Sistemas de Cultura de Células, Tecidos e Órgãos de
Arabidopsis thaliana (Linné) Heynhold *in vitro*

ROBERVAL DE CASSIA SALVADOR RIBEIRO
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Março de 1992

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

R482s Ribeiro, Roberval de Cassia Salvador
 Sistemas de cultura de células, tecidos e órgãos de
Arabidopsis thaliana (Linné) Heynhold "in vitro". Pi
racicaba, 1992.
 70p. ilustr.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Crucífera - Cultivo "in vitro" I. Escola Superior
de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 583.123

i

Sistemas de Cultura de Células, Tecidos e Órgãos de

Arabidopsis thaliana (Linné) Heynhold *in vitro*

ROBERVAL DE CASSIA SALVADOR RIBEIRO

Aprovada em: 30.03.92

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Antonio Roque Dechen..... ESALQ/USP

Prof. Dr. Oswaldo Galvão Brasil..... IB/UNESP

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo CEBTEC/USP

Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

Orientador

Este trabalho é dedicado aos meus avós paternos (Antônio e Maria José) e maternos (João e Maria), sempre presentes, assim como aos meus quatro irmãos, companheiros de todas as horas, mas de maneira profundamente especial aos meus queridos pais, Antônio e Edith, pelo exemplar e raro talento que possuem em transmitir muito amor e carinho àqueles que os cercam.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", por intermédio do Campus de Ilha Solteira - Departamento de Agricultura, à Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- Centro de Biotecnologia Agrícola e à Universidade de Nottingham - Departamento de Ciências da Vida, pela oportunidade do aperfeiçoamento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - CAPES - pela concessão de Bolsa de Estudos e pela oportunidade de desenvolver este trabalho no exterior.

Ao Prof. Dr Otto Jesu Crocomo pela excelente orientação e consideração.

Ao Prof. Dr. Antonio Valeriano Pereira dos Santos, pelos conhecimentos transmitidos no início da execução deste trabalho, minha estima e consideração.

Ao Prof. Edward C. Cocking, Dr. Michael R. Davey, Dr. Bernard J. Mulligan e Dr. Brian J. Power, da Universidade de Nottingham, pelo acompanhamento crítico deste trabalho, pelo apoio e amizade.

De maneira especial à Janet Dawson, pela ajuda em laboratório e pela companhia amiga e sincera. Ao Paul Frederick Tutin e Richard Plumb pelas correções na versão do "Summary" e pela incomparável amizade.

À atenção e eficiência da Profa. Dra. Marney Pascoli Cereda na orientação quanto ao uso e preparo da mistura de amido.

Aos amigos e colegas Márcia Cristina Furlaneto pelas correções no texto, Wagner Campos Otoni, Fernando Berlinck d'Utra Vaz e Gary Manders pela colaboração no laboratório.

À Profa. Dra. Marília Rodrigues Pereira de Noronha, quem muito admiro, pelo incentivo e pela amizade, real e sincera.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e finalmente a Deus que zela pela nossa existência e manutenção da nossa esperança, fé e amor.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Cultura de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	04
2.2. Regeneração a partir de células e tecidos cultivados.....	06
2.3. Cultura de tecidos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	07
2.4. Cultura de células de <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Material vegetal.....	14
3.2. Condições de cultura.....	16
3.2.1. Local.....	16
3.2.2. Casa de vegetação.....	17
3.2.3. Câmaras de crescimento.....	17
3.2.4. Câmara fria.....	17
3.2.5. Tratamento fitossanitário.....	17
3.3. Meios para cultura <i>in vitro</i>	18
3.4. Cultura de plantas.....	18
3.4.1. Em casa de vegetação.....	18
3.4.2. <i>In vitro</i>	20

Página

3.4.3. Otimização da troca gasosa na cultura <i>in vitro</i>	21
3.4.4. Agentes gelificantes na cultura <i>in vitro</i> de plantas.....	22
3.4.5. Armazenamento de plantas.....	24
3.5. Cultura e regeneração de tecidos.....	24
3.6. Cultura de células em suspensão.....	25
3.6.1. Estabelecimento de suspensões celulares.....	25
3.6.2. Efeito de temperatura sobre o crescimento.....	26
3.6.3. Seleção de meio de cultura.....	26
3.6.4. Curva de crescimento.....	27
3.7. Regeneração de plantas intactas a partir de células cultivadas.....	27
3.7.1. Indução de brotos.....	27
3.7.2. Choque frio.....	27
3.7.3. Elongamento de brotos.....	27
3.7.4. Indução de enraizamento.....	27
3.7.5. Controle de escurecimento de tecidos.....	28
3.7.6. Desenvolvimento de plantas e produção de sementes.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Cultura de plantas em casa de vegetação.....	29
4.2. Cultura <i>in vitro</i> de plantas.....	30
4.2.1. Efeito de agentes gelificantes e de troca gasosa.....	30
4.2.2. Armazenamento de plantas.....	36
4.3. Cultura e organogênese de tecidos.....	36
4.4. Cultura de células em suspensão.....	38
4.4.1. Estabelecimento de suspensões celulares.....	38
4.4.2. Efeito de temperatura sobre o crescimento.....	39
4.4.3. Crescimento de células cultivadas.....	41

	Página
4.5. Organogênese em células cultivadas.....	42
4.5.1. Indução de brotos.....	42
4.5.2. Elongamento de brotos.....	44
4.5.4. Enraizamento.....	44
4.5.5. Controle de escurecimento de brotos.....	46
4.5.6. Obtenção de plantas intactas férteis.....	46
5. DISCUSSÃO.....	47
5.1. Cultura de plantas.....	47
5.2. Organogênese em tecidos cultivados.....	49
5.3. Cultura de células em suspensão.....	50
5.4. Organogênese em células cultivadas.....	51
6. CONCLUSÕES.....	53
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	55
APÊNDICE.....	66

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Aspecto geral de *Arabidopsis thaliana*..... 14

Figura 2. Ação de agentes gelificantes e aeração na cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*: massa de matéria fresca de parte aérea por planta..... 31

Figura 3. Ação de agentes gelificantes e aeração na cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*: massa de matéria fresca de raiz por planta..... 31

Figura 4. Ação de agentes gelificantes e aeração na cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*: massa de matéria seca de parte aérea por planta..... 32

Figura 5. Ação de agentes gelificantes e aeração na cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*: massa de matéria seca de raiz por planta..... 32

Figura 6. Ação de agentes gelificantes e aeração na cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*: altura da roseta foliar..... 33

Figura 7. Ação de agentes gelificantes e aeração na cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*: número de folhas por planta..... 33

Figura 8. Ação de agentes gelificantes e aeração na cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*: teor de clorofila de folhas de plantas cultivadas em frascos aerados e não aerados 34

Figura 9. Cultura de <i>Arabidopsis thaliana</i> em casa de vegetação e <i>in vitro</i>	35
Figura 10. Crescimento de células cultivadas em suspensão após 7 dias em MSC1, em 5 temperaturas e 3 diferentes explantes (valores em %)......	39
Figura 11. Crescimento de células cultivadas em suspensão após 7 dias em MSC3, em 5 temperaturas e 3 diferentes explantes (valores em %)......	40
Figura 12. Crescimento de células cultivadas em suspensão após 7 dias em MSC2, em 5 temperaturas e 3 diferentes explantes (valores em %)......	40
Figura 13. Curva de crescimento de células de raiz cultivadas em suspensão em MSC1 e a 24°C, no escuro.....	41
Figura 14. Número de regenerantes obtidos em MIB1 (3, 5 e 7mg/l de IPA), MIB2 (1, 2, e 3mg/l de Thidiazuron) e MIB3 (0,5, 1,0 e 2,0mg/l de Zeatina)......	42
Figura 15. Cultura de células em suspensão e organogênese em células e tecidos cultivados de <i>Arabidopsis thaliana</i>	45

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Plantas transgênicas de diferentes ecótipos de *Arabidopsis thaliana* e o tecido em que o sistema foi baseado..... 11

Tabela 2. Meios de cultura empregados para o cultivo *in vitro* de plantas tecidos e células de *Arabidopsis thaliana*..... 19

Tabela 3. Agentes gelificantes utilizados na cultura *in vitro* de plantas de *Arabidopsis thaliana* e suas respectivas concentrações..... 23

Tabela 4. Número de brotos regenerados via organogênese indireta de tecidos cultivados de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Landsberg erecta de acordo com diferentes explantes e meios indutores de brotos (MIB)..... 37

Tabela 5. Superfície clorofilada de calos e número de regenerantes em relação aos dias em câmara fria e ao tipo de plaqueamento: direto em MIB (A) ou com pré-incubação em MIC (B)..... 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
ABA	Acido abscísico
ADB	Agar Difco Bacto
AG1	Agarose 1
AG5	Agarose 5
AIA	Acido indolil-3-acético
AIB	Acido indolil-3-butírico
AMI	Amido (mistura)
ASG	Agar Sigma
B5	Meio B5 de GAMBORG et alii (1968)
BAP	6-Benzilaminopurina
cm	Centímetro
DNA	Acido desoxirribonucleico
EDTA	Acido etileno diamino tetracético
<i>Et alii</i>	Do latim <i>et alia</i> (singular), <i>et alii</i> (plural): e outros
F1	Primeira geração filial
GA3	Acido giberélico
GEL	Gelrite
h	Hora
IPA	Isopentenil adenina ou 2iP
KM8	Meio de KAO & MICHAYLUK (1975)
LER	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L) Heynh. ecótipo Landsberg erecta
lux	Unidade de luminosidade
M	Molar
m	Metro
MEB	Meio de alongamento de brotos
MES	Acido 2-(N-morfolino)etano sulfônico
MG	Meio de germinação e desenvolvimento de plantas
mg	Miligrama

MIB	Meio indutor de broto
MIC	Meio indutor de calo
min	Minuto
MIR	Meio para indução de raiz
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Meio de MURASHIGE & SKOOG (1962)
MSC	Meio para suspensão celular
°C	Graus Celsius
p b	Pares de bases
pH	Logarítmo negativo da concentração do íon hidrogênio $[-\log(\text{H}^+)]$
PHY	Phytigel
rpm	Revoluções por minuto
s	Segundos
SEA	Seaplaque
Xg	Força da gravidade
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrometro

Sistemas de Cultura de Células, Tecidos e Órgãos de *Arabidopsis thaliana* (Linné) Heynhold *in vitro*

Autor: ROBERVAL DE CASSIA SALVADOR RIBEIRO

Orientador: PROF. DR. OTTO JESU CROCOMO

RESUMO

Arabidopsis thaliana tem sido utilizada como planta modelo para estudos nas genéticas clássica e molecular. Várias das técnicas utilizadas na genética molecular dependem de um sistema para transferência de genes, que em muitos dos casos se baseiam em cultura de tecidos. Um dos ecótipos mais utilizados em estudos de biologia molecular, Landsberg erecta, é um dos que se apresentam mais recalcitrantes quando cultivados *in vitro*.

Neste trabalho são apresentadas metodologias desenvolvidas especificamente para o ecótipo Landsberg erecta, no tocante ao cultivo de plantas, células em suspensão e à organogênese de células, órgãos e tecidos cultivados

O trabalho teve início com o cultivo de plantas em condições de casa de vegetação e *in vitro*.

Duas técnicas de cultivo de plantas em casa de vegetação foram desenvolvidas, uma de semeadura definitiva em vasos e outra com pré-cultura em placas de Petri mantidas em câmara de crescimento, seguida de transplante e desenvolvimento em casa de vegetação.

No tocante à cultura *in vitro* de plantas foram estudados os efeitos de oito agentes gelificantes (Agar, Bacto Agar, Agaroses 1 e 5, Phytigel, Gelrite, Seaplaque e Amido) e a otimização da troca gasosa, indicando que a tradicional cultura de plantas em meio gelificado com agar pode ser substituída com grandes vantagens por produtos alternativos, tanto em termos de produção de biomassa, como qualidade de plantas. A combinação

de frasco aerado contendo meio com amido aumentou a massa de matéria seca em mais de 3 vezes para parte aérea e em mais de 10 vezes a raiz, quando comparado com meio gelificado com agar. O uso de filtros de espuma melhorou a troca gasosa e permitiu a produção de sementes *in vitro*, além de produzir plantas mais saudáveis, excelentes fontes de explantes.

Das plantas cultivadas *in vitro* foram retirados explantes para outros estudos. Conseguiu-se regeneração de explantes cultivados de folha e de raiz. Através do uso de um meio original na organogênese de tecidos de *Arabidopsis thaliana* conseguiu-se reduzir o tempo de regeneração de plantas intactas férteis para apenas 60 dias, computados desde a inoculação do explante de raiz até a produção de sementes.

Suspensões celulares foram estabelecidas a partir de plântula inteira, folha ou raiz, sendo que esta última foi a que produziu maior biomassa independentemente dos meios e temperaturas de cultivo utilizados. Tais suspensões celulares foram cultivadas em temperaturas que variaram de 22 a 30°C, encontrando-se como mais conveniente a de 26°C. Entre os quatro meios de cultura testados, dois foram selecionados, um contendo baixo teor de 2,4-D (0,2mg/l) e outro com teor de 2mg/l.

Quanto à organogênese a partir de células cultivadas de raiz, observou-se que os meios contendo Thidiazuron, apesar de propiciarem regeneração de plantas em grande profusão, estas não produziram sementes. Por outro lado, meio contendo isopentenil adenina foi o que melhor aliou produtividade e fertilidade de regenerantes, não apresentando maiores dificuldades para a obtenção de plantas intactas, com sementes. Dentre os outros parâmetros estudados que estimularam a organogênese de células cultivadas encontra-se: o tamanho e quantidade de agregados celulares plaqueados; a pré-incubação desses agregados em meio de formação de calos por 7 dias; incubação a 4°C por 24 horas, no escuro, logo após a transferência ao meio de regeneração. O emprego de carbono ativado neutralizado, por sua vez, reduziu o escurecimento de brotos regenerados e o uso de filtros de espuma nos frascos de cultura, contribuiu, também neste caso, para que os regenerantes produzissem sementes.

Culture Systems of Cells, Tissues and Organs of *Arabidopsis thaliana* (Linné) Heynhold *in vitro*

Author: ROBERVAL DE CASSIA SALVADOR RIBEIRO

Adviser: PROF. DR. OTTO JESU CROCOMO

SUMMARY

For the past few years *Arabidopsis thaliana* has been used as a model plant for studies in classic and molecular genetics. Many of the techniques employed in molecular genetics depend on a gene transfer system which is mostly based on tissue culture. Although *Landsberg erecta* is one of the most largely used ecotypes in such studies it is also known as one of the most recalcitrant for *in vitro* culture.

In order to achieve the aim of obtaining fertile plants through the organogenesis of culture cells and tissues it was first necessary to develop protocols for the growth of plants in both glasshouse and *in vitro* conditions.

Two ways for achieving the growth of plants in a glasshouse were developed. Firstly, by direct sowing in a glasshouse and secondly, by pre-culture, under artificial conditions, in a growth room, with a subsequent transfer to a glasshouse to complete their development.

The effects of eight gelling agents (Agar, Bacto Agar, Agaroses 1 and 5, Phytagel, Gelrite, Seaplaque and a starch mixture) and gaseous exchange on *in vitro* growth of plants were also investigated. The traditional method of growing plants on Agar was substituted with alternative products producing advantages in terms of both biomass production and costs. A 3-fold and 10-fold increase in the dry weight of aerial parts and roots was produced by a combination of aerated vessels containing Agar-gelled media. It was also shown that the use of cylindrical foam bung filters improved the gaseous exchange leading to the production of healthier

plants, a good source of explants, and allowing the setting of seeds, thereby completing their cycle *in vitro*.

Excised from that *in vitro* cultured material were the explants for the organogenesis of tissues. The regeneration of fertile plants from leaf and root explants was then observed. By employing an original and simple regeneration medium in *Arabidopsis* tissue culture a time of only 60 days between the inoculation of root explants and the production of seeds was made possible.

From the same *in vitro* grown plants cell suspensions were established using either plantlet, leaf or root explants, where the latter of the three was found to be superior in terms of biomass production regardless of the type of culture media or temperature levels. Cell suspensions were cultured without light at between 22 and 30°C. The most suitable temperature being 26°C. Of the four tested media two were selected, one containing low contents of 2,4-D (0.2mg/l) and the other with ten times that amount.

Organogenesis was then successfully achieved from those cultured cells. Although media containing Thidiazuron induced a large amount of shoots, seed setting was not observed when that growth regulator was employed. Thus, if fertile plants with seeds were not the main aim, then Thidiazuron would be a suitable option. On the other hand IPA proved itself to be superior as a growth regulator for shoot induction and did not inhibit seed production, leading to normal looking plants. Other observations included the enhancement of organogenesis by a 7 day pre-incubation period on callus inducing medium prior to their transfer to shoot inducing medium. Also observed were the effects of cold treatment for 24h at 4°C without light for the first day of usage of shoot inducing medium. It was also found that neutralized activated charcoal was effective in reducing the browning of newly regenerated shoots, and the use of foam bung filters promoted normal flowering and consequently seed setting by the regenerants.

1. INTRODUÇÃO

Arabidopsis thaliana (Linné) Heynhold é uma planta superior de pequeno porte que deixou de ser considerada apenas uma erva daninha para ser tida atualmente como o organismo vegetal ideal para estudos nas genéticas clássica e molecular.

A maioria dos estudos relacionados com genética vegetal têm sido voltados para plantas comerciais como milho, ervilha, fumo, trigo e tomate. Tais plantas são relativamente grandes em tamanho, demandam grande área para seu desenvolvimento e apresentam um longo período entre gerações, o que permite apenas duas a três gerações por ano, sendo portanto inconvenientes para certos tipos de experimentos. Além disso são também caracterizadas por possuírem grande genoma nuclear, com uma significativa proporção na forma de DNA repetitivo e disperso. Estas propriedades aumentam as dificuldades em muitos tipos de experimentos com DNA recombinante.

A planta ideal para esses tipos de estudos deve reunir características como pequeno porte (para maior facilidade de cultivo em pequenas áreas), curto período entre gerações, genoma reduzido, pouco DNA repetitivo, um sistema eficiente para genética clássica, transformação e regeneração, boa citogenética e importância econômica (MEYEROWITZ, 1989). Com tais características uma planta pode ser adotada para estudos básicos tanto em genética clássica quanto molecular.

Embora *Arabidopsis thaliana* não ofereça importância econômica, apresenta-se bastante atrativa para a genética clássica, pois devido ao seu porte pequeno torna-se possível cultivar mais de 1.000 plantas por metro quadrado, em condições naturais ou "in vitro", obtendo gerações em média a cada seis semanas.

Durante os últimos anos *Arabidopsis thaliana* tem atraído também grande interesse dos estudiosos em genética molecular, devido principalmente ao tamanho de seu genoma haplóide, o qual apresenta apenas 70×10^6 pares de bases, dispostas em 5 pares de cromossomos, sendo o menor

genoma conhecido entre as plantas superiores (SPARROW *et alii*, 1972). Esse genoma não é muito maior do que o de alguns microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* (15×10^6 pares de bases) e mais de sessenta vezes menor, por exemplo, que o da ervilha (*Pisum sativum*), outra planta modelo em genética, que apresenta 4.500×10^6 pares de bases. A organização do genoma nuclear de *Arabidopsis thaliana* é bastante importante, uma vez que apresenta baixo conteúdo de seqüências repetitivas (NORTH, 1985). *Arabidopsis thaliana* é, portanto, uma planta superior com propriedades de ciclo de vida e organização genômica que permitem amplas investigações genéticas e eficiente seleção de mutações. Embora para alguns casos ainda existam limitações, como por exemplo, a pequena quantidade de material obtido a partir de plantas intactas, a gama de benefícios oferecidos por *Arabidopsis thaliana* não é encontrada em nenhuma outra planta superior, justificando a sua adoção como planta modelo para estudos em fisiologia, bioquímica, biologia molecular e manipulação genética.

O sucesso das técnicas atualmente empregadas para manipulação genética (cultura de tecidos, células, órgãos, protoplastos e transformação) depende muitas vezes da regeneração de plantas intactas a partir de tecidos e células via organogênese. Na maioria dos casos é importante que essas plantas regeneradas sejam férteis e capazes de produzir sementes, caso contrário os efeitos da técnica utilizada não podem ser avaliados nas gerações subsequentes.

A grande variação genética encontrada em diferentes ecótipos de *Arabidopsis thaliana* é conhecida. Não é de se surpreender, portanto, que os vários ecótipos respondam diversamente quando submetidos à cultura de tecidos. No caso de cultura de protoplastos, por exemplo, o ecótipo Landsberg erecta necessitou um protocolo especial para dar bons resultados (DAMM & WILLMITZER, 1990). Justamente esse ecótipo, o mais amplamente utilizado como espécie selvagem em estudos de biologia molecular e manipulação genética, constitui-se num dos que apresentam maiores dificuldades para o cultivo *in vitro*. As barreiras encontradas para esse ecótipo vão desde a obtenção de plantas saudáveis quando cultivadas *in vitro*, passando por baixa eficiência de organogênese à partir de tecidos, culminando com inexistência de protocolo para regeneração de plantas intactas à partir de células cultivadas.

O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver as seguintes metodologias para *Arabidopsis thaliana* ecótipo Landsberg erecta: a)

estabelecer o seu cultivo em condições de casa de vegetação; b) otimizar a cultura *in vitro* de plantas, investigando a influência da troca gasosa e a dos agentes gelificantes do meio de cultura no desenvolvimento da planta; c) regeneração de plantas intactas e férteis, via organogênese indireta a partir de explantes de diferentes tecidos ou órgãos; d) estabelecimento e cultura de células em suspensão; e) regeneração de plantas intactas e férteis a partir de células cultivadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Um grande número de estudos realizados em biotecnologia de *Arabidopsis thaliana* baseou-se em plantas cultivadas axenicamente para atingir seus objetivos, como por exemplo no estabelecimento de cultura de tecidos (LOEWENBERG, 1965; ZIEBURG, 1965; NEGRUTIU, 1976; NEGRUTIU *et alii*, 1978; NEGRUTIU & JACOBS, 1978; ACEDO, 1986; PATTON & MEINKE, 1987 e 1988; FELDMANN & MARKS, 1986; CHAUDHURY & SIGNER, 1989a e VALVEKENS *et alii*, 1988), suspensão celular (ANAND, 1966; CORCOS, 1971; CORCOS *et alii*, 1972; NEGRUTIU *et alii*, 1975; SCHOLTEN, 1980; SCHOLTEN *et alii*, 1985; SCHOLTEN, 1986 e GLEDDIE, 1989), isolamento de protoplastos (GRESSHOF, 1972; GLEBA *et alii*, 1978; XUAN & MENCZEL, 1980; BINDING *et alii*, 1981; DAMM & WILLMITZER, 1988; FORD, 1990 e KARESCH *et alii*, 1991a), assim como transformação genética (AN *et alii*, 1986; LLOYD *et alii*, 1986; FELDMANN AND MARKS, 1987; KLEE *et alii*, 1987; SHEIKHOSLESLAM & WEEKS, 1987; ZHANG & SOMERVILLE, 1987; HAYFORD *et alii*, 1988; SCHIMIDT & WILLMITZER, 1988; VALVEKENS *et alii*, 1988; CHAUDHURY & SIGNER, 1989b; FELDMANN *et alii*, 1989; KARESCH *et alii*, 1991b e MARTON & BROWSE, 1991).

É muito provável que a qualidade das plantas cultivadas exerça um certo grau de influência sobre o resultado final de tais trabalhos e é de se esperar que, na maioria dos casos, plantas saudáveis e bem nutridas levem a melhores resultados.

As plantas cultivadas *in vitro* estão sujeitas a diferentes parâmetros como qualidade e intensidade de luz, umidade, temperatura, fotoperíodo e meio de cultura e seus componentes. *Arabidopsis thaliana* é grandemente influenciada pelo caráter nutricional, sendo que nutrição insuficiente pode acelerar o florescimento e reduzir o ciclo reprodutivo, tendo como consequência um número reduzido de sementes (MEYEROWITZ, 1987 e 1989).

O meio de cultura por sua vez é composto basicamente de sais, vitaminas e fonte de energia, sendo complementados muitas vezes com reguladores de crescimento e alguns outros componentes. Na maioria das investigações acima citadas para *Arabidopsis thaliana* foi utilizado agar como agente gelificante nos meios de cultura. A marca comercial e a concentração de agar muitas vezes é omitida nos protocolos. Agar é um polissacarídeo complexo normalmente usado para a cultura de microorganismos porque estes são capazes de hidrolisar algumas outras opções de agente gelificante, tais como gelatina e amido. Embora agar tenha sido considerado biologicamente inerte por vários autores, esta atribuição tem sido questionada (SINGHA, 1980; DEBERGH, 1983; ARNOLD & ERICKSSON, 1984; HENDERSON & KINNERSLEY, 1988; ZIMMERMAN & COBB, 1989 e QIAO & FALAVIGNA, 1990), sendo inclusive reportado o efeito inibitório de agar em cultura de anteras (KOHLENBACH & WERNICKE, 1978).

Tecidos cultivados em agar frequentemente apresentam variações de crescimento de acordo com a marca comercial e a concentração utilizada, podendo ocasionar vitrificação em alcachofra (*Cynara scolymus* L.), *Forsythia intermedia* VAHL., *Oreopanax nymphacifolium* DECNE & PLANCK e *Gerbera jamesonii* H. BOLUS (DEBERGH, 1983). Outros pesquisadores vem contestando a hegemonia do agar pela comparação com substitutivos. Cultura de células em suspensão de *Arabidopsis thaliana* quase que triplicam o número de colônias regeneradas quando Gelrite (Imperial Laboratories, Reino Unido), substitui o tradicional agar (GLEDDIE, 1988). O mesmo produto se mostrou mais eficaz na cultura *in vitro* de *Asparagus officinalis*, pois apresentou melhores resultados em embriogênese somática (SAITO *et alii*, 1991) e cultura de anteras (QIAO & FALAVIGNA, 1990). O amido é outro agente que tem se destacado perante o agar em uma série de investigações em cultura de anteras de cevada (SORVARI, 1986a, b), na diferenciação de discos de tubérculo de batata (SORVARI, 1986c), assim como em cultura de células de fumo e cenoura selvagem, onde as massas de matérias fresca e seca mostraram-se três vezes superiores àquelas cultivadas em agar (HENDERSON & KINNERSLEY, 1988).

Outro fator importante para a cultura *in vitro* de algumas plantas, entre as quais *Arabidopsis thaliana*, é proporcionar uma eficiente troca gasosa com o meio ambiente, sem prejuízo da assepsia. Alguns autores já reportaram a importância da troca gasosa para a organogênese indireta de raízes de *Arabidopsis thaliana* (VALVEKENS *et alii*, 1988 e MARTON & BROWSE,

1991) e dos efeitos negativos da alta umidade sobre a abertura de anteras (VALVEKENS *et alii*, 1988), o que certamente dificultaria o florescimento, frutificação e ulteriormente a obtenção de sementes de plantas intactas ou regeneradas via cultura de células ou tecidos.

2.2. Regeneração a partir de células e tecidos cultivados

A regeneração de plantas intactas e férteis é o ponto básico para qualquer sistema de cultura de tecidos (no seu sentido amplo) visando áreas mais avançadas da biotecnologia.

Segundo THOMAS & DAVEY (1975) a habilidade de uma célula individual crescer de maneira autônoma foi pela primeira vez teorizada por SCHLIEDEN (1838) e posteriormente por SCHWANN (1839), o qual também definiu como totipotência a capacidade de uma única célula se desenvolver em um indivíduo completo; HABERLANDT (1902) foi o primeiro a discorrer sobre a importância da totipotência de células vegetais, enunciando as maneiras que essa propriedade, caso existente, poderia ser explorada; no entanto, mais de um século depois da primeira referência foi que a totipotência foi comprovada quando a regeneração a partir de uma única célula de fumo foi obtida por VASIL & HILDEBRANDT (1965), citado por WARREN (1991).

Apesar de tais avanços, existe ainda uma grande lacuna no que se refere ao conhecimento básico sobre a diferenciação e desenvolvimento de plantas, assim como o controle do crescimento de maneira geral. O mecanismo de ação de reguladores de crescimento tem se revelado muito difícil de ser entendido, o que faz com que a maioria dos estudos com cultura de tecidos e regeneração seja dominado por características empíricas.

Os principais tipos de diferenciação observados em plantas são a formação de raízes e parte aérea, chamada organogênese. Na maioria dos casos esses processos não ocorrem ao mesmo tempo. Em poucos casos esses processos ocorrem simultaneamente e de maneira coordenada, à semelhança do que ocorre num embrião vegetal, sendo este fenômeno denominado embriogênese somática. Em algumas situações é fácil se fazer a distinção entre organogênese e embriogênese, mas na maioria dos casos se torna muito trabalhosa. Na embriogênese somática de maneira geral, a formação de brotos precede a organogênese radicular (rizogênese), que é teoricamente induzida por uma diferenciação vascular formando uma conexão raiz-caule, dando origem a uma plântula autônoma (WARREN, 1991). O importante é que tanto

um quanto outro podem se desenvolver em plantas normais. Se a organogênese ocorrer a partir de meristema pré-existente no explante é denominada direta. Se o primórdio meristemático for induzido (calo) a organogênese observada nesse tecido é indireta.

Por analogia também existem dois tipos de embriogênese, a direta e a indireta. A embriogênese é dita direta quando uma célula (ou um agregado delas) inicia crescimento meristemático e todos os descendentes desta célula fazem parte do embrião. Esse tipo de embriogênese é rara, sendo reportada para tecido nucelar de *Citrus*, em algumas culturas de anteras e muito ocasionalmente em protoplastos (WARREN, 1991). Segundo o mesmo autor a embriogênese indireta é muito mais comum e é definida como o desenvolvimento do embrião a partir de uma massa meristemática previamente formada. Esse tipo de embriogênese já vem sendo relatada para *Arabidopsis thaliana* como de ocorrência esporádica nos sistemas de transformação e regeneração apresentados por RÉDEI *et alii* (1988) e KONCZ *et alii* (1990) e, mais recentemente, em sistema aperfeiçoado por MARTON & BROWSE (1991).

Com exceção destes três últimos trabalhos todos os tipos de regeneração conseguidos até agora para *Arabidopsis thaliana* são provavelmente do tipo organogênese indireta.

2.4. Cultura de tecidos de *Arabidopsis thaliana*

Entre outras aplicações, a cultura de tecidos é de grande utilidade para propagação e melhoramento genético de plantas. A micropropagação pode ser usada para a propagação clonal de genótipos específicos ou simplesmente para a rápida multiplicação. A cultura de tecidos também pode ser usada para induzir variabilidade (variação somaclonal), salvamento de embriões que normalmente não se desenvolveriam numa planta, obtenção de haplóides por cultura de anteras, hibridação somática (pela fusão de protoplastos) e transformação genética.

A cultura de tecidos em *Arabidopsis thaliana* tem sido objeto de pesquisa por mais de 25 anos. Esse período pode ser dividido em três fases: na primeira obteve-se a cultura de calos, na segunda a regeneração de plantas a partir de calos cultivados e na terceira a otimização do processo de organogênese.

A primeira fase da cultura de tecidos refere-se portanto ao estabelecimento de culturas de calos e à sua capacidade em se manter como tal depois de diversas subculturas, sem que se obtivesse a regeneração. A cultura de calos foi estabelecida pela primeira vez em meados da década de sessenta a partir de plântulas (LOEWENBERG, 1965), hipocótilo (ZIEBURG, 1965), partes de plantas maduras (YOKOYAMA & JONES, 1965), ou ainda de sementes em estágio de germinação (SHEN & SHARP, 1966). Desde então vários trabalhos vêm sendo publicados.

A segunda fase começou com a obtenção de organogênese (raízes e parte aérea) em cultura de calos reportado por YAKOYAMA & JONES (1965), variando-se as concentrações de AIA e Cinetina. Em seguida, a diferenciação foi observada em um estudo sobre efeitos de reguladores de crescimento em *Arabidopsis thaliana* (STEWART *et alii* 1967, citado por CORCOS 1975)

GRESSHOF & DOY (1972), trabalhando com cultura de anteras, conseguiram rizogênese (em cultivo no escuro) e tecidos clorofilados e brotos (em cultivo sob iluminação) usando meio com 0,5mg/l de ANA e 10mg/l de Cinetina. Com esse procedimento, foi obtido um broto fasciado e como esperado para uma planta haplóide não produziu sementes, embora as flores apresentassem aparência normal.

Vários outros fatores que controlam e influenciam a morfogênese foram investigados, como o efeito dos fitorreguladores 2,4-D, ANA e Cinetina, no crescimento e regeneração de calos (NEGRUTIU *et alii*, 1975). Neste caso, os melhores resultados foram obtidos com 2,4-D (1-2 mg/l) e baixa concentração de Cinetina (0,05mg/l) e o emprego de ANA resultou em calos vascularizados e cobertos por estrutura aveludada. Continuando em uma linha de trabalho similar NEGRUTIU & JACOBS (1978a) apontaram como fatores que melhoraram a morfogênese (formação de folhas) *in vitro*: o uso de um meio de cultura definido química e fisicamente; subcultura de calos em intervalos de 6 a 8 semanas, mantidos sob pouca luz contínua ou escuro; tratamento frio a 4°C por 3 dias antes da regeneração, uso de glutamina (1,5g/l) como única fonte de nitrogênio no último subcultivo antes da regeneração; uso de inóculo de calo de tamanho pequeno (0,075g) e meio de cultura líquido esterilizado por filtração. Na mesma época, publicaram um estudo sobre fatores capazes de restaurar a capacidade morfogenética de calos cultivados por seis a quinze meses (NEGRUTIU & JACOBS, 1978 b), indicando para isso um aumento da quantidade de glucose (de 2 para 6%) e eliminação

dos reguladores de crescimento do meio de cultura, duas semanas antes da transferência para meio indutor de brotos. Todo esse procedimento é indicado para cultura de calos derivados de anteras do ecótipo Estland e não foi testado para outros sistemas. Outros autores, por sua vez, estudaram o efeito de substâncias capazes de inibir a cultura de calos (CATTOIR *et alii*, 1980).

NOBUHARU (1980) investigou a capacidade organogenética e a herdabilidade em plantas obtidas a partir de tecidos de diferentes idades. Este mesmo autor conseguiu obter flores e frutos em regenerantes posteriormente envasados. O caminho da morfogênese *in vitro* de calos derivados de sementes e a sua proliferação foram acompanhados por HUANG & YEOMAN (1984). Calos apresentaram autonomia com relação à citocinina, mas não mostraram esta propriedade quando cultivados no escuro, sendo dependentes de 2,4-D (ONDREJ *et alii*, 1984). Em compensação, 2,4-D quando administrado em altas concentrações, estimulou a formação e secreção de polissacarídeos mucilaginosos (GOTO, 1986).

O esquema tradicional para regeneração de brotos anteriormente adotado, era o de induzir a formação de calos a partir de explantes em meios com concentração intermediária de auxina em proporção à de citocinina; os explantes permaneciam naquele meio por mais de trinta dias antes de serem transferidos para meio indutor de brotos que continham baixa concentração de auxina e alta de citocinina (GRESSHOF & DOY, 1972 e NEGRUTIU *et alii*, 1978). Assim sendo, o sistema tradicional tinha como características a baixa frequência de regeneração de brotos, ocorrida num substancial espaço de tempo. Uma outra característica é que muitas das plantas obtidas das culturas estabelecidas eram anormais em aparência e como nada foi mencionado à respeito da fertilidade, presume-se que não produziram sementes, tudo isso como provável consequência do processo prolongado de cultura.

A variação somaclonal pode constituir-se, no entanto, o meio para obtenção de plantas com características desejadas. Uma das aplicações práticas nesse sentido foi a indução de cultura de calos à variação somaclonal visando a obtenção de linhagens resistentes a herbicidas (HAUGHN & SOMERVILLE, 1986; HEIM *et alii* 1990a e b). A variação somaclonal induzida em organogênese indireta também foi estudada por GAJ & MALUSZYNSKI (1987), os quais obtiveram plantas que continham alta frequência de mutações e alterações no número de cromossomos.

A terceira etapa na pesquisa em organogênese de *Arabidopsis thaliana* ocorreu com o trabalho de FELDMANN & MARKS (1986), que reduziram o tempo de cultivo em meio indutor de calos e utilizaram IPA como regulador de crescimento. Se o tempo que o tecido permanece em cultura for reduzido, ocorre em geral um aumento correspondente no potencial morfogenético e uma diminuição na proporção de plantas anormais regeneradas. Para evitar-se a variação somaclonal recomenda-se, portanto, encurtar o período de cultivo. Esse recurso é notadamente útil em experimentos de transformação genética baseados na cultura de tecidos. Os problemas encontrados no início, com relação ao longo período necessário para regeneração, vem sendo sucessivamente superados e atualmente já se obtém uma regeneração muito mais rápida, tanto a partir de cultura de calos originados de plântulas (ACEDO, 1986) e cotilédones (PATTON & MEINKE, 1987 e 1988) como de explantes de folhas (FELDMANN & MARKS, 1986), passando ainda por diferentes tecidos da parte aérea de diversos ecótipos (CHAUDHURY & SIGNER, 1989 a), como também de raiz (VALVEKENS *et alii*, 1988 e MARTON & BROWSE, 1991).

Os trabalhos mais recentes recorrem à cultura de tecidos para a transformação genética intermediada por *Agrobacterium tumefaciens* (AN *et alii*, 1986; LLOYD *et alii*, 1986; FELDMANN & MARKS, 1987; KLEE *et alii*, 1987; SHEIKHOSLESLAM & WEEKS, 1987; ZHANG & SOMERVILLE, 1987; HAYFORD *et alii*, 1988; SCHIMIDT & WILLMITZER, 1988; VALVEKENS *et alii*, 1988; CHAUDHURY & SIGNER, 1989b; FELDMANN *et alii*, 1989 e MARTON & BROWSE, 1991), variando, entre outras coisas, os explantes e ecótipos utilizados (Tabela 1).

A cultura de tecidos também foi empregada para o salvamento de embriões de mutantes letais através de sua transferência para cultivo em meio artificial (BAUS *et alii*, 1986), sendo que alguns deles formaram plantas anormais, mostrando ausência de raízes. Em outro trabalho (FRANZAMANN *et alii*, 1989), algumas das plantas obtidas tinham aparência normal, apresentando contudo aborto de sementes após a fecundação e uma maioria de aberrantes.

A cultura de tecidos também pode ser utilizada para a obtenção de plantas haplóides a partir da cultura de anteras. Tecidos haplóides e plantas originadas de anteras foram cultivados em meio sólido contendo diferentes concentrações de AIA ou ANA e Cinetina (GRESSHOF & DOY, 1972). Os calos obtidos a partir do mesmo tecido foram haplóides, mas alguns

regenerantes tornaram-se também diplóides (SCHOLL & AMOS, 1980). O uso de meio líquido e carbono ativado no meio de regeneração foram apontados como estimulantes do desenvolvimento de flores e raízes em cultura de calos derivados de anteras e de plântulas (SCHOLL *et alii*, 1981a e b). Também foi possível a obtenção de estruturas semelhantes a embrióides a partir da cultura de anteras (SCHOLTEN & FEESTRA, 1984).

Tabela 1. Plantas transgênicas de diferentes ecótipos de *Arabidopsis thaliana* e o tecido em que o sistema foi baseado.

Explante	Ecótipo	Referência
Folha	Columbia	HAYFORD <i>et alii</i> (1988)
Folha	Columbia	KLEE <i>et alii</i> (1987)
Folha	Columbia	AN <i>et alii</i> (1986)
Semente	Wassilewskija	FELDMANN & MARKS (1987)
Folha	Wassilewskija	SHEIKHOESLAM & WEEKS(1987)
Folha e Cotilédone	Columbia	SCHMIDT & WILLMITZER (1988)
	Wassilewskija	
	Land. erecta	
Raiz	Columbia	VALVEKENS <i>et alii</i> (1988)
	Land. erecta	
Raiz	Benshein	CHAUDHURY & SIGNER (1989)
Semente	Wassilewskija	FELDMANN <i>et alii</i> (1989)
Folha	Columbia	ZHANG & SOMERVILLE (1987)
Folha	Columbia	LLOYD <i>et alii</i> (1986)
Raiz	RLD	MARTON & BROWSE (1991)
Raiz	Columbia	KEMPER <i>et alii</i> (1992)
	Nossen	

2.1.3 - Cultura de células de *Arabidopsis thaliana*

As culturas de células em suspensão são de grande utilidade para biotecnologia de plantas, pois fornecem uma população relativamente homogênea de células, desenvolvidas sob condições definidas e assépticas e

prontamente acessíveis para a aplicação de produtos químicos exógenos. São também grandes fornecedoras de protoplastos, assim como largamente empregadas como sistemas modelo para estudos de metabolismo secundário, indução de enzimas e expressão de genes.

O estabelecimento de uma cultura de células em suspensão parece ter sido tarefa de relativa simplicidade (ANAND, 1966 e CORCOS, 1971). A presença de 2,4-D em concentração superior a 10^{-6} M foi apontada como essencial no estabelecimento de suspensões, do contrário os explantes de raiz ao invés de desenvolverem-se em pequenos calos apresentariam apenas alongamento (CORCOS & LEWIS, 1972). Suspensões celulares foram estabelecidas por NEGRUTIU *et alii* (1975) para determinação de taxa de crescimento, tempo de geração, densidade celular e viabilidade, sem, no entanto serem mantidas por mais do que três ciclos. SCHOLTEN (1980) reportou a cultura de células em suspensão utilizando diferentes fontes de nitrogênio, sendo que em seguida foi também desenvolvida uma série de estudos com mutantes deficientes em redutase de nitrato (SCHOLTEN *et alii*, 1985) e resistentes a clorato (SCHOLTEN, 1986).

Mais um exemplo do que pode ser feito com base em células em suspensão, sem que necessariamente se desenvolva uma planta completa, é a expressão e sequenciamento de genes indutíveis pela ação de auxina (CONNER *et alii*, 1989). Embora tenha gerado interessantes informações, a não obtenção de descendentes bloqueou a verificação da transmissão dessas características para as próximas gerações da planta. Este fato ilustra a importância da regeneração de plantas a partir de células em suspensão para análises bioquímicas, moleculares e genéticas.

A primeira referência a respeito de organogênese a partir de células cultivadas foi feita por CORCOS *et alii* (1973), os quais relataram que a simples transferência de células em suspensão para meio sólido contendo AIA (0,03mg/l) e Cinetina (1mg/l) permitiu a formação de raízes, parte aérea, flores e sementes que germinaram e deram origem a plantas diplóides. Entretanto, o autor referiu-se à vulnerabilidade da rediferenciação em relação a fatores estacionais, o que sugere uma certa inconstância de resultados.

A regeneração de plantas férteis de *Arabidopsis thaliana* a partir de suspensão celular também foi obtida por GLEDDIE (1989). A suspensão celular foi estabelecida a partir de explante foliar ou hipocótilo. Entre outros detalhes, este mesmo autor recomenda que a cultura de células

em suspensão seja feita a temperaturas não superiores a 25°C. Embora tenha regenerado plantas férteis, estas só foram obtidas a partir da transferência dos brotos enraizados para casa de vegetação. Seria interessante se o ciclo da planta pudesse ter sido completado em condições *in vitro*, pois além de causar menor estresse aos regenerantes, certos experimentos que usam antibióticos como marcadores seletivos na transformação genética poderiam ser testados ainda *in vitro*, inclusive no caso de gerações subseqüentes do regenerante. GLEDDIE (1988) apontou inclusive a superioridade dos reguladores de crescimento Zeatina e Thidiazuron e do agente gelificante Gelrite na promoção de organogênese indireta.

Outro campo de estudos dentro da cultura de tecidos de *Arabidopsis thaliana* são os protoplastos. Protoplastos (células desprovidas de parede celular) podem ser obtidos das mais diferentes fontes de tecidos ou suspensões celulares e em *Arabidopsis thaliana* podem ser isolados em grandes quantidades por digestão enzimática da parede celular. Um fator essencial para o sucesso da tecnologia de protoplastos é, sem dúvida, a obtenção de uma sistema que culmine em plantas completas e férteis. Por exemplo, qualquer que seja o método escolhido para melhoramento ou transformação genética que se utilize de protoplastos (hibridação somática, micro-injeção, absorção direta de DNA mediado por PEG, eletroporação, etc), a herdabilidade do gene exógeno incorporado só poderá ser facilmente comprovada a partir da regeneração de plantas férteis.

No primeiro isolamento de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* observou-se que apesar de terem sobrevivido algumas semanas, não chegaram a apresentar divisão (NEGRUTIU *et alii*, 1975). Diversos trabalhos se seguiram na tentativa de conseguir regenerantes férteis, utilizando-se como fonte de protoplastos basicamente células de mesófilo foliar ou suspensões celulares originadas a partir de folhas ou raízes. Embora vários autores tenham relatado isolamento e cultura de protoplastos (GRESSHOF, 1972; GLEBA *et alii*, 1978), e regeneração de plantas (XUAN & MENCZEL, 1980; BINDING *et alii*, 1981 e FORD, 1990), apenas dois dos protocolos, desenvolvidos conjuntamente, relatam a regeneração de plantas férteis (DAMM & WILLMITZER, 1988 e KARESCH *et alii*, 1991a). Nestes, os protoplastos de mesófilo foliar, ao contrário de outros trabalhos, foram plaqueados em meio sólido contendo alginato de sódio como alternativa de agente gelificante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Figura 1: Aspecto geral de uma planta adulta de *Arabidopsis thaliana*.

(modificado a partir da gravura promocional da IV Conferência Internacional sobre Pesquisa em *Arabidopsis* - Viena, 02-05/06/1990)

Acredita-se que *Arabidopsis thaliana* seja proveniente do Velho Mundo, pois sua origem geográfica não é conhecida com exatidão. Pode ocorrer desde em áreas mais elevadas dos trópicos até as frias regiões da Escandinávia, passando por outras áreas na Europa, assim como Asia, Africa, Austrália e América do Norte (RÖBBELEN 1957, RÉDEI 1970, KRANZ 1978 e KARSEN *et alii* 1983). Devido à predominância quase que exclusiva de autofecundação e à vasta distribuição geográfica, diversos ecótipos desta espécie podem ser encontrados.

Arabidopsis thaliana pertence à família Brassicaceae (=Cruciferae). Esta família reúne espécies predominantemente herbáceas provavelmente originadas de plantas lenhosas tropicais da ordem Capparales (MORAWETZ, 1990). A família (com cerca de 300 gêneros e 3000 espécies) é extremamente circunscrita, sendo os gêneros confluentes e de difícil distinção. De maneira geral, existe relativamente pequena variação morfológica dentro das Brassicaceae quando comparada com o alto grau de variabilidade dentro de uma mesma espécie. As características principais da família são determinadas pelas flores tetrâmeras com seis estames (tetradínamos), fruto singular tipo síliqua que apresenta uma cápsula bivalve e também a ocorrência de glicosídeos de óleo mostarda. O número de cromossomos varia entre 5 e 12.

Conforme citado por MORAWETZ (1990), *Arabidopsis thaliana* foi mencionada pela primeira vez por DALECHAMP (1587) como *Aizoon telephium* e desde então vem acumulando cerca de 35 sinônimos; a primeira descrição válida foi efetuada por LINEÉ (1753) como *Arabis thaliana* e HEYNHOLD (1842) a transferiu para o seu recém criado gênero *Arabidopsis* que agregava ao redor de 11 espécies (no sentido clássico). O número cromossômico básico é 8 com exceção de *Arabidopsis thaliana* que apresenta 5, embora em várias espécies aquele número ainda não tenha sido aferido e a ocorrência de variação infra-específica do número de cromossomos tenha sido reportada (MORAWETZ, 1990). *Cardaminopsis* é o gênero mais próximo de *Arabidopsis thaliana*. Ambos demonstram a clara incerteza quanto à relação taxonômica e evolutiva que caracteriza as Brassicaceae. *C. suecica* e *Arabidopsis thaliana* só podem ser distinguidas quando são férteis e, mesmo assim, possuem poucas características de fruto que possibilitem tal tarefa.

A planta adulta de *Arabidopsis thaliana* (Figura 1) consiste de uma roseta de folhas pequenas distribuídas radialmente, na base da qual sai um ramo principal. Este vai se ramificando à medida que a planta fica mais

velha, dando origem a segmentos secundários e terciários. A altura máxima da planta pode alcançar 30 a 40 centímetros, embora o tamanho possa ser influenciado pela nutrição e densidade de cultivo. A inflorescência é um racemo contendo uma série de flores, sendo que as mais velhas ocupam a porção basal. As flores são típicas da família Brassicaceae, consistindo de quatro pétalas e quatro sépalas em posições alternadas. Possuem seis estames, dos quais quatro são longos e dois mais curtos. O ovário é bicarpelar e os óvulos se apresentam em sequência ao longo da parede do ovário. Flores plenamente desenvolvidas atingem um diâmetro aproximado de 3 mm e comprimento de 6mm. As flores normalmente sofrem autofecundação, mas permitem facilmente o cruzamento em condições de laboratório. O fruto, uma siliqua, pode apresentar de 30 a 60 sementes e a maturidade pode ocorrer duas semanas depois da fertilização em plantas mantidas a 25°C (MEYEROWITZ, 1989). As sementes são diminutas, pesando em média menos de 20 µg e apresentando poucas centenas de micrômetros na maior dimensão. Quando armazenadas longe de umidade podem manter a viabilidade por anos. A germinação ocorre ao terceiro dia pós-semeadura e em condições ideais a roseta, o pendão e as flores são formados em apenas 4 semanas. Tais condições incluem nutrição, temperatura, características genéticas e fotoperíodo (responde melhor aos dias longos). Sob condições de luminosidade contínua a 25°C e boa nutrição, o ecótipo Landsberg erecta apresenta um ciclo de 5 semanas. Considerando-se que as plantas produzem flores por vários meses, é possível uma produção de 10.000 sementes a partir de uma única planta (MEYEROWITZ 1989).

As sementes do ecótipo Landsberg erecta utilizadas neste trabalho foram fornecidas pelo "Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre" do Departamento de Ciências da Vida - Universidade de Nottingham - Reino Unido.

3.2. Condições de cultura

3.2.1. Local

Os experimentos foram conduzidos nas dependências do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Nottingham, Reino Unido.

3.2.2. Casa de vegetação

As condições de casa de vegetação foram: 26°C com iluminação natural durante o verão e complementação com 10.000lux de luz artificial fluorescente branca (WOTAN L58W/23, Alemanha), para obtenção de 16h por dia de fotoperíodo durante os meses com dias mais curtos. A irrigação foi diária.

3.2.3. Câmaras de crescimento

3.2.3.1. Iluminada

A temperatura foi ajustada para 20 e 16°C, dia e noite, respectivamente. Para a iluminação utilizaram-se com lâmpadas fluorescentes brancas, gerando de 1.500 a 2.000 lux de intensidade e o fotoperíodo foi de 16h de luz para 8h de escuro.

3.2.3.2. Escura

Para a cultura de células em suspensão a temperatura adotada foi 24°C, a não ser na determinação da temperatura ideal (variando de 22 a 30°C).

3.2.4. Câmara fria

A câmara fria (4°C) apresentava uma parte constantemente iluminada com lâmpadas fluorescentes brancas sob intensidade de 100 lux e outra totalmente escura.

3.2.5. Tratamento fitossanitário

O controle de afídios na casa de vegetação foi feito com a queima de nicotina peletizada (Dow Chemical Company, Reino Unido) durante uma noite completa e a cada quinze dias.

3.3. Meios para cultura *in vitro*

Durante os experimentos diversos meios de cultura foram testados (Tabela 2). Todos estes derivaram basicamente do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) ou do B5 (GAMBORG *et alii*, 1968) e foram preparados a partir de produto comercial em pó (Imperial Laboratories Ltd, Andover, Reino Unido).

A maioria dos meios de cultura foi gelificado com 2g/l de Gelrite (Imperial Laboratories Ltd.) e suplementados com 30g/l de sacarose, exceção feita aos MSC (todos líquidos), MIC (Bacto Agar) e MG. Este último sofreu duas alterações, pois na cultura de plantas foram utilizados outros 7 agentes gelificantes além de Gelrite (Tabela 3) e no desenvolvimento de regenerantes foram testadas diferentes concentrações de carbono ativado (Sigma Chemical Co.).

Todos os meios tiveram o pH ajustado para 5,8 com NaOH. A maioria dos suplementos e reguladores de crescimento, assim como os meios, foram autoclavados a 121°C por 20min, com exceção de Zeatina e ácido giberélico (GA₃), os quais foram esterilizados por filtração em 0,2µm (Millipore UK Ltd, Middlessex, Reino Unido).

Reguladores de crescimento foram armazenados em soluções estoque de 1mg/ml, por no máximo três meses e mantidos em geladeira (4°C), no escuro.

3.4. Cultura de plantas

3.4.1. Cultura de plantas em casa de vegetação

Dois sistemas foram testados para cultura de plantas em casa de vegetação. Para maior facilidade de entendimento serão definidos como direto e indireto.

No sistema direto a semeadura foi feita diretamente em bandejas de propagação formados por "vasos" interligados e de secção quadrangular com 4cm de lado na parte superior (Figura 8B) contendo o mesmo substrato descrito para o sistema indireto. Neste processo foram colocadas duas sementes por "vaso" sendo que após uma semana foram desbastadas para ficar apenas uma por "vaso". As plantas remanescentes foram mantidas nas condições descritas para casa de vegetação.

Tabela 2. Meios de cultura empregados para o cultivo *in vitro* de plantas, tecidos e células de *Arabidopsis thaliana*.

Código	Emprego	Meio Básico	Alterações
MG	Germinação e Cultura de Plantas.	MS	Sem reguladores de crescimento
MSC1 (a)	Suspensão Celular	MS	2,00 mg/l 2,4-D
MSC2 (b)	Suspensão Celular	Sais: MS Vitaminas: B5	0,50 mg/l 2,4-D 0,05 mg/l Cinetina 0,60 g/l MES
MSC3	Suspensão Celular	MS	0,20 mg/l 2,4-D 0,05 mg/l Cinetina 0,60 g/l MES
MSC4	Suspensão Celular	MS	0,05 mg/l 2,4-D 2,00 mg/l ANA 0,15 mg/l Cinetina 0,15 mg/l BAP
MIC (c)	Indução de Calos	B5	20 g/l glucose 0,50 g/l 2,4-D 0,05 g/l cinetina 1% Bacto Agar (Difco)
MIB1	Indução de Brotos	MS	A=3,0; B=5,0 ou C=7,0 mg/l IPA
MIB2 (a)	Indução de Brotos	MS	A=1,0; B=2,0 ou C=3,0 mg/l Thidiazuron
MIB3 (a)	Indução de Brotos	MS	A=0,5; B=1,0 ou C=2,0 mg/l Zeatina
MIB4 (c)	Indução de Brotos	B5	20 g/l glucose 5,00 mg/l IPA 0,15 mg/l AIA 0,50 g/l MES
MIB5	Indução de Brotos	MS	A=0,2 e 0,2; ou B=0,2 e 0,4; ou C=0,4 e 0,2 mg/l ANA e BAP respectivamente
ME (d)	Elongamento de Brotos	MS	20 g/l sacarose 0,10 mg/l ANA 1,00 mg/l BAP 0,10 mg/l GA ₃
MIR (d)	Indução de Raízes	MS: metade da concentração	10 g/l sacarose 1,0 mg/l AIB

(a) Segundo GLEDDIE (1989)

(b) Segundo FORD (1990)

(c) Segundo VALVEKENS (1988)

(d) Segundo DAMM & WILLMITZER (1988)

(Para formulação de meios vide apêndice)

No outro sistema, o indireto, as sementes de *Arabidopsis thaliana* (não desinfestadas superficialmente) foram distribuídas em placas de Petri de vidro contendo uma fina camada de 5 mm de perlita (Silvaperl Products Ltd, Harrogate, Reino Unido), previamente esterilizadas em estufa (160°C por 2h). Cerca de 40 sementes foram distribuídas sobre a perlita pelos 10cm de diâmetro de cada placa de Petri. Após essa operação, as placas foram irrigadas com cerca de 10ml de meio básico de MS, B5, KM (KAO & MICHAYLUK, 1975), sais de MS ou simplesmente água bidestilada, todos em duas condições: com pH ajustado para 5,8 ou sem ajuste de pH. Sacarose, glucose e água de coco, assim como reguladores de crescimento, foram suprimidos destes meios.

Passados 7 dias de cultura em câmara iluminada, quando os cotilédones podiam ser claramente visualizados (cerca de 3mm de comprimento), as plântulas foram analisadas quanto ao efeito do meio de cultura e transferidas (aos 7 ou 14 dias) para bandejas de cultivo, contendo o seguinte substrato:

- a. 2 partes de turfa ("Irish Peat Moss" Joseph Bentley & Sons, Barrow on Humber, Reino Unido)
- b. 2 partes de composto para vasos ("John Innes No 3", Norwich, Reino Unido)
- c. 2 partes de cascas de árvore picadas (Joseph Bentley & Sons)
- d. 1 parte de vermiculita (Vermiperl Medium Grade, Silverperl Ltd, Reino Unido).

Após o transplante, as plantinhas foram irrigadas, colocadas dentro de propagadores com a tampa de plástico transparente e mantidas em câmara de cultura iluminada até a formação de rosetas foliares. Passado esse estágio as plantas foram transferidas para casa de vegetação.

3.4.2. Cultura *in vitro* de plantas

Todas as manipulações de material cultivado *in vitro* e outras operações como esterilização em filtro foram conduzidas em câmara de fluxo laminar horizontal de ar estéril (Slee 6HLF, Reino Unido), com velocidade de 0,5m/seg.

A desinfestação superficial de sementes foi feita com Domestos (Lever Bros. Ltd., 114 New Bond Street, Londres, Reino Unido), a 15% em volume por 15 min sob constante agitação. Domestos é o produto comercial

cuja composição (peso/volume) é a que se segue: 10.5% NaOCl₃; 0.3% Na₂CO₃; 10.0% NaCl; 0.5% NaOH; espessante patenteado.

Após o tratamento para desinfestação superficial as sementes foram lavadas em abundância por seis vezes com água esterilizada. Foram então colocadas para secar em placas de Petri abertas dentro de câmara de fluxo laminar durante a noite. Depois de secas as placas de Petri foram seladas com Parafilm (American National Can, Greenwich, EUA) e mantidas em local seco e escuro para semeadura no futuro.

Tanto as sementes recém desinfestadas como as que estavam armazenadas foram colocadas para germinar sobre 100 ml de MG (Tabela 2) em placas de Petri de 14 cm de diâmetro (Northern Media, Midlands Division, Nottingham, Reino Unido), seladas com Parafilm e mantidas em câmara de cultura iluminada. Dependendo da finalidade do experimento essas plantas (cerca de 250 a 300 por placa) poderiam ser usadas diretamente ou transplantadas para recipiente de maior volume, para melhor desenvolvimento.

Os recipientes pós-transplante empregados foram frascos de vidro de 175ml do tipo compota (Beatson Clarke, Rotterdam, Reino Unido), com tampa de polipropileno resistente à autoclavagem, ou por unidades compostas de dois vasos de 500ml cada. Estes eram de plástico transparente de base quadrada (Magenta, Sigma London Chemical Co, Dorset, Reino Unido), sendo que o superior ficou invertido, e ambos foram unidos por um conector (Figura 8 C). Todos os recipientes, equipamento e meios contendo componentes não termolábeis foram esterilizados por autoclavagem a 121°C/20min (15psi).

3.4.3. Otimização da troca gasosa na cultura *in vitro*

Alguns dos recipientes acima citados também foram adaptados a fim de se observar a importância da troca de ar, sem prejuízo das condições estéreis de cultura. Um dispositivo de troca gasosa feito de espuma de polipropileno autoclavável (Scientific Industries, Loughborough, Reino Unido), de formato cilíndrico (4cm de diâmetro por 5cm de comprimento), foi acoplado a cada um dos recipientes. Tais filtros de espuma foram ajustados a orifícios de 2,5cm de diâmetro perfurados nas tampas de polipropileno dos frascos de 175ml ou no topo dos frascos "Magenta" (Figura 8C)

Cinco semanas depois da semeadura foi feita a análise do teor de pigmentos fotossintéticos presentes nas folhas. A extração de clorofilas a e

b, assim como de carotenóides foram efetuadas de acordo com o método de DAVIS (1983), descrito brevemente a seguir. As plantas de cada tratamento tiveram todas as folhas extraídas e picadas em pedaços quadrados de aproximadamente 3mm e misturados. Em seguida, 0,05g desse tecido foi homogeneizado em homogenizador de vidro (Potter Elvehjem, Reino Unido) com 10ml de acetona a 80% mantida em gelo e transferido para tubos de centrífuga de 16 ml. Em seguida foram centrifugados a 10.000Xg por 5 min. O sobrenadante foi então coletado e analisado em espectrofotômetro (LKB Biochrom Utrospec 4050, Suécia). As leituras de absorbância (A) foram efetuadas nos comprimentos de onda 480, 645 e 663nm. O conteúdo original de clorofilas a e b, assim como o de clorofila total foram calculados segundo os coeficientes de extinção de ARNON (1949). O teor de carotenóides totais foi estimado a 480nm e corrigido quanto à interferência de clorofilas por intermédio dos coeficientes de KIRK & ALLEN (1965), citado por DAVIES (1983). Para o cálculo dos teores de pigmentos aplicaram-se então as seguintes fórmulas:

a. Clorofila a = $12,7 A_{663} - 2,69 A_{645}$

b. Clorofila b = $22,9 A_{645} - 4,68 A_{663}$

c. Clorofila total = Clorofilas a + b

d. Carotenóides = $A_{480} + 0,114 \times A_{663} - 0,638 A_{645}$

3.4.4. Agentes gelificantes na cultura *in vitro* de plantas

O meio básico utilizado foi MG (Tabela 2), gelificado com oito diferentes agentes (Tabela 3).

Meio MS em pó (Imperial Laboratories Ltd), sacarose e os agentes gelificantes correspondentes (ASG, ADB, GEL ou PHY), foram previamente misturados e o volume completado com água bidestilada. Os meios tiveram então o pH ajustado para 5,8 com NaOH e foram colocados em frascos de 175ml (40ml/frasco) e tampados antes de autoclavar.

As agaroses (AG1, AG5 e SEA) foram dissolvidas a dupla concentração em água bidestilada, autoclavadas e reservadas, tomando assim consistência firme. Posteriormente foram fundidas e misturadas com meio líquido (duplamente concentrado e previamente autoclavado) antes que a

Tabela 3. Agentes gelificantes utilizados na cultura *in vitro* de plantas de *Arabidopsis thaliana* e suas respectivas concentrações.

Código	Gelificante	Conc (g/l)
ASG	Agar A1296 (a)	9.0
AG1	Agarose I (a)	5.0
AG5	Agarose V (a)	5.0
ADB	Bacto Agar (b)	9.0
GEL	Gelrite (c)	2.0
PHY	Phytigel (a)	2.0
SEA	Seaplaque (d)	6.0
AMI	Amido(mistura)(e)	70.0

(a) Sigma London Chemical Co,Dorset, Reino Unido;

(b) Difco Laboratories, Surrey, Reino Unido;

(c) Imperial Laboratories Ltd, Andover, Reino Unido;

(d) FMC Bioproducts, High Wycombe, Reino Unido;

(e) UNESP - Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Ciências Agrônômicas

18600 - Botucatu - SP (Patente Requerida)

temperatura de ambos ficasse inferior a 40°C, ponto abaixo do qual começaria a gelificação.

A mistura de amido foi adicionada ao meio antes de se ajustar o pH. Após tal ajuste o meio foi imediatamente distribuído nos frascos de 175 ml e autoclavado, ou então foi previamente aquecido (com agitação) até que ocorresse a gomificação, sendo então levado aos frascos e autoclavado.

O volume final de meio colocado em cada frasco foi de 40ml, valor adotado para todos os tratamentos. Metade dos 8 frascos por tratamento, contendo diferentes agentes gelificantes, foi fechado com tampa de polipropileno normal e a outra metade com tampa contendo o filtro de espuma. Como alternativa, alguns frascos Magenta, conectados dois a dois, também foram usados com a finalidade de permitir maior espaço para o desenvolvimento da planta, sendo que metade deles apresentava os mesmos dispositivos para otimização da troca gasosa.

A cultura das plantas foi conduzida em dois estágios para maior facilidade de manejo.

No primeiro, aproximadamente 250 sementes previamente desinfestadas foram colocadas para germinar em MG solidificado com Gelrite, em placas de Petri de 14cm, seladas com Parafilm. Após dez dias em câmara de crescimento iluminada, duas plântulas foram transferidas sob condições estéreis para frascos de 175ml (vedados ou aerados), contendo meio com um dos oito gelificantes.

Tanto a germinação como a cultura de plantas foram conduzidas em câmara de crescimento sob fotoperíodo e iluminação descritos no item 3.2.3.1.

Aos 30 dias algumas plantas foram avaliadas quando à altura, comprimento de folha, raiz e caule, sendo também contado o número de folhas por planta, massas de matéria fresca e seca, tanto das raízes como da parte aérea. Coletaram-se também dados referentes aos efeitos dos agentes gelificantes e troca gasosa no desenvolvimento das plantas, tais como período de florescimento, número de frutos por planta e número de sementes por fruto.

3.4.5. Armazenamento de plantas

Plantas com 2 semanas de idade foram transferidas para câmara fria (4°C) sob 100lux de iluminação contínua, dentro de frascos de 175ml (5 plantas por frasco), com ou sem dispositivo de aeração, contendo 40ml de MG gelificado com Gelrite. As plantas foram mantidas nestas condições por 30 dias, quando foram colocadas de volta à câmara de crescimento para completar seu ciclo.

3.5. Cultura e regeneração de tecidos

As plantas utilizadas na produção de explantes foram cultivadas em câmara de crescimento, sob fotoperíodo, a partir de sementes previamente desinfestadas. No primeiro estágio foram cultivadas em placas de Petri de 14cm e, aos 7 dias, foram transferidas para frascos de 175ml, com filtro de espuma, por mais 14 dias. O meio de cultura utilizado em ambos os casos foi MG gelificado com Gelrite.

Selecionaram-se explantes provenientes de segmentos internodais de caule (porção com internódios longos), folhas e raízes. Os segmentos internodais foram cortados com bisturis em dois comprimentos diferentes: de 2 a 3mm (curto) e de 7 a 10 mm (longo). As folhas foram selecionadas quanto à aparência e, devido ao seu tamanho diminuto e fragilidade, foram cortadas ao meio ou mantidas inteiras. As raízes foram cortadas em 3 porções (proximal, mediana e distal) ou mantidas inteiras.

Os explantes foram então colocados sobre MIC (25 ml em placas de Petri plásticas de 9cm), onde foram mantidos até que se evidenciasse a formação de massa desdiferenciada de células, momento no qual foram então transferidos sobre meios apropriados para indução de brotos (MIB3 ou MIB4) até que ocorresse a regeneração. Todo o processo foi conduzido em câmara de crescimento iluminada, sob fotoperíodo.

3.6. Cultura de células em suspensão

Para seleção de cultura de células em suspensão foram utilizados 3 tipos diferentes de explantes, 4 meios líquidos de cultura (Tabela 2) e 5 temperaturas.

3.6.1. Estabelecimento de suspensões celulares

As suspensões celulares foram estabelecidas de maneira bastante simples. Explantes de folhas, plântulas completas (uma semana pós-germinação) e raízes de plantas cultivadas *in vitro* foram cortados em segmentos de menos de 2mm e cerca de 0,5g destes foram colocados em 3 frascos Erlenmeyers de 250ml, contendo cada um 50ml de um dos 4 meios de cultura testados (MSC1, MSC2, MSC3 ou MSC4). Os frascos foram incubados no escuro em agitador horizontal, sob 120rpm e a 24°C. As subculturas ocorreram a cada sete dias, mediante a retirada de todo o meio líquido e preservando-se apenas 3ml do volume decantado dos calos originais. Após 45 dias, os calos foram passados em filtro de malha de 500µm e subcultivados como anteriormente, dando origem a suspensões celulares mais finas.

3.6.2. Efeito da temperatura sobre o crescimento

Suspensões celulares de três meses de idade foram submetidas a temperaturas de 22, 24, 26, 28 e 30°C. Foram mantidas no escuro, sob agitação horizontal a 120 rpm. O crescimento foi avaliado aos 7 dias de subcultura através do volume decantado de células, utilizando-se pipetas de 10ml.

3.6.3. Seleção de meio de cultura

A seleção das suspensões quanto ao meio de cultura foi feita ao terceiro mês, observando-se a qualidade das células e agregados celulares ao microscópio, sendo preferidas as células com formatos esféricos e de citoplasma denso. No campo macroscópico foram analisados o tamanho dos agregados e volume de células produzidas durante um ciclo de 7 dias de subcultura, assim como a coloração das suspensões, sendo consideradas de boa qualidade as de cor pálida, em detrimento das escurecidas.

3.6.4. Curva de crescimento

O crescimento foi avaliado através do volume de células produzido até a sua estabilização, por meio da decantação de células em pipetas de 10ml. A massa de matéria fresca foi pesada após a retirada total do meio de cultura e a massa de matéria seca foi obtida após incubação em estufa a 60°C, por 48 horas.

3.7. Regeneração de plantas intactas a partir de células cultivadas

3.7.1. Indução de Brotos

Para indução de brotos foram estudados dois sistemas: o de plaqueamento direto ou o sistema com pré-incubação. No primeiro o plaqueamento de agregados celulares (0,5g/frasco) foi feito diretamente sobre um volume de 40ml de um dos MIB (Meio Indutor de Brotos) em frascos de 175ml. No segundo, em duas etapas, o plaqueamento de 0,5g de agregados celulares foi feito inicialmente sobre 25 ml de MIC (Meio Indutor de Calo) em placas de Petri (9cm, seladas com Parafilm) por 7 dias, com posterior

transferência para um dos MIB (40ml em frascos de 175ml). Em ambos os sistemas tais agregados celulares foram mantidos em câmara de crescimento sob fotoperíodo.

3.7.2. Choque frio

O efeito da baixa temperatura sobre a organogênese também foi avaliado. Após serem incubados em MIC, os agregados foram transferidos para MIB, e mantidos em câmara fria por 0 (controle), 1, 2, 4, 7, 10 ou 15 dias, a 4°C e no escuro.

3.7.3. Elongamento de brotos

Eliminaram-se as primeiras folhas basais dos brotos obtidos que foram então transferidos para MG (Meio de Germinação) ou ME (Meio de Elongamento), ambos em frascos de 175ml.

3.7.4. Indução ao enraizamento

Para rizogênese foram utilizados 40 ml de MIR (Meio Indutor de Raízes) por frasco de 175ml. Plantas recém regeneradas provenientes de MIB ou brotos que passaram por 7 dias em ME foram plaqueados em MIR.

3.7.5. Controle do escurecimento de plantas

Para amenizar o ocasional escurecimento de plantas recém regeneradas, MG foi suplementado com carbono ativado neutralizado (Sigma Chemical Co) nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5 ou 1,0%.

O carbono ativado foi adicionado ao meio antes da autoclavagem, após a qual os frascos foram agitados e colocados em água fria para evitar que os grânulos de carbono se sedimentassem no fundo dos recipientes. O controle não possuía tais suplementos e as condições de cultura foram as especificadas para câmara de crescimento sob fotoperíodo.

3.7.6. Desenvolvimento de plantas e produção de sementes

Para concluir o ciclo da planta regenerada foi usado MG suplementado com 0,1, 0,2, 0,5 ou 1,0% de carbono ativado neutralizado em frascos de 175ml (40ml de meio por frasco). Até o processo de florescimento todos os frascos foram mantidos fechados com tampa de polipropileno. Ao início do florescimento alguns frascos tiveram suas tampas substituídas por tampas com filtros de espuma.

4. RESULTADOS

4.1. Cultura de plantas em casa de vegetação

Não foi detectada nenhuma alteração em termos de biomassa entre os meios de cultura testados para o sistema indireto na germinação de sementes em relação ao controle (com água bidestilada apenas). A percentagem de germinação foi em torno de 94% para todos os casos, incluindo meios de cultura com pH ajustado ou não. Plantas cultivadas em KM8 apresentaram-se um pouco cloróticas em pH não ajustado para 5,8. A melhor época para transplante de plântulas cultivadas em perlita para o composto foi dos 7 aos 10 dias, caso contrário o sistema radicular já se encontrava muito desenvolvido e emaranhado, além do que as plantas começavam a mostrar crescimento deficiente quando cultivadas em água destilada apenas (Figura 9A). Plantas cultivadas no sistema indireto apresentaram de 9 a 12 folhas por volta dos 30 dias após semeadura, quando ocorreu o aparecimento da primeira flor. Os primeiros frutos formaram-se cerca de 7 dias depois da antese e aos 14 dias as primeiras sementes já se encontravam maduras. A altura da planta após seis semanas variou de 17 cm a 20 cm e, na maioria, apresentava 2 ou 3 ramificações caulinares.

Plantas provenientes do cultivo direto apresentaram dados similares às aquelas cultivadas pelo processo indireto. O número de frutos por planta variou de 18 a 40 aos 60 dias. Nesse mesmo período a variação do número de sementes por fruto foi de 40 a 44 e o peso de 100 sementes recém colhidas foi de 3 mg. Houve, no entanto uma diferença de 2 dias a menos para o aparecimento da primeira flor, a percentagem de germinação caiu para 83% e enquanto as plantas mantidas em câmara de crescimento foram irrigadas uma vez na semeadura e outra no transplante, as plantas produzidas pelo sistema direto necessitaram de irrigações diárias.

A vernalização de sementes (embebição a 4°C por uma semana) e presença ou ausência de luz (1.500 lux) não alterou a percentagem

de germinação. Como esperado, as plântulas provenientes de sementes germinadas no escuro mostraram-se um pouco estioladas e cloróticas.

4.2. Cultura de plantas *in vitro*

4.2.1. Efeito de agentes gelificantes e de troca gasosa

Tanto os agentes gelificantes como a otimização da troca gasosa apresentaram grandes diferenças no desenvolvimento da planta.

A ação dos agentes gelificantes não se fez notável nos primeiros 3 dias da fase cotiledonar de desenvolvimento da planta, mas a partir do transplante (aos 7 dias), essa diferença começou a se tornar mais evidente. O crescimento da planta avaliado por massa de matéria fresca (Figuras 2 e 3) e massa de matéria seca (Figuras 4 e 5) apresentou curvas muito semelhantes.

A produção total de biomassa em termos de raízes e parte aérea foi superior em meio solidificado com amido. A segunda melhor produção foi observada em Seaplaque e Agarose 5. Os gelificantes Gelrite, Phytigel e Agarose 1, vieram em seguida e finalmente os agares Difco Bacto e Sigma. Amido foi também o melhor agente gelificante no tocante à produção de raízes (Figuras 3 e 5), explante muito importante para a cultura de tecidos de *Arabidopsis thaliana*.

A gomificação do amido antes da autoclavagem mostrou-se essencial, uma vez que o amido não se dissolvia completamente e o produto autoclavado apresentava-se pouco engrossado e com presença de agregados soltos. A gomificação foi obtida à temperatura de $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação.

A presença dos filtros de espuma com a conseqüente melhora da troca gasosa teve efeitos marcantes, como, por exemplo, um aumento adicional generalizado na altura das rosetas foliares (Figura 6). O mesmo foi observado para produção de biomassa, como indicado para massas de matéria fresca e seca (Figuras 2 a 5), exceto quando as plantas foram cultivadas em amido. A utilização de amido para a cultura de plantas em frascos vedados resultou em maior produção de biomassa (Figuras 2 a 5).

A falta de aeração por sua vez deu origem a uma série de outras respostas morfológicas e fisiológicas. Plantas cultivadas em frascos vedados mostraram um aumento no número de folhas por planta (Figura 7),

Figura 2. Ação de agentes gelificantes e aeração na cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*: massa de matéria fresca de parte aérea por planta.

Figura 3. Ação de agentes gelificantes e aeração na cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*: massa de matéria fresca de raiz por planta.

Figura 4. Ação de agentes gelificantes e aeração na cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*: massa de matéria seca de parte aérea por planta.

Figura 5. Ação de agentes gelificantes e aeração na cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*: massa de matéria seca de raiz por planta.

Figura 6. Ação de agentes gelificantes e aeração na cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*: altura da roseta foliar.

Figura 7. Ação de agentes gelificantes e aeração na cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*: número de folhas por planta.

sendo estas frequentemente muito menores, chegando a até um décimo do que as de tamanho normal.

Outra consequência da aeração limitada foi a diminuição do teor de pigmentos fotossintéticos (Figura 8). Plantas cultivadas por quatro semanas em frascos vedados mostraram uma redução de 57, 60 e 57% para clorofilas a, b, e para carotenóides, respectivamente, quando comparadas com aquelas cultivadas em frascos com filtros de aeração. Por conseguinte, as plantas em frascos vedados mostraram-se bastante cloróticas enquanto aquelas cultivadas em frasco sob livre troca de ar apresentaram-se bem verdes.

Figura 8: Ação de agentes gelificantes e aeração na cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*: teor de clorofila de folhas de plantas cultivadas em frascos aerados (A) e não aerados (N).

Apesar do florescimento ter ocorrido tanto em frascos vedados como aerados, plantas em frascos não aerados não produziram frutos e consequentemente falharam em produzir sementes.

Por outro lado, quando os frascos foram aerados todas as plantas produziram frutos e sementes em abundância. Após 12 semanas de cultivo em frascos aerados cada planta produziu de 15 a 32 frutos,

Figura 9. Cultura de *Arabidopsis thaliana* em casa de vegetação e *in vitro*.

A. Germinação de sementes em perlita. Aos 14 dias em câmara de crescimento (placa superior) as plantas mostram sinais claros de competição por nutrientes entre si e raízes bem desenvolvidas. Plantas aos 7 dias (placa inferior) em idade ideal para o transplante.

B. Plantas com 4 semanas cultivadas em bandejas com composto sob condições de casa de vegetação.

C. Efeito de aeração e agente gelificante na cultura *in vitro*. Plantas com 4 semanas cultivadas em frascos Magenta.

Esquerda. gotículas de água condensada nas paredes, que indicam o excesso de umidade que prejudica o florescimento e frutificação. Plantas cultivadas em meio gelificado com Agar Sigma.

Centro. cultura com filtros de espuma resolve o problema do excesso de umidade e permite produção de plantas mais saudáveis, com frutos e sementes. Biomassa continua reduzida em Agar Sigma.

Direita. aumentos da biomassa e frutificação verificados em frasco aerado contendo meio gelificado com Gelrite.

D. Florescimento e frutificação de plantas cultivadas *in vitro*.

E. Maturação de frutos e liberação de sementes de plantas cultivadas *in vitro*.

contendo de 34 a 38 sementes cada um. Mesmo quando cultivadas em vasos Magenta, que permitem certa troca de ar, o uso de filtros de espuma melhorou muito o aspecto e desenvolvimento da planta (Figura 9C). Em vasos Magenta plantas com 14 semanas apresentaram cerca de 60 frutos (Figura 9D) por planta contendo de 40 a 50 sementes cada (Figura 9E). A germinação de sementes obtidas *in vitro* ultrapassou mais de 90%.

O emprego do MG contendo metade da concentração de sais, vitaminas e sacarose diminuiu o ciclo da planta em aproximadamente uma semana quando comparado com meio usado em concentração normal. No entanto, este último foi preferido por dar origem a plantas de aspecto mais saudável e mais prolíficas, além do que, em certas situações, é desejável a disponibilidade de plantas por um maior espaço de tempo.

O uso de vasos Magenta foi mais adequado quando pretendeu-se o cultivo de plantas até o florescimento e frutificação, por permitirem livre crescimento vertical. Estes recipientes também facilitaram em muito a coleta de frutos e sementes pela praticidade de se desconectarem ao meio.

4.2.3. Armazenamento de plantas

As plantas armazenadas em câmara fria tiveram seu crescimento paralisado, não floresceram e assim permaneceram durante os 30 dias do tratamento. Aparentemente poderiam ser utilizadas para qualquer outro experimento, pois apresentavam-se bastante saudáveis. Quando colocadas de volta à câmara de crescimento sob fotoperíodo continuaram seu desenvolvimento e completaram seu ciclo. Todos os dados coletados, como número de frutos e sementes por planta, assim como comprimento do ciclo foram normais para o ecótipo, se descontados obviamente os 30 dias de "repouso fisiológico". Essas plantas foram ótimas fontes de explante e puderam ser aproveitadas por maior espaço de tempo que as plantas não tratadas.

4.3. Cultura e organogênese de tecidos

Os diferentes tecidos apresentaram comportamentos distintos quando no MIC. As raízes começaram a mostrar os primeiros sinais de formação de calos aos 2 dias, independentemente do tamanho do explante e da porção da raiz de que eram provenientes (distal, mediana, ou proximal). Aos 7

dias foram transferidas para os MIB, quando apresentavam calos de cerca de 1mm. Todos os segmentos de raízes apresentaram calos.

As folhas, por sua vez, começaram a ficar cloróticas após o segundo dia, sendo que os primeiros sinais visíveis a olho nu de formação de calos ocorreram aos 7 dias. O início da formação dos calos deu-se pela região de ferimento em 70% dos casos, ou seja nas folhas inteiras os calos iniciaram-se pelo pecíolo, ao passo que nas meias-folhas distais pela região proximal (corte), e nas meias folhas proximais nas duas extremidades cortadas. Os outros 30% de explantes foliares apresentaram calos por toda a superfície. Um total de 71% dos explantes desenvolveu calos. Progressivamente os calos foram aumentando em relação ao tamanho do explante foliar e aos 21 dias apresentavam diâmetro aproximado de 5mm, quando então foram transferidos ao MIB.

Os segmentos internodais apresentaram calos em 90% dos explantes plaqueados no MIC. Desse total, 96% mostraram calos nas duas extremidades e os outros 4% em apenas uma das extremidades. Foram transferidos para os MIB aos 21 dias, quando os calos já atingiam cerca de 6mm de diâmetro.

A indução de organogênese foi tentada em dois MIB (tabela 3). Após 10 dias no MIB apareceram os primeiros sinais de mudança de coloração dos tecidos, caracterizados por pontos entumescidos de tom cada vez mais verde nos calos derivados de folha e raiz, com rara ocorrência naqueles derivados de segmentos internodais. Em MIB3-B houve também o aparecimento de pêlos radiculares por todos os calos.

Tabela 4. Número de brotos regenerados via organogênese indireta de tecidos cultivados de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Landsberg erecta de acordo com diferentes explantes e meios indutores de brotos (MIB).

Tipo de Explante	MIB3-B		MIB4	
	14 dias	40 dias	14 dias	40 dias
Ramo	0	0	0	0
Raiz	31 ± 4	68 ± 7	10 ± 3	133 ± 17
Folha	4 ± 2	31 ± 6	7 ± 3	42 ± 7

O meio MIB3-B permitiu uma organogênese mais acelerada em relação ao MIB4. Em MIB3-B o primeiro broto, a partir de raiz, surgiu aos 7 dias. Aos 14 dias (Tabela 4) o número de regenerantes a partir de raízes era maior no MIB3-B, embora no mesmo período os regenerantes de folhas fossem mais numerosos no MIB4. Aos 21 dias havia maior número de brotos regenerados no MIB4, tendência que se manteve até os 40 dias (Tabela 4) tanto para raízes como folhas. Como se observa na mesma Tabela os segmentos internodais de ramos primários não se mostraram boas fontes de explantes.

Os regenerantes provenientes do MIB3-B apresentaram as primeiras flores já aos 14 dias e, portanto, puderam ser transferidos ao MG antes daqueles vindos do MIB4. No entanto, somente aos 21 dias, tanto os brotos grandes como os pequenos foram transferidos ao MG. Os frutos já estavam presentes em brotos provenientes do MIB3-B, pois começaram a se formar 7 dias depois do florescimento, independentemente do MIB original. No entanto, plantas regeneradas no MIB4 apresentaram ciclo um pouco mais tardio, pois iniciaram o florescimento 7 a 10 dias mais tarde. Cerca de 76% das plantas produziram sementes férteis, apresentando uma variação de 10 a 22 sementes maduras por fruto e de 10 a 220 sementes por planta. Nenhum dos regenerantes chegou a enraizar no MG, mas isso não impediu a produção de sementes.

4.4. Cultura de células em suspensão

4.4.1. Estabelecimento de suspensões celulares

Com exceção dos explantes cultivados no MSC4, no prazo de duas semanas já era possível a visualização de calos. Após 6 semanas já havia uma mistura de calos e células em suspensão, com exceção do MSC4 que não formou calos satisfatoriamente para nenhuma fonte de explante, sendo por isso descartado. As demais suspensões foram então fracionadas em filtro de 0,5mm. Da fração que passou pelo filtro foram retirados 3ml de células, as quais foram levadas a incubar em 50ml de meio. Nos meios MSC1, MSC2 e MSC3 observou-se um crescimento uniforme de células de cor palha (considerada uma boa coloração), quando cultivadas a 24°C.

4.4.2. Efeito de temperatura sobre o crescimento

A temperatura teve efeito marcante sobre o crescimento de células em suspensão independentemente do tecido que as originou. No regime de subcultura e volume de meio utilizados, notou-se um aumento positivo no crescimento celular quando elevou-se a temperatura. As células cultivadas (Figura 15A) multiplicaram-se a taxas cada vez maiores à medida que a temperatura aumentou de 22 para 26°C, mas a tendência do crescimento diminuiu a 28°C e praticamente paralisou a 30°C (Figuras 10, 11 e 12). A própria coloração das células tornou-se muito escura a partir de 28°C, especialmente no caso do MSC3. Esse escurecimento foi observado em células cultivadas no MSC1 a partir de 29°C. Quando cultivadas por mais de 14 dias a 30°C, mesmo reduzindo-se o tempo de subcultura para 3 dias com reposição de meio fresco e colocando-se de volta a 24°C, as células não retomaram o crescimento.

Figura 10: Crescimento de células cultivadas em suspensão após 7 dias no MSC1 em 5 temperaturas e 3 diferentes explantes (valores em %).

Figura 11: Crescimento de células cultivadas em suspensão após 7 dias no MSC2 em 5 temperaturas e 3 diferentes explantes (valores em %).

Figura 12: Crescimento de células cultivadas em suspensão após 7 dias no MSC2 em 5 temperaturas e 3 diferentes explantes (valores em %):

Como pode ser observado nas curvas de crescimento, a temperatura teve o mesmo efeito sobre o crescimento de células em qualquer um dos meios testados. Notou-se que a elevação da temperatura acima de 26°C exerceu influência negativa sobre o crescimento e coloração das células cultivadas, tornando-as escuras, independentemente do meio de cultura utilizado.

As células em suspensão mantiveram-se ainda com aparência saudável se a subcultura fosse feita aos 8 dias ao invés de 7, mas começavam a escurecer caso passasse dos 9 dias pós-subcultura.

4.4.3. Crescimento de células cultivadas

Figura 13: Curva de crescimento de células de raiz cultivadas em suspensão no MSC1(Meio de Suspensão Celular) e a 24°C, no escuro.

Foram apontados MSC1 e MSC3 como os meios mais apropriados para o crescimento celular, sendo a temperatura adotada a de 24°C. A curva de crescimento (Figura 13) mostra que a fase de adaptação (fase lag) foi menor que 24 horas. A fase acelerada de crescimento (fase log) ocorreu até 4 ou 5 dias após a subcultura. Em seguida ocorreu uma desaceleração e a partir do dia 7 tornou-se mais nítida a entrada na fase estacionária, com competição entre células e conseqüente perda da viabilidade. Ocorreu também um aumento do valor de pH do meio variando de

5.8 na subcultura (dia 1) para $6,09 \pm 0,17$ aos 11 dias. A massa de matéria seca, obtida de 1 ml de células, foi de aproximadamente 70mg.

4.5. Organogênese em células cultivadas

4.5.1. Indução de brotos

Entre as doze combinações de meio testadas para organogênese de células cultivadas de *Arabidopsis thaliana* obteve-se maior número de regenerantes no MIB2, seguido do MIB1 e MIB3 (Figuras 14 e 15B). As combinações de reguladores de crescimento do MIB5 resultaram em ausência de regeneração no MIB5-A (0,2mg/l de ANA e BAP), apenas 2 regenerantes/g de material plaqueado no MIB5-B (0,2mg/l de ANA e 0,4mg/l de BAP) e formação de raízes no MIB5-C (0,4mg/l de ANA e 0,2mg/l de BAP).

Figura 14. Número de regenerantes obtidos no MIB1 (3, 5 e 7mg/l de IPA, respectivamente A, B, e C), MIB2 (1, 2, e 3mg/l de Thidiazuron, respectivamente A, B e C), MIB3 (0,5, 1,0 e 2,0mg/l de Zeatina, respectivamente A, B e C).

O número de regenerantes também foi influenciado pelo sistema de plaqueamento e pelo tratamento em câmara fria. O sistema de plaqueamento com pré-incubação no MIC por uma semana, seguido pela transferência ao MIB2, provou ser melhor que o plaqueamento direto no MIB (Tabela 5).

O tratamento em câmara fria sobressaiu-se em relação ao controle (não tratado), como pode ser visto na Tabela 5. Houve uma correlação direta entre a percentagem de tecido clorofilado e o número de regenerantes obtidos em cada um dos tratamentos.

Outro fator que influenciou a organogênese (embora em menor proporção) foi a forma com que a mesma quantidade de agregados celulares foi plaqueada. Fixou-se em 0,5g a quantidade de células por placa de Petri e plaqueou-se essa massa em porção única de 0,5g/placa (A), duas porções de 0,25g/placa (B) ou, ainda, quatro porções de 0,125g/placa (C), no MIB1. Notou-se que após 30 dias no MIB1 (com uma pré-incubação de 7 dias no MIC e 1 dia em câmara fria) a média de regenerantes foi de 28, 52 e 82/g de material plaqueado, respectivamente, para as condições A, B e C.

Tabela 5. Superfície clorofilada de calos e número de regenerantes em relação aos dias em câmara fria e ao tipo de plaqueamento: direto no MIB (A) ou com pré-incubação no MIC (B).

Exposição ao Frio (dias)	Superfície clorofilada de calo aos 30 dias (%)		Superfície clorofilada de calo aos 45 dias (%)		Número de brotos aos 40 dias	
	A	B	A	B	A	B
0	2.5	40.0	1.5	10.0	0.0	34,3±13,2
1	3.8	72.5	2.5	47.5	0.0	104,6±8,8
4	2.5	35.0	1.0	13.8	0.0	23,8±9,7
7	1.3	35.0	0.0	12.5	0.0	13,8±5,9
15	1.3	12.5	0.0	0.0	0.0	0,5±0,5

4.5.3. Elongamento de brotos

Os regenerantes provenientes do MIB1, em especial, apresentaram-se ainda muito pequenos aos 30 dias, mas se mantidos por mais tempo naquele meio, começavam a escurecer sem todavia elongar. Assim sendo, foram transferidos aos 30 dias para meio de alongamento (ME) ou diretamente no MG onde permaneceram por 7-14 dias.

A transferência ao ME provou ser melhor do que simplesmente transferi-los diretamente ao MG. Regenerantes mantidos no ME mostraram-se bem verdes e após 14 dias, alguns deles começaram a florescer. Tais regenerantes também puderam ser melhor individualizados e separados do tecido original, antes de serem plaqueados no MG. Enquanto isso, os brotos no MG que não passaram por ME, começaram a se tornar cloróticos mostrando tendência ao escurecimento.

O plaqueamento no ME também foi tentado como um estímulo ao florescimento de plantas regeneradas no MIB2 (contendo thidiazuron), sendo bastante positivo nesse sentido. Todos os brotos deixados por 14 dias naquele meio floresceram, mas quando transferidos ao MG não produziram sementes.

Plantas regeneradas em qualquer dos MIB frequentemente entravam em degeneração e apresentavam escurecimento quando transferidas ao MG, onde 32 a 77% delas não sobreviveram.

4.5.4. Enraizamento

Embora MIB2 tenha permitido o maior número de regenerantes, o enraizamento desses não ocorreu espontaneamente. Como a presença de raízes é por vezes citada como estimulante para completar o ciclo dos regenerantes, levando à produção de sementes, tentou-se nesse sentido o enraizamento no MR, sendo que o emprego deste meio elevou a proporção de brotos enraizados de 0 para 23 %.

A presença de raízes, no entanto, não exerceu efeito positivo na redução ao escurecimento e degeneração de brotos observada anteriormente no MG, nem tampouco conferiu fertilidade às plantas regeneradas no MIB2.

Figura 15. Cultura de células em suspensão e organogênese em células, tecidos e órgãos cultivados de *Arabidopsis thaliana*

A. Agregado celular e célula em divisão (à direita) de suspensão aos 3 dias após subcultura da suspensão celular (X30).

B. Organogênese de parte aérea de células cultivadas (X3)

Placa superior esquerda: em meio MIB5

Placa superior direita: em meio MIB3-C

Placa inferior direita: em meio MIB1-C

Placa inferior esquerda: em meio MIB2-C

C. Detalhe de brotos regenerados a partir de células cultivadas (X12).

D. Regeneração de células cultivadas em meio MIB1-C (X4).

E. Aspecto da cultura de células em suspensão (X0,5).

F. Organogênese a partir de explante cultivado de raiz no MIB4 (X4)

G. Planta fértil regenerada a partir de cultura de células em suspensão (X2,5)

4.5.4. Controle de escurecimento de brotos

Visto que a passagem por MG, independentemente do meio previamente utilizado, sempre ocasionou uma certa perda da capacidade de desenvolvimento do regenerante, outras alternativas foram testadas para amenizar esse efeito. Como o enraizamento não trouxe benefícios em termos de reduzir esse fator, foram desta vez tentadas quatro diferentes concentrações de carbono ativado neutralizado. Todas as quatro mostraram-se eficientes em evitar que as plantas se tornassem cloróticas, ao contrário, mantiveram-se bem verdes e saudáveis.

4.5.5. Obtenção de plantas intactas férteis.

A maior dificuldade observada em plantas regeneradas no MIB2 foi a impossibilidade em se obter plantas férteis com sementes, mesmo em brotos enraizados e cultivados no ME, que provou ser estimulante ao florescimento. Apenas algumas plantas (menos de 5% do total) provenientes do MIB2 e enraizadas no MR produziram frutos sem contudo produzir sementes.

Esses dados deixam muito a desejar quando comparados com os de regenerantes provenientes de outros meios. Nestes uma boa proporção dos regenerantes oriundos do MIB1 e MIB3 (25 e 33 %, respectivamente) desenvolveram-se em plantas férteis com sementes, sem necessidade de enraizamento, quando cultivados no MG suplementado com 0,1 a 1,0% de carbono ativado neutralizado.

Devido ao efeito prejudicial da elevada umidade sobre a abertura de anteras, um bom florescimento e produção de frutos (Figura 15G) e sementes foi obtido com o emprego dos mesmos filtros cilíndricos de espuma autoclavável utilizados para a cultura *in vitro* de plantas.

5. DISCUSSÃO

5.1. Cultura de Plantas

A otimização da troca gasosa na cultura *in vitro* de plantas de *Arabidopsis thaliana* provou ser muito importante. Os seus benefícios, tanto do ponto de vista qualitativo como quantitativo, puderam ser notados desde o estágio pós-cotiledonar das plântulas. As plantas obtidas foram de melhor qualidade, sendo uma boa fonte de explantes para outros estudos em cultura de tecidos, células, órgãos, protoplastos e transformação genética. Com o uso de filtros de espuma obteve-se também a produção de frutos e sementes, o que não foi possível quando a umidade interior do frasco estava elevada. Resultados similares quanto à necessidade de aeração foram observados por VALVEKENS *et alii* (1988), que atribuiu o não florescimento à inibição da abertura das anteras devido à umidade elevada.

O uso de filtros de espuma não prejudicou a cultura de plantas ou regenerantes do ponto de vista da assepsia, o que normalmente aconteceria se os recipientes não fossem hermeticamente fechados. Outra interessante característica qualitativa, resultante do emprego de tais dispositivos de troca gasosa, é o "endurecimento" das plantas, preparando-as para condições *ex vitro* quando retiradas de tais frascos. Isto é particularmente atraente quando se pretende transferir o regenerante para condições de casa de vegetação ou mesmo no caso da manipulação de plantas cultivadas *in vitro* sob as condições desidratantes de uma câmara de fluxo laminar.

Embora alguns protocolos reportem o uso de meio contendo metade da concentração de nutrientes originalmente descrito para o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e mais algumas pequenas modificações como sendo efetivos para a cultura de plantas e o desenvolvimento de regenerantes (VALVEKENS *et alii*, 1988; DAMM & WILLMITZER, 1989; KARESCH *et alii*, 1991), o meio MS contendo concentração normal de sais e vitaminas foi mais efetivo sob as condições aqui relatadas.

Em termos de agente gelificante, já foi notada anteriormente uma atuação positiva de produtos alternativos ao agar em cultura de *Arabidopsis*. É o caso de Gelrite em organogênese de células cultivadas (GLEDDIE, 1988), de Seaplaque em organogênese indireta de raízes (CLARKE & LINDSEY, 1991) e mesmo em cultura de protoplastos, onde normalmente impera o uso de agaroses, o emprego de alginato de sódio levou à regeneração de plantas férteis de *Arabidopsis thaliana* (DAMM & WILLMITZER, 1988 e KARESCH *et alii*, 1991). Na presente investigação confirma-se, portanto, que o agar, produto tão largamente empregado, não tem sido o mais recomendável para *Arabidopsis thaliana*, em mais de uma aplicação, incluindo o próprio cultivo *in vitro* de plantas.

Verificou-se também uma correlação com os resultados de DEBERGH (1983) quanto às diferentes respostas de sistemas vegetais quando cultivados em diversos tipos, concentrações e marcas comerciais de agentes gelificantes, assim como a superioridade do amido como agente gelificante do meio de cultura observada para outros sistemas vegetais (SORVARI, 1986a, 1986b e 1986c; HENDERSON & KINNERSLEY, 1988).

Na concentração de 70g/l, utilizada para o cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana*, o amido também promoveu o crescimento superficial de raízes facilitando a sua remoção. Este seria um fator positivo quando tais órgãos forem utilizados como matéria prima para outras investigações, como, por exemplo, transformação a partir de raízes (VALVEKENS *et alii*, 1988 e CHAUDHURY & SIGNER, 1989b). Algumas vezes, no entanto, tornou-se um pouco trabalhoso separar as raízes mais aprofundadas do meio de cultura com amido. Quanto aos demais meios de cultura, a retirada de raízes foi feita facilmente em Gelrite e Phytigel, ficando um pouco mais difícil nas Agaroses. Outro problema verificado com agar foi a baixa produtividade de raízes, quando comparado com os outros produtos, tanto em termos de biomassa como em comprimento.

Um fato inesperado foi que a combinação de meio gelificado com amido e a utilização de frascos vedados resultou em maior produção de biomassa quando comparada com o meio equivalente aerado. Neste caso a remoção de raízes foi bastante laboriosa. Por outro lado não houve grandes diferenças entre Seaplaque em condições aeradas e não aeradas. O excesso de umidade, contudo, impediu o florescimento normal, frutificação e produção de sementes, observado também com amido e todos os outros tratamentos.

Além da ausência de sementes, as plantas cultivadas em frascos não aerados apresentaram-se com baixos teores de clorofila. A perda de clorofila está geralmente associada com a senescência, sendo seu teor amplamente reconhecido como medida bioquímica da senescência (SLAMET, 1991). Estudos mais aprofundados seriam necessários para uma confirmação, mas os filtros de espuma, além de permitirem melhor oxigenação da planta também facilitariam a liberação de etileno, que é um indutor de senescência, durante a cultura *in vitro*.

5.2. Organogênese em tecidos cultivados

Recentes investigações mostraram que raízes são excelentes fontes de explantes para produção de plantas transgênicas (VALVEKENS *et alii*, 1988 e MARTON & BROWSE, 1991), quando cultivadas utilizando-se IPA (Isopentenil adenina) nos seus meios de regeneração. O regulador IPA vem sendo usado em diversos trabalhos desde quando primeiro relatado em organogênese em *Arabidopsis thaliana* (FELDMANN & MARKS, 1986). Embora com IPA também tenha-se obtido um bom número de regenerantes nos resultados aqui apresentados, consumiu-se 90 dias para completar o procedimento de regeneração de plantas férteis, fato também observado por outros autores (SHEIKHOSLESLAM & WEEKS, 1987; VALVAKENS *et alii*, 1988 e KONCZ *et alii*, 1990). É sabido que o tempo consumido em cultura de tecido está associado com a frequência de aberrações verificadas nos regenerantes, portanto, reduzir esse tempo teria importantes aplicações práticas.

A organogênese em meio com Zeatina (MIB3) foi aqui reportada pela primeira vez em cultura de tecidos de *Arabidopsis thaliana*, sendo indicada como uma opção plausível ao IPA, especialmente pelas vantagens que oferece no que se refere ao tempo de cultura *in vitro*. De acordo com o protocolo aqui descrito, os explantes de raízes ficaram por 4 dias no MIC, sendo então transferidos para MIB3, onde já aos 14 dias produziram a primeira flor. Transferidos aos 21 dias para o MG, produziram as primeiras sementes maduras após 20 a 30 dias, o que totalizou um ciclo aproximado de 60 dias para condições totalmente *in vitro*, dois terços do tempo necessário para indivíduos regenerados em meios contendo IPA. Portanto, o MIB3 promoveu um encurtamento no processo de regeneração de várias semanas, quando comparado aos mais de 90 dias necessários conforme descrito em outros

métodos. A produtividade, contudo, decaiu um pouco, pois obteve-se um número menor de brotos por explante.

Como o ciclo da planta é bem rápido, apontou-se aqui como alternativa o repouso temporário de plantas em câmara fria à fim de que se estendesse o período em que esse material pudesse ser utilizado em cultura de tecidos, sem prejudicar a continuidade do ciclo depois do tratamento. Recentemente foi recomendado o tratamento de plantas a 4°C por até 4 meses, como benéfico para a regeneração de tecidos a partir de raízes, otimizando assim a eficiência de transformação genética em *Arabidopsis thaliana* (MARTON & BROWSE, 1991). Aliou-se assim os benefícios da disponibilidade de plantas por maior espaço de tempo ao estímulo à regeneração.

5.3. Cultura de células em suspensão

O estabelecimento de suspensões celulares não foi tarefa complicada. Os meios MSC1 e MSC3, foram selecionados entre os quatro testados, pois, além de oferecerem suficiente suporte para a cultura de células, estas apresentavam-se arredondadas, com citoplasma denso, agrupadas em pequeno número e tamanho (Figura 15A), características desejadas para uma boa suspensão celular.

GLEDDIE (1988) utilizou folhas como material para estabelecimento de cultura de células em suspensão, sendo que aqui demonstramos que células de raízes se adaptaram melhor às condições de cultura a que foram submetidas, independentemente da temperatura e do meio empregados. A suspensão celular citada por aquele autor foi mantida sob fotoperíodo de 16h, enquanto a suspensão descrita neste trabalho foi mantida no escuro. FORD (1990) manteve sua cultura de células de raiz no escuro no MSC2, mas não reportou organogênese de plantas férteis a partir de protoplastos, ou regeneração das células cultivadas em suspensão. Em nossas condições, tal meio de cultura resultou em suspensão com agregados relativamente grandes ao nível microscópico. Apesar de apresentar bom crescimento em volume mesmo quando comparado com os demais, MSC2 não foi selecionado por possuir agregados celulares com quase o dobro do diâmetro dos observados em outros meios, podendo ser considerados pequenos calos compactos, causados talvez terem sido utilizados ecótipos diferentes dos estudados por FORD (1990).

Tanto o uso do MSC1 como do MSC3 provocou a formação de agregados celulares finos, friáveis, que se apresentaram com taxa de crescimento semelhante para o período de subcultura de 7 dias. Ambas as suspensões detiveram boas qualidades e o sistema de regeneração aplicado para o MSC1 também promoveu regeneração no MSC3 (dados não apresentados).

Embora 26°C tenha sido a temperatura ótima para cultivo de células em suspensão, de acordo com os resultados obtidos, seria mais prudente o cultivo em câmaras de crescimento a 24°C, pois normalmente existe uma variação entre dia e noite da ordem de 1 a 2°C. Se cultivadas a 26°C, as células em suspensão estariam sujeitas a elevações esporádicas de temperatura que poderiam ser prejudiciais ou até fatais. A faixa de temperatura de 24 a 26°C aproxima-se das recomendadas por outros autores (XUAN & MENCZEL, 1980; GLEDDIE, 1988 e FORD, 1990).

Quanto ao tecido de origem, outro parâmetro analisado na cultura de células em suspensão, as raízes se sobressaíram em produção de biomassa em relação às folhas e plântulas. GLEDDIE (1988) não fez referência quanto à uma possível diferença entre suas suspensões celulares de folha e hipocótilo, enquanto outros autores não investigaram essa possibilidade. No entanto, tanto em investigação anterior em cultura de tecidos (VALVEKENS *et alii*, 1988), quanto nas citadas neste trabalho, as raízes também provaram ser superiores a outros tecidos quanto ao potencial organogênético.

5.4. - Organogênese de células cultivadas

Tanto o ecótipo Columbia usado por GLEDDIE (1988), como o Wassilewskija usado por FORD (1990) são tidos como os mais responsivos às técnicas de cultura de tecidos, do que o aqui empregado, Landsberg erecta. Este tem sido alvo freqüente de estudos para obtenção de protocolos dado à sua recalcitrante atuação em cultura de tecidos em geral. Nesse sentido DAMM & WILLMITZER (1990) divulgaram um novo protocolo especificamente desenvolvido para regeneração de protoplastos de Landsberg erecta, com sensíveis modificações ao anteriormente publicado (DAMM & WILLMITZER, 1988).

A pré-incubação no MIC foi relevante para o processo de organogênese, quando comparado com o processo de plaqueamento direto em um dos MIB. O volume de agregados celulares agrupados também influenciou a

organogênese. Diminuindo-se o tamanho dos explantes obteve-se um sensível aumento no número de brotos, fato este que encontra paralelo no trabalho de NEGRUTIU & JACOBS (1978a), onde calos de menor tamanho apresentaram melhor capacidade para morfogênese.

A exposição de agregados celulares ao frio, por sua vez, também resultou em maior número de regenerantes. Esse recurso já havia sido utilizado em calos para restaurar sua capacidade organogenética (NEGRUTIU & JACOBS, 1978 a), ao passo que a incubação por 48h a 4°C também foi benéfica para a cultura de protoplastos (DAMM & WILLMITZER, 1988 e KARESCH *et alii*, 1991), mostrando estimular a divisão celular. A exposição a temperaturas de mesma ordem também melhorou a taxa de regeneração de tecidos e transformação genética no recente trabalho de MARTON & BROWSE (1991). Parece, portanto, que a breve exposição a baixas temperaturas da ordem de 4°C, estimula a divisão ou diferenciação celular em cultura de células e tecidos cultivados de *Arabidopsis thaliana*.

Os resultados aqui obtidos assemelham-se em vários aspectos aos de GLEDDIE (1988). Um deles por exemplo é o excelente estímulo que Thidiazuron exerceu na organogênese, quando comparado com outras citocininas, assim como a mesma dificuldade encontrada em conduzir tais brotos ao enraizamento e a produzir plantas férteis, com sementes. Este autor sugere Zeatina como o mais recomendado regulador para organogênese, justamente por possibilitar a obtenção de sementes. Quando comparou-se os reguladores por ele apontados como mais efetivos em matéria de organogênese (Thidiazuron, Zeatina e BAP, nessa ordem) com IPA, constatou-se que este foi superior à Zeatina no tocante ao número de brotos regenerados de agregados celulares, mas inferior ao Thidiazuron. No presente trabalho plantas regeneradas em qualquer outro meio que não os MIB2 (Meio Indutor de Brotos contendo Thidiazuron) produziram sementes quando transferidas para o MG (Meio de Germinação e Desenvolvimento) suplementado com carbono ativado neutralizado. O desenvolvimento dos regenerantes neste meio encontra paralelo no trabalho sobre regeneração de anteras cultivadas desenvolvido por SCHOLL *et alii* (1981), que encontrou melhores resultados quando carbono ativado foi adicionado ao meio.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

1. Ambos os sistemas direto e indireto para cultura de *Arabidopsis thaliana* em casa de vegetação foram eficientes. A opção por um ou outro deve ser baseada principalmente na disponibilidade de equipamento, mão de obra e irrigação.

2. O emprego de amido na cultura *in vitro* de plantas de *Arabidopsis thaliana* é o recomendado. Apesar dos frascos não aerados contendo amido apresentarem melhores resultados em biomassa, recomenda-se o emprego dos filtros de espuma, pois além de produzirem plantas mais saudáveis, permitiram a produção de sementes. O uso de tais filtros foi também excelente alternativa para "endurecer" regenerantes a serem transferidos para condições *ex vitro*.

3. O Meio Indutor de Brotos contendo IPA estimulou a regeneração do maior número de plantas férteis, com sementes tanto a partir da cultura de explantes de raiz como de células em suspensão.

4. O emprego do Meio Indutor de Brotos contendo 1 mg/l Zeatina (MIB3) reduziu em 1/3 o tempo de regeneração de plantas intactas de *Arabidopsis thaliana* na cultura de tecidos de raiz.

5. O uso de Meio Indutor de Brotos contendo Thidiazuron, tanto em sistemas de cultura de células como de tecidos, propiciou a regeneração de grande número de plantas, porém não férteis.

6. Apesar de ambos os meios de suspensão MSC1 e MSC3 (contendo alto e baixo teores relativos de 2,4-D, respectivamente) originarem boas suspensões celulares, recomenda-se o primeiro apenas quando a possível variação somaclonal não seja impecilho. A cultura deve ser conduzida no escuro e sob temperatura de 24 a 26°C.

7. O choque térmico (tratamento a 4°C por 24 horas), a quantidade de agregado celular plaqueado e a pré-incubação em Meio Indutor de Calos (MIC) contribuíram sensivelmente para o aumento do número de plantas de *Arabidopsis thaliana* regeneradas a partir de células cultivadas.

6. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ACEDO, G. N. Regeneration of *Arabidopsis* calus *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 6: 109-114, 1986.
- AN, G; WATSON, B. D.; CHIANG, C. C. Transformation of tobacco, potato and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system. *Plant Physiology*, 81:301-305, 1986.
- ANAND, R. Preliminary studies on callus culture of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Information Service*, 13:15, 1966.
- ARNOLD, S. V. & ERICKSSON, T. Effect of agar concentrations on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* (L.) KARST. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 3:257-264, 1984.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24:1-5, 1949
- BAUS, A. D.; FRANSMANN, L.; MEINKE, D. W. Growth *in vitro* of arrested embryos from lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Theoretical and Applied Genetics*, 72:577-586, 1986.
- BHALLA-SARIN, N.; SOPORY, S. K.; GUHA-MUKHERJEE, J. Yield of protoplasts from *Arabidopsis thaliana* and its application in physiological studies. *Phytomorphology*, 31:100-104, 1981.
- BINDING, H.; NEHELS, R.; KOCK, R.; FINGER, J. & MORDHORST, G. Comparative studies on protoplast regeneration in herbaceous species of Dicotyledonae class. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 101:119-130, 1981.
- BOWMAN, J. L.; YANOFSKY, M. F.; MEYEROWITZ. *Arabidopsis thaliana*: a Review. In: MIFLIN, B.J., ed. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*. New York, Oxford University Press, 1989. 0, p. 57-88.

- CATTOIR, A.; DEGRYSE, E.; JACOBS, M.; NEGRUTIU, I. Inhibition of barley (*Hordeum vulgare*) cultivar capri and *Arabidopsis thaliana* callus growth by lysine analogs. *Plant Science. Letters*, 17:327-332, 1980.
- CHANG, S.-S.; PARK, S.-K.; NAM, H.-G. Transformation of *Arabidopsis* by *Agrobacterium* inoculation on wounds. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ARABIDOPSIS RESEARCH, 4., Viena, 2-5/Junho/1990. *Abstracts*. Viena, Institute of Botany, Department of Cytology & Genetics, University of Viena, 1990. p.28
- CHAUDHURY, A. M. & SIGNER, E. R. Non-destructive transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 74:258-265, 1989.
- CHAUDHURY, A. M. & SIGNER, E. R. Relative regeneration proficiency of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Plant Cell Reports*, 8:368-369, 1989.
- CLARK, M & LINDSEY, K. *Arabidopsis* transformation: silver thiosulphate as an aid to increased efficiency. In: FLANDERS, D & DEAN, C, ED. *Arabidopsis thaliana: the compleat guide*. 1. Norwich, Agriculture and Food Research Council - Plant Molecular Biology - *Arabidopsis* Programme. 1991. p. 34-35.
- CONNER, T. W.; GOEKJIAN, V.; STROZYCKI, P; KEY, J. L. Expression and sequence of auxin-inducible gene in suspension culture cells of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Biochemistry-Supplement*, 0:264, 1989.
- CORCOS, A. & LEWIS, R. Callus growth and differentiation in liquid media. *Arabidopsis Information Service*, 9:18, 1972..
- CORCOS, A. Tissue culture in *Arabidopsis*: its beginning, its present, its future. *Arabidopsis Information Service*, 13:175-179, 1976.
- CORCOS, A.; PIPER, B.; LEWIS, R. Redifferentiation of normal *Arabidopsis* plants from callus culture. *Arabidopsis Information Service*, 10:10, 1973.
- DAMM, B. & WILLMITZER, L. Regeneration of fertile plants from protoplasts of different *Arabidopsis thaliana* genotypes. *Molecular and General Genetics*, 213:15-20, 1988.

- DAMM, B. & WILLMITZER, L. Stable transformation of *Arabidopsis thaliana* var. Landsberg erecta using direct gene transfer to protoplasts. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON *Arabidopsis* RESEARCH, 4., Viena, 2-5/Junho/1990. *Abstracts*. Viena, Institute of Botany, Department of Cytology & Genetics, University of Viena, 1990. p.29
- DAMM, B.; SCHMIDT, R.; WILLMITZER, L. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplasts. *Molecular and General Genetics*, 217:6-12, 1989.
- DAVEY, M. R.; COCKING, E. C.; FREEMAN, J.; PEARCE, N.; TUDOR, I. Transformation of *Petunia* protoplasts by isolated *Agrobacterium* plasmids. *Plant Science Letters*, 18:307-313, 1980.
- DAVIES, B.H. & KUMAR, A. Carotenoids. In: GOODWIN, T. W., ed. *Chemistry and biochemistry of plant pigments* .1. Academic Press, 1983. p. 38-165.
- DEBERGH, P. C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiolgia Plantarum*, 59:270-276, 1983.
- DIJAK, M.; SMITH, D. L.; WILSON, T. J.; BROWN, D. C. W. Stimulation of direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa*. *Plant Cell Reports*, 5:468-470, 1986.
- EVANS, K. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ARABIDOPSIS RESEARCH, 4., Viena, 2-5/Junho/1990. *Abstracts*. Viena, Institute of Botany, Department of Cytology & Genetics, University of Viena, 1990. p.30
- FELDMANN, K. A.; MARKS, M. D.; CHRISTIANSON, M. L.; QUATRANO, R. S. A dwarf mutant of *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis. *Science*, 243:1351-1354, 1990.
- FELDMANN, K. A. & MARKS, M. D. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Molecular and General Genetics*, 208:1-9, 1987.

- FELDMANN, K. A. & MARKS, M. D. Rapid and efficient regeneration of plants from explants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 47:63-69, 1986.
- FORD, K. G. Plant regeneration from *Arabidopsis thaliana* protoplasts. *Plant Cell Reports*, 8:534-537, 1990.
- FRANZMANN, L.; PATTON, D. A.; MEINKE, D. W. In-vitro morphogenesis of arrested embryos from lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Theoretical and Applied Genetics*, 77:609-616, 1989.
- GAJ, M. D. & MALUSZYNSKI, M. Genetic variation in callus culture of *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. *Arabidopsis Information Service*, 23:1-8, 1987.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50:151-158, 1968.
- GLEDDIE, S. Plant regeneration from cell suspension cultures of *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. *Plant Cell Reports*, 8:1-5, 1989.
- GOTO, N. Stimulation of polysaccharide formation by 2,4-D in callus tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 66:49-52, 1986.
- GRESSHOFF, P. M. & DOY, C. H. Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. *Australian Journal of Biological Science*, 25:259-268, 1972.
- HAUGHN, G. W. & SOMERVILLE, C. Sulfonyleurea-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics*, 204:430-434, 1986.
- HAYFORD, M. B.; MEDFORD, J. I.; HOFFMAN, H. L. ROGERS, S. G.; KLEE, H. J. Development of a plant transformation selection system based on expression of genes encoding gentamycin acetyltransferases. *Plant Physiology*, 86:1216-1222, 1988.
- HEIM, D. R.; ROBERTS, J. L.; PIKE, P. D.; LARRINUA, I. M. A second locus IXR B1 in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the herbicide isoxaben. *Plant Physiology (Bethesda)*, 92:858-861, 1990.

- HEIM, D. R.; ROBERTS, J. L.; PIKE, P. D.; LARRIUA, I. M. Mutation of a locus of *Arabidopsis thaliana* confers resistance to the herbicide isoxaben. *Plant Physiologie (Bethesda)*, 90:146-150, 1989.
- HENDERSON, W. E. & KINNERSLEY, A. M. Corn starch as an alternative gelling agent for plant tissue culture. *Plant, Cell Tissue and Organ Culture*, 15:17-22, 1988.
- HUANG, B. C. & YEOMAN, M. M. Formation of somatic embryos in tissue cultures of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Information Service*, 20:73-78, 1983.
- HUANG, B. C. & YEOMAN, M. M. Callus proliferation and morphogenesis in tissue cultures of *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Science Letters*, 33:353-363, 1984.
- KAO, K. N. & MICHAYLUK, M. R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*, 126:105-110, 1975.
- KARESCH, H.; BILANG, R.; POTRYKUS, I. *Arabidopsis thaliana*: protocol for palnt regeneration from protoplasts. *Plant Cell Reports*, 9:575-578, 1991.
- KARESCH, H.; BILANG, R.; SHEID, O. M.; POTRYKUS, I. Direct gene transfer to protoplasts of *Arabidopsis thaliana*.. *Plant Cell Reports*, 9:571-574, 1991.
- KARSSSEN, C M.; BRINKHORST-VAN DER SWAN, D. L. C.; BREEKLAND, A. E.; KOORNEEF, M. Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. *Planta*, 157:158-65, 1983.
- KEATHLEY, D. E. & SCHOLL, R. L. Culture of *Arabidopsis thaliana* anthers on liquid medium. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 106:199-212, 1982.
- KEMPER, E.; GREVELDING, C.; SCHELL, J.; MASTERSON, R. Improved method for the transformation of *Arabidopsis thaliana* with chimeric dihydrofolate reductase constructs which confer methotrexate resistance. *Plant Cell Reports*, 11:118-121, 1992.

- KOLENBACH, H. & WERNICKE W. Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 86:463-472, 1978.
- KRANZ, A. R. Demonstration of new and additional population samples and mutant lines of the AIS-seed bank. *Arabidopsis Information Service*, 15:118-139, 1978.
- KRENS, F. A.; MOLENDIJK, L.; WULLWMS, G. J.; SCHILPEROORT, R. A. *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti plasmid. *Nature*, 296:72-74, 1982.
- LLOYD, A. M.; BARNASON, A. R.; ROGERS, S. G.; BYRNE, M. C. FRALEY, R. T.; HORSCH, R. B. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Science*, 234:464-467, 1986.
- LOEWENBERG, J. R. Callus culture of *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service*, 2:34, 1965.
- MARTON, L. & BROWSE. Facile transformation of *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 10:235-239, 1991.
- MEYEROWITZ, E. M. & PANG, P. P. *Arabidopsis thaliana*: a model system for plant molecular biology. *Bio/technology*, 5:1178-1181, 1987.
- MEYEROWITZ, E. M. *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Genetics*, 21:93-111, 1987.
- MEYEROWITZ, E. M. *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell*, 56:263-264, 1989.
- MORAWETZ, W. Systematic relationships and history of *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNHOLD. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ARABIDOPSIS RESEARCH, 4. Viena, 1990. *Abstracts (supl.)*. Viena, 1990. 1p.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cell cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:15-23, 1962.
- NEGRUTIU, I. & JACOBS, M. Factors which enhance *in vitro* morphogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 90:423-430, 1978a.

- NEGRUTIU, I. & JACOBS, M. Restoration of the morphogenetic capacity in long-term callus cultures of *Arabidopsis thaliana*. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 90:431-441, 1978b.
- NEGRUTIU, I. ; BEEFTINK, F. R.; JACOBS, M. *In vitro* culture of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Information Service*, 12:27-29, 1975.
- NEGRUTIU, I. *In vitro* morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Information Service*, 13:180-187, 1976.
- NEGRUTIU, I.; BEEFTINK, F.; JACOBS, M. *Arabidopsis thaliana* as a model system in somatic cell genetics: 1- Cell and tissue culture. *Plant Science Letters*, 5:293-304, 1975.
- NORTH, G. A plant joins the pantheon at last? *Nature*, 315:366-367, 1985.
- ONDREJ, M.; PESINA, K.; PAVINGEROVA, D. Hormonal autonomy of *Arabidopsis thaliana* calli. *Biologia Plantarum*, 26:181-188, 1984.
- PANG, P. P. & MEYEROWITZ, M. *Arabidopsis thaliana*: a model system for plant molecular biology. *Bio/technology*, 5:1178-1181, 1987.
- PATTON, D. A. & MEINKE, D. W. High-frequency plant regeneration from cultured cotyledon segments of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Biochemistry (Supplement)*, 11:2-8, 1987.
- PATTON, D. A. & MEINKE, D. W. High-frequency plant regeneration from cultured cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 7:233-237, 1988.
- PAVINGEROVA, D.; BISKOVA, R.; ONDREJ, M. Gametic transmission of mannopine and agropine synthesis in *Arabidopsis thaliana* hairy root tumor regenerants. *Arabidopsis Information Service*, 0:1-4, 1984.
- PAVINGEROVEA, D. & ONDREJ, M. Comparision of hairy root and crown gall.tumours of *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum (Praha)*, 28:149-151, 1986.
- POWER, J. B.; CHAPMAN, J. V.; WILSON, D. Laboratory Manual: Plant Tissue Culture. I - Isolation, culture and fusion of protoplasts; II- Associated

techniques; III - Plant Transformation. Nottingham, Plant Genetic Manipulation Group, Department of Botany, University of Nottingham. 1984 (Rev.1989), 138p

QIAO, Y.M. & FALAVIGNA, A. An improved *in vitro* anther culture method for obtaining double-haploid clones of *Asparagus*. In: INTERNATIONAL ASPARAGUS SYMPOSIUM, 7., Ferrara, Italia, 1989. *Proceedings Acta Horticulturae*, Wageningen, 27:145-150, 1990.

RÉDEI, G. P. *Arabidopsis* as a genetic tool. *Annual Review of Genetics*, 9:111-127 1975.

RÉDEI, G. P. *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. A review of the genetics and biology. *Bibliography on Genetics*, 20:834-841, 1970.

RÖBBELEN, G. Untersuchungen an strahleninduzierten Blattforbmutanten von *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. *Zeitschrift für induktive Abstammungs und Vererbungslehre*, 88:189-252, 1957.

SCHIMIDT, R & WILLMITZER, L. High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants. *Plant Cell Reports*, 7:583-586, 1988.

SCHOLL, R. L. & AMOS, J. A. Isolation of doubled haploid plants through anther culture in *Arabidopsis thaliana*. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 96:407-414, 1980.

SCHOLL, R. L.; KEATHLEY, D. E.; AMOS, J. A. Improvement of *Arabidopsis thaliana* anther cultures by liquid primary cultures and activated charcoal in the regeneration medium. *Environmental and Experimental Botany*, 21:435, 1981.

SCHOLL, R. L.; KEATHLEY, D. E.; BARIBAULT, T. J. Enhancement of root formation and fertility in shoots regenerated from anthers derived and seedling derived callus cultures of *Arabidopsis thaliana*. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 104:: 225-232, 1981.

SCHOLTEN, H. J.; DE VRIES, S. E.; NIJDAM, H.; FEENSTRA, W. J. Nitrate reductase deficient cell lines from diploid cell cultures and lethal mutant M-2

plants of *Arabidopsis thaliana*. *Theoretical and Applied Genetics*, 71:556-562, 1985.

SCHOLTEN, H. J.; FEENSTRA, W. J.; NIJDAM, H.; DATEMA, G. The use of cell culture of *Arabidopsis thaliana* for the study of nitrate reductase-less mutants which are lethal as intact plants. *Arabidopsis Information Service*, 0:108-110, 1982.

SCHOLTEN, H. J. & FEENSTRA, W. J. . Embryoid-like structures in anther culture of *Arabidopsis thaliana*.. *Arabidopsis Information Service*, 0:65-68, 1984.

SCHOLTEN, H. J. & FEENSTRA, W. J. Uptake of chlorate and other ions in protoplasts and seedlings of the nitrate-uptake mutant B-1 of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Information Service*, 0:105-108, 1985.

SCHOLTEN, H. J. & FEENSTRA W. J. Expression of the mutant character of chlorate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* in cell culture. *Journal of Plant Physiology*, 123:45-54, 1986.

SHEIKOLESLAM, S. N. & WEEKS, D. P. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens* *Plant Molecular Biology*, 8:291-298, 1989.

SHEN, M. & SHARP, W. R. An improved medium for rapid initiation of *Arabidopsis* tissue culture from seed. *Bulletin of the Torey Botanic Club*, 93:68-69, 1966.

SINGHA, S. Influence of two commercial agars on *in vitro* shoot proliferation of 'almey' crab apple and 'seckel' pear. *Horticultural Science*, 19:227-228, 1980.

SOMERVILLE, C. R. & SOMERVILLE, S. C.; OGREN, W. L. Isolation of photosynthetically active protoplasts and chloroplasts from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science Letters*, 21:89-96, 1981.

SORVARI, S. Comparison of anther cultures of barley cultivars in barley-starch and agar gelatinized media. *Annales Agriculturae Fenniae*, 25:249-254, 1986.

- SORVARI, S. Differentiation of potato tuber discs in barley starch gelatinized nutrient media. *Annales Agriculturae Fenniae*, 25: 135-138, 1986.
- SORVARI, S. The effect of starch gelatinized nutrient media in barley anther cultures. *Annales Agriculturae Fenniae*, 25:127-133, 1986.
- SPARROW, A. H.; PRICE, H. J.; UNDERBRINK, A. B. A survey of DNA content per cell and per chromosome of prokaryotic and eukaryotic organisms some evolutionary considerations. *Brookhaven Symposium on Biology*, 23:451-494, 1972.
- STEWART, F. C.; KENT, A. E.; MAPES, M. O. Growth and organization in cultured cells: sequential and synergistic effects on growth regulating substances. *New York Academy of Sciences Annals*, 144:326-334, 1967.
- VALVEKENS, D.; LIJSEBETTENS, M. VAN ; MONTAGU, M. VAN. *Arabidopsis thaliana*: transformation protocols. Laboratorium voor Genetica, Rijksuniversiteit Gent, Gent, 1988, 8p.
- VALVEKENS, D.; MONTAGU, M. VAN; LIJEBETTENS, M. VAN *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants using kanamycin selection. *Proceedings of the National Acadademy of Sciences of the USA*, 85:5536-5540, 1988.
- WARREN, G. The regeneration of plants from cultured cells and tissues.. In: STAFFORD, A. & WARREN, G., ed. *Plant, cell and tissue culture*. 1. Milton Keynes, Open University Press, 1991. 1cap. 4, p.82-100.
- WILSON, D. Laboratory Manual on Plant Tissue Culture: IV-Protoplast and Tissue Culture Media Formulations. Nottingham, Plant Genetic Manipulation Group, Department of Botany, University of Nottingham. 1988, 59p.
- XUAN, L. T. & MENCZEL, L. Improved protoplast culture and plant regeneration from protoplast-derived callus in *Arabidopsis thaliana*. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 96:77-80, 1980.
- YOKOYAMA, K. & JONES, W.H. Tissue culture of *Arabidopsis thaliana*.. *Plant Physiology*, 40:78-81, 1965.

- ZHANG, H & SOMERVILLE, C. R. Transfer of the maize transposable element MU1 into *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 48:165-173, 1987.
- ZIEBURG, N. Tissue culture. *Arabidopsis Information Service*, 2:34-35, 1965.

APÊNDICE

1. Meios de Cultura

1.1. Meio básico B5 (GAMBORG *et alii*, 1968)

Componente	Concentração (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150,000
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,020
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,800
H_3BO_3	3,000
KI	0,750
KNO_3	2500,000
Na_2EDTA	37,300
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134,000
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150,000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250,000
MnSO_4	10,000
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,000
Mio-Inositol	100,000
Acido Nicotínico	1,000
Piridoxina (HCl)	1,000
Tiamina (HCl)	10,000

1.2. Meio básico MS (MURASHIGE AND SKOOG, 1962)

Componente	Concentração (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440,000
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,850
H_3BO_3	6,200
KH_2PO_4	170,000
KI	0,830
KNO_3	1900,000
$\text{Na}_2\text{EDTA-N}_2$	37,250
Na_2MoO_4	0,250
NH_4NO_3	1650,000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,000
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,300
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600
Glicina	2,000
Inositol	100,000
Acido Nicotínico	0,500
Piridoxina (HCl)	0,500
Tiamina (HCl)	0,100

1.3. Meio básico KM8 (KAO & MICHAYLUK, 1975)

Componentes	Concentração (mg/l)
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
Sequestrene 330 Fe	28,000
KI	0,750
H_3BO_3	3,000
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10,000
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,000
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Inositol	100,000
Nicotinamida	1,000
Piridoxina (HCl)	1,000
Tiamina (HCl)	1,000
D-Pantotenato de Cálcio	1,000
Acido Fólico	0,400

p-ABA	0,020
Biotina	0,010
Colina (Cl)	1,000
Riboflavina	0,200
Acido ascórbico	2,000
Vitamina A	0,010
Vitamina D ₃	0,010
Vitamina B ₁₂	0,020
Piruvato de Na	20,000
Ácido cítrico	40,000
Ácido málico	40,000
Ácido fumárico	40,000
Frutose	250,000
Ribose	250,000
Xilose	250,000
Manose	250,000
Ramnose	250,000
Celobiose	250,000
Sorbitol	250,000
Mannitol	250,000
Casoamino ácidos	250,000
Água de coco	20,0ml

2. Esterilização de meios e equipamentos

Todo equipamento e meios contendo componentes não termolábeis foram colocados em recipientes apropriados e esterilizados por autoclavagem a 121°C/20 min (15psi).

2.2. Técnicas de assepsia

Todas as manipulações de material cultivado *in vitro* e outras operações como esterilização por filtro foram conduzidas em câmara de fluxo laminar horizontal de ar estéril (Slee 6HLF, Reino Unido) com velocidade de 0.5m/seg.

A desinfestação de sementes foi feita com Domestos (Lever Bros. Ltd., 114 New Bond Street, Londres, Reino Unido), cuja composição (peso/volume) é a que se segue:

10.5% NaOCl₃

0.3% Na₂CO₃

10.0% NaCl

0.5% NaOH

Espessante patenteado