X contendo todos os micronutrientes
- preparar soluções-estoque 10 X para cada vitamina
- preparar solução-estoque FeEDTA 50 X

dissolver o Na_2EDTA em um pequeno volume da água deionizada aquecida

dissolver o FeSO_4 em um pequeno volume de água deionizada aquecida

misturar os dois, completar o volume e deixar agitando para aerar

- As soluções-estoque devem ser mantidas a 4°C em frascos fechados.
- A solução de FeEDTA deve ser mantida em frasco escuro a 4°C .
- O meio deve ser autoclavado por 20 minutos a 121°C .

2. Meio CPW

- Preparo dos estoques

	Componente	Quantidade p/ 500 mL
Estoque A (g)	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,400
Estoque B (mg)	KH_2PO_4	136,000
	KNO_3	505,000
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1230,000
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,800
	KI	0,125

- autoclavar os estoques por 20 minutos a 121°C
- após resfriados à temperatura ambiente, armazenar a 4°C

- **Preparo do meio**

Componente		Quantidade para 500 mL
Estoque A		50 mL
Estoque B		50 mL
Agente tamponante	MÊS	0,11% (p/v)
Osmótico*	manitol	40 g
pH		5,7

* A quantidade de osmótico é dependente do material com que se trabalha. O valor fornecido é adequado para *Nicotiana tabacum* e *Stylosanthes guianensis*.

- autoclavar em alíquotas de 50 mL por 20 min a 121°C
- armazenar a temperatura ambiente em frascos fechados

3. MEIOS PARA CULTIVO DE PROTOPLASTOS

(Kao, 1977) modificado por Gilmour et al. (1989)

- Preparo dos estoques

Categoria		Quantidade (mg) p/ 500 mL
Sais Minerais	NH_4NO_3	600,000
	KNO_3	1900,000
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	600,000
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	300,000
	KH_2PO_4	170,000
	KCl	300,000
	KI	0,750
	H_3BO_3	3,000
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,000
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,000
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,250
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
FeEDTA	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,800
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,300
Ácidos orgânicos		
	piruvato de sódio	5,000
	ácido cítrico	10,000
	ácido málico	10,000
	ácido fumárico	10,000

Categoria		Quantidade p/ 500 mL
Açúcares (g)		
	frutose	0,125
	ribose	0,125
	xilose	0,125
	manose	125 FL
	ramnose	0,125
	celobiose	0,125
	sorbitol	0,125
	manitol	0,125
Vitaminas (mg)		
	inositol	100,000
	nicotinamida	1,000
	piridoxina	1,000
	tiamina	1,000
	pantotenato de cálcio	0,500
	ácido γ -aminobenzóico	0,010
	biotina	0,005
	riboflavina	0,100
	ácido ascórbico	1,000
	vitamina A	0,005
	vitamina D3	0,005
	vitamina B12	0,010

- preparar estoques 10 X concentrados, dividir em alíquotas de 20 mL e armazenar a -20°C em frascos escuros.

- Preparo dos meios

KM8P (2X)		
Componente		Quantidade para 1 mL
Sais minerais	10 X	20 mL
Vitaminas	10 X	15 mL
Água de côco		10 mL
Caseína hidrolisada		125 mg
FeEDTA	estoque MS	5 mL
glicose		100 g
sacarose		250 mg
2,4 D		0,2 mg
zeatina		0,5 mg
NAA		1,0 mg

KM8 (2X)		
Componente		Quantidade para 1 L
Sais minerais	10 X	20 mL
Vitaminas	10 X	15 mL
Água de côco		10 mL
Caseína hidrolisada		125 mg
FeEDTA	estoque MS	5 mL
glicose		10 g
sacarose		20 g
2,4 D		0,1 mg
zeatina		0,2 mg
NAA		1,0 mg

- ajustar o pH para 5,7 com NaOH 1 N
 - esterilizar por filtração (filtro nitrocelulose 0,2 μ m) em câmara asséptica, dividir em aliquotas de 20 mL em frascos pequenos autoclavados e armazenar a -20°C .

4. ESTOQUES DE FITORREGULADORES

Hormônio	Solvente	Concentração estoque
2,4-D	NaOH 1 N ou etanol	1 mg.mL ⁻¹
zeatina	NaOH 1 N ou etanol	1 mg.mL ⁻¹
NAA	NaOH 1N ou etanol	1 mg.mL ⁻¹
BAP	NaOH 1N ou etanol	1 mg.mL ⁻¹

* Importante : zeatina não suporta autoclavagem.
 esterilizar por filtração (filtro nitrocelulose 0,2 μ m)

APÊNDICE 3

SOLUÇÕES E TAMPÕES PARA ÁCIDOS NUCLEÍCOS

1. SSC 20X

	Concentração Final	Quantidade p/ 1 L
NaCl	3 M	175,3 g
citrato de sódio	0,3 M	88, 2 g
H ₂ O deionizada		q.s.p. 1000 mL
pH = 7,0		

2. SSPE 20X

	Concentração Final	Quantidade p/ 1 L
NaCl	3 M	175,3 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	200 mM	27,6 g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	20 mM	7, 4 g
H ₂ O deionizada		q.s.p. 1000 mL
pH = 7,0		

3. TAE 50X

	Concentração Final	Quantidade p/ 1 L
Tris base	2 M	242 g
ácido acético	2 M	57,1 mL
H ₂ O deionizada		q.s.p. 1000 mL
pH = 7,2		

4. TBE 20X

	Concentração Final	Quantidade p/ 1 L
Tris base	1 M	121 g
ácido bórico	1 M	61,7 g
EDTA- Na_4	20 mM	7,44 g
H_2O deionizada		q.s.p. 1000 mL
pH = 7,0		

5. TE pH 8,0

	Concentração Final	Quantidade p/ 100 mL
Tris-HCl 1 M pH 8,0	10 mM	1 mL
EDTA 500 mM pH 8,0	1 mM	200 μL
H_2O deionizada		q.s.p. 100 mL

6. MOPS 10X

	Concentração Final	Quantidade p/ 1 L
MOPS	200 mM	41,85 g
Acetato de sódio	50 mM	6,80 g
$\text{Na}_2\text{.EDTA.2H}_2\text{O}$	10 mM	3,72 g
H_2O com 0,1% DEPC		q.s.p. 1000 mL
pH = 4,2 (após a mistura dos componentes o pH deve estar próximo deste valor)		

7. Solução de Denhardt 50X

	Concentração Final	Quantidade p/ 100 mL
BSA	1 % (p/v)	1 g
Ficoll 400	1 % (p/v)	1 g
PVP	1 % (p/v)	1 g
H ₂ O		q.s.p. 100 mL

- dividir em alíquotas de até 12 mL e armazenar a -20°C

8. Tampão da amostra para eletroforese 10X

	Concentração Final	Quantidade p/ 10 mL
Azul de bromofenol	0,25 % (p/v)	25 mg
Ficoll 400	30 % (p/v)	3 g
EDTA 500 mM pH 8,0	1 mM	20 µL
H ₂ O		q.s.p. 10 mL

APÊNDICE 4

SOLUÇÕES E TAMPÕES PARA PROTEÍNAS

1. PBS 10X

	Concentração Final	Quantidade p/ 1000 mL
Na ₂ HPO ₄	100 mM	14,4 g
KH ₂ PO ₄	17 mM	2,4 g
NaCl	1,4 M	80 g
KCl	27 mM	2 g
H ₂ O		q.s.p. 1000 mL

2. PBST

PBS 1X adicionado de 0,05 % (v/v) Tween 20

3. TBS 10X

	Concentração Final	Quantidade p/ 1000 mL
Tris-HCl 1 M (pH7,5)	50 mM	50 mL
NaCl	1,4 M	80 g
KCl	27 mM	2 g
H ₂ O		q.s.p. 1000 mL

4. TBST

TBS 1X adicionado de 0,05 % (v/v) Tween 20

5. Soluções para PAGE

Tampão do gel concentrador (stacking gel) → Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Tampão do gel concentrador (resolving gel) → Tris-HCl 0,5 M pH 6,8

Solução estoque de acrilamida → 30% (p/v) acrilamida e 0,8% (p/v) bisacrilamida

Tampão de corrida 5X → 125 mM Tris base (15,15 g.L⁻¹)

0,96 M glicina (72 g.L⁻¹)

6. Tampão da amostra 2X (para SDS-PAGE)

	Concentração Final	Quantidade p/ 10 mL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	125 mM	2,5 mL
SDS 20 %	4 % (v/v)	2,0 mL
↓-mercaptoetanol	10 % (v/v)	1, 0 mL
glicerol	20 % (v/v)	2, 0 mL
azul de bromofenol	0,04% (p/v)	4, 0 mg
H ₂ O		q.s.p. 10 mL

APÊNDICE 5

PLANT TRANSFORMATION: ADVANCES AND PERSPECTIVES

Adriana Cristina Alves; Vera Maria Quecini; Maria Lucia Carneiro Vieira*

Depto. de Genética-ESALQ/USP, C.P. 83, CEP: 13400-970 - Piracicaba, Brasil

*e-mail: mlcvieir@carpa.ciagri.usp.br

ABSTRACT: Genetic transformation is a powerful tool for plant breeding and genetical, physiological or biochemical research, consequently it is an extremely dynamic field. Transgenic plants are commonly used to complete or substitute mutants in basic research, helping the studies of complex biological situations such as pathogenesis process, genome organization, light reception and signal transduction. In this review, recent approaches for foreign gene introduction (e.g. *Agrobacterium* transformation, whole tissue electroporation, *in planta Agrobacterium* transformation), screening (reporter gene possibilities and performance) and transformant selection (*ipt* selective marker) are discussed. Transgene expression and mechanisms underlying (trans)gene inactivation are presented. Practical applications of genetically modified plants, field tests and commercial transgenic crops worldwide and in Brazil are listed, as well as the main traits and species modified. Potential uses of transgenic plants for animal compound production, biological remediation and synthetic polymer assembly are also shown.

Key words: plant transformation, *Agrobacterium*, electroporation, reporter genes, transgenic crops

TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS: AVANÇOS E PERSPECTIVAS

RESUMO: A transformação genética é um valioso recurso para o melhoramento e para a pesquisa em Genética, Fisiologia e Bioquímica. Plantas transgênicas são usadas para complementar ou substituir mutantes na pesquisa fundamental e para auxiliar em estudos de fenômenos biológicos complexos como patogenicidade, organização do genoma, captação de luz e transdução de sinais. Nesta revisão, são discutidas abordagens recentes visando a introdução, *screening* e seleção de transformantes, estudos sobre expressão do transgene e uso de plantas geneticamente modificadas. Ensaio de campo e culturas transgênicas comerciais são listadas assim como as principais espécies e características modificadas. O potencial das plantas transgênicas para a produção de compostos animais, remediação biológica e síntese de polímeros é igualmente apresentado.

Palavras-chave: transformação de plantas, *Agrobacterium*, eletroporação, genes repórteres, culturas transgênicas

A commonly accepted definition of plant transformation is: "the introduction of exogenous genes into plant cells, tissues or organs employing direct or indirect means developed by molecular and cellular biology" (Jenes et al., 1993). However, only integrative events, confirmed by molecular and genetical analyses, are correctly designated as genetic transformation (Potrykus, 1990; Potrykus, 1991; Birch, 1997).

Numerous methods for exogenous gene introduction into plant genomes have been described (Potrykus, 1990; Potrykus, 1991), and they can be classified into two groups: **indirect gene transfer** - where exogenous DNA is introduced by a biological vector and **direct gene transfer** - where physical and chemical processes are responsible for DNA

introduction. Some of the proposed methods show low efficiency and repeatability, being scarcely utilized. Thus, basically three methods are responsible for almost all existing transgenic plants, namely indirect transformation mediated by *Agrobacterium* (i) or direct systems using electroporation (ii) and biolistics (iii). Detailed explanations, applications and characteristics of these methods can be found in: Horsch et al. (1984), De Block et al. (1984), Teftter (1990), Zupan & Zambryski (1995) and Sheng & Citovsky (1996) concerning the *Agrobacterium* system; Fromm et al. (1987), Shillito & Potrykus (1987), Gad et al. (1990), Negruțiu et al. (1990) and Neuhaus & Spangenberg (1990) for electroporation procedures and, Klein et al. (1987), Sanford (1988), Morikawa

et al. (1989), Birch & Franks (1991), Christou (1992), Sanford et al. (1993) and Christou (1995) for microparticle bombardment.

Regardless of the transformation method, a previous plant regeneration protocol for the species under investigation and a cloned gene of interest must exist. Foreign genes can be obtained from other plant species or even from different kingdoms, like fungi, bacteria and animals.

Every stable transformation process demands the simultaneous occurrence of two independent biological events, which are: stable insertion of the transgene into the plant genome and regeneration of those cells where it occurred, producing a non-chimeric transgenic plant. The need of both events occurring in the same cell makes it a constraint for higher transformation efficiency. Selection markers and reporter genes are frequently used to detect transformation sites.

Although perfectly established, principal transformation methods often undergo changes or improvements to achieve recalcitrant species transformation or higher frequencies.

Agrobacterium-mediated plant transformation without the need of an *in vitro* culture stage was achieved by employing *in planta* inoculation (Bechtold et al., 1993; Chang et al., 1994). In this methodology, young flower buds are inoculated with the bacteria under *ex-vitro* conditions. When seeds are produced, they are submitted to selection for marker-induced resistance. Despite the ease of this method, only *Arabidopsis thaliana* stable transformants have been obtained and, differences in the efficiency among ecotypes were observed (Bechtold et al., 1993).

Since the system greatly depends on pathogenesis, basic aspects of *Agrobacterium*-plant interaction have been studied, such as T-DNA transfer and insertion (Bundock & Hooykaas, 1996), susceptibility of plant genotypes (Nam et al., 1997) and influence of host cell cycle stage on T-DNA transference (Villemont et al., 1997). In addition, technical improvements in order to increase transformation rates, such as employment of particle bombardment to provoke microwounding at the inoculation site - *Agrobacterium* (Bidney et al., 1992; Brasileiro et al., 1996; Hansen & Chilton, 1996) and intracellular microinjection of bacteria into regions with regenerative abilities (Escudero et al., 1996) have been developed.

Electroporation is a technique that uses electrical discharges to create reversible pores in the plasma membrane, thus allowing the introduction of foreign DNA. Since the main drawback for electroporation employment is the ability to obtain

fully developed plants from protoplasts, whole tissues have been used as explants, like zygotic intact embryos in cowpea (Akella & Lurquin, 1993), common bean (Dillen et al., 1995) and rice (Xu & Li, 1994; Rao, 1995).

Immediate identification is a highly desirable feature of transformed cells, but since most introduced genes are unable to induce phenotypes distinct from the wild type, the utilization of a promptly identified reporter gene *in cis* or *in trans* provides a screening tool.

The most utilized reporter gene so far is *uidA*, which codes for a monomeric stable enzyme- β -glucuronidase (GUS), which catalyzes the conversion of methylumbeliferone glucuronide into methylumbeliferone, forming an easily identifiable blue precipitate. There are many advantages of GUS: it is undemanding to visualize, the enzyme is not easily denatured and the precipitate is stable (Jefferson, 1987). However a disadvantage of the GUS system is that it is a destructive assay, that is, the explant cannot be recovered.

Some plants show variable levels of endogenous β -glucuronidase expression (Kosugi, 1990), which impairs interpretation of GUS assay results. Use of an engineered virus as a gene amplification vector of GUS was proposed by Shen & Hohn (1994). These authors reported up to a four fold increase in blue points, indicating that viral DNA was responsible for reporter gene amplification.

Alternatively, Chalfie et al. (1994), Niedz et al. (1995) and Sheen et al. (1995) suggested "green fluorescent protein (GFP)" as useful reporter gene for plant and animal systems. GFP is a protein produced by a jellyfish, *Aequorea victoria*, that is able to emit green fluorescence under blue light or UV illumination without any additional substrate. The principal advantages of this reporter gene compared to the formerly used, namely GUS, is the easiness of its visualization. It needs no extra substrate for detection and, most important, is a non-destructive assay (Vain et al., 1998). Very recently, soluble, highly fluorescent variants of GFP were produced (Davis & Vierstra, 1998).

Since transformation is a rare event, selective markers impair the development of a great number of non-transformed cells in favor of transgenic ones. However, the use of a selective agent, which is frequently an antibiotic or a herbicide, retards cell differentiation and shoot development in the explant submitted to a transformation process (Colby & Meredith, 1990). In addition, if another transformation of the same material is needed, the selective marker is no longer effective. Due to these limitations, Ebinuma et al. (1997) proposed a

selective marker that unlike the former ones imposes no negative effect on non-transformed cells, instead inducing a different phenotype in transgenic shoots. These authors have proposed a construction based on a chimeric *ipt* gene, which codes isopentenyl AMP, a cytokinin precursor (phenotype ESP - "extreme shooty phenotype") cloned inside the maize transposable element *Ac*. Transposon *Ac* was used to remove the gene *ipt* from the transformed cells in explants with an ESP phenotype after transformation, since during the transposition process the excised element very rarely reintegrates. If it does, it occurs in a sister chromatid and is lost due to somatic segregation.

Concerning the size of cloning vectors, most of the plasmids employed in plant transformation range from 15 to 25 kb, but the construction of an artificial binary bacterial chromosome (BIBAC) made the stable insertion of 150 kb possible, which is approximately ten times the previous sequence size (Hamilton et al., 1996). It opens the possibility of the introduction of quantitative traits into other plant genomes. Gelvin (1998) for example, modernly described multigene plant transformation.

Frequently, high levels of expression are desirable, thus constitutive promoters, like 35S from cauliflower mosaic virus (CaMV), have been widely used as single or double copies. Surprisingly, events of partial or complete transgene and/or its endogenous homologue expression inhibition have been observed (Napoli et al., 1990; Van Der Krol et al., 1990). These inactivation events are due to complex mechanisms involving methylation and epigenetic alterations (Renckens et al., 1992; Meyer et al., 1992; Neuhuber et al., 1994; Meyer & Heidmann, 1994; Park et al., 1996; Thierry & Vaucheret, 1996). Although the exact mechanism that targets certain sequences to methyltransferases or other enzymes responsible for epigenetic alterations remains unknown, there are some hypotheses suggesting the involvement of DNA-DNA, DNA-RNA and RNA-RNA homology-dependent interactions (Grierson et al., 1991; Mol et al., 1991; Flavell, 1994; Matzke & Matzke, 1995a; Matzke & Matzke, 1995b; Meyer, 1996; Stam et al., 1997).

Utilization of DNA sequences known as "matrix attachment regions" (MAR) or "scaffold attachment regions" (SAR) has been recommended as a means of keeping chromatin structure accessible to RNA polymerase and the transcription machinery, promoting higher levels and more constant transgene expression (Spiker & William, 1996). Elimination of repeated sequences in

transformation vector construction, selection of plants with lower copy numbers and moderated transcription rates in order to favor RNA turnover and the avoidance of multiple copies of the 35S promoter are strategies recommended by Matzke & Matzke (1995b) to avoid (trans)gene silencing. Other promoters able to drive high transcription rates, like chimeric promoters derived from *Agrobacterium tumefaciens* octopine and manopine synthase genes (Ni et al., 1995), are possible alternatives to maintain high expression levels and reduce homology in order to avoid inactivation phenomena.

Many aspects of plant biology have been elucidated using transgenic plants. There are several reports employing transgenic plants, and a few recent ones are here emphasized: Creté et al. (1997) and Scheible et al. (1997) have elucidated transcription regulation and signal transduction aspects of nitrogen metabolism in higher plants using genetically modified *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana plumbaginifolia* and *N. tabacum*. Molecular identification of plant blue light photoreceptor has also employed transgenic plants (Ahmad & Cashmore, 1993; Lin et al., 1995a; 1995b). Complex biological situations like pathogenesis (Bonas & Van Der Ackerken, 1997), developmental regulation (Silverstone et al., 1997), genome organization (Murata et al., 1997), reproductive self-incompatibility (Lee et al., 1994) and cross-membrane transportation (Grabov et al., 1997) among many others, have been studied using transgenic plants.

Gene expression and its regulation are frequently studied employing chimeric constructs carrying the promoter fused to a reporter gene, so that induction of the promoter under study is easily assessed by reporter gene expression. However, studies using fusion promoter/reporter genes are being severely criticized (Taylor, 1997), because they do not take into consideration upstream and intragenic sequences that also regulate gene transcription.

Nowadays, many countries have field tests of transgenic plants. As of December 1995, 3,647 genetically engineered plants were field tested worldwide: United States (1952), Canada (486), France (253), United Kingdom (133), Holland (113), Argentina (78), Italy (69), Germany (49), Australia (46), Chile (39), Mexico (38), Spain (30), Japan (25), South Africa (22), Sweden (18), Cuba (18) and Russia (11) among many others. The main transgenic tested field crops are maize, oilseed rape, potato, tomato, soybean, cotton and tobacco, and the most frequent genetically introduced traits are herbicide tolerance (35%), product quality (20%), insect resistance (18%), virus resistance (11%), fungi resistance (3%)

and others (13%). The last corresponds to nematode and bacteria resistance and marker or reporter gene transference (Fontes & Carvalho, 1997).

In Brazil, from February to June, 1997, several companies started field tests with transgenic plants. Company names, plant material and the introduced character are listed in TABLE 1 (Comissão Técnica de Biossegurança - CTNBio, 1997). Birch (1997) shows an extensive list of commercial transgenic plants worldwide. Besides the above mentioned conventional applications, genetically modified plants have also been used in phytoremediation (environmental heavy metal detoxification) (Rugh et al., 1996), metabolic engineering (Nawrath et al., 1994; John & Keller, 1996) and animal protein production (Ma & Hein, 1995; Rosso & Abad, 1996). Moreover, plant-based vaccines are attractive alternatives to more traditional

antigen preparations because of their ease of production and delivery. Arakawa et al. (1998) have developed a transgenic potato that produces human insulin, an insulin-dependent diabetes mellitus autoantigen (IDDM). When the transformed potato was fed to a mouse model of IDDM, the protein was directed to the gut-associated lymphoid tissue, where it induced oral tolerance, as shown by decreased insulinitis and suppression of diabetic symptoms.

The main objective of plant transformation is to solve agricultural problems without environmental damage, so that the development of "intelligent plants" able to exclusively kill fungus-infected cells (Strittmatter et al., 1995), or grow taller when there is a shortage of light but grow normally when there are no surrounding plants (Robson et al., 1996), are the goals of modern breeding programs all over the world.

TABLE 1 - Field assays of transgenic plants in Brazil from February to June 1997.

Company	Plant Material	Character
Sociedade Agrícola Germinal Ltda	<i>Zea mays</i> line	Stalk worm tolerance
Sociedade Agrícola Germinal Ltda	<i>Zea mays</i> hybrids	Pest control
Sociedade Agrícola Germinal Ltda	<i>Zea mays</i> hybrids	Pest and herbicide control
Monsanto do Brasil Ltda	Ten <i>Glycine max</i> cultivars	Roundup resistance
Monsanto do Brasil Ltda	Ten BR and ten US <i>Glycine max</i> cultivars	Roundup resistance
Copersucar Ltda	<i>Saccharum</i> sp. hybrids	Ammonium glyphosinate resistance
Profigen do Brasil Ltda	<i>Nicotiana tabacum</i> variety	Resistance to TSWV
Hoechst Shering AgrEvo do Brasil Ltda	<i>Glycine max</i> cultivars	Ammonium glyphosinate resistance

REFERENCES

- AHMAD, M.; CASHMORE, A.R. *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, v.366, n.5, p.162-166, 1993.
- AKELLA, V.; LURQUIN, P.F. Expression in cowpea seedlings of chimeric transgenes after electroporation into seed-derived embryos. *Plant Cell Reports*, v.12, n.2, p.110-117, 1993.
- ARAKAWA, T.; YU, J.; CHONG, D. K. X.; HOUGH, J.; ENGEN, P. C.; LANGRIDGE, W. H. R. A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nature Biotechnology*, v.16, n.10, p.934-938, 1998.
- BECHTOLD, N.; ELLIS, J.; PELLETIER, G. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Académie de Sciences/Paris*, v.316, n.3, p.1194-1199, 1993.
- 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, n.2, p.301-313, 1992.
- BIRCH, R.G.; FRANKS, T. Development and optimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.18, n.5, p.453-469, 1991.
- BIRCH, R.G. Plant Transformation: Problems and strategies for practical applications. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, v.48, p.297-326, 1997.
- BONAS, U.; VAN DER ACKERKEKEN, G. Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial diseases? *The Plant Journal*, v.12, n.1, p.1-8, 1997.

- BRASILEIRO, A.C.M.; ARAGÃO, F.J.L.; ROSSI, S.; DUSI, D.M.A.; BARROS, L.M.G.; RECH, E.L. Susceptibility of common and tepary beans to *Agrobacterium* spp. strains and improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation using microprojectile bombardment. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.121, n.5, p.810-815, 1996.
- BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P.J.J. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences/USA**, v.93, n.26, p.15272-15275, 1996.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUKIRCHEN, G.; WARD, W.W.; PRASHER, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v.263, n.5148, p.802-805, 1994.
- CHANG, S.S.; PARK, S.K.; KIM, B.C.; KANG, B.J.; KIM, D.U.; NAM, H.G. Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation in planta. **The Plant Journal**, v.5, n.4, p.551-558, 1994.
- CHRISTOU, P. Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. **The Plant Journal**, v.2, n.3, p.275-281, 1992.
- CHRISTOU, P. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. **Euphytica**, v.85, n.1/3, p.13-27, 1995.
- COLBY, S.M.; MEREDITH, C.P. Kanamycin sensitivity of cultured tissues of *Vitis*. **Plant Cell Reports**, v.9, n.5, p.237-240, 1990.
- CRETÉ, P.; CABOCHE, M.; MEYER, C. Nitrite reductase expression is regulated at the post-transcriptional level by the nitrogen source in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.11, n.4, p.625-634, 1997.
- DAVIS, S.J.; VIERSTRA, R.D. Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. **Plant Molecular Biology**, v.36, n.4, p.521-528, 1998.
- DE BLOCK, M.; HERRERA-ESTRELLA, L.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J.; ZAMBRYSKI, P. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. **EMBO Journal**, v.3, n.8, p.1681-1689, 1984.
- DILLEN, W.; ENGLER, G.; VAN MONTAGU, M.; ANGENON, G. Electroporation-mediated DNA delivery to seedling tissues of *Phaseolus vulgaris* L. (common beans). **Plant Cell Reports**, v.15, n.1/2, p.119-124, 1995.
- EBINUMA, H.; SUGITA, K.; MATSUNAGA, E.; YAMAKADO, M. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences/USA**, v.94, n.6, p.2117-2121, 1997.
- ESCUADERO, J.; NEUHAUS, G.; SCHLÄPPI, M.; HOHN, B. T-DNA transfer in meristematic cells of maize provided with intracellular *Agrobacterium*. **The Plant Journal**, v.10, n.2, p.355-360, 1996.
- FLAVELL, R.B. Inactivation of gene expression in plants as consequence of specific sequence duplication. **Proceedings of the National Academy of Sciences/USA**, v.91, n.9, p.3490-3496, 1994.
- FROMM, M.; CALLIS, J.; TAYLOR, L. P.; WALBOT, V. Electroporation of DNA and RNA into plant protoplasts. **Methods in Enzymology**, v.153, p.351-366, 1987.
- FONTES, E.M.G.; CARVALHO, V.F. Biosafety on genetically modified plants: an overview in Brazil and in the world. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL TOMATO DISEASES, 1., Recife, 1996. **Proceedings**. Alexandria: American Society for Horticultural Science, 1997. p.100-103.
- GAD, A.E.; ROSENBERG, N.; ALTMAN, A. Liposome-mediated gene delivery into plant cells. **Physiologia Plantarum**, v.79, n.1, p.177-183, 1990.
- GELVIN, S.B. Multigene plant transformation: More is better! **Nature Biotechnology**, v.16, n.10, p.1009-1010, 1998.
- GRABOV, A.; LEUNG, J.; GIRAUDAT, J.; BLATT, M.R. Alterations of anion channel kinetics in wild-type and abi-1 transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. **The Plant Journal**, v.12, n.1, p.203-214, 1997.
- GRIERSON, D.; FRAY, R.G.; HAMILTON, A.J.; SMITH, C.J.S.; WATSON, C.F. Does co-suppression of sense genes in transgenic plants involve antisense RNA? **Trends in Biotechnology**, v.9, n.4, p.122-123, 1991.
- HAMILTON, C.M.; FRARY, A.; LEWIS, C.; TANKSLEY, S.D. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences/USA**, v.93, n.18, p.9975-9979, 1996.
- HANSEN, G.; CHILTON, M.D. "Agrolistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated in planta. **Proceedings of the National Academy of Sciences/USA**, v.93, n.25, p.14978-14983, 1996.
- HORSCH, R.B.; FRALEY, R.T.; ROGERS, S.G.; SANDERS, P.R.; LLOYD, A. Inheritance of functional foreign genes in plants. **Science**, v.223, n.4635, p.496-498, 1984.
- INSTRUÇÕES normativas e comunicados da CTNBio. Brasília: CTNBio, 1997. 84p.
- JEFFERSON, R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reports**, v.5, n.7, p.387-405, 1987.

- JENES, B.; MOORE, H.; CAO, J.; ZHANG, W.; WU, R. Techniques for gene transfer. In: KUNG, S.; WU, R. (Ed.) **Transgenic plants**. New York: Academic Press, 1993. cap.4, p.125-146.
- JOHN, M.E.; KELLER, G. Metabolic pathway engineering in cotton: Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences/USA**, v.93, n.23, p.12768-12773, 1996.
- KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R.; SANFORD, J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, v.327, n.6117, p.70-73, 1987.
- KOSUGI, S.; OHASHI, Y.; NAKAJIMA, K.; ARAI, Y. An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. **Plant Science**, v.70, n.1, p.133-140, 1990.
- LEE, H.S.; HUANG, S.; KAO, T.H. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. **Nature**, v.367, n.6463, p.560-563, 1994.
- LIN, C.; AHMAD, M.; GORDON, D.; CASHMORE, A.R. Expression of a *Arabidopsis* cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A and green light. **Proceedings of the National Academy of Sciences/USA**, v.92, n.18, p.8423-8427, 1995a.
- LIN, C.; ROBERTSON, D.E.; AHMAD, M.; RAIBEKAS, A.A.; JORNS, M.S.; DUTTON, P.L.; CASHMORE, A.R. Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY 1. **Science**, v.269, n.5226, p.968-970, 1995b.
- MA, J.K.-C.; HEIN, M.B. Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants. **Trends in Biotechnology**, v.13, n.12, p.522-527, 1995.
- MATZKE, M.A.; MATZKE, A.J. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: what does it really tell us? **Trends in Genetics**, v.11, n.1, p.1-3, 1995a.
- MATZKE, M. A.; MATZKE, A.J. How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? **Plant Physiology**, v.107, n.3, p.679-685, 1995b.
- MEYER, P.; HEIDMANN, I. Epigenetic variants of a transgenic petunia line show hypermethylation in transgene DNA: an indication for specific recognition of foreign DNA in transgenic plants. **Molecular and General Genetics**, v.243, n.4, p.390-399, 1994.
- MEYER, P. Homology-dependent gene silencing in plants. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.4, p.23-48, 1996.
- MEYER, P.; LINN, F.; HEIDMANN, I.; MEYER, H.Z.A.; NIEDENHOF, I.; SAEDLER, H. Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. **Molecular and General Genetics**, v.231, n.3, p.345-352, 1992.
- MOL, J.; VAN BLOKLAND, R.; KOOTER, J. More about co-suppression. **Trends in Biotechnology**, v.9, n.6, p.182-183, 1991.
- MORIKAWA, H.; IIDA, A.; YAMADA, Y. Transient expression in plant cells and tissues obtained by a simple biolistic device (particle-gun). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.31, n.3, p.320-322, 1989.
- MURATA, M.; HESLOP-HARRISON, J.S.; MOTOYOSHI, F. Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones. **The Plant Journal**, v.12, n.1, p.31-38, 1997.
- NAM, J.; MATTHYSSE, A.G.; GELVIN, S.B. Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. **The Plant Cell**, v.9, n.3, p.317-333, 1997.
- NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, v.2, n.4, p.279-289, 1990.
- NAWRATH, C.; POIRIER, Y.; SOMERVILLE, C. Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthesis pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences/USA**, v.91, n.26, p.12760-12764, 1994.
- NEGRUTIU, I.; DEWULF, J.; PIETRZAK, M.; BOTTERMAN, J.; RIETVELD, E. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. II. Transient expression versus stable transformation: analysis of parameters influencing gene expression levels and transformation efficiency. **Physiologia Plantarum**, v.79, n.1, p.197-205, 1990.
- NEUHAUS, G.; SPANGENBERG, G. Plant transformation by microinjection techniques. **Physiologia Plantarum**, v.79, n.1, p.213-217, 1990.
- NEUHUBER, F.; PARK, Y. D.; MATZKE, A. J. M.; MATZKE, M. A. Susceptibility of transgene loci to homology-dependent gene silencing. **Molecular and General Genetics**, v.244, n.3, p.230-241, 1994.
- NI, M.; CUI, D.; EINSTEIN, J.; NARASIMHULU, S.; VERGARA, C.E.; GELVIN, S.E. Strength and tissue specificity of chimeric promoters derived from the octopine and mannopine synthase genes. **The Plant Journal**, v.7, n.4, p.661-676, 1995.
- NIEDZ, R.P.; SUSSMAN, M R.; SATTERLEE, J.S. Green fluorescent protein: an *in vivo* reporter of plant gene expression. **Plant Cell Reports**, v.14, n.7, p.403-406, 1995.
- PARK, Y.D.; PAPP, I.; MOSCONE, E.A.; IGLESIAS, V.A.; VAUCHERET, H.; MATZKE, A.J.M.; MATZKE, M.A. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. **The Plant Journal**, v.9, n.2, p.183-194, 1996.

- POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.42, p.205-225, 1991.
- POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessments and perspectives. **Physiologia Plantarum**, v.79, n.1, p.125-134, 1990.
- RAO, K.V. Transient gene expression in electroporated immature embryos of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology**, v.147, n.1, p.71-74, 1995.
- RENCKENS, S.; DE GREVE, H.; VAN MONTAGU, M.; HERNALSTEENS, J.P. Petunia plants escape from negative selection against a transgene by silencing the foreign DNA via methylation. **Molecular and General Genetics**, v.233, n.1/2, p.53-64, 1992.
- ROBSON, P.R.H.; MCCORMAC, A.C.; IRVINE, A.S.; SMITH, H. Genetic engineering of harvest index in tobacco through overexpression of a phytochrome gene. **Nature Biotechnology**, v.14, n.8, p.995-998, 1996.
- ROSSO, M.N.; ABAD, P. Des anticorps pour soigner les plantes. **La Recherche**, v.288, n.6, p.34-36, 1996.
- RUGH, C.L.; WILDE, H.D.; STACK, N.M.; THOMPSON, D.M.; SUMMERS, A.O.; MEAGHER, R.B. Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *mer A* gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences/USA**, v.93, n.8, p.3182-3187, 1996.
- SANFORD, J. The biolistic process. **Trends in Biotechnology**, v.6, n.12, p.299-302, 1988.
- SANFORD, J.C.; SMITH, F.D.; RUSSEL, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzymology**, v.217, p.483-509, 1993.
- SCHEIBLE, W.R.; LAUERER, M.; SCHULZE, E.D.; CABOCHE, M.; STITT, M. Accumulation of nitrate in shoots acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. **The Plant Journal**, v.11, n.4, p.671-692, 1997.
- SHEEN, J.; HWANG, S.; NIWA, Y.; KOBAYASHI, H.; GALBRAITH, D.W. Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. **The Plant Journal**, v.8, n.5, p.777-784, 1995.
- SHEN, W.H.; HOHN, B. Amplification and expression of the β -glucuronidase gene in maize plants by vectors based on maize streak virus. **The Plant Journal**, v.5, n.2, p.227-236, 1994.
- SHENG, J.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **The Plant Cell**, v.8, n.10, p.1699-1710, 1996.
- SHILLITO, R. D.; POTRYKUS, I. Direct gene transfer to protoplasts of dicotyledonous and monocotyledonous plants by a number of methods, including electroporation. **Methods in Enzymology**, v.153, p.313-336, 1987.
- SILVERSTONE, A. L.; CHANG, C.W.; KROL, E.; SUN, T.P. Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene *GA1* in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.12, n.1, p.9-20, 1997.
- SPIKER, S.; WILLIAM, F. Nuclear matrix attachment regions and transgene expression in plants. **Plant Physiology**, v.110, n.1, p.15-21, 1996.
- STAM, M.; MOL, J.N.M.; KOOTER, J.M. The silence of genes in transgenic plants. **Annals of Botany**, v.79, n.1, p.3-12, 1997.
- STRITTMATTER, G.; JANSSENS, J.; OPSOMER, C.; BOTTERMAN, J. Inhibition of fungal disease development by engineering controlled cell death. **Bio/Technology**, v.13, n.10, p.1085-1089, 1995.
- TAYLOR, C.B. Promoter fusion analysis: an insufficient measure of gene expression. **The Plant Cell**, v.9, n.3, p.273-275, 1997.
- TEFTER, D. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. **Physiologia Plantarum**, v.79, n.1, p.140-146, 1990.
- THIERRY, D.; VAUCHERET, H. Sequence homology requirements for transcriptional silencing of 35S transgenes and post-transcriptional silencing of nitrite reductase (trans)genes by the tobacco 271 locus. **Plant Molecular Biology**, v.32, n.6, p.1075-1083, 1996.
- VAIN, P.; WORLAND, B.; KOHLI, A.; SNAPE, J.W.; CHRISTOU, P. The green fluorescent protein (GFP) as a vital marker in rice transformation. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, n.2, p.164-169, 1998.
- VAN DER KROL, A.R.; MUR, L.A.; BELD, M.; MOL, J.N.M.; STUITJE, A.R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **The Plant Cell**, v.2, n.4, p.291-299, 1990.
- VILLEMONT, E.; DUBOIS, F.; SANGWAN, R.S.; VASSEUR, G.; BOURGEOIS, Y.; SANGWAN-NORREEL, B.S. Role of host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. **Planta**, v.201, n.2, p.160-172, 1997.
- XU, X.; LI, B. Fertile transgenic Indica rice plants obtained by electroporation of the seed embryo cells. **Plant Cell Reports**, v.13, n.3/4, p.237-242, 1994.
- ZUPAN, J.R.; ZAMBRYSKI, P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. **Plant Physiology**, v.107, n.4, p.1041-1047, 1995.

Recebido para publicação em 25.01.99

Aceito para publicação em 25.02.99

Electroporation-mediated gene transfer and expression in intact tissues of *Stylosanthes guianensis*

V. M. Quecini; M. L. C. Vieira

Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas, Departamento de Genética - ESALQ / USP – P.O. Box 83, CEP 13400-970 Piracicaba – SP, Brazil.

Telephone : + 55 (19) 429-4125

Fax : + 55 (19) 434-6706

vmquecin@carpa.ciagri.usp.br

mlcvieir@carpa.ciagri.usp.br

Correspondence to : M.L.C. Vieira

ABSTRACT

Plasmid DNA was introduced and expressed in intact tissues of *Stylosanthes guianensis* after electroporation. Leaf, hypocotyl and cotyledonary tissues expressed the reporter gene β -glucuronidase (*uid A*) as spread stains in discrete areas. Electroporation physical parameters had influence on transgene expression and higher levels were achieved with a field strength of 250 V. cm^{-1} discharged by a $900 \text{ }\mu\text{F}$ capacitor in chloride-free electroporation medium. Osmotic pretreatment of the explant, the employment of linearized plasmid DNA, the absence of chloride and presence of calcium ions also increased transient gene expression. PCR analysis confirmed the transformed status of the electroporated *Stylosanthes* tissues.

Key words : direct gene transfer, electroporation, forage legume, intact tissue, *Stylosanthes guianensis*

Abbreviation : PCR, polymerase chain reaction, dNTP, dideoxynucleotide, GUS, β -glucuronidase, CaMV, cauliflower mosaic virus, TBE buffer (TRIS 90 mM, boric acid 90 mM, EDTA 2 mM)

INTRODUCTION

Genetic transformation through protoplast electroporation has been established for many plant species but requires (i) an effective regeneration protocol from protoplast to fertile non-chimerical transgenic plants; (ii) development of genotype-specific regeneration protocols; (iii) long periods of *in vitro* cultivation which may induce genetic and epigenetic alterations; (iv) intense and expertise work.

Intact cell wall of bacteria and eukaryotic cells is known to be DNA-permeable to variable extents (Shimogawara et al., 1998; Lin et al., 1998; Neumann et al., 1996) thus, selective permeability lies on the cellular membrane. Electric pulses elevate the transmembrane potential promoting pore formation due to increased dipole moment of the hydrophilic lipid heads (Kinosita and Tsong, 1977; Neumann et al., 1982). The effects of an electric field onto cell walls are still unknown although transgene delivery and expression have been described for intact cells of maize (Sabri et al., 1996; Songstad et al., 1993), common beans and other grain legumes (Dillen et al., 1995), rice and wheat (Xu and Li, 1994; Dekeyser et al., 1990), cowpea (Akella and Lurquin, 1993), alfalfa (Senaratna et al., 1991) and sugarbeet (Lindsey and Jones, 1987).

DNA introduction into organized tissues is a promising means to avoid the fore mentioned constraints of protoplast electroporation and easily obtain wholly transformed plants (Lin et al., 1997).

In this article, we describe plasmid DNA introduction and expression into organized tissue of *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. Reporter gene expression was observed in hypocotyl, cotyledonary and, to a lesser extent, leaf tissues. Transgene PCR amplification was achieved in the genomic DNA of the target cells.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material and Tissue Cultures

Stylosanthes guianensis cv. Mineirão seeds were kindly provided by CPAC / EMBRAPA (Brasília - DF). After surface sterilization (30 sec in ethanol 70%, 15 min in calcium hypochloride 2%, abundantly rinsed with autoclaved water), seeds were *in vitro* germinated in half-strength MS medium (Murashige and Skoog, 1962) devoid of growth regulators but containing 1.5% sucrose and 0.18% Phytigel (Sigma) solidified. Hypocotyls and fully expanded cotyledons were excised from 7-8 day old seedlings and completely developed leaves from 14-15 day old ones. Explants were immediately incubated into electroporation buffer or submitted to osmoticum treatment.

After electrotreatment, the explants were placed on MS3 (MS salts, 3% sucrose, 0.18% Phytigel) for 2-3 days. Cultures were maintained under 16 h light regime ($65 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) and 25 °C.

Plasmid

Transformation vector pCambia 1301 (CAMBIA GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Australia) carries a selective marker gene conferring hygromycin resistance - *hpt II* and a reporter gene, β -glucuronidase (GUS) - *uidA*, both driven by 35S promoter from cauliflower mosaic virus (CaMV) (Figure 1). The presence of a catalase intron into the coding sequence of *uidA* rules out the possibility of reporter gene expression in transformed endophytic microorganisms.

Plasmid DNA was transformed into *E. coli* JM 109 cells (Dower et al., 1988) and purified by CsCl method (Sambrook et al., 1989). Supercoiled plasmid DNA was directly

employed in transformation experiments or linearized through digestion with *Eco* RI (GIBCO BRL). Concentrations of plasmid DNA were spectrophotometrically determined at 260 nm and confirmed by 0,8% agarose TBE gel electrophoresis (Sambrook et al., 1989).

Pre-pulse treatments

The explants were classified according to their size and shape in order to provide similar loading of the cuvettes. A cuvette containing ten explants was considered a replicate and three replicates were evaluated. All tested variables, i.e. explant type, electric field strength, osmotic treatment, DNA form and buffer types, were independently assayed.

Hypocotyl (H), cotyledonary (C) and leaf (L) tissues were presoaked in 5 mL of electroporation buffer supplemented with 0, 2, 8 or 16 M mannitol for 20 min at 0 °C.

Previously to pulse, 10 µg of supercoiled or linear plasmid DNA were added to each 800 µL mixture of electroporation buffer and explants. The cuvettes were kept on ice for 10 min before pulse.

Electroporation conditions

Commercial Bio Rad TM Gene Pulser II with Capacitance Extender device was employed to deliver 50 to 250 V. cm⁻¹ electric field, by discharging a 900 µF capacitor to 0.4 cm electrode-gap cuvettes containing 10 explants in electroporation buffer I (Fromm et al., 1987), II (Tada et al., 1990) or III (Walbot, 1993).

Sample resistance was 20 Ω (buffer I and III) and 50 Ω (buffer II) as determined by the device measurements. The time, expressed as pulse decay constant, established by

internal settings of the apparatus was $\tau = RC$. Since a constant discharge capacitor was employed ($C = 900 \mu\text{F}$), pulses imposed energy discharges depending on the voltage ($E = \frac{1}{2} CV^2$).

Reference default conditions featured buffer I (Fromm et al., 1987), 10 μg of supercoiled plasmid DNA, no osmotic treatment previous to pulse and 100 V.cm^{-1} discharged by 900 μF capacitor (720 kJ) to cotyledonary, hypocotyl and leaf explants.

Histochemical GUS assays

Explants were histochemically analyzed for β -glucuronidase activity as described by Jefferson (1987). Electroporated tissues were longitudinally sliced and vacuum-infiltrated for 5 min with staining buffer containing the chromogenic substrate, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) (McCabe et al., 1988) with addition of 20 % methanol in order to suppress endogenous β -glucuronidase activity (Kosugi et al., 1990). After 24 hour incubation at 37 °C, tissue pigments were removed by successive washes with 80% ethanol and the explants were observed under the stereomicroscope.

GUS stained areas were visually evaluated and given notes from 0 to 5 according to their size, intensity and frequency per explant.

Polymerase chain reaction (PCR) analysis

Specific transgene amplification was carried out to prove that staining was not due to residual endogenous β -glucuronidase activity and to confirm the transformed status of the tissue.

internal settings of the apparatus was $\tau = RC$. Since a constant discharge capacitor was employed ($C = 900 \mu F$), pulses imposed energy discharges depending on the voltage ($E = \frac{1}{2} CV^2$).

Reference default conditions featured buffer I (Fromm et al., 1987), 10 μg of supercoiled plasmid DNA, no osmotic treatment previous to pulse and 100 $V.cm^{-1}$ discharged by 900 μF capacitor (720 kJ) to cotyledonary, hypocotyl and leaf explants.

Histochemical GUS assays

Explants were histochemically analyzed for β -glucuronidase activity as described by Jefferson (1987). Electroporated tissues were longitudinally sliced and vacuum-infiltrated for 5 min with staining buffer containing the chromogenic substrate, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) (McCabe et al., 1988) with addition of 20 % methanol in order to suppress endogenous β -glucuronidase activity (Kosugi et al., 1990). After 24 hour incubation at 37 °C, tissue pigments were removed by successive washes with 80% ethanol and the explants were observed under the stereomicroscope.

GUS stained areas were visually evaluated and given notes from 0 to 5 according to their size, intensity and frequency per explant.

Polymerase chain reaction (PCR) analysis

Specific transgene amplification was carried out to prove that staining was not due to residual endogenous β -glucuronidase activity and to confirm the transformed status of the tissue.

Seven days after electric treatment, genomic DNA was isolated from randomly chosen samples of electroporated or non-electroporated explants as described by Edwards et al. (1991).

Each 25 µL reaction mixture contained 20 ng of genomic DNA, 10 mM TRIS-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂, 160 µM of each dNTP, 1.0 U of *Taq* polymerase (GIBCO BRL) and 200 nM of each *uidA* specific primer (*gus 1* – CCT GTA GAA ACC CCA CAA CG and *gus 2 c* – TGC AGC GCT ACC TAA GGC CG) (Figure 1), which provide an amplification product of 795 bp. The mixture was overlaid with sterile mineral oil and submitted to denaturation (2 min at 95°C) followed by 25 cycles of amplification (1 min at 94°C, 1 min at 45°C and 1.5 min at 72°C) and a final extension (7 min at 72°C) in thermal cycler (Perkin Elmer Thermus). DNA amplification products were visualized in ethidium bromide (1 mg / 100 mL) stained 1.4% agarose TBE gels under UV light.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of explant type on transgene expression

Cotyledons showed the highest levels of GUS expression independently of the employed buffer, DNA form, osmotic treatment and electric field strength, followed by hypocotyl-derived explants (Figures 2 and 3A). Expression in the leaves was much lower, never reaching more than 2 points in the arbitrary scale nor comprising more than 50% of the assayed explants (Figure 2C, 3A, 3D), although it was possible to detect transgene DNA amplification in leaf tissues (Figure 4).

Transgene specific amplification was accomplished for all tested explants under default electroporation conditions but not when explants were incubated in DNA-containing buffer without electric treatment (Figure 4).

The low levels of expression in leaves are probably due to the small portion of growing areas in fully expanded leaves from 14-15 day old seedlings. Most of leaf tissue is constituted of non-growing cells with secondary wall, which means that subsequent layers have been added to the primary wall present only when cell volume is able to increase (Rieter, 1998, Cosgrove, 1997).

In higher plants, the cell wall follows the architectural plan found in cell-shaping structures of fungi, arthropods and animals, i.e., a fibrous material embedded into an amorphous matrix (Rieter, 1998). Its fibrous components are cellulose fibrils in a complex arrangement (Delmer, 1998; Ha et al., 1998) and hemicellulose and pectin are the matrix (Showalter, 1993). Other physical barriers to macromolecules, specially important in tropical semi-arid plant leaves like *Stylosanthes*, are depositions of waxes, lignin and the presence of superficial trichomes.

Intensive growing areas such as hypocotyls and cotyledons, have much smaller regions of secondary cell wall (Wojtaszek and Bolwell, 1995; Cosgrove, 1997).

Optimizing field strength to foreign DNA deliver

Initially, cotyledon, hypocotyl and leaf explants were electroporated at 50 V.cm^{-1} to check tissue damage and GUS expression. Low levels of expression and virtually no tissue damage were observed. Increasing field strengths (50 V.cm^{-1} increments) were applied up to 350 V.cm^{-1} , when intense whitening and death were present.

Fixed discharge capacity was employed ($C = 900 \mu\text{F}$) in an RC circuit, thus the energy input was correlated to the applied voltage ($E = \frac{1}{2} CV^2$) and ranged from 180 kJ (at 50 V.cm^{-1}) to 8820 kJ (at 350 V.cm^{-1}). The strength of the electric field promotes pore formation in cellular membranes (Kinosita and Tsong 1977; Neumann et al., 1982), alters the viscosity of homogalacturan gel-like structure (Zabackis et al., 1995) and affects ionic interactions of positively-charged lysine and histidine residues from extensins to negatively-charged uronic acid from pectin (Showalter, 1993; Rieter, 1998) allowing macromolecular migration across these structures.

Long-term and high-energy electric fields cause cell membrane disruption (Kinosita and Tsong 1977). Organized tissue death has also been observed under high intensity fields (Sabri et al., 1996; Saunders et al., 1995; Dillen et al., 1995).

Cotyledonary and hypocotyledonary tissues showed approximately the same patterns of GUS expression, with the highest values ranging from 150 to 250 V.cm^{-1} (Figure 5A), which are similar to those reported by Dillen et al. (1995) for bean embryonic axes. Dekeyser et al.(1990) reported that field strengths of 375 V.cm^{-1} led to tissue death and, consequently, no GUS expression, we obtained similar results at 350 V.cm^{-1} (Figure 5). A strong linear correlation ($y = 88.3000 + 0.0442 x$, $r = 0.9650$ where y = frequency of GUS positive explants (%), x = electric field strength (V.cm^{-1})) was observed for all tested explants between 100 to 250 V.cm^{-1} electric field strengths. Leaves have never reached high levels of reporter gene expression, nor high frequencies of transiently transformed explants under the tested conditions (Figure 5B).

Effect of electroporation buffer on DNA introduction

No statistical differences ($P < 0.05$) were observed in explants electroporated with buffer I, II and III (Figure 6A). However, frequency of transformed explants was apparently increased in chloride-free electroporation buffer, as previously reported in rice protoplasts (Tada et al. 1990). Chloride-free buffers II and III avoided the formation of toxic Cl_2 gas during electric discharge. A greater number of explants was included in expression levels 4 and 5 when electroporated in buffer II (Figure 6C), which lacks chloride ions and has 4 mM Ca^{+2} , which is responsible for changes in pectin gel viscosity and rheological properties of the plant cell wall (Showalter, 1993; Cosgrove, 1997).

Influence of supercoiled and linear plasmid DNA on reporter gene expression

Linear DNA was most effectively introduced into whole tissue of *Stylosanthes* (Figure 7A), as describe for other Fabaceae (Akella and Lurquin, 1993; Dillen et al., 1995). Higher efficiency of transformation employing linearized plasmid DNA has been reported for bacteria (Rittich and Spanova, 1996), yeast and filamentous fungi (Kwon-Chung et al. 1998), plant protoplasts (Lin et al. 1997) and intact tissue (Lin et al. 1997; Sabri et al. 1996; Saunders et al. 1995; Dillen et al. 1995; Aquella and Lurquin, 1993)

The transient nature of membrane pores and of structural alterations of the cell wall induced by electric fields imposes conformational restrictions to the macromolecules to be introduced (Neumann et al., 1982).

There was a slight increase in expression level employing linear DNA (Figure 7B and 7C) but it was not statistically significant ($P < 0.05$).

Influence of the osmoticum pretreatment on transient GUS expression

No statistically significant enhancement ($P < 0.05$) was observed in reporter gene expression frequency (Figure 8A) but 0.8 M and 1.6 M mannitol increased the number and the intensity of blue spots, as evaluated by the arbitrary scale (Figures 8D and 8E). Intermediary osmotic treatments seemed to provoke a slight trend towards higher expression levels (Figures 8B and 8C).

Osmotic treatment of the target tissue has been reported to increase transformation rates from 7- to 10-fold in microorganisms (Armaleo et al. 1990; Shark et al. 1991) and plant cells (Russell et al. 1992; Vain et al. 1993). The increased distance between the cell wall and cytoplasm in plasmolyzed cells makes them less susceptible to organelle damage and cytoplasm loss when immersed in an electric field.

CONCLUSIONS

We have demonstrated that intact tissue electroporation is an effective means to transiently transform *Stylosanthes guianensis*, as evaluated by reporter gene expression and specific PCR amplification of the transgene.

Explant type was the most critical tested variable, since it could lead to virtually no transformation, as in leaves, to almost 100 %, as in cotyledons. Transient gene expression was highly dependent on the explant type for the other assayed parameters, i.e., electric field strength, DNA form, buffer type, osmotic treatment.

Electric field strength had also decisive impact on transformation rates. The best results were obtained with 150 V.cm⁻¹ (1620 kJ) to 250 V.cm⁻¹ (4500 kJ). Intense electric fields (350 V.cm⁻¹) lead to tissue death and weak electric fields (50 V.cm⁻¹) were not capable of promoting macromolecular movement across intact plant cell wall.

Linearized DNA, electroporation buffer lacking chlorine ions and osmotic treatment (1.6 M mannitol) were also responsible for increased expression levels, although not as critically as the fore mentioned parameters since they could not significantly alter the frequency of GUS expressing explants.

Calli can be obtained from the employed explants and they can further be induced to plant regeneration via organogenesis (Dornelas et al., 1991; Dornelas et al. 1992). Thus intact tissue electroporation is a promising means to obtain transgenic plants of *Stylosanthes guianensis*.

Aknowledgements

We thank Dr. C. Karia (CPAC / EMBRAPA) for kindly providing *Stylosanthes guianensis* cv Mineirão seeds. This research work is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant No.98/11270-7 to M.L.C.V..

References

Akella V, Lurquin PF (1993) Expression in cowpea seedlings of chimeric transgenes after electroporation into seed-derived embryos. Plant Cell Rep 12 : 110-117

Armaleo D, Ye G-N, Klein TM, Shark KB, Sanford JC, Johnston SA (1990) Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi Curr Genet 17: 97-103

Cosgrove DJ (1997) Relaxation in a high-stress environment : the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. Plant Cell 9:1031-1041

Dekeyser RA, Claes B, De Rycke RMU, Habets ME, van Montagu MC, Caplan AB (1990) Transient gene expression in intact and organized rice tissues. *Plant Cell* 2:591-602

Delmer D (1998) A hot mutant for cellulose synthesis. *Trends Plant Sci* 3: 164-165

Dillen W, Engler G, van Montagu M, Angenon G (1995) Electroporation-mediated DNA delivery to seedling tissues of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean). *Plant Cell Rep* 15:119-124

Dornelas MC, Vieira MLC, Appezzato-da-Glória B (1992) Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis induced in immature tissues of *Stylosanthes scabra*. *Ann Bot* 70:477-482

Dornelas MC, Vieira MLC, Souza Jr. Cl de (1991) Fonte e idade de explante, radiação luminosa e combinações de NAA e BAP na indução de calos em *Stylosanthes scabra* Vog. *Pesq Agropec Brasil* 26:1901-1909

Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high-voltage electroporation. *Nuc Acid Res* 16:6127-6145

Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nuc Acid Res* 19:1349

Fromm M, Callis J, Taylor LP, Walbot V (1987) Electroporation of DNA and RNA into plant protoplasts. *Meth Enzymol* 153:351-365

Ha M-A, Apperley DC, Evans BW, Huxham IM, Gordon Jardine W, Viëtor RJ, Reis D, Vian B, Jarvis MC (1998) Fine structure in cellulose microfibrils : NMR evidence from onion and quince. *Plant J* 16:183-190

Jefferson RA., Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion : the β -glucuronidase as sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6 : 3301-3307

Knosita K, Tsong TY (1977) Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes. Bioch Bioph Acta 471:227-242

Kosugi S, Ohashi Y, Nakajima K, Arai Y (1990) An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells : methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. Plant Sci 70:133-140

Kwon-Chung KJ, Goldman WE, Klein B, Szaniszlá PJ, Polonelli LO, Walsh TJ (1998) Fate of transforming DNA in pathogenic fungi. Med Mycol 36:38-44

Lin CH, Xiao L, Hou BH (1997) Optimization of electroporation conditions for expression of GUS activity in electroporated protoplasts and intact cells. Plant Physiol Bioch 35:959-968

Lindsey K, Jones MGK (1987) The permeability of electroporated cells and protoplasts of sugar beet. Planta 172:346-355

McCabe DE, Swain WF, Matinell JB, Christou, P (1988) Stable transformation of soybean (*Glicine max*) by particle acceleration. Bio/Tech 6:923-926

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497

Neumann E, Kakorin S, Tsoneva I (1996) Calcium-mediated DNA adsorption to yeast cells and kinetics of cell transformation by electroporation. Biophys J 71:868-877

Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang M, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. EMBO J 1:841-845

Reiter W-D (1998) The molecular analysis of cell wall components. Trends Plant Sci 3:27-32

Rittich B, Spanova A (1996) Electrotransformation of bacteria by plasmid DNAs : statistical evaluation of a model quantitatively describing the relationship between the number of electrotransformants and DNA concentration. Bioelectroch Bioener 40:233-238

Russell JA, Roy MK, Sanford JC (1992) Major improvements in biolistic transformation of suspension-cultured tobacco cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 28P:97-105

Sabri N, Pelissier B, Teissie J (1996) Transient and stable electrotransformation of intact black Mexican sweet maize cells are obtained after preplasmolysis. Plant Cell Rep 15:924-928

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed, vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Saunders JA, Lin CH, Hou BH (1995) Rapid optimization of electroporation conditions for plant cells, protoplasts and pollen. Mol Biotechnol 3:181-190

Senaratna T, Mckersie BD, Kasha KJ, Procunier JD (1991) Direct DNA uptake during the imbibition of cells. Plant Sci 79:223-228

Shark KB, Smith FD, Hapending PR, Rasmussen JL, Sanford JC (1992) Biolistic transformation of a prokaryote, *Bacillus megaterium*. Appl Environ Microbiol 57:480-485

Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A (1998) High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. Genetics 148:1821-1828

Showalter AM (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. Plant Cell 5:9-23

Songstad DD, Halaka FG, DeBoer DL, Armstrong CL, Hinchee MAW, Ford-Santino CG, Brown SM, Fromm ME, Horsch RB (1993) Transient expression of GUS and anthocyanin constructs in intact maize immature embryos following electroporation. Plant Cell Tissue Organ Cult 33 : 195-201

Tada Y, Sakamoto M, Fujimura T (1990) Efficient gene introduction into rice by electroporation and analysis of transgenic plants : use of electroporation buffer lacking chloride ions. Theor Appl Genet 80:475-480

Vain P, McMullen MD, Finer JJ (1993) Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. Plant Cell Rep 12:84-88

Varner JE, Lin L-S (1989) Plant cell wall architecture. Cell 52:231-239

Vieira MLC, Jones B, Cocking EC, Davey MR (1990) Plant regeneration from protoplasts isolated from seedling cotyledons of *Stylosanthes guianensis*, *S. macrocephala* and *S. scabra*. Plant Cell Rep 9:289-292

Walbot V (1993) Gene pulser™ electroprotocols, survey number 181, Bio-Rad Laboratories, Hercules-CA,

Wojtaszek P, Bolwell GP (1995) Secondary cell-wall-specific glycoprotein(s) from French bean hypocotyls. Plant Physiol 108:1001-1012

Xu X, Li B (1994) Fertile transgenic Indica rice plants obtained by electroporation of the seed embryo cells. Plant Cell Rep 13:237-242

Zabackis E, Huang J, Müller B, Darvill AG, Albersheim P (1995) Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. Plant Physiol 107:1129-1138

Figure 1 : Transformation vector pCambia 1301 expression cassette and *Eco RI* linearized plasmid (11.837 Kb).

PCR primers are indicated by ▶ (*gus1*) and ◀ (*gus2*). Molecular mass marker 100 bp DNA ladder (GIBCO BRL). Arrows indicate cloning direction. Regulatory sequences (polyadenylation signals and promoters) are shown as filled segments and coding sequences as unfilled ones. S = supercoiled pCambia 1301, MCS = multicloning site, NOS = nopaline synthase, *lac z* α = α sub-unit of bacterial lactase.

Figure 2 : GUS expression in electroporated *Stylosanthes guianensis* tissues.

(A) cotyledon, (B) hypocotyl, (C) leaf

Bar = 2 mm

Figure 3 : Effect of the explant type on GUS expression.

(A) Frequency of GUS positive explants.

(B), (C), (D) Distribution of GUS positive cotyledons, hypocotyls and leaves, respectively, in the expression level arbitrary scale from 0 to 5.

Standard electroporation conditions were 900 μF capacitor, 100 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ electric field strength, 20 Ω sample resistance, electroporation buffer I, 10 μg of supercoiled plasmid DNA, absence of osmotic treatment. Error bars indicate $\pm$ se.

Figure 4 : Transgene specific PCR amplification in genomic DNA of electroporated *Stylosanthes guianensis* tissue.

Cotyledon (C), hypocotyl (H) and leaf (L) DNA was isolated from randomly chosen samples from two independent experiments (I and II). Two transgenic *Stylosanthes guianensis* plants (1 and 8) and plasmid pCambia 1301 DNA (0.5 µg and 1 µg) were employed as positive controls and non-electroporated buffer-incubated tissue (S-) and without template (C-) as negative controls. Molecular mass marker is 100 bp DNA ladder (GIBCO BRL).

Figure 5 : Effect of electric field strength on GUS expression.

(A) Frequency of GUS positive explants

(B) Influence of electric field strength on GUS expression level in cotyledons, hypocotyls and leaves as evaluated by arbitrary scale values from 0 to 5.

Standard electroporation conditions were 900 μ F capacitor, 20 Ω sample resistance, electroporation buffer I, 10 μ g of supercoiled plasmid DNA, absence of osmotic treatment. Error bars indicate $\pm$ se.

Figure 6 : Effect of electroporation buffer on GUS expression.

(A) Frequency of GUS positive explants.

(B), (C), (D) Distribution of GUS positive explants in expression level arbitrary scale from 0 to 5 for cotyledons, hypocotyls and leaves, respectively.

Standard electroporation conditions were 900 μ F capacitor, 100 V.cm⁻¹ electric field strength, 20 Ω sample resistance for buffer I and III and 50 Ω for buffer II, 10 μ g of supercoiled plasmid DNA, absence of osmotic treatment. Error bars indicate $\pm$ se. Statistical differences are indicated by different letters on the top.

Figure 7 : Effect of plasmid DNA form on GUS expression.

Frequency of GUS positive explants

(B), (C) Distribution of GUS positive explants on expression level arbitrary scale from 0 to 5 for supercoiled and linear plasmid DNA, respectively.

Standard electroporation conditions were 900 μF capacitor, 100 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ electric field strength, 20 Ω sample resistance, electroporation buffer I, 10 μg of supercoiled or linear plasmid DNA, absence of osmotic treatment. Error bars indicate $\pm$ se. Statistical differences are indicated by different letters on the top.

Figure 8 : Effect of the osmotic treatment on GUS expression.

(A) Frequency of GUS positive explants

(B), (C), (D), (E) Distribution of GUS positive explants under 0, 0.2, 0.8 and 1.6 M mannitol as osmoticum, respectively, as evaluated by expression level arbitrary scale from 0 to 5.

Standard electroporation conditions were 900 μF capacitor, 100 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ electric field strength, 20 Ω sample resistance for buffer I and III and 50 Ω for buffer II, 10 μg of supercoiled plasmid DNA. Error bars indicate $\pm$ se. Statistical differences are indicated by different letters on the top.