Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Estabelecimento de protocolo de cultura de tecidos e transformação genética para três genótipos de *Lemnoideae*

Juliana Helena Verissimo de Oliveira

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2022

Juliana Helena Verissimo de Oliveira
Bacharela em Ciências Biológicas

Estabelecimento de protocolo de cultura de tecidos e transformação genética para três genótipos de *Lemnoideae*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **HELAINE CARRER**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Oliveira, Juliana Helena Verissimo de

Estabelecimento de protocolo de cultura de tecidos para genótipos de *Lemnoideae* / Juliana Helena Verissimo de Oliveira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

91 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. *Lemna minor* 2. *Spirodela polyrhiza* 3. Indução de calos 4. Regeneração de plantas *in vitro* 5. Transformação genética I. Título

Aos meus pais Marcos e Sandra, pelo incentivo,
conselhos e apoio incondicional.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar por toda minha jornada e me fortalecer nos momentos de fraqueza.

À Professora Dra. Helaine Carrer pela orientação, conhecimentos e ensinamentos transmitidos e confiança em meu trabalho.

À MSc. Valentina de Fátima Martin pelos auxilios nas atividades laboratoriais, amizade e todo suporte e conselhos ao longo deste processo.

Ao Dr. Enio Tiago de Oliveira pelo auxilio na montagem e instalação de experimentos, conhecimento compartilhado e amizade.

Ao MSc. Antônio Francisco de Campos Amaral pela ajuda no manuseio de equipamentos e conselhos de trabalho.

À Professora Dra. Clarice Garcia Borges Demetrio e ao MSc. Breno Gabriel da Silva pelo grande auxílio com as análises estatísticas.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelos ensinamentos compartilhados ao longo das disciplinas e também fora da sala de aula, engrandecendo minha formação acadêmica.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pela oportunidade de cursar o mestrado em minha terra natal.

Aos colegas de laboratório Aline Araujo Politano, Gabriel Luís Moreira, Fernando Matias Hurtado, Olman, Ingrid, Anna, Laura e Bárbara pelos momentos de descontração, amizade e suporte.

Às Dras. Maísa Siqueira e Perla Novais de Oliveira pela imensa ajuda ao longo dos experimentos e avaliações, paciência em compartilhar seus conhecimentos e por todo o suporte e amizade.

À Maria Solizete G. Silva, secretária do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelo amparo com documentos e todos os auxilios prestados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

À todos os meus familiares, em especial, meus pais, irmã, tias e avó, e às minhas amigas por terem me apoiado com tanto carinho, e por acreditarem em mim ao longo desta jornada.

À Marcia Vieira Marcos pelo auxilio e amizade ao longo deste processo de estudo.

E a todos os que indretamente auxiliaram de alguma maneira para que este trabalho fosse realizado.

"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível"

São Francisco de Assis

SUMÁRIO

RESUMO **7**

ABSTRACT **8**

LISTA DE FIGURAS **9**

LISTA DE TABELAS **12**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS **14**

1. INTRODUÇÃO **15**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **17**

2.1. ASPECTOS GERAIS DA LENTILHA D'ÁGUA 17
2.2. APLICAÇÕES DAS LENTILHAS D'ÁGUA 18
2.3. LINHAGENS ESTUDADAS 20
2.4. CULTURA DE TECIDOS 21
2.5. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA 22

3. OBJETIVOS **25**

4. MATERIAL E MÉTODOS **27**

4.1. MATERIAL VEGETAL E MANUTENÇÃO DAS PLANTAS 27
4.2. TESTES DE INDUÇÃO DE CALOS 27
4.3. TESTE DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS 32
4.4. TESTE DE CRESCIMENTO DE PLANTAS EM DIFERENTES ANTIBIÓTICOS 34
4.5. TESTE DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DE CALOS EM MEIOS DE CULTURA COM DIFERENTES ANTIBIÓTICOS 36
4.6. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA 37
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA 39

5. RESULTADOS **41**

5.1. INDUÇÃO DE CALOS 41
5.2. REGENERAÇÃO DE PLANTAS 52
5.3. RESISTÊNCIA DAS PLANTAS À ANTIBIÓTICOS 61
5.4. REGENERAÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DE CALOS CULTIVADOS EM MEIOS DE CULTURA COM ANTIBIÓTICOS 65
5.5. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA 70

6. DISCUSSÃO **75**

6.1. INDUÇÃO DE CALOS 75
6.2. REGENERAÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DE CALOS 76
6.3. CRESCIMENTO EM ANTIBIÓTICOS 78
6.4. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA 79

7. CONCLUSÃO **81**

REFERÊNCIAS **83**

APÊNDICE **89**

ANEXO **91**

RESUMO

Estabelecimento de protocolo de cultura de tecidos e transformação genética para três genótipos de *Lemnoideae*

As lentilhas d'água (Lemnaceae), também conhecidas como "duckweeds", são pequenas monocotiledoneas aquáticas que se dividem em duas subfamilias: *Lemnoideae* e *Wolffioideae*. Essas espécies possuem diversas cararcteristicas de interesse agronômico, aquanômico e ecológico sendo as principais delas: rápida multiplicação de suas pequenas folhas, denominadas frondes; seu alto valor nutricional e proteico; sua capacidade de remoção de resíduos e fitorremediação do local onde habitam; suas aplicações farmacológicas e biotecnológicas; e a possibilidade de produção em larga escala em biorreatores. Devido às suas qualidades, essas plantas vem sendo estudadas para serem introduzidas em protocolos de cultura de tecidos, permitindo assim a manipulação genética. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer protocolos de cultura de tecidos para três genótipos de *Lemnoideae*: 8627 e DWC124, da espécie *Lemna minor*, e 7498 da espécie *Spirodela polyrhiza*. Neste estudo, foram conduzidos experimentos para obtenção de indução de calos, regeneração de plantas, testes de resistência de frondes a antibiótico, regeneração de plantas a partir de calos na presença de antibióticos e também a transformação genética de calos do genótipo 8627 de *Lemna minor* via *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor pCAMBIA2301. Este vetor expressa o genes *uidA* que codifica a proteína β-glucuronidase - GUS e o *nptII* que confere resistência à canamicina. O tratamento que melhor permitiu indução de calos para os três genótipos estudados, foi o com adição de 0,25 $mg.L^{-1}$ de 2,4-D e 1 $mg.L^{-1}$ de TDZ ao meio de cultivo MS na condição de escuro e a partir de frondes inteiras (intactas). Para regeneração de plantas, o meio de cultivo MS diluído, e o tratamento com adição de 0,2 $mg.L^{-1}$ de BAP, foram os mais eficientes em promover a regeneração de novas folhas a partir dos calos. Para o genótipo 8627 de *L. minor*, calos com idade entre 120 e 130 dias, ou entre 140 e 150 dias, foram os que apresentaram maior taxa de regeneração, de 88%. Para o genótipo DWC124 de *L. minor*, calos com idade entre 120 e 130 dias promoveram um a taxa de 74% de regeneração. E os calos do genótipo 7498 de *S. polyrhiza*, apresentaram 44% de regeneração a partir de calos com idades entre 45 e 55 dias ou entre 85 e 95 dias. A partir dos resultados dos experimentos de resistência a antibióticos, onde se foram testadas diferentes concentraçoes de canamicina, espectinomicina, estreptomicina, geneticina, tobramicina e timentin, pode-se definir quais concentrações se mostraram letais para cada um dos três genótipos e quais permitiram o crescimento de cerca de 50% das plantas, concentração ideal para ser utilizada em seleção de plantas em experimentos de transformação. A transformação genética de calos do genótipo 8627 de *L. minor* resultou na eficiência de 82,2 % de expressão transiente do GUS em calos e somente 2,7% nas frondes. Pode-se então induzir calos nos três genótipos, regenerar plantas a partir desses, e transformar de manera transiente calos de *L. minor* 8627.

Palavras-chave: *Lemna minor*, *Spyrodela polyrhiza*, Indução de calos, Regeneração de plantas *in vitro*, Transformação genética

ABSTRACT

Establishment of a tissue culture protocol and genetic transformation for three *Lemnoideae* genotypes

The duckweed family (Lemnacceae) are small aquatic monocots that are divided in two subfamilys: *Lemnoideae* e *Wolffioideae*. These species have several characteristics of agronomical, aquanomic and ecological interest, the main ones are: rapid multiplication of their small leaves, called fronds; their high nutritional and protein value; their capacity to remove residues and to phytorremediate their habitat; their pharmacological and biotechnological applications; and the possibility of a large-scale production in bioreactors. Due to their qualities, these plants have been studied to be introduced in tissue culture protocols, thus allowing their genetic manipulation. This work aimed to establish tissue culture protocols for three genotypes of *Lemnoideae*: 8627 and DWC124 of the species *Lemna minor* and 7498 of the species *Spirodela polyrhiza*. In this study, experiments were conducted to obtain callus induction, plant regeneration, tests of fronds resistance and growth in antibiotic, plant regeneration from calli in the presence of antibiotics, and genetic transformation of *L. minor* 8627 genotype via *Agrobacterium tumefaciens* harboring the pCAMBIA2301 vector. This vector express the *uidA* gene that codifies the enzyme β-glucuronidase – GUS and the *nptII* gene that confers resistence to kanamicin. The treatment that best allowed callus induction for the three genotypes studied, was the one with 0,25 $mg.L^{-1}$ of 2,4-D and 1 $mg.L^{-1}$ of TDZ added to the MS culture media in the dark condition using entire (intact) fronds. For plant regeneration, the diluted MS culture medium and the treatment with addition of 0.2 $mg.L^{-1}$ of BAP were the most efficient in promoting the regeneration of new leaves from the calli. For *L. minor* 8627, calli with ages between 120 and 130 days, or between 140 and 150 days, were the ones with the highest regeneration rate, 88%. For *L. minor* DWC124, calli with ages between 120 and 130 days promoted the rate of 74% of regeneration. And *S. polyrhiza* 7498 showed 44% of regeneration of calli with ages between 45 and 55 days or between 85 and 95 days. From the results of antibiotic resistance experiments, where different concentrations of kanamycin, spectinomycin, streptomycin, geneticin, tobramycin and timentin were tested, it could be defined the lethal concentration for each of the three genotypes and which concentration allowed the growth of about 50% of plants, ideal concentration for use in plant selection in transformation experiments. The genetic transformation of the *L. minor* 8627 genotype resulted in the efficiency of 82,2% of GUS transient expression in calli and only 2,7% in fronds. Calli induction were obtained for the three genotypes, and also the plant regeneration from them. Calli of *L. minor* 8627 were transformed transiently.

Keywords: *Lemna minor, Spirodela polyrhiza,* Callus induction, *In vitro* Plant regeneration, Genetic transformation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DOS GENÓTIPOS 8627 E DWC124 DA ESPÉCIE *LEMNA MINOR*, E DO GENÓTIPO 7498 DE *SPIRODELA POLYRHIZA*. (BARRA=1000µM).....27

FIGURA 2. DISPOSIÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE AMOSTRA FOLIAR DAS PLANTAS EM MEIO DE CULTURA PARA TESTE DE INDUÇÃO DE CALOS. A) ESQUEMA DOS TIPOS DE AMOSTRA FOLIAR UTILIZADOS: FRONDES INTEIRAS ("I"), CORTE MANTENDO AS GEMAS LATERAIS E REGIÃO DE INICIAÇÃO DA RAIZ ("F"), E PORÇÃO FINAL DA RAÍZ ("R"); B) DISPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS FOLIARES EM PLACAS DE PETRI COM TRATAMENTO, DO GENÓTIPO 8627; C) DISPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS FOLIARES EM PLACAS DE PETRI COM TRATAMENTO, DO GENÓTIPO DWC124; D) DISPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS FOLIARES EM PLACAS DE PETRI COM TRATAMENTO, DO GENÓTIPO 7498. 29

FIGURA 3. INDUÇÃO DE CALOS SOB INCIDÊNCIA LUMINOSA NOS GENÓTIPOS DE *LEMNAS*. AS PLANTAS ENTUMECIDAS NO PERÍODO DE R0 FORAM ISOLADAS TANTO EM R1 NO CLARO COMO NO ESCURO. OS CALOS INDUZIDOS NO PERÍODO DE R1 NO CLARO FORAM ISOLADOS E TRANSFERIDOS PARA R2 TANTO NO CLARO QUANTO NO ESCURO. 31

FIGURA 4. LINHA DO TEMPO REPRESENTANDO A IDADE DOS CALOS INDUZIDOS PARA AS ESPÉCIES *LEMNA MINOR* E *SPIRODELA POLYRHIZA*. A) INDUÇÃO DE CALOS NO ESCURO; B) INDUÇÃO DE CALOS NO CLARO. R0 REPRESENTA O PERÍODO DE INDUÇÃO ONDE AS FOLHAS DAS PLANTAS SÃO COLOCADAS EM MEIOS DE CULTURA COM TRATAMENTO PARA INDUÇÃO DE CALOS. R1 REPRESENTA O ISOLAMENTO DESSES CALOS EM SEUS RESPECTIVOS MEIOS DE CULTURA NOVOS. R2, R3 E R4 REPRESENTAM AS POSTERIORES PASSAGENS MENSAIS PARA MEIOS DE CULTURA NOVOS.....32

FIGURA 5. A) ESQUEMA REPRESENTANDO A DISPOSIÇÃO DOS CALOS NAS PLACAS DE PETRI COM OS DIFERENTES TRATAMENTOS DE REGENERAÇÃO DE DE PLANTAS A PARTIR DE CALOS. B) DISPOSIÇÃO DAS PLACAS NA PRATELEIRA DA SALA DE CULTURA DE TECIDOS SOB EXPOSIÇÃO À LUZ. 33

FIGURA 6. EXPERIMENTOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS. A) ESQUEMA DA DISPOSIÇÃO DAS PLACAS EM PRATELEIRAS NA SALA DE CULTURA DE TECIDOS. B) FOTO ILUSTRANDO A DISPOSIÇÃO DAS PLACAS COM PLANTAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS, EM PRATELEIRAS ILUMINADAS.....35

FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PLASMÍDEO PCAMBIA 2301 COM O GENE *NPTII* DE RESISTÊNCIA A CANAMICINA E O GENE REPÓRTER GUS, SOB CONTROLE DO PROMOTOR CAMV35S. 37

FIGURA 8. CALOS DO GENÓTIPO 7498 DE *SPIRODELA POLYRHIZA* INDUZIDOS NO ESCURO. A) CALOS FORMADOS EM AMOSTRAS DO TIPO "F"; B) CALOS FORMADOS EM AMOSTRAS DO TIPO "I"; C-D) CALOS ISOLADOS DAS PLANTAS. (BARRAS = 1000µM).....41

FIGURA 9. PROPORÇÃO DE CALOS INDUZIDOS DO ESCURO DE *S. POLYRHIZA* 7498 NOS TRATAMENTOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D E TDZ, AJUSTADOS COM INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA OS TRATAMENTOS. A) REPETIÇÃO 1; B) REPETIÇÃO 2. LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI, E LETRAS DIFERENTES DIFEREM ENTRE SI. 42

FIGURA 10. PROPORÇÃO DE CALOS INDUZIDOS EM AMOSTRAS DO TIPO "I" (INTEIRAS) E DO TIPO "F" (CORTE DA FRONDE COM REGIÃO DAS GEMAS LATERAIS) AJUSTADOS COM INTERVALOS DE CONFIANÇA. A) REPETIÇÃO 1; B) REPETIÇÃO 2. LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI, E LETRAS DIFERENTES DIFEREM ENTRE SI.....43

FIGURA 11. CALOS INDUZIDOS NO ESCURO DOS GENÓTIPOS DE *LEMNA NIMOR*. A) CALOS EM MEIOS AS FOLHAS DE 8627 AO FIM DO PERÍODO DE R0; C) CALOS DE 8627 ISOLADOS EM MEIOS DE CULTURA; B) CALOS EM MEIOS AS FOLHAS DO GENÓTIPO DWC124 AO FIM DO PERÍODO DE R0; D) CALOS DO GENÓTIPO DWC124 ISOLADOS EM MEIOS DE CULTURA. (BARRAS DE A E B = 5MM; BARRAS DE C E D = 1000µM). 44

FIGURA 12. PROPORÇÃO DE INDUÇÃO DE CALOS DE *S. POLYRHIZA*. A) QUANTO AOS TRATAMENTOS DE INDUÇÃO TESTADOS; B) QUANTO AO TIPO DE AMOSTRA FOLIAR; C)

QUANTO A IDADE DAS PLANTAS. LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI, E LETRAS DIFERENTES DIFEREM ENTRE SI.....45

FIGURA 13. PROPORÇÃO DE INDUÇÃO DE CALOS DE *S. POLYRHIZA* EM MEIOS DE INDUÇÃO DOS TRATAMENTOS T10 E T14.....46

FIGURA 14. INDUÇÃO DE CALOS PARA O GENÓTIPO DE *S. POLYRHIZA* NO ESCURO EM DIFERENTES TRATAMENTOS COM ADIÇÃO DE 2,4-D E TDZ. LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI, E LETRAS DIFERENTES DIFEREM ENTRE SI. 46

FIGURA 15. CALOS DE *SPIRODELA POLYRHIZA* INDUZIDOS NO CLARO. A) APÓS 15 DIAS DE EXPOSIÇÃO A LUZ EM R0; B) APÓS 30 DIAS EM R0, C) CALOS ISOLADOS AO FIM DE R1; D) DETALHE DOS CALOS OXIDADOS ISOLADOS AO FIM DE R1. (BARRAS = 1000µM).....47

FIGURA 16. INDUÇÃO DE CALOS PARA O GENÓTIPO *S. POLYRHIZA* SOB EXPOSIÇÃO A LUZ EM DIFERENTES TRATAMENTOS COM ADIÇÃO DE 2,4-D E TDZ. LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI, E LETRAS DIFERENTES DIFEREM ENTRE SI. 48

FIGURA 17. FOLHAS ENTUMECIDAS DE *LEMNAS MINOR* APÓS EXPOSIÇÃO A LUZ NO PERÍODO DE INDUÇÃO (R0). A) FOLHAS DO GENÓTIPO 8627; B) FOLHAS DO GENÓTIPO DWC124; C) CALOS INDUZIDOS EM R1 NO ESCURO DE 8627; D) CALOS INDUZIDOS EM R1 NO ESCURO DE DWC124. (BARRAS = 1000µM).....49

.....49

FIGURA 18. ASPECTO DOS CALOS DOS GENÓTIPOS DE *LEMNA MINOR* INDUZIDOS NO CLARO. A) CALO DE 8627 ISOLADO APÓS INDUÇÃO EM R1 NA LUZ; B) CALO DE DWC124 ISOLADO APÓS INDUÇÃO EM R1 NA LUZ. C) DESENVOLVIMENTO DE CALOS DE 8627 EM R2 SOB INCIDÊNCIA LUMINOSA D) DESENVOLVIMENTO DE CALOS DE 8627 EM R2 ARMAZENADOS NO ESCURO. (BARRAS = 1000µM). 49

FIGURA 19. PROPORÇÃO DE CALOS INDUZIDOS NA PRESENÇA DE LUZ AJUSTADOS COM INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA OS TRÊS GENÓTIPOS APÓS OS RESPECTIVOS PERÍODOS DE INDUÇÃO DE CALOS, FIM DE R0 PARA O GENÓTIPO 7498 DE *S. POLYRHIZA*, E FIM DE R1 PARA OS GENÓTIPOS 8627 E DWC124 DE *L. MINOR*. LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI, E LETRAS DIFERENTES DIFEREM ENTRE SI. 50

FIGURA 20. PROPORÇÃO DE CALOS INDUZIDOS DE *S. POLYRHIZA* SOB DIFERENTES EXPOSIÇÕES LUMINOSAS: 10, 15 OU 20 DIAS NO CLARO (E POSTERIOR PRIVAÇÃO DE LUZ) E ESCURO, AJUSTADOS COM INTERVALOS DE CONFIANÇA. LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI, E LETRAS DIFERENTES DIFEREM ENTRE SI. 51

FIGURA 21. PROPORÇÃO DE CALOS INDUZIDOS DO GENÓTIPO DWC124 DE *L. MINOR* SOB INCIDÊNCIA LUMINOSA AJUSTADOS COM INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA OS TRATAMENTOS. LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI, E LETRAS DIFERENTES DIFEREM ENTRE SI.....52

FIGURA 22. PLANTAS REGENERANDO A PARTIR DE CALOS EM TRATAMENTO MR2. A) DO GENÓTIPO 8627 DE *L. MINOR*; B) DO GENÓTIPO DWC124 DE *L. MINOR*; C) DO GENÓTIPO 7498 DE *S. POLYRHIZA*. (BARRAS = 5000µM). 52

FIGURA 23. RESULTADOS DO EXPERIMENTO 1 DE REGENERAÇÃO EM DIFERENTES TRATAMENTOS COM ADIÇÃO DE BAP E ANA (MR1 A MR12), CONSIDERANDO AS DIFERENTES IDADES DE CALOS TESTADOS PARA CADA UM DOS TRÊS GENÓTIPOS: *LEMNA MINOR* 8627 E *LEMNA MINOR* DWC124 E *SPIRODELA POLYRHIZA* 7498.....53

FIGURA 24. RESULTADOS DO EXPERIMENTO 2 DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS EM DIFERENTES TRATAMENTOS COM ADIÇÃO DE BAP E ANA (MR1, MR2 E MR9), CONSIDERANDO AS DIFERENTES IDADES DE CALOS TESTADOS PARA CADA UM DOS TRÊS GENÓTIPOS: *LEMNA MINOR* 8627 E *LEMNA MINOR* DWC124 E *SPIRODELA POLYRHIZA* 7498. .54

FIGURA 25. RESULTADOS DO EXPERIMENTO 3 DE REGENERAÇÃO EM DIFERENTES TRATAMENTOS COM ADIÇÃO DE BAP E ANA (MR1, MR2 E MR3), CONSIDERANDO AS DIFERENTES IDADES DE CALOS TESTADOS PARA CADA UM DOS TRÊS GENÓTIPOS *LEMNA MINOR* 8627 E *LEMNA MINOR* DWC124 E *SPIRODELA POLYRHIZA* 7498.....55

FIGURA 26. RESULTADOS DO EXPERIMENTO 4 DE REGENERAÇÃO EM DIFERENTES TRATAMENTOS COM ADIÇÃO DE BAP E ANA (MR1 E MR2), CONSIDERANDO AS DIFERENTES IDADES DE CALOS TESTADOS PARA CADA UM DOS TRÊS GENÓTIPOS: *LEMNA MINOR* 8627 E *LEMNA MINOR* DWC124 E *SPIRODELA POLYRHIZA* 7498. 55

FIGURA 27. RESULTADOS DO EXPERIMENTO 5 DE REGENERAÇÃO DE CALOS DOS GENÓTIPOS *L. MINOR* 8627 E *L. MINOR* DWC124 INDUZIDOS NO CLARO E MANTIDOS EM R2 NO CLARO E NO ESCURO, TESTADOS NOS TRATAMENTOS MR1 E MR2. 57

FIGURA 28. SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DO EXPERIMENTO 1 DE REGENERAÇÃO EM TRATAMENTOS COM BAP E ANA (MR1 A MR12), PROVENIENTES DE CALOS EM DIFERENTES IDADES PARA OS TRÊS GENÓTIPOS (*S. POLYRHIZA* 7498, *L. MINOR* 8627 E *L. MINOR* DWC124). 58

FIGURA 29. SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DO TESTE 2 DE REGENERAÇÃO EM TRATAMENTOS COM BAP E ANA (MR1, MR2 E MR9), PROVENIENTES DE CALOS EM DIFERENTES IDADES PARA OS TRÊS GENÓTIPOS (*S. POLYRHIZA* 7498, *L. MINOR* 8627 E *L. MINOR* DWC124). 58

FIGURA 30. SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DO TESTE 3 DE REGENERAÇÃO EM TRATAMENTOS COM BAP E ANA (MR1, MR2 E MR9), PROVENIENTES DE CALOS EM DIFERENTES IDADES PARA OS TRÊS GENÓTIPOS (*S. POLYRHIZA* 7498, *L. MINOR* 8627 E *L. MINOR* DWC124). 59

FIGURA 31. SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DO EXPERIMENTO 4 DE REGENERAÇÃO EM TRATAMENTOS COM BAP E ANA (MR1 E MR2), PROVENIENTES DE CALOS EM DIFERENTES IDADES PARA OS TRÊS GENÓTIPOS (*S. POLYRHIZA* 7498, *L. MINOR* 8627 E *L. MINOR* DWC124). 59

FIGURA 32. PROPORÇÕES ESTIMADAS COM INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA OS TRATAMENTOS DE REGENERAÇÃO DE CALOS EM ANTIBIÓTICOS PARA CALOS DO GENÓTIPO 8627 DE *L. MINOR* NO A) FINAL DE R2 (FR2); B) MEIO DE R3 (MR3); C) INÍCIO DE R3 (IR3). MR2 [0]: CONTROLE; 300 T: TRATAMENTO COM 300 MG.L^{-1} DE TIMENTIN; 30 C + 300 T: TRATAMENTO COM CANAMICINA A 30 MG.L^{-1} MAIS 300 MG.L^{-1} DE TIMENTIN; 50 C + 300 T: TRATAMENTO COM CANAMICINA A 50 MG.L^{-1} MAIS 300 MG.L^{-1} DE TIMENTIN. LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI, E LETRAS DIFERENTES DIFEREM ENTRE SI. 67

FIGURA 33. ANÁLISE DE EXPRESSÃO TRANSIENTE DO GUS EM CALOS DE *LEMNA MINOR* 8627 TRANSFORMADOS COM PCAMBIA2301 VIA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*. A) CALOS TRANSFORMADOS EM MEIO DE SELEÇÃO APÓS O CO-CULTIVO; B) CALOS APÓS 12 DIAS DA TRANSFORMAÇÃO SOB EXPOSIÇÃO LUMINOSA EM MEIOS DE SELEÇÃO; C) CALO GUS POSITIVO; D) CALO DO CONTROLE NEGATIVO SEM EXPRESSÃO DO GUS. (BARRAS=1000µM). 71

FIGURA 34. TRANSFORMACAÇÃO GENÉTICA DE CALOS DO GENÓTIPO 8627 DE *L. MINOR* VIA *A. TUMEFACIENS* CONTENDO O VETOR PCAMBIA2301. A) CALOS APÓS CO-CULTIVO, EM MEIO DE SELEÇÃO; B) FRONDES REGENERANDO A PARTIR DE CALOS TRANSFORMADOS APÓS 25 DIAS; C) ISOLAMENTO DAS FRONDES TRANSFORMADAS EM MEIO DE SELEÇÃO; D-E) FRONDES GUS POSITIVA; F) FRONDE DO CONTROLE NEGATIVO SEM EXPRESSÃO DO GUS. (BARRAS = 1000µM). 72

.....73

FIGURA 35. GEL DE AGAROSE 1% COM AMOSTRAS DE PLANTAS DE *L. MINOR* GENÓTIPO 8627 TRANSFORMADAS VIA *A. TUMEFACIENS*, PARA CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA COM VETOR PCAMBIA2301. A) AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO ENTRE O PROMOTOR 35S E O GENE *NPTII*; B) AMPLIFICAÇÃO DO GENE *VIRG*.). C+: CONTROLE POSITIVO DA BACTÉRIA (PLASMÍDEO PCAMBIA2301); WT: CONTROLE NEGATIVO DAS AMOSTRAS (PLANTA NÃO TRANSFORMADA); BR: CONTROLE NEGATIVO DA REAÇÃO (ÁGUA). 73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. TESTE DE INDUÇÃO DE CALOS DE *LEMNA MINOR* (GENÓTIPOS 8627 E DWC124) E *SPIRODELA POLYRHIZA* (GENÓTIPO 7498) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO 2,4 D E BAP. 28

TABELA 2. TESTE DE INDUÇÃO DE CALOS DE *LEMNA MINOR* (GENÓTIPOS 8627 E DWC124) E *SPIRODELA POLYRHIZA* (GENÓTIPO 7498) COM OS REGULADORES DE CRESCIMENTO 2,4 D E TDZ. 28

TABELA 3. COMBINAÇÃO DOS REGULADORES VEGETAIS BAP E ANA UTILIZADA NO TESTE DE REGENERAÇÃO DE CALOS EM PLANTAS 32

TABELA 4. CONCENTRAÇÕES DOS ANTIBIÓTICOS TESTADAS NOS GENÓTIPOS 8627, DWC124 DE *LEMNA MINOR* E 7498 DE *S. POLYRHIZA* 36

TABELA 5. INICIADORES (PRIMERS) UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR, DO GENE *NPTII*, DO PROMOTOR 35S E DA REGIÃO *VIRG*. 39

TABELA 6. RELAÇÃO DO NÚMERO DE PLANTAS REGENERADAS NOS EXPERIMENTOS DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DE CALOS INDUZIDOS NO ESCURO PARA OS TRÊS GENÓTIPOS COM CALOS EM DIFERENTES IDADES EM RELAÇÃO AO TOTAL DE CALOS TESTADOS. 56

TABELA 7. RELAÇÃO DO NÚMERO DE PLANTAS REGENERADAS NOS EXPERIMENTOS DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DE CALOS DE *L. MINOR* 8627 E DWC124 INDUZIDOS NO CLARO, NO SUBCULTIVO R2 NO CLARO OU NO ESCURO, NOS TRATAMENTOS MR1 (MS DILUÍDO) E MR2 (MS DILUÍDO COM ADIÇÃO DE 0,2 MG.L^{-1} DE BAP) DE REGENERAÇÃO EM RELAÇÃO AO TOTAL DE CALOS TESTADOS. 57

TABELA 8. RELAÇÃO DO NÚMERO DE PLANTAS SOBREVIVENTES DOS EXPERIMENTOS DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DE CALOS INDUZIDOS NO ESCURO PARA OS TRÊS GENÓTIPOS COM CALOS EM DIFERENTES FASES EM RELAÇÃO AO TOTAL DE CALOS TESTADOS. 60

TABELA 9. NÚMEROS ABSOLUTOS DE SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DO GENÓTIPO *L. MINOR* 8627 NOS TRATAMENTOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS A PARTIR DO TOTAL DE PLANTAS AVALIADAS EM CADA EXPERIMENTO. 61

TABELA 10. NÚMEROS ABSOLUTOS DE SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DO GENÓTIPO *L. MINOR* DWC124 NOS TRATAMENTOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS A PARTIR DO TOTAL DE PLANTAS AVALIADAS EM CADA EXPERIMENTO. . 62

TABELA 11. NÚMEROS ABSOLUTOS DE SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DO GENÓTIPO DE *S. POLYRHIZA* 7498 NOS TRATAMENTOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS A PARTIR DO TOTAL DE PLANTAS AVALIADAS EM CADA EXPERIMENTO. . 63

TABELA 12. NÚMERO DE CALOS QUE REGENERARM PLANTAS NO TESTE 1 DE REGENERAÇÃO DE CALOS EM DIFERENTES IDADES (FASES DE SUBCULTIVO) NA PRESENÇA DE ANTIBIÓTICOS (ESTREPTOMICINA A 200 MG.L^{-1}, CANAMICINA A 30 MG.L^{-1}, ESPECTINOMICINA A 50 MG.L^{-1} E CONTROLE – MR2 SEM ADIÇÃO DE ANTIBIÓTICO) PARA OS TRÊS GENÓTIPOS, DO TOTAL DE 30 CALOS POR TRATAMENTO APÓS 40 DIAS. 66

TABELA 13. NÚMERO DE CALOS QUE REGENERARM PLANTAS NO TESTE 2 DE REGENERAÇÃO DE CALOS EM DIFERENTES IDADES (FASES DE SUBCULTIVO) NA PRESENÇA DE ANTIBIÓTICOS (TIMENTIN A 300 MG.L^{-1}, CANAMICINA A 30 MG.L^{-1} MAIS 300 MG.L^{-1} DE TIMENTIN, CANAMICINA A 50 MG.L^{-1} MAIS 300 MG.L^{-1} DE TIMENTIN E CONTROLE – MR2 SEM ADIÇÃO DE ANTIBIÓTICO) PARA OS TRÊS GENÓTIPOS, DO TOTAL DE 50 CALOS POR TRATAMENTO. 67

TABELA 14. NÚMERO DE PLANTAS SOBREVIVENTES (DO TOTAL DE 30 CALOS POR TRATAMENTO) NO TESTE 1 DE REGENERAÇÃO DE CALOS NA PRESENÇA DE ANTIBIÓTICO EM CADA UMA DAS CINCO REPETIÇÕES, COM: ESTREPTOMICINA A 200 MG.L^{-1}, CANAMICINA A 30 MG.L^{-1}, ESPECTINOMICINA A 50 MG.L^{-1} E CONTROLE (TRATAMENTO MR2 SEM ADIÇÃO DE ANTIBIÓTICO). 69

TABELA 15. NÚMERO DE PLANTAS SOBREVIVENTES (DO TOTAL DE 50 CALOS POR TRATAMENTO) NO TESTE 2 DE REGENERAÇÃO DE CALOS NA PRESENÇA DE ANTIBIÓTICO: TIMENTIN A 300 MG.L^{-1}, CANAMICINA A 30 MG.L^{-1} MAIS 300MG.L^{-1} DE TIMENTIN, CANAMICINA A 50 MG.L^{-1} MAIS 300 MG.L^{-1} DE TIMENTIN E CONTROLE (TRATAMENTO MR2 SEM ADIÇÃO DE ANTIBIÓTICO). 70

TABELA 16. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GUS EM CALOS DE *LEMNA MINOR* 8627 VIA *AGROBACTERIUM TUMAFACIENS* EHA 105 CONTENDO O VETOR PCAMBIA2301.....70

TABELA 17. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CALOS DE *LEMNA MINOR* GENÓTIPO 8627 VIA *AGROBACTERIUM TUMAFACIENS* EHA 105 CONTENDO O VETOR PCAMBIA2301 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA	Ácido 3-indolacético
ANA	Ácido naftaleno acético
AS	Acetoceringona
BAP	6-benzilaminopurina
KIN	Cinetina
M	Molar
Mbp	Mega base pairs
rpm	Rotações por minuto
TDZ	Thidiazuron
2,4-D	Ácido 2-diclorofenoxiacético
6-BA	6-benziladenina

1. INTRODUÇÃO

As lentilhas d'água, ou como são conhecidas pelo nome comum em ingles "duckweeds", são um grupo de pequenas plantas aquáticas pertencentes a família Lemnaceae. Essas plantas são monocotiledôneas consideradas as menores angiospermas existentes no reino vegetal (LANDOLT, 1986; APPENROTH, BORISJUK e LAM 2013).

Essas plantas se propagam e se desenvolvem de maneira vegetativa, ou sexuada e formam colônias com plantas geneticamente iguais (clones) (HILLMAN, 1961). Estão divididas em cinco gêneros: *Spirodela*, *Lemna*, *Landoltia*, *Wolffia* e *Wolffiella*, que possuem juntos 37 espécies (LES et al, 2002; APPENROTH, BORISJUK e LAM 2013).

As pequenas folhas das lentilhas d'àgua são denominadas frondes, e possuem de 1 mm a 1 cm, e podem possuir ou não raízes (HILLMAN 1961; LEMON e POSLUSZNY, 2000; BOGNER, 2009). Essas frondes possuem gemas em suas regiões laterais e é a partir delas que ocorre a formação de novas folhas, as chamadas frondes filhas (ASHBY et al, 1949; LEMON e POSLUSZNY, 2000). Essas por sua vez, vão produzir as frondes netas e assim sucessivamente até a formação de colônias a partir de uma única folha (LEMON e POSLUSZNY, 2000; APPENROTH, BORISJUK e LAM 2013). O processo de duplicação é rápido e pode ocorrer em cerca de 30 a 48 horas (WANG, KERSTETTER e MICHAEL1 2011; WANG et al, 2014; YANG et al, 2021b).

As "duckweeds" possuem alto valor proteico, podendo o teor de proteínas chegar a 45% do peso seco da planta (YILMAZ, AKYURT e GÜNAL, 2004; YU, et al, 2011; APPENROTH et al, 2017). A alta porcentagem de proteína faz com que essas plantas venham sendo utilizadas na suplementação de dieta para animais (STOMP, 2005), auxiliando também na redução de custos com rações convencionais (YILMAZ et al, 2004).

Essas pequenas plantas aquáticas também tem sido foco em estudos farmacológicos, onde, em biorreatores, podem produzir compostos como proteínas recombinantes (STOMP 2005; YANG et al, 2021a), a partir de plantas transformadas geneticamente (HE et al, 2008; FIRSOV et al, 2015). Por acumularem biomassa rapidamente, também se tornam interessantes para produção de biocombustíveis de segunda geração (ZHAO et al, 2012; NAHAR e SUNNY, 2020), além de promoverem a fitorremediação de ambientes com águas contaminadas (GIMENES, 2015; LIMA, 2018).

As linhagens estudadas no presente trabalho foram: dois genótipos de *Lemna minor*, (8627 e DWC124) e um de *Spirodela polyrhiza* (7498). Ambas as espécies pertencem a subfamília *Lemnoideae*, que se caracteriza por presença de raiz em suas frondes, uma por fronde no caso das *Lemnas* e várias raízes por fronde nas *Spirodelas* (HILLMAN 1961; LANDOLT, 1998; APPENROTH, BORISJUK e LAM 2013).

Devido a tantos fatores atrativos, principalmente ao rápido período de propagação dessas plantas, elas se tornaram interessantes para introdução em laboratórios para estudos de cultura de tecidos e de transformação genética de plantas (MOON e STOMP 1997; STOMP, 2005; YANG et al, 2014; YANG et al, 2018b).

Para que a cultura de tecidos de uma espécie se torne possível, é necessário delinear um protocolo que permita a indução de calos embriogênicos a partir da planta estudada, e posterior regeneração desse calo em plantas novas (ANDRADE, 2002), através de ajustes de parâmetros como luminosidade, nutrientes e adição de reguladores vegetais (YANG et al, 2014; SILVA et al, 2017).

Um protocolo de cultura de tecidos bem definido, é a base para que se possa transformar geneticamente os calos embriogenicos a fim de se obter plantas transgênicas com populações geneticamente uniformes (STOMP, 2005). Porém ainda há muito que ser estudado e estabelecido para se permitir o uso dessas plantas em biotecnologia.

Com isso, objetivou-se, no presente trabalho, a partir de testes com diferentes meios de cultura, obter um protocolo eficiente de cultura de tecidos para os dois genótipos de *Lemna minor* (8627 e DWC124) e de um genótipo

de *Spirodela polyrhiza* (7498), com alta taxa de regeneração de plantas *in vitro* a partir de calos, aplicando a abordagem de organogênese e embriogênese somática. E também transformar geneticamente a *Lemna minor* 8627 via *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor pCAMBIA2301 a título de obter frondes regeneradas transgênicas. Este projeto tem importância estratégica que permitirá o avanço em pesquisas voltadas a aplicabilidade biotecnológica dessas plantas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais da lentilha d'água

As lentilhas d´água, também conhecidas como "duckweed", são pequenas plantas aquáticas monocotiledôneas, pertencentes a família Lemnaceae, que se divide em duas subfamílias: *Lemnoideae* e *Wolffioideae* (LES et al, 2002; BORISJUK et al, 2015). São consideradas as menores angiospermas do reino vegetal e são comumente encontradas flutuando na superfície de lagos e outros ambientes aquáticos (LANDOLT, 1987; APPENROTH, BORISJUK e LAM 2013; LAN, 2020), onde se desenvolvem de maneira vegetativa formando colônias de plantas geneticamente homogêneas (HILLMAN, 1961).

Estão divididas em cinco gêneros, que abrigam um total de 37 espécies conhecidas até o momento (LES et al, 2002; APPENROTH, BORISJUK e LAM 2013; BORISJUK et al, 2015) e possuem distribuição global (STOMP, 2005). Os gêneros são: *Spirodela*, *Lemna*, *Landoltia*, *Wolffiella* e *Wolffia*, e estes apresentam características distintas entre si, no tamanho do limbo foliar, presença ou ausência de raízes, tempo de duplicação entre outros fatores, como genotipagem (LANDOLT, 1987; MOON e STOMP, 1997; BORISJUK et al, 2015). *Spirodela* (com 2 espécies), sendo a maior em tamanho, *Lemna* (13 espécies) e *Landoltia* (1 espécie) compõe a subfamília *Lemnoideae*, e *Wolffiella* (10 espécies) e *Wolffia* (11 espécies), a menor delas em tamanho, com aproximadamente 1 milímetro de comprimento de folha, compõe a subfamília *Wolffioideae* (APPENROTH, BORISJUK e LAM 2013).

Evolutivamente, pode se notar uma redução no tamanho das plantas e um aumento do genoma nessas espécies. *Spirodela polyrhiza*, a mais ancestral, possui o menor genoma, cerca de 150 Mbp, similar ao tamanho do genoma da planta modelo *Arabidopsis thaliana* (WANG, KERSTETTER e MICHAEL, 2011; WANG et al, 2014; ZIEGLER et al, 2015). Já a espécie mais recente em termos evolutivos, a *Wolffia*, possui um genoma com 1.881 Mbp (ZIEGLER et al, 2015; WANG, KERSTETTER e MICHAEL1 2011). Pode se notar então, uma redução neotênica do tamanho das plantas que evoluíram mantendo características juvenis, onde as folhas são consideradas tecido embrionário, ou cotilédones (Wang et al, 2014).

A ramificação das Lemnaceae ocorreu no início do período Cretáceo, ao final da Pangeia, o que permitiu a distribuição global das plantas e colonização das mesmas em diferentes climas e ambientes ao redor do mundo (APPENROTH, BORISJUK e LAM 2013; SREE, BOG e APPENROTH, 2016).

As pequenas folhas verdes e achatadas das lentilhas d´água, com no máximo 1 centímetro de comprimento, são denominadas frondes, e a anatomia das plantas é composta por uma fronde de tamanho bem reduzido e suas raízes, ou ausência delas no caso de *Wolffiella* e *Wolffia* (HILLMAN 1961; LEMON e POSLUSZNY, 2000; BOGNER, 2009). As frondes das Lemnaceaes são consideradas unidades morfológicas que surgem e se desenvolvem em um mesmo organismo em diferentes intervalos de tempo até sua senescência (ASHBY et al, 1949).

A fronde mãe possui duas gemas ou bolsos laterais que, por propagação vegetativa, originam duas frondes filhas (ASHBY et al, 1949; LEMON e POSLUSZNY, 2000; APPENROTH, BORISJUK e LAM 2013). As frondes possuem também uma região vegetativa central de onde as raízes se desenvolvem. *Spirodela*, *Landoltia* e *Lemna*, possuem duas gemas laterais, por onde as frondes filhas se desenvolvem, já as espécies *Wolffia* e *Wolffiella* possuem apenas um bolso lateral por onde as frondes se propagam (APPENROTH, BORISJUK e LAM 2013).

As frondes filhas se desenvolvem (a partir das gemas da planta mãe) e suas gemas dão origem às frondes netas e assim sucessivamente. Quando chegam em seu estágio maduro, as folhas filhas se desprendem da fronde mãe, que com o passar do tempo entra em senescência, adquirindo coloração amarelada antes de morrer (ASHBY et al,

1949; HILLMAN, 1961), enquanto as filhas e netas se desenvolvem, de maneira acelerada (LEMON e POSLUSZNY, 2000; STONP, 2005).

O tempo de duplicação das lentilhas d'água chega a ser duas vezes maior que de outras plantas de crescimento rápido, variando de um a dois dias (STOMP, 2005). Alguns estudos apontam que sua biomassa pode duplicar em 30 horas, ou menos (WANG, KERSTETTER e MICHAEL1 2011; WANG et al, 2014; YANG et al, 2021a) já outros enfatizam que quando em condições laboratoriais controladas, a duplicação se dá em 48 horas (BURNS et al, 2015; STOMP, 2005). A taxa de desenvolvimento propagativo das Lemnaceaes se dá de maneira rápida, porém, distinta entre suas espécies (ZIEGLER et al, 2015).

Estas plantas possuem então, um rápido tempo de duplicação com crescimento quase que exponencial similar ao dos microrganismos (CHHABRA et al, 2011; APPENROTH, BORISJUK e LAM 2013; YANG et al, 2018a; YANG et al, 2021b), característica que já fez com que as lentilhas d'água fossem utilizadas como plantas modelos antes do uso de *Arabidopsis thaliana* (HILLMAN, 1961). Porém, por ser uma planta aquática, a lentilha d'água deu lugar a outras plantas terrestres de rápido desenvolvimento e com características ideais para estudos científicos, deixando de ser utilizada como planta modelo.

Em situações de estresse, como queda ou aumento da temperatura do ambiente aquático, e alteração de intensidade luminosa, por exemplo, as lentilhas d'água formam os chamados turiões, que são folhas que passam a acumular amido e com isso acabam afundando no lago ou ambiente em que se encontram (HILlMAN, 1961; WANG et al, 2014). Com isso decantam e permanecem em estado de dormência até que o ambiente volte a ter condições ideais para seu desenvolvimento (PERRY, 1968; LENG, STAMBOLIE e BELL, 1995).

2.2. Aplicações das Lentilhas d'água

2.2.1. Aspecto nutricional

As lentilhas d`água, como o próprio nome em inglês sugere, duckweed (duck=pato, weed =erva), são plantas utilizadas por animais aquáticos em sua alimentação. Porém não apenas os patos se alimentam dessas macrófitas aquáticas. O alto conteúdo proteico das lentilhas d`água as tornam atrativas para suplementação de aminoácidos tanto para outros animais como até mesmo para o homem (APPENROTH et al, 2017; BEUKELAAR et al, 2019).

As *Lemnoideaes* apresentam alto valor nutricional e proteico, onde a porcentagem de proteína, de alto valor biológico, varia entre 35 e 45% aproximadamente, em peso seco, com grande variedade de aminoácidos (similar a proteína animal) (YILMAZ, AKYURT e GÜNAL, 2004; YU, et al, 2011; APPENROTH et al, 2017). Possuem cerca de 5% de fibras (LENG, STAMBOLIE e BELL, 1995; YILMAZ, AKYURT e GÜNAL, 2004; YANG et al, 2021a) e podem fornecer até cinco vezes mais proteína por hectare do que o cultivo de soja (SOŃTA, REKIEL e BATORSKA, 2019). Possuem altas taxas de amido que podem acumular como fonte de reserva de energia, e pode ser convertido em sacarose dependendo da demanda energética da planta (ZHAO et al, 2012).

Estudos mostram que a suplementação com lentilhas d'água em dietas de carpas (*Cyprinus carpio*) pode substituir rações comerciais sem alterações no metabolismo animal (YILMAZ et al, 2004, STOMP, 2005). A adição das lentilhas d'água em dietas também é benéfica devido ao seu baixo custo, resultando em economia ao produtor (YILMAZ et al, 2004).

A introdução de 30% de *Spirodela polyrhiza* seca na dieta de tilápias (*Oreochromis niloticus*) se mostrou eficiente e promoveu uma redução nos custos com ração (FASAKIN, BALOGUN e FASURU, 1999). Um estudo com galinhas

poedeiras, mostrou que a inserção de lentilha d'água (*Lemna gibba*) em suas dietas promoveu um aumento proteico dos ovos e maior pigmentação da gema, importantes fatores comerciais, além de reduzir os custos com rações convencionais (soja e farinha de peixe, por exemplo) (HAUSTETN et al, 1990). Em porcos, a adição de lentilhas d'água a dieta a base de farelo de soja promoveu um aumento no peso corporal dos animais (SOŃTA, REKIEL e BATORSKA, 2019). Também existem diversos estudos sobre a ingestão de duckweeds por ruminantes. Nesses animais, a degradação proteica ocorre no rúmen, onde as lentilhas d'água são facilmente digeridas, além de serem uma ótima fonte de fósforo e nitrogênio (LENG, STAMBOLIE e BELL, 1995; SOŃTA, REKIEL e BATORSKA, 2019).

Com o aumento populacional, almeja-se produzir fontes alternativas de proteínas para suprir as necessidades nutricionais humanas, uma vez que a produção de proteína animal possa não acompanhar o crescimento populacional (BEUKELAARA et al, 2019). A inserção de lentilhas d'água na dieta humana ainda não é totalmente difundida, principalmente no ocidente, uma vez que esta planta não é acessível nem divulgada a população como fonte alternativa de proteínas (APPENROTH et al, 2017; BEUKELAARA et al, 2019). Em algumas regiões, porém, como na Tailândia, o consumo de lentilhas d'água acompanha gerações, especialmente em comunidades mais pobres, onde a ingestão da planta ocorre no sentido de suprir a demanda proteica da população (BHANTHUMNAVIN e MCGARRY, 1971).

2.2.2. Aplicações farmacológicas em biorreator

As lentilhas d'água também vêm sendo estudadas para uso em biorreatores. As características dessas plantas como rápida multiplicação e reprodução assexuada, responsável pelo acúmulo de biomassa (YANG et al, 2018a; YANG et al, 2021a), seu fácil cultivo e manejo em condições axênicas laboratoriais, tamanho reduzido, baixo custo entre outros fatores, fazem delas plantas de grande interesse para produção de proteínas recombinantes de aplicações farmacológicas (STOMP, 2005; FIRSOV et al 2015; YANG et al, 2021a).

Nos biorreatores, plantas transformadas geneticamente com proteínas de interesse se desenvolvem de maneira a se multiplicarem enquanto produzem um determinado produto biológico, como por exemplo anticorpos e vacinas (HE et al, 2008). No caso das vacinas, as lentilhas d'água podem ser transformadas para produção de um antígeno, e este produto alvo produzido, após passar pelo biorreator, deve então ser extraído e purificado, ou a proteína desejada pode ser secretada pela planta no próprio meio de cultivo (STOMP, 2005; YANG et al, 2021a). Firsov e colaboradores (2015) expressaram um antígeno do vírus da influenza aviaria em plantas da espécie *Lemna gibba* transformadas nuclearmente via *Agrobacterium tumefaciens*, comprovando a viabilidade da utilização de *Lemnoideas* em biorreatores para produção proteínas recombinantes para usos farmacêuticos e medicinais.

2.2.3. Remoção de resíduos e Produção de biomassa

Outra característica que chama a atenção nas lentilhas d`água é que elas auxiliam na redução de resíduos e impurezas no ambiente aquático onde habitam (GIMENES, 2015), podendo promover a hidrólise de matéria orgânica e são uma ótima alternativa para serem utilizadas na produção de biomassa além de promoverem a remoção de nitrogênio, principalmente na forma de amônio, e fósforo de águas residuais (ZHAO et al, 2012; LIMA, 2018).

O tratamento de águas efluentes possibilita a remoção de resíduos para que a água possa ser reutilizada para diversos fins como irrigação e refrigeração industrial (ORON, 1994). XU e colaboradores (2012) conduziram um

experimento onde *Spirodela polyrhiza* foi utilizada em águas residuárias de suínos rica em nutrientes. Pode se notar um aumento de biomassa, no período do verão (temperaturas mais altas) e remoção de compostos nitrogenados e fosfatados, auxiliando na fitorremediação do ambiente. As plantas então foram coletadas dos tanques e utilizadas posteriormente ou como matéria prima na dieta de animais ou para produção de etanol.

Lemna minor foi utilizada em um estudo onde a remoção do metal pesado arsênio por meio de fitorremediação foi testada, a fim de descontaminar o ambiente aquático. Após testes onde as plantas foram expostas a diferentes concentrações desse metal, foram feitas coletas do material vegetal, que após seco, passou por digestão e foi aferida a quantidade de arsênio na biomassa. O resultado obtido foi de remoção superior a 50% deste metal em um período de 48 horas (GIMENES, 2015).

Como já citado, a as lentilhas d'água acumulam biomassa rapidamente, e isso faz com que elas sejam objetos de estudos também na área de produção de biocombustíveis. As lentilhas d'água possuem um baixo teor de lignina em sua parede celular e também altos níveis de sacarificação o que as tornam interessantes para produção de etanol de primeira e segunda geração, (PAGLIUSO et al, 2020). Devido a uma recente necessidade de se reduzir o consumo de combustíveis fósseis, plantas aquáticas se mostram promissoras para a produção de biocombustíveis (NAHAR e SUNNY, 2020). O alto teor de amido das Lemnaceaes permite que este seja convertido em glicose possibilitando a produção de bioetanol por processos fermentativos (ZHAO et al, 2012). Também, por não ser uma planta comum na cadeia alimentar, sua produção não causa impactos ecológicos além de não competir por terras agrícolas nem áreas de cultivo (NAHAR e SUNNY, 2020).

As condições ambientais interferem na produção da biomassa nas lentilhas d'água, e para que esta ocorra de maneira mais eficiente, a temperatura ambiente deve estar entre cerca 20 e 28 °C e o pH entre 5 e 7,5, e as condições de vento no local onde as plantas se encontram não deve ultrapassar 0,3 m/s, para que haja estabilidade nas condições de crescimento (SOŃTA, REKIEL e BATORSKA, 2019).

2.3. Linhagens estudadas

As subdivisões de plantas dentro de uma mesma espécie de *Lemnoideae* se dão a partir de análises filogenéticas, que permitem a identificação de pequenas diferenças no genoma dessas, o que confere diferenças fisiológica entre as plantas. Essa diferenciação intra-espécie pode ser expressa pelo nome de ecótipo, linhagens gênicas, clones entre outros (APPENROTH, BORISJUK e LAM 2013; CAO, FOUROUNJIAN e WANG, 2020). Neste trabalho, foi se utilizado o termo genótipo para subdividir linhagens diferentes dentro de uma mesma espécie.

2.3.1. Spirodela polyrhiza

Spirodela polyrhiza, a Lemnaceae mais ancestral, é uma das apenas duas espécies do gênero *Spirodela*, e vem sendo estudado desde o século passado.

A publicação de Hillman (1961) descreveu a presença de várias raízes por fronde nesse gênero, podendo estas variarem de 5 a 11 raízes aproximadamente que se desenvolvem a partir de uma única fronde (LEMON e POSLUSZNY, 2000; BOGNER, 2009; YANG et al, 2021b) e são consideradas adventícias (HILLMAN, 1961). As raízes possuem apenas função de suporte e não de absorção de nutrientes (LANDOLT, 1998). A absorção de nutrientes ocorre a partir da face inferior, ou abaxial das folhas (AN et al, 2019). Possuem feixes vasculares reduzidos, e em média cinco ou mais enervações por folha (HILLMAN, 1961).

Apesar de possuir um genoma de tamanho próximo ao da planta modelo *Arabidopsis thaliana*, apresenta cerca de 30% menos genes codificantes de proteínas que esta, e cerca de 50% menos que o arroz (WANG, KERSTETTER e MICHAEL 2011; WANG et al, 2014). Esta redução pode estar relacionada a repressão da transição da fase juvenil a adulta (WANG et al, 2014).

Lemon et al (2001) aponta que o tempo médio de vida útil de *Spirodela*, é de cerca de 12 dias, a partir de onde começam a ocorrer processos de envelhecimento e senescência da fronde mãe, e neste período ocorre a formação de cerca de 3,6 frondes filhas por fronde mãe. ZIEGLER et al (2015) mostrou que *Spirodela* tem uma taxa de crescimento relativo de 0,29 ao dia e a formação de folhas novas se dá em uma taxa de 0,62 por dia (APPENROTH, BORISJUK e LAM 2013). Outros estudos, porém, reportam um tempo de vida mais longo, de aproximadamente 30 dias. Essas diferenças de período de vida útil podem se dar devido ao fato dessas plantas possuírem alta plasticidade, o que faz com que elas se adaptem a um determinado ambiente onde habitam, podendo isso acarretar em aumento ou diminuição da longevidade das mesmas (LANDOLT, 1987).

As espécies de *Spirodela* vem sendo estudadas em processos de engenharia genética desde os anos 1990 (STOMP, 2005), e ao longo do tempo foram ganhando destaque por serem um sistema ideal para testes bioquímicos, genéticos e toxicológicos (WANG et al, 2014; YANG et al, 2018b).

2.3.2. Lemna minor

Lemna minor é uma das 13 espécies do gênero *Lemna*. Ela é amplamente utilizada como sistema modelo em estudos de relógios circadianos, transformação genética e aplicações biotecnológicas, além de se adaptar facilmente a diferentes climas em diversas regiões (AN et al, 2018).

Possui frondes com cerca de três milímetros com apenas uma raiz por fronde, e o comprimento desta pode variar entre seus genótipos e até mesmo devido às condições ambientais de onde se encontram, variando de um a cinco centímetros (HILLMAN, 1961). Também possuem feixes vasculares reduzidos e a média de enervação por folha é de uma a três (HILLMAN, 1961). Assim como as *Spirodelas*, as raízes das *Lemnas* também possuem função de suporte e não de captação de nutrientes (LANDOLT, 1998).

Existe uma ampla variação no tamanho do genoma das *Lemnas*, que vai desde 323 Mbp a 800 Mbp (WANG, KERSTETTER e MICHAEL1 2011; AN et al, 2018), sendo os menores depois de *Spirodela* (AN et al, 2018).

Lemna e *Spirodela* também diferem quanto ao tempo de vida útil. As *Lemnas* possuem uma vida de aproximadamente 31 dias (de 4 a 5 semanas) ou mais, e ao longo deste período produzem cerca de 14 folhas filhas. Após este período as plantas começam a entrar em senescência. (LEMON et al, 2001). A taxa de crescimento relativo de *Lemna* se dá entre 0,31 e 0,62 por dia (LEMON et al, 2001; ZIEGLER et al, 2015).

2.4. Cultura de tecidos

Alguns estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de estabelecer um protocolo de cultura de tecidos eficiente, ou seja, regeneração de plantas a partir de calos, para algumas espécies de lentilhas d'água a fim de possibilitar a transformação genética eficiente dessas plantas (STOMP, 2005; YANG et al, 2014).

A cultura de tecidos é uma importante ferramenta para estudos biotecnológicos de plantas, pois é capaz de gerar várias plantas a partir de uma única (ANDRADE, 2002). Essa técnica consiste na inserção de uma amostra

vegetal em um meio de cultura contendo os nutrientes específicos para que esta possa se regenerar, formando células embriogênicas totipotentes que posteriormente poderão se diferenciar formando uma nova planta (ANDRADE, 2002). Isto só é possível com ajustes de parâmetros como reguladores de crescimento, concentração de nutrientes, carboidratos, luminosidade, temperatura, entre outros (YANG et al, 2014; SILVA et al, 2017).

Para que a cultura de tecido de uma espécie seja bem-sucedida, é necessário se estabelecer um protocolo eficiente, onde possa haver alta taxa de regeneração de plantas a partir de um explante ou de calos embriogênicos. O estabelecimento de um protocolo de cultura de tecidos para as Lemnaceaes, se faz necessário para que se possa empregar essas plantas para fins biotecnológicos e de melhoramento genético, aumentando ainda mais suas qualidades e melhorando suas propriedades biológicas (HUANG et al, 2016; HUANG et al, 2018).

A indução de calos em *Lemnoideae* já foi descrita desde o século passado para algumas espécies (STOMP, 2005). Estudos testaram diferentes reguladores vegetais a fim de obter respostas de formação de calos e depois a regeneração de folhas novas a partir dos mesmos. Chang e Chiu relataram em 1978 o estabelecimento de cultura de tecidos em *Lemna gibba*, o primeiro relato de indução de calos para o gênero. A partir daí diversos outros estudos foram desenvolvidos para o estabelecimento de indução de calos e regeneração de plantas para outras espécies, abrindo portas para a possibilidade de transformação genética (STOMP, 2005).

Os protocolos de cultura de tecidos, porém, variam muito entre as espécies de *Lemnoideas* e até mesmo entre seus genótipos (STOMP, 2005; YANG et al, 2018a) e fatores como o tipo de regulador vegetal utilizado e sua concentração, determinando o balanço auxina-citocinina, também são fatores essenciais para o sucesso de indução de calos (MOON e STOMP 1997).

2.5. Transformação genética

Todas as características acima citadas fizeram com que, tanto *Lemna minor* como *Spirodela polyrhiza*, ganhassem destaque entre a comunidade científica nos últimos anos, porém ainda serão necessários mais estudos bioquímicos e fisiológicos para que se possa empregá-las de maneira eficiente e produtiva em áreas biotecnológicas (LI et al, 2004; CHHABRA et al, 2011).

Nos anos 1980, pesquisadores começaram a transformar Lemnaceaes através de biolística, uma vez que a transformação via *Agrobacterium* não estava difundida entre as monocotiledôneas. A partir disso obtiveram respostas transientes de expressão de genes nas plantas (ROLFE e TOBIN, 1991). Mais tarde, estudos com *Agrobacterium* também começaram a ser desenvolvidos para essas plantas, porém apenas de maneira transiente, e não estável. (STOMP, 2005). A utilização de métodos indiretos de transformação genetica, ou seja, a partir de calos, passou a ser atraente devido a maior eficiência de transformação (STOMP, 2005).

Protocolos de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* já foram descritos para algumas espécies de Lemnmaceae (STOMP, 2005), no entanto, o sucesso ainda não é tão alto devido a limitações na implementação de protocolos eficientes de indução de calos e regeneração de plantas (CHHABRA et al, 2011).

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria gram-negativa causadora da galha-da-coroa em células vegetais, que promove o aparecimento de tumores (células com crescimento incontrolado) entre o tronco e a raiz das plantas (ZAMBRYSKI, 1988). O processo de infecção se dá pela presença do plasmídeo Ti ("tumor inducing"), que possui a região *vir* (de virulência), responsável pela transferência da egião do T-DNA bacteriano para o interior do genoma da célula vegetal (ZAMBRYSKI, 1988; ANDRADE, SARTORETTO e BRASILEIRO, 2003). Uma vez que a região do T-DNA é inserida no genoma da planta, este se envolve na biossíntese de auxina e citocinina (que auxiliam os processos

de divisão celular) e também de opinas, que serão consumidas pela bactéria (ZAMBRYSKI, 1988; PĂCURAR et al, 2011).

Genes de interesse, assim como de resistência a um antibiótico, ou um gene repórter, podem ser inseridos na região do T-DNA substituindo os genes de auxinas e citocininas em um vetor binário que contém as regiões repetidas invertidas denominadas de bordas direita e esquerda que determinam a região do T-DNA da *Agrobacterium* (ANDRADE, SARTORETTO e BRASILEIRO, 2003; SARTORETTO, SALDANHA e CORDER, 2008). Após a infecção bacteriana, a região do T-DNA é inserida no genoma nuclear da planta e os genes desta região são transcritos e replicados pela célula vegetal, e passam a ser expressos pela planta (PĂCURAR et al, 2011).

Os genes de seleção utilizados em sistemas de transformação genética de plantas, tem papel essencial no processo de identificação de plantas transgênicas quando comparadas às selvagens (SARTORETTO, SALDANHA e CORDER, 2008). O gene *nptII* confere resistência à antibióticos aminoglicosídeos, como canamicina e geneticina, pois codifica a enzima Neomicina Fosfotransferase II, o qual é amplamente utilizado em diversas espécies de dicotiledôneas e em algumas monocotiledôneas (WILMINK e DONS, 1993). A concentração e o antibiótico utilizado como agente de seleção deve ser eficiente para selecionar plantas transformadas, não levar as plantas à morte e para evitar o aparecimento de escapes (WILMINK e DONS, 1993).

Genes repórteres também são importantes na identificação e de plantas transgênicas, e um dos mais utilizados é o gene *uidA*. Este codifica a enzima β-glucuronidase (GUS), que promove a degradação do composto X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide), resultando em um precipitado de cor azul no local da atividade enzimática, permitindo a identificação do gene na planta (Jefferson, 1987; CERVERA, 2005).

O primeiro relato de sucesso em transformação genética de *Lemna* foi publicado pelo grupo de Yamamoto e colaboradores (2001). Neste trabalho, calos de *Lemna minor*, foram transformados via *Agrobacterium tumefaciens* portando vetores contendo o gene *uid*A e o de resistência à canamicina. Apesar de haver plantas transformadas, não se pôde estimar a porcentagem das mesmas uma vez que as amostras analisadas provinham de nódulos de calos diferentes que cresceram todos juntos em mesmos frascos.

Cantó-Pastor e colaboradores (2014) transformaram *Lemna minor* 8627via *Agrobacterium tumefaciens* com uso de GFP ("green fluorescente protein") como gene repórter, e obtiveram uma eficiência de 59% dos calos expressando GFP, de maneira transiente.

A expressão transiente se refere a expressão do gene repórter por um curto período após a transformação, e este pode não estar inserido no genoma da planta, e, portanto, não seria replicado por ela, assim, após um tempo, esse gene exógeno seria degradado (SMITH, 2013; YANG et al, 2020). Para que se possa obter a transformação estável, ou seja, para que as plantas transgênicas mantenham por várias gerações o gene inserido, esses devem ser integrados ao genoma da planta. Este processo acompanha as divisões celulares da planta, a qual passa a conter o transgene de maneira estável (SMITH, 2013).

Ambos os métodos, de transformação, transiente e estável, geram informações importantes sobre processos genéticos e moleculares, onde o transiente permite análises de expressão de um gene em um menor período, e o estável permite a análise da expressão de genes a longo prazo (HEENATIGALA et al, 2018).

Yang et al (2018a) testaram a eficiência de transformação genética em *Lemna minor* a partir de calos e a partir de frondes, com o vetor pCAMBIA2301 abrigando o gene *CPY710A11*, responsável pela produção de estigmasterol, para fins medicinais. A porcentagem de linhagens transgênicas obtidas a partir da transformação de calos foi de 4%, e na transformação das frondes, a taxa variou entre 2 e 6% dependendo do genótipo testado. Chhabra e colaboradores

(2011) também transformaram calos de *Lemna minor* via *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor pCAMBIA2301 e obtiveram uma eficiência de 3,8 % de frondes GUS positivas e 1,7% de linhagens PCR positivas.

Existem também estudos em transformação genética de *Spirodela*. Yang e colaboradores (2018b) transformaram *S. pollyrhiza* genótipo 5543 via *Agrobacterium* a partir de calos. O plasmídeo utilizado continha genes repórteres que sinalizam respostas a citocinina e auxina, TCS::GUS e DR5::GUS respectivamente. Foi observado que a indução de calos ocorreu de maneira mais eficiente com uma porcentagem mais elevada de auxina, e a eficiência do processo de transformação foi de cerca de 13%.

Thu et al (2015) transformaram as frondes de *S. polyrhiza* via *Abrobacterium* com o gene que codifica o antígeno do vírus H5N1 da gripe aviária, para fins medicinais (produção de vacina). As frondes foram infectadas com *Agrobacterium* e após a seleção e análise de PCR, foram obtidas 4 linhagens transgênicas com a presença do antígeno.

Ainda existem muitas lacunas em protocolos de transformação genética e de cultura de tecidos para *Lemnoideaes*, desta forma, o presente trabalho objetivou explorar, através de diferentes experimentos, as respostas a reguladores vegetais para indução de calos e regeneração de plantas para duas espécies de *Lemnoideaes* (*L. minor* – genótipos 8627 e DWC124, e *S. polyrhiza* – 7498), e testar um protocolo de transformação de calos via *Agrobacterium* para *L. minor* 8627, a fim de contribuir com os avanços biotecnológico dessas plantas.

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi obter um protocolo de cultura de tecidos (indução de calos e regeneração de plantas) para dois genótipos de *Lemna minor* (8627 e DWC124) e para um genótipo de *Spirodela polyrhiza* (7498) como também transformar geneticamente *Lemna minor* 8627 via *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor pCAMBIA2301.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas, do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq) da Universidade de São Paulo, situada na cidade de Piracicaba.

4.1. Material vegetal e manutenção das plantas

Foram utilizados três genótipos de *Lemnoideae*, sendo dois deles da espécie *Lemna minor:* 8627 e DWC124, e um de *Spirodela polyrhiza*: 7498 (figura 1). O material biológico foi cedido pelo Dr. Eric Lam, da Universidade de Rutgers (The State University of New Jersey). A especificação das plantas (a partir dos números e/ou letras de identificação) se relaciona ao local de origem, que é descrito pela Rutgers Duckweed Stock Cooperative.

Figura 1. Representação dos genótipos 8627 e DWC124 da espécie *Lemna minor*, e do genótipo 7498 de *Spirodela polyrhiza*. (Barra=1000μM)

As plantas foram cultivadas em meio MS sólido (Murashige & Skoog, 1962) (anexo 1) com 3% de sacarose, pH aferido para 5,8 e adição de Phytagel (Sigma) como agente solidificador. Para os dois genótipos de *Lemna*, o meio MS foi diluído em 50% para melhor desenvolvimento das plantas. As plantas foram mantidas em placas de Petri 90x15 e em fotoperíodo de 16 horas claro e 8 horas escuro (condição de luz) com intensidade luminosa de 100 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. O subcultivo das plantas foi feito semanalmente de maneira axênica e a manutenção das mesmas se deu em sala climatizada a 24° C.

4.2. Testes de indução de calos

Para os testes de indução de calos, diferentes combinações de reguladores vegetais foram adicionadas ao meio de cultura MS diluído (50% da concentração do meio MS). Também foram testadas as condições de presença e ausência de luz no processo de indução de calos. Foi avaliado visualmente o tempo em que a indução de calos ocorria

para cada um dos três genótipos. Os reguladores testados foram ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (auxina sintética), 6-benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) (citocininas sintéticas). Foram testadas combinações do 2,4 D com BAP e do 2,4 D com TDZ, onde foi feito o delineamento quadrado latino com as combinações dos dois reguladores, obtendo-se um total de 16 tratamentos diferentes. Para a combinação 2,4 D e BAP utilizou-se: 0 $mg.L^{-1}$; 1 $mg.L^{-1}$; 2 $mg.L^{-1}$ e 3 $mg.L^{-1}$ de 2,4 D e 0 $mg.L^{-1}$; 0,25 $mg.L^{-1}$; 0,5 $mg.L^{-1}$ e 1 $mg.L^{-1}$ de BAP (tabela 1). Já para a combinação de 2,4 D e TDZ, utilizou-se 0 $mg.L^{-1}$; 0,25 $mg.L^{-1}$; 0,5 $mg.L^{-1}$ e 1 $mg.L^{-1}$ para ambos os reguladores (tabela 2).

Tabela 1. Teste de indução de calos de *Lemna minor* (genótipos 8627 e DWC124) e *Spirodela polyrhiza* (genótipo 7498) com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4 D e BAP.

		2,4-D ($mg.L^{-1}$)			
		0	**1,0**	**2,0**	**3,0**
BAP ($mg.L^{-1}$)	**0**	T1	T2	T3	T4
	0,25	T5	T6	T7	T8
	0,5	T9	T10	T11	T12
	1,0	T13	T14	T15	T16

Tabela 2. Teste de indução de calos de *Lemna minor* (genótipos 8627 e DWC124) e *Spirodela polyrhiza* (genótipo 7498) com os reguladores de crescimento 2,4 D e TDZ.

		2,4-D ($mg.L^{-1}$)			
		0	**0,25**	**0,5**	**1,0**
TDZ ($mg.L^{-1}$)	**0**	T1	T2	T3	T4
	0,25	T5	T6	T7	T8
	0,5	T9	T10	T11	T12
	1,0	T13	T14	T15	T16

4.2.1. Experimentos realizados no escuro

Foi realizado para os três genótipos, um teste de indução de calos nos 16 tratamentos com combinações de 2,4-D e BAP.

Em fluxo laminar, com o auxílio de pinças esterilizadas foram testados três tipos diferentes de amostra foliar, conforme mostrado na figura 2, sendo:

"i": planta inteira

"f": porção central da fronde com parte da raiz e gema meristemática dos bolsos laterais intacta

"r": raiz (corte da porção final-meristemática da raiz)

Para o genótipo 7498 de *Spirodela polyrhiza* foram transferidas 6 amostras de cada tipo ("i", "f" e "r") por placa de Petri e para os genótipos 8627 e DWC124 de *Lemna minor* foram transferidas 8 amostras de cada tipo ("i", "f" e "r") por placa. O experimento se deu em triplicata. As placas foram vedadas com plástico filme para evitar contaminação e então mantidas em câmara escura a 28 °C.

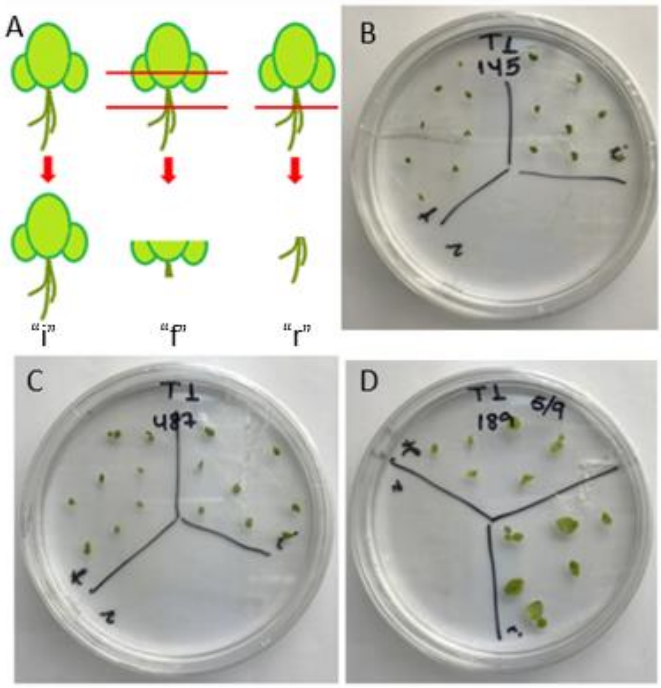


Figura 2. Disposição dos diferentes tipos de amostra foliar das plantas em meio de cultura para teste de indução de calos. A) esquema dos tipos de amostra foliar utilizados: frondes inteiras ("i"), corte mantendo as gemas laterais e região de iniciação da raiz ("f"), e porção final da raíz ("r"); B) disposição das amostras foliares em placas de Petri com tratamento, do genótipo 8627; C) disposição das amostras foliares em placas de Petri com tratamento, do genótipo DWC124; D) disposição das amostras foliares em placas de Petri com tratamento, do genótipo 7498.

A avaliação deste experimento se deu na observação de formação ou não de calos em cada um dos tratamentos para os três genótipos.

Os demais experimentos foram realizados com combinações de 2,4-D e TDZ

- Experimento 1:

Da mesma maneira que no experimento anterior, plantas dos três diferentes tipos de amostra foliar ("i", "f" e "r") foram transferidas para os 16 tratamentos de combinação de 2,4-D e TDZ. Para o genótipo 7498 de *Spirodela polyrhiza* foram transferidas 6 amostras de cada tipo por placa de Petri e para os genótipos 8627 e DWC124 de *Lemna minor* foram transferidas 8 amostras de cada tipo por placa. O experimento se deu em triplicata. As placas foram vedadas com plástico filme para evitar contaminação e então mantidas em câmara escura a 28 °C. Este experimento foi realizado em duas repetições.

- Experimento 2:

Neste experimento foram testadas duas idades das plantas do genótipo de *S. polyrhiza*: plantas mais jovens, de 2 semanas de idade e plantas mais velhas, de 3 semanas de idade, somente nos tratamentos T1, T10, T11, T12, T14, T15 e T16 de 2,4-D e TDZ tanto com amostras foliares tipo "i" (inteiras) como "f" (corte da porção mediana central com gemas laterais). N amostral =20 plantas por tratamento.

- Experimento 3:

Em seguida, uma vez que se foi observado maior frequência de formação de calos nos tratamentos T10 e T14, estes foram testados novamente com 24 placas de Petri com 10 plantas por placa em condições de escuro.

- Experimento 4:

Neste experiemento, os três genótipos foram testados nos 16 tratamentos (tabela 2) de combinações de 2,4 D e TDZ utilizando 10 plantas inteiras "i" por placa em triplicata (n amostral=30 plantas por tratamento). Este experimento foi realizado em condições de escuro e sob iluminação.

As avaliações se deram pela contagem do número de plantas que induziram calos, no caso de *S. polyrhiza* e presença ou ausência de formação de calos para as *L. minor*, em cada um dos tratamentos e com os dados obtidos fez se a análise estatística.

4.2.2. Experimentos realizados no claro

Para os experimentos de indução de calos na presença de fonte luminosa, as plantas foram mantidas em prateleiras iluminadas com lâmpadas tubulares de LED em fotoperíodo de 16 horas de claro e 8 horas de escuro.

- Experiento 1:

Os três genótipos foram testados nos 16 tratamentos (tabela 2) de combinações de 2,4 D e TDZ. Foram utilizadas 10 plantas inteiras 'i" por placa em triplicata para cada tratamento (n amostral=30 plantas por tratamento). Este experimento foi realizado sob iluminação e no escuro para fins comparativos.

- Experimento 2:

Neste experimento, somente foi utilizado o tratamento T14 para os três genótipos, onde foi avaliado o número de plantas que induziram calos para cada genótipo. Para *S. polyrhiza*, a avaliação se deu após 30 dias (período de indução denominado R0, item 4.2.3), quando houve a indução dos calos, já para as *L. minor*, não houve formação de calos mesmo após 40 dias (período denominado R0, item 4.2.3), e sim, somente um entumecimento das frondes. Estas folhas entumecidas foram transferidas para novos meios do tratamento T14, denominados subcultivos R1, tanto no claro como no escuro, e só então, ao fim deste período (30 dias, item 4.2.3), é que foi observada a formação de calos. Os calos foram transferidos para novo subcultivo (designado de R2), divididos tanto para crescimento no claro como no escuro, conforme ilustrado no esquema da figura 3. N amostral=50 plantas por genótipo.

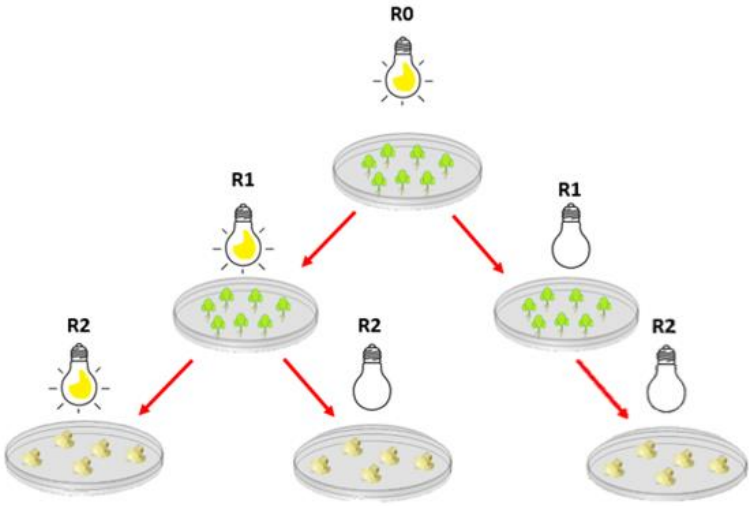


Figura 3. Indução de calos sob incidência luminosa nos genótipos de *Lemnas*. As plantas entumecidas no período de R0 foram isoladas tanto em R1 no claro como no escuro. Os calos induzidos no período de R1 no claro foram isolados e transferidos para R2 tanto no claro quanto no escuro.

- Experimento 3:

Neste experimento, utilizou-se 10 frondes por placa, em cinco placas para cada um dos três genótipos no tratamento T14, utilizando 10 placas por genótipo para cada período de luz.

As placas foram mantidas no claro por diferentes períodos de luz (10, 15 e 20 dias) e em seguidas foram transferidas para o escuro até completarem o período de R0 (item 4.2.3) (30 dias para *S. polyrhiza* e 40 dias para as *L. minor*). Exemplo: as culturas mantidas por 10 dias no claro ficaram mais 20 dias no escuro, as culturas mantidas 15 dias no claro, ficaram mais 15 dias no escuro e as culturas mantidas por 20 dias no claro, ficaram mais 10 dias no escuro.

- Experimento 4:

Este experimento foi realizado apenas com o genótipo DWC124 de *L. minor*, nos tratamentos T6, T7, T8, T10, T11, T12, T14, T15 e T16 para confirmar os resultados iniciais em que se obteve baixa indução de calos para este genótipo comparado com o genótipo 8627 de *L minor*. Foram utilizadas 10 plantas por placa e três placas por tratamento e a avaliação se deu a partir da contagem do número de plantas entumecidas que induziram calos ao fim do período de 30 dias denominado de R1 (item 4.2.3).

4.2.3. Fases de indução de calos

Os períodos de indução de calos foram chamados de R0, e as posteriores passagens mensais dos calos formados para meios novos, de R1, R2, R3, R4 e assim sucessivamente. Esses períodos foram determinados para as duas espécies a partir dos experimentos de indução.

Para os genótipos de *Lemna minor*, o período ideal de indução de calos no escuro, denominado de R0, foi de 90 dias e para *Spirodela polyrhiza*, este período de indução de calos (R0) foi de 45 dias. O período ideal de indução de calos no claro, denominado de R0, foi de 40 dias para as *Lemnas* e de 30 dias para *S. polyrhiza*. A partir da determinação

dessas datas, pode-se aferir a idade desses calos com maior precisão, e assim, utilizá-los para os posteriores experimentos de regeneração de plantas.

O esquema da figura 4 mostra a linha do tempo da idade dos calos induzidos (tempo decorrido após a indução e subcultivos) no escuro e no claro para as duas espécies estudadas.

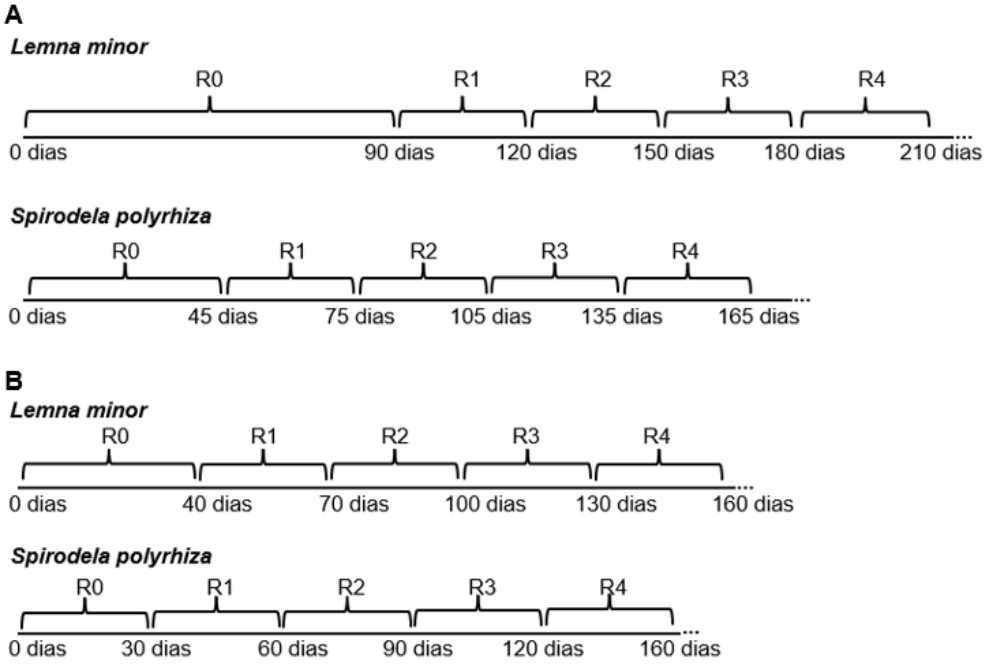


Figura 4. Linha do tempo representando a idade dos calos induzidos para as espécies *Lemna minor* e *Spirodela polyrhiza*. A) indução de calos no escuro; B) indução de calos no claro. R0 representa o período de indução onde as folhas das plantas são colocadas em meios de cultura com tratamento para indução de calos. R1 representa o isolamento desses calos em seus respectivos meios de cultura novos. R2, R3 e R4 representam as posteriores passagens mensais para meios de cultura novos.

4.3. Teste de regeneração de plantas

Para avaliar a regeneração de plantas a partir de calos, foram utilizados em meio MS diluído, diferentes concentrações dos reguladores BAP e ANA (ácido naftalenoacético). As concentrações utilizadas dos reguladores foram de 0; 0,2; 0,5 e 1 mg.L^{-1} de BAP, e 0; 0,1 e 0,2 mg.L^{-1} de ANA, obtendo-se assim um total de 12 tratamentos diferentes, como mostra a tabela 3.

Tabela 3. Combinação dos reguladores vegetais BAP e ANA utilizada no teste de regeneração de calos em plantas

		BAP (mg.L^{-1})			
		0	**0,2**	**0,5**	**1,0**
ANA (mg.L^{-1})	**0**	MR1	MR2	MR3	MR4
	0,1	MR5	MR6	MR7	MR8
	0,2	MR9	MR10	MR11	MR12

Foram testadas também idades diferentes de calos baseando-se nas idades estabelecidas nos testes de indução de calos, definidas como R0 (período de indução dos calos, ou seja, formação de calos a partir de folhas) e

posteriores passagens mensais desses calos para placas com meios de cultura novos chamadas de R1, R2 e assim sucessivamente. A partir disso, nos testes foram utilizados calos nos subcultivos R1, R2, R3, R4, R5 e R6 (item 4.2.3).

As análises foram realizadas em diferentes períodos de tempo dentro de cada subcultivos a partir de R1, onde os mesmos foram subdivididos.

Início: entre 1 e 10 dias da inoculação nos subcultivos

Meio: entre 10 e 20 dias da inoculação nos subcultivos

Fim: entre 20 e 30 dias da inoculação nos subcultivos

Os calos foram dispostos em placas de Petri contendo os meios de cultura com os diferentes tratamentos, e expostos em luz em prateleiras, como mostra o esquema da figura 5.

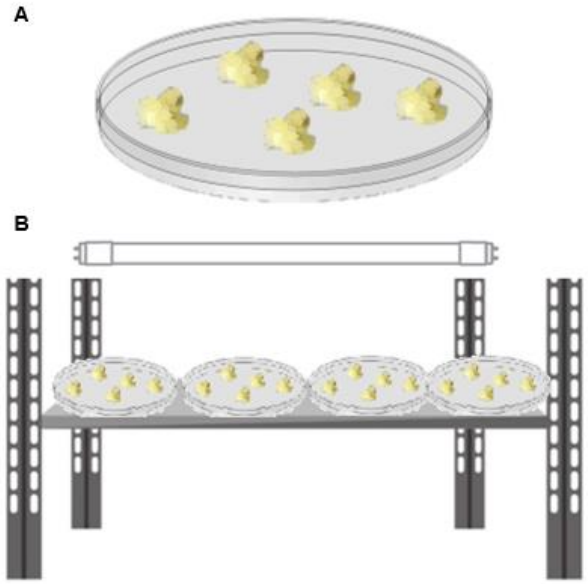


Figura 5. A) esquema representando a disposição dos calos nas placas de Petri com os diferentes tratamentos de regeneração de de plantas a partir de calos. B) disposição das placas na prateleira da sala de cultura de tecidos sob exposição à luz.

Foram colocados 10 calos por placa por tratamento e foram testados os calos induzidos no escuro e no claro. A avaliação se deu pela contagem do número de calos capazes de regenerar plantas após cerca de 40 dias da montagem do experimento, e fez-se as análises estaísticas.

Todas as frondes regeneradas foram isoladas e transferidas para meios de manutenção, MS para o genótipo 7498 de *S. polyrhiza* e MS diluído para os genótipos 8627 e DWC124 de *L. minor* onde foram mantidas para observação de seu desenvolvimento e realização da análise de sobrevivência (contagem de quantas das plantas regeneradas se mantiveram vivas pelo período de 3 meses). Em alguns casos, as frondes regeneradas não se desenvolveram e morreram.

Ao todo foram realizados 5 experimentos de regeneração: quatro com calos induzidos no escuro e dois com calos induzidos no claro, sendo estes:

1) O experimento utilizou os 12 tratamentos de combinações dos reguladores BAP e ANA, calos do genótipo 7498 de *S. polyrhiza* no início de R1 (45 a 55 dias), no meio de R2 (85 a 95 dias) e ao fim de R4 (155 a 165 dias). Para os genótipos 8627 e DWC124 de *L. minor*, calos estavam no fim de R3 (170 a 180 dias).

2) O experimento utilizou os tratamentos MR1 (MS diluído), MR2 (MS diluído mais 0,2 mg.L^{-1} de BAP) e MR9 (MS diluído mais 0,2 mg.L^{-1} de ANA), com calos do genótipo 7498 de *S. polyrhiza* no fim de R2 (95 a 105 dias) e no fim de R3 (125 a 135 dias). Para as *Lemnas*, os calos encontravam-se no início de R2 (120 a 130 dias) e no meio de R6 (250 a 260 dias).

3) O experimento utilizou os tratamentos MR1, MR2 e MR9, com calos do genótipo 7498 de *S. polyrhiza* no fim de R2 (95 a 105 dias), no início de R4 (135 a 145 dias) e no início de R5 (165 a 175 dias). Para *Lemnas*, no genótipo 8627 foram utilizados calos no meio de R4 (190 a 200 dias); e no genótipo DWC124, calos no fim de R3 (170 a 180 dias) e no meio de R4 (190 a 200 dias).

4) O experimento foi realizado apenas nos tratamentos MR1 e MR2 com calos do genótipo 7498 de *S. polyrhiza* no início de R3 (105 a 115 dias), e com calos dos dois genótipos de *Lemna* no fim de R2 (140 a 150 dias).

5) O experimento foi realizado nos tratamrntos MR1 e MR2 com calos das *Lemnas* em fim de R2 (90 a 100 dias) no claro e em fim de R2 no escuro.

4.4. Teste de crescimento de plantas em diferentes antibióticos

Foram realizados testes para se avaliar o desenvolvimento e a multiplicação das lentilhas d'água em diferentes antibióticos. Os antibióticos testados foram: estreptomicina, canamicina, geneticina, espectinomicina, tetraciclina, tobramicina e timentin, em diversas concentrações.

Para cada genótipo, os experimentos foram montados em triplicata para cada tratamento incluindo o controle (apenas meios MS diluído, sem adição de antibiótico).

As placas de Petri com as plantas nos diferentes tratamentos foram dispostas em prateleiras no laboratório de cultura de tecidos, em condição de luz (figura 6).

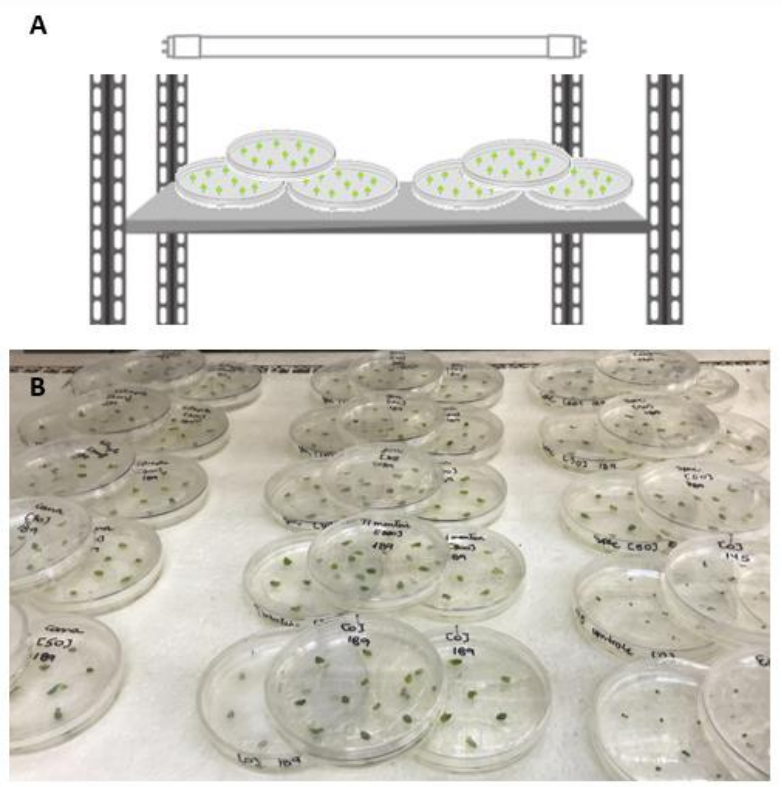


Figura 6. Experimentos de resistência a antibióticos. A) esquema da disposição das placas em prateleiras na sala de cultura de tecidos. B) foto ilustrando a disposição das placas com plantas em diferentes concentrações de antibióticos, em prateleiras iluminadas.

As concentrações testadas variaram de 10 $mg.L^{-1}$ a 500 $mg.L^{-1}$ dependendo do antibiótico (tabela 4). A partir da avaliação do primeiro experimento, os demais experimentos foram realizados apenas para alguns antibióticos por genótipo para se confirmar em quais desses antibióticos e concentrações as plantas seriam capazes de sobreviver e se desenvolverem, a fim de se determinar uma concentração ideal para seleção (entre 40-60% de sobrevivência) em experimentos de transformação para cada um dos genótipos.

Tabela 4. Concentrações dos antibióticos testadas nos genótipos 8627, DWC124 de *Lemna minor* e 7498 de *S. polyrhiza*

	***L. minor* 8627**	***L. minor* DWC124**	***S. polyrhiza* 7498**
Estreptomicina	30, 50, 100, 200, 300 e 500 $mg.L^{-1}$	30, 50, 100, 200, 300 e 500 $mg.L^{-1}$	30, 50, 100, 200, 300 e 500 $mg.L^{-1}$
Geneticina	10, 20, 30, 50, 100, 300 e 500 $mg.L^{-1}$	10, 20, 30, 50, 100, 300 e 500 $mg.L^{-1}$	10, 20, 30, 50, 100, 300 e 500 $mg.L^{-1}$
Espectinomicina	10, 20, 30, 50, 100, 300 e 500 $mg.L^{-1}$	10, 20, 30, 50, 100, 300 e 500 $mg.L^{-1}$	10, 20, 30, 50, 100, 300 e 500 $mg.L^{-1}$
Canamicina	10, 20, 30, 50, 100, 300 e 500 $mg.L^{-1}$	10, 20, 30, 50, 100, 300 e 500 $mg.L^{-1}$	10, 20, 30, 50, 100, 300 e 500 $mg.L^{-1}$
Tetraciclina	30, 50, 100, 300 e 500 $mg.L^{-1}$	30, 50, 100, 300 e 500 $mg.L^{-1}$	30, 50, 100, 300 e 500 $mg.L^{-1}$
Tobramicina	30, 50, 100, 300 e 500 $mg.L^{-1}$	30, 50, 100, 300 e 500 $mg.L^{-1}$	30, 50, 100, 300 e 500 $mg.L^{-1}$
Timentin	300 $mg.L^{-1}$	300 $mg.L^{-1}$	300 $mg.L^{-1}$

Foram colocadas 20 plantas de *L. minor* e 10 de *S. polyrhiza* por placa de Petri, separadamente em triplicata por tratamento no primeiro experimento, e, a partir do segundo experimento, foram colocadas 10 plantas de cada genótipo por placa, também em triplicata por tratamento. A avaliação baseou-se na observação do desenvolvimento das plantas nos diferentes tratamentos, onde foram contados os números de plantas que se mantiveram vivas e foram capazes de se multiplicar em até 30 dias.

4.5. Teste de regeneração de plantas a partir de calos em meios de cultura com diferentes antibióticos

Para se testar a eficiência de regeneração de plantas a partir de calos em tratamentos com adição de antibióticos, foram selecionadas algumas concentrações de determinados antibióticos com base nos experimentos de crescimento das plantas nos antibióticos (item 4.4).

Foram feitos dois experimentos. No primeiro (teste 1), foram utilizados meios de regeneração do tratamento MR2 (MS diluído com adição de 0,2 $mg.L^{-1}$ de BAP) com adição de a) 200 $mg.L^{-1}$ de estreptomicina, b) 30 $mg.L^{-1}$ de canamicina, e c) 50 $mg.L^{-1}$ de espectinomicina, separadamente, além do tratamento controle (apenas o MR2 sem adição de antibiótico). Este teste foi realizado em cinco repetiçoes e cada uma delas ocorreu em triplicata utilizando 10 calos por placa. Foram testados calos em diferentes fases do subcultivo: dos genótipos 8627 e DWC124 de *L. minor* no meio de R2 (130 a 140 dias) e no fim de R2 (140 a 150 dias), início de R3 (150 a 160 dias), no meio de R3 (160 a 170 dias) e no início de R5 (210 a 220 dias). Os calos de *S. polyrhiza* testados se encontravam no meio de R2 (85 a 95 dias), no fim de R2 (95 a 105 dias), no início de R3 (105 a 115 dias) e no início de R5 (165 a 175 dias).

O segundo experimento (teste 2) foi realizado apenas para o genótipo 8627 de *Lemna minor* em meio MR2 com adição de a) 300 mg.L^{-1} de timentin, b) 30 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin e, c) 50 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin, além do controle (apenas o MR2 sem adição de antibiótico). Estes experimentos foram realizados em três repetições. Cada repetição consistiu em cinco placas com 10 calos por placa por tratamento. Os calos utilizados neste experimento se encontravam no fim de R2 (140 a 150 dias), no início de R3 (150 a 160 dias) e no meio de R3 (160 a 170 dias).

Os experimentos foram conduzidos na condição de luz. As avaliações, baseadas na contagem de quantos calos foram capazes de regenerar novas frondes, foram feitas semanalmente até o total de 40 dias. Os calos testados vieram de indução no escuro.

As plantas regeneradas do teste 1 foram isoladas e transferidas para o mesmo meio de cultura (MR2) sem antibiótico e as plants regeneradas do teste 2 foram transferidas para o mesmo meio de cultura na presença dos mesmos antibióticos. A análise de sobrevivência se deu da mesma maneira que nos experimentos de regeneração de plantas.

4.6. Transformação genética

Calos do genótipo 8627 de *Lemna minor* no fim do subcultivo R2 (com cerca de 140 a 150 dias a partir da indução) foram utilizados para experimentos de transformação genética com o vetor pCAMBIA2301 via *Agrobacterium tumefacien* estirpe EHA 105.

O vetor pCAMBIA2301 contém o gene neomicina fosfotransferase II (*nptII*), que confere resistência a canamicina, e o gene *uidA* que codifica a enzima β-glucuronidase definida como gene reporter GUS (figura 7).

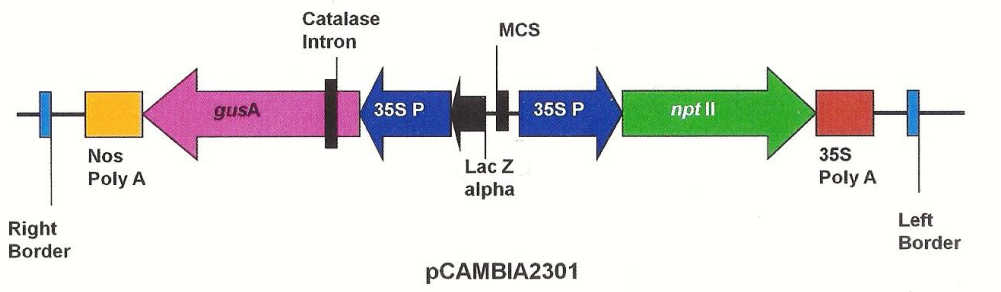


Figura 7. Representação esquemática do plasmídeo pCAMBIA 2301 com o gene *nptII* de resistência a canamicina e o gene repórter GUS, sob controle do promotor CaMV35S.

Placas de Petri contendo meio LB (anexo A) com 50 mg.L^{-1} de canamicina e 50 mg.L^{-1} de rifampicina foram riscadas com a bactéria contendo o vetor que estavam mantidas em estoque em glicerol no freezer -80^{o}C. As placas com a bactéria foram colocadas para crescer a 28 ^{o}C por três dias.

Após o crescimento da bactéria, colônias isoladas foram coletadas e cultivadas Erlenmeyers contendo 5 mL de meio LB líquido com 50 mg.L^{-1} de canamiciana e 50 mg.L^{-1} de rifampicina por mais 24 horas em agitador a 200 rpm e 28 °C no escuro (pré-inóculo 1).

Após o crescimento da bactéria em meio líquido, 100 µL da suspenção bacteriana (pré-inóculo 1) foram coletados e transferidos para Erlenmeyers contendo 40 mL de meio LB líquido com 50 mg.L^{-1} de canamiciana e 50

mg.L^{-1} de rifampicina. A suspensão foi mantida em agitador a 28 ˚C e 200 rpm por 16 horas – "overnight" (pré-inóculo 2), até atingir uma densidade óptica (OD 600) entre 0,6 e 0,8.

A suspensão foi então vertida dos Erlenmeyers em tubos Falcon de 50 mL e então centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante (meio LB) foi descartado e o precipitado (pellet bacteriano) foi diluído em meio MS x 0,5 líquido. Foi então aferida a OD 600 para 0,5 e adicionado 100μM de acetoceringona à suspensão, que descansou por 10 minutos.

Logo em seguida, 4 mL da suspensão foram distribuídos em placas de Petri contendo os calos (25 calos por placa) induzidos em meio de tratamento T14. Os calos ficaram em contato com a suspensão por 30 minutos sob agitação de 40 rpm a 28 °C e em seguida, a suspensão foi retirada com pipeta e o excesso de suspensão na placa foi retirado com papel filtro autoclavado.

As placas foram mantidas em co-cultivo por 2 dias no escuro a 28 °C e após este período, os calos foram transferidos para os meios de seleção (MS diluído com 0,2 mg.L^{-1} de BAP e adição dos antibióticos: 30 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin). Foram colocados 12 calos por placa, e as mesmas foram mantidas em prateleiras iluminadas.

4.6.1. Confirmação da transgenia

4.6.1.1. Em calos

Decorridos doze dias da transformação, os calos transformados foram coletados para realização do teste histoquímico do GUS (JEFFERSON, 1987). Os calos foram colocados em microtubos de 1,5 mL, foi adicionado cerca de 100 a 200 μL de X-Gluc em cada um deles, ou até cobri-los por completo. Os calos ficaram em contato com a solução por 16 horas a 37 °C em ausência de luz. Após este período, o X-gluc foi removido e os calos foram lavados com álcool 70% a fim de facilitar a visualização da cor azul no tecido.

4.6.1.2. Em frondes regeneradas

Após 25 dias da transformação genética, quando as frondes regeneradas atingiram o tamanho de folhas adultas, essas foram coletadas e transferidas para meios de seleção novos (MS diluído com 0,2 mg.L^{-1} de BAP e adição dos antibióticos: 30 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin) e separadas por evento. Cada calo foi considerado um evento e se um mesmo calo promoveu a regeneração de folhas em regiões diferentes, cada uma foi separada e avaliada separadamente para evitar quimeras.

Após 15 dias, quando as frondes gerram duas ou três frondes filhas, uma delas foi coletada para o teste histoquímico do GUS (JEFFERSON, 1987), que foi realizado da mesma maneira que nos calos.

Quando se obteve resultado positivo, o evento (colônia de frondes) foi transferido para meios de seleção com aumento da concentração de canamicina (MS diluído com 0,2 mg.L^{-1} de BAP e adição dos antibióticos: 50 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin) para passar por uma segunda seleção. As frondes sobreviventes foram coletadas para se realizar a extração de DNA e realização de PCR para se confirmação da transgenia.

A extração de DNA das plantas se deu pelo método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990) e a análise de PCR (reação em cadeia da polimerase) foi realizada com iniciadores para identificar a inserção do gene *nptII* sob regulação

do promotor 35S presente no vetor pCAMBIA2301, e também fez-se um PCR com iniciadores da região *Vir*G da bactéria para corfirmar se a presença do gene *nptII* não seria pela presença da Agrobactéria nas plantas obtidas. Foram utilizados dois pares de iniciadores (*primers*) específicos para cada cada um dos genes (tabela 5).

Tabela 5. Iniciadores (primers) utilizados nas reações de PCR, do gene *nptII*, do promotor 35S e da região *Vir*G.

Gene	Primer	Sequência
35S	Forward	5' CGC ACA ATC CCA CTA TCC TTC 3'
nptII	Reverse	5' TCG ACA AGA CCG GCT TCC ATC 3'
Região *Vir*G	Forward	5' CTG GCG GCA AAG TCT GAT 3'
	Reverse	5' TGT CGT AAA CCT CCT CGT 3'

Para amplificação do gene *nptII* e o promotor 35S o termociclador (Applied Biosystems GeneAmp 9700 PCR System) foi ajustado para realizar um ciclo de desnaturação a 94 °C por cinco minutos, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por um minuto e 72 °C por dois minutos, seguidos de um ciclo final de 72 °C por dez minutos. Para a amplificação do gene *VirG* utilizou-se os parâmetros de desnaturação a 96 °C por dois minutos seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 52 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, seguidos de um ciclo final de 72 °C por cinco minutos.

Após as PCRs, os produtos obtidos foram avaliados em gel de eletroforese (tampão TAE 1x com 1% de agarose) corado com brometo de etídeo em uma voltagem de 80 V por 45 minutos. A visualização dos géis se deu no fotodocumentador *Molecular* Imager® ChemiDoc™ XRS+ with ImageLab™ Software (BIORAD). Para cada reação foi utilizado um controle positivo, que consistiu de DNA da bactéria contendo o vetor pCAMBIA2301, e dois controles negativos, um para as amostras vegetais e outro para a reação, sendo estes a planta não transformada e água, respectivamente.

4.7. Análise estatística

Para os experimentos de indução de calos os dados foram analisados usando o software R versão 4.0.2 (R Core Team, 2020), os gráficos da análise estatística foram realizados com a função ggplot do pacote "ggplot2" (Wickham, 2016). O modelo de regressão comumente utilizado para modelar dados de proporção é o binomial, sendo este caso particular de um modelo linear generalizado (McCullagh e Nelder, 1989). Para estes modelos, assumiu-se que cada indivíduo tem a mesma chance de responder ao tratamento e age de forma independente. No entanto, os dados de proporção se mostraram superdispersos no sentido de que exibiram mais variação do que a variabilidade especificada pelo modelo binomial (Hinde e Demétrio, 1998). A fim de acomodar a superdispersão, foi utilizado um modelo quase-binomial com a função de ligação logit (Demétrio, Hinde e Moral, 2014). O gráfico de probabilidade semi-normal com envelope simulado foi usado para verificar a adequação dos modelos ajustados, usando o pacote "hnp" (Moral, Hinde e Demétrio, 2017).

O teste F, neste caso, equivalente a um teste de razão de quasi-verossimilhança, foi aplicado aos modelos aninhados. Neste, valores de "p" menores que 0,05 demosntram que houve diferença estatística entre os tratamentos analisados e por isso rejeita-se a hipótese nula de nenhum efeito de tratamento, permitindo uma variabilidade adicional, enquanto valores de "p" maiores que 0,05 determinam que não houve diferença estatística entre os tratamentos, e

desta forma não se rejeita a hipótese nula de nenhum efeito de tratamento. O teste de Tukey (Tukey, 1949) também foi empregado para comparação de tratamentos.

Para os experimentos de regeneração de plantas na ausência ou na presença de antibióticos, a análise foi realizada a partir da média obtida em cada tratamento.

5. RESULTADOS

5.1. Indução de calos

5.1.1. Indução de calos no escuro

No experimento em que se foi testada a combinação dos reguladores 2,4-D e BAP, nos três genótipos (*S. polyrhiza*, *Lemna* 8627 e DWC124) não houve indução de calos em nenhuma das amostras foliares testadas em nenhum dos tratamentos.

Em contrapartida os tratamentos com adição de 2,4-D combinados com TDZ se mostraram eficientes para formação de calos a partir de plantas para os três genótipos testados.

No experimento 1, observou-se, nas plantas de *S. polyrhiza*, após 30 dias, o surgimento de calos na ponta das raízes das amostras de plantas inteiras ("i") e nas amostras com corte da fronde com gemas intactas ("f") nos tratamentos T6, T7, T8, T10, T11, T12, T14, T15 e T16. Nas raízes isoladas ("r") raramente pode-se notar a formação de calos. Como os calos aparecerem nas pontas das raízes das plantas, houve, em muitos casos, a formação de mais de um calo por planta, sendo assim, para a avaliação, considerou-se cada plantas que gerou um ou mais calos, como uma amostra positiva para indução (Figura 8). Para este genótipo, pode-se realizar a contagem do número de plantas que induziram calos, o que permitiu análise estatística.

Após 45 dias pode se notar o melhor desenvolvimento desses calos, os quais foram isolados das raízes das plantas e subcultivados nos mesmos meios de cultura dos respetivos tratamentos (em R1).

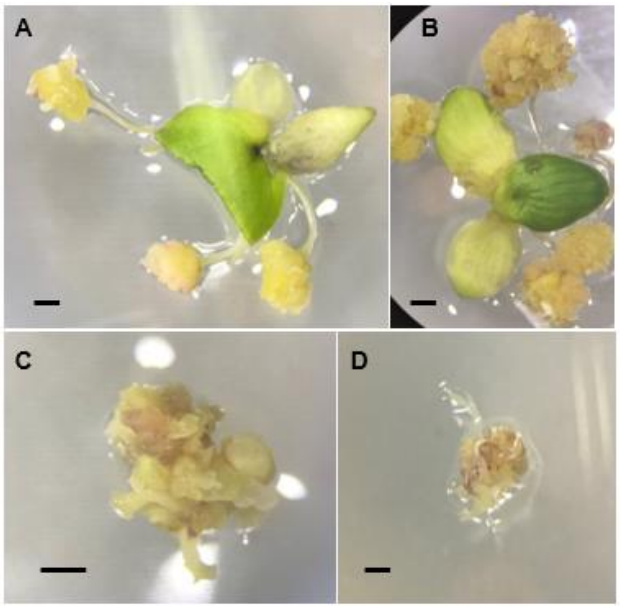


Figura 8. Calos do genótipo 7498 de *Spirodela polyrhiza* induzidos no escuro. A) calos formados em amostras do tipo "f"; B) calos formados em amostras do tipo "i"; C-D) calos isolados das plantas. (Barras = 1000μM).

Por meio do teste de Tukey, verificou-se que não houve diferenças significativas de indução entre os tratamentos empregados que possibilitaram a indução de calos (tratamentos T6, T7, T8, T10, T11, T12, T14, T15 e T16) (teste F=2,08 (p-valor = 0,06), que é pequeno quando comparado com $F_{0,95;8,44}$=2,15), na repetição 1 do

experimento (figura 9A), por isso não se rejeitou a hipótese nula de nenhum efeito de tratamento, permitindo uma variabilidade adicional. Já para a repetição 2, o teste de Tukey mostrou que o tratamento T10 apresentou a maior proporção de calos induzidos, em contrapartida, o tratamento T8 apresentou a menor proporção de calos induzidos (teste F=2,75 (p-valor = 0,01), que é maior eu F0,95;8,70=2,07) (figura 9B).

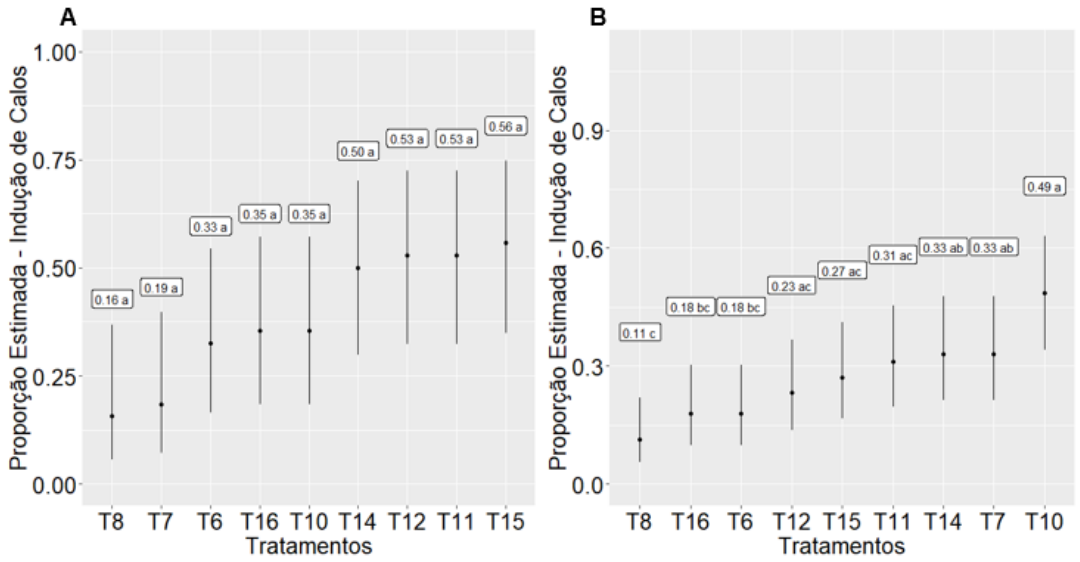


Figura 9. Proporção de calos induzidos do escuro de *S. polyrhiza* 7498 nos tratamentos com diferentes concentrações de 2,4-D e TDZ, ajustados com intervalos de confiança para os tratamentos. A) repetição 1; B) repetição 2. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si, e letras diferentes diferem entre si.

O teste F, considerou as amostras foliares e evidenciou um valor de 7,77 (p-valor = 0,007), que é grande quando comparado com $F_{0,95;1,52}$=2,13, e por isso rejeitou-se a hipótese nula de nenhum efeito de amostras foliares, permitindo uma variabilidade adicional. O teste de Tukey mostrou que na repetição 1 as amostras foliares "i" apresentam proporções superiores de calos induzidos em relação às amostras foliares "f" em *S. polyrhiza* (figura 10A) e houve uma taxa nula de indução em amostras "r" o que fez com que esta amostra fosse removida das análises estatísticas devido à falta de variabilidade. Já para a segunda repetição, pode se notar que as amostras foliares "i" apresentaram proporções superiores de calos induzidos em relação às amostras foliares "f", no entanto, não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre si, além de que, as amostras foliares "r" apresentaram as menores proporções de calos induzidos, diferindo das demais (teste F=27,84 (p-valor < 0,0001) que é grande quando comparado com $F_{0,95;2,78}$=3,11) (figura 10B).

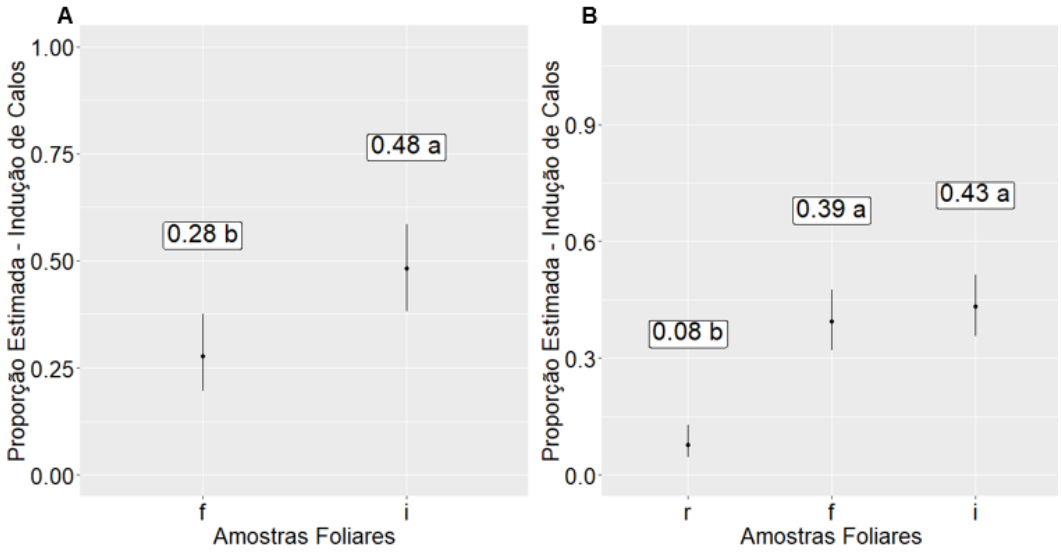


Figura 10. Proporção de calos induzidos em amostras do tipo "i" (inteiras) e do tipo "f" (corte da fronde com região das gemas laterais) ajustados com intervalos de confiança. A) repetição 1; B) repetição 2. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si, e letras diferentes diferem entre si.

Quanto aos genótipos de *Lemna minor* (8627 e DWC124), cerca de 90 dias (R0) após a indução em meio com 2,4-D e TDZ, também nos tratamentos T6, T7, T8, T10, T11, T12, T14, T15 e T16, pode se notar alguns aglomerados celulares diferenciados, porém, diferentes dos calos formados em *S. polyrhiza*, pois estes não se encontravam na ponta das raízes, mas sim em meio das folhas (figura 11A e B). A partir de análises feita em lupa, pode-se confirmar que estes aglomerados eram calos. Porém não foi possível fazer uma contagem do número de plantas que geraram calos, pois as plantas se desenvolveram e se espalharam pela placa de Petri, deste modo, ao final do experimento, avaliou-se quais dos tratamentos apresentaram a presença ou ausência de formação de calos.

Desta forma, houve a formação de calos a partir de amostras do tipo "i" e "f". Estes foram então isolados em meios de cultura novos em seus respectivos tratamentos, para que pudessem se desenvolver e crescer em tamanho (figura 11C e D).

Os calos de *S. polyrhiza* apresentaram tamanho aproximado de 3 a 5 mm após o período de R0, e uma coloração amarelada/acinzentada. Com as posteriores passagens para meios novos, estes aumentaram de tamanho e adquiriram aspecto friável (se desmanchavam ao toque). Já os calos dos genótipos das *Lemnas*, ao fim de R0, apresentavam tamanho bem reduzido, de aproximadamente 1 mm, coloração branca/transparente. No período de R1 aumentaram consideravelmente de tamanho, chegando a 3-4 mm sendo que os calos do genótipo 8627 apresentavam textura mais maleável e friável e coloração amarelada a creme, enquanto os calos do genótipo DWC124 apresentavam aspecto mais rígido e de coloração mais esbranquiçada.

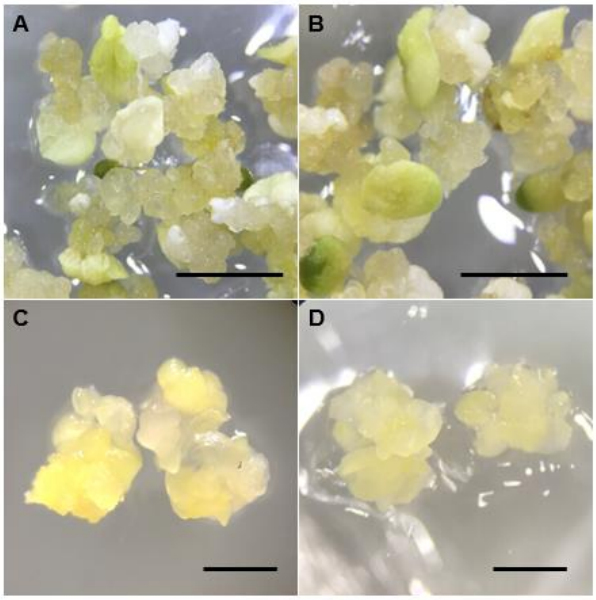


Figura 11. Calos induzidos no escuro dos genótipos de *Lemna nimor*. A) calos em meios as folhas de 8627 ao fim do período de R0; C) calos de 8627 isolados em meios de cultura; B) calos em meios as folhas do genótipo DWC124 ao fim do período de R0; D) calos do genótipo DWC124 isolados em meios de cultura. (Barras de a e b = 5mm; barras de c e d = 1000μM).

No experimento 2, no qual realizou-se a comparação das plantas de *S. polyrhiza*, com idade de duas e três semanas nos tratamentos T10, T11, T12, T14, T15 e T16 utilizando amostras de folhas inteiras ("i") e amostras de corte da região meristemática das gemas laterais ("f"), foi observado que as plantas com 2 semanas de idade foram mais eficientes na indução de calos. O teste F, considerando os tratamentos, evidenciou o valor de 2,31 (p-valor = 0,03), que é maior que $F_{0,95;5,87}$=1,54, e por isso rejeitou se a hipótese nula de nenhum efeito entre tratamentos. O teste de Tukey mostrou que o tratamento T10 apresentou a maior proporção de calos induzidos, em contrapartida, o tratamento T16 apresentou a menor proporção de calos induzidos (figura 12A).

Quanto aos tipos de amostras foliares, o teste F evidenciou o valor de 4,60 (p-valor = 0,03), que é grande quando comparado com $F_{0,95;1,92}$=3,94, e por isso rejeitou se a hipótese nula de nenhum efeito de amostras foliares. O teste de Tukey mostrou que amostras foliares "i" apresentaram proporções superiores de calos induzidos em relação às amostras foliares "f" (figura 12B). Quanto a idade das plantas, o teste F evidenciou um valor de 21,43 (p-valor < 0,0001), grande quando comparado com $F_{0,95;1,86}$=3,95, e o teste de Tukey mostrou que as plantas com duas semanas de idade apresentaram proporções superiores de calos induzidos em relação às plantas com três semanas de idade (figura 12C).

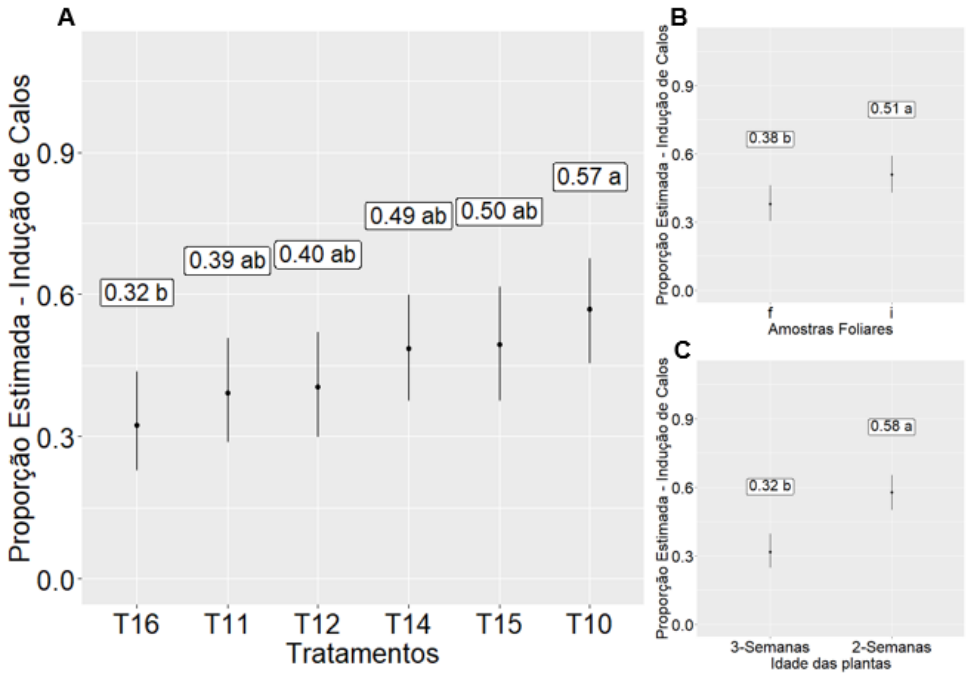


Figura 12. Proporção de indução de calos de *S. polyrhiza*. A) quanto aos tratamentos de indução testados; B) quanto ao tipo de amostra foliar; C) quanto a idade das plantas. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si, e letras diferentes diferem entre si.

As análises estatísticas demonstraram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos testados com as combinações de diferentes concentrações de 2,4-D e TDZ, desta forma, um novo experimento (experimento 3) foi realizado para testar os tratamentos T10 e T14 (os quais apresentam menores concentrações de 2,4-D quando comparados com os tratamentos T11, T12, T15 e T16) analisando-se o número de calos induzidos.

Referente ao experimento 3, estatisticamente, o teste F, considerando os tratamentos, evidenciou um valor de 1,49 (p-valor = 0,22), que é pequeno quando comparado com $F_{0,95;1,46}$=4,05, e por isso não rejeitou a hipótese nula de nenhum efeito de tratamento. O teste de Tukey demonstrou que os tratamentos T10 e T14 não diferem entre si quanto a capacidade de induzir calos (figura 13). A contagem de calos induzidos, porém, revelou que no tratamento T14 houve a formação de 6,43% calos a mais que no tratamento T10 (204 calos em T10 e 218 em T14, a partir de 240 calos testados).

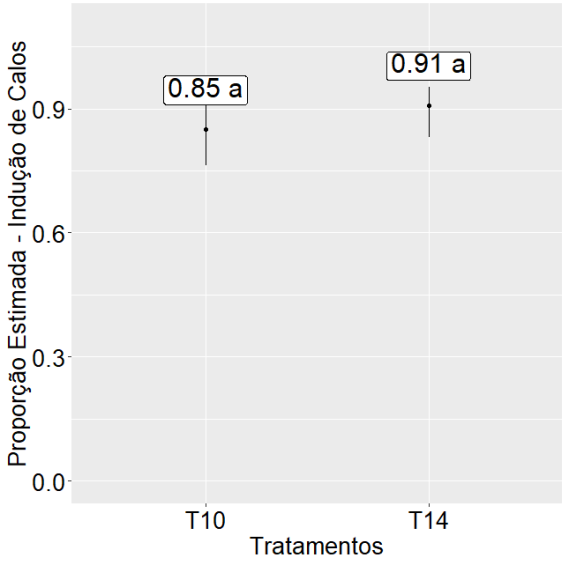


Figura 13. Proporção de indução de calos de *S. polyrhiza* em meios de indução dos tratamentos T10 e T14.

No experimento 4, para *S. polyrhiza*, removeram-se da análise estatística, os tratamentos "T1", "T2", "T3", "T4", "T5" e "T13" por falta de variabilidade (0% de indução). O teste F evidenciou um valor de 7,04 (p-valor = 0,0001), maior que o $F_{0,95;9,20}$=2,39. O teste de Tukey mostrou que o tratamento T14 apresentou a maior proporção de calos induzidos, em contrapartida, o tratamento T9, a menor (figura 14).

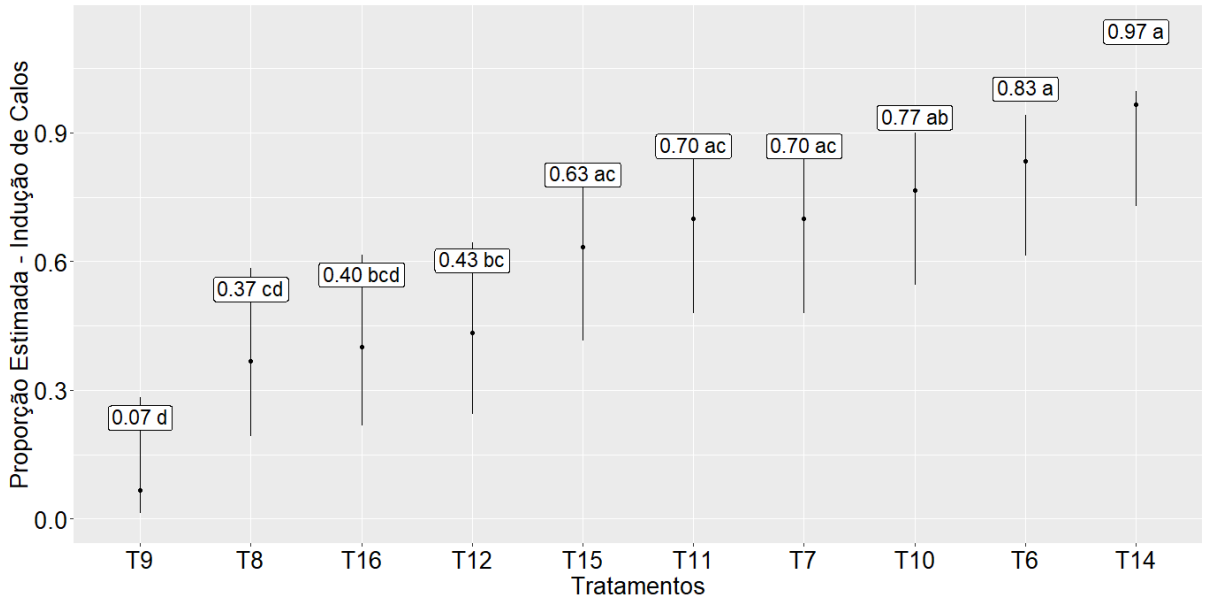


Figura 14. Indução de calos para o genótipo de *S. polyrhiza* no escuro em diferentes tratamentos com adição de 2,4-D e TDZ. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si, e letras diferentes diferem entre si.

Para os genótipos de *L. minor*, a avaliação, que se deu na observação de presença ou ausência de formação de calos, indicou que houve indução de calos nos tratamentos T6, T7, T8, T10, T11, T12, T14, T15 e T16 ao fim de R0 (após 90 dias da indução). O tratamento T14 foi o que apresentou maior quantidade de calos após o isolamento desses em R1, para os dois genótipos onde para cada uma placa com plantas, pode-se obter duas a duas placas e meia

de calos, enquanto nos demais tratamentos, a proporção de plantas induzidas e de placas com os calos isolados foi de um para um.

5.1.2. Indução de calos na presença de luz

Referente ao experimento 1, dos três genótipos testados nos 16 tratamentos, para *S. polyrhiza*, com cerca de 15 dias já se pode notar o surgimento de pequenos calos nas pontas das raízes, e após 30 dias (R0), esses calos, de coloração verde, foram isolados das plantas e transferidos para os mesmos tratamentos iniciando o subcultivo R1, no escuro. Com o passar do tempo, porém, esses calos foram perdendo sua coloração verde e começaram a oxidar. Na passagem para R2, a maioria dos calos já estavam completamente pretos e mortos e inviáveis para utilização nos posteriores testes de regeneração de plantas (figura 15).

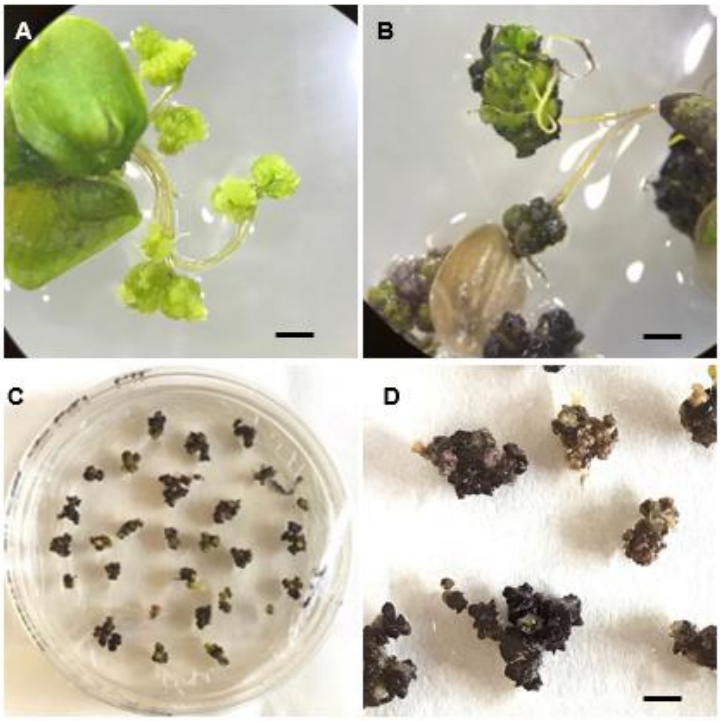


Figura 15. Calos de *Spirodela polyrhiza* induzidos no claro. A) após 15 dias de exposição a luz em R0; B) após 30 dias em R0, C) calos isolados ao fim de R1; D) detalhe dos calos oxidados isolados ao fim de R1. (Barras = 1000µM).

Os tratamentos T1, T5, T9, T13 e T14 foram removidos das análises estatísticas por falta de variabilidade, onde T1, T5, T9 e T13 apresentaram 0% de indução e o T14 100%. O teste F, considerando os tratamentos, evidenciou um valor de 20,29 (p-valor < 0,0001), maior que $F_{0,95;10,22}$=2,29, e o teste de Tukey mostrou que o tratamento T7 apresentou a maior proporção de calos induzidos, em contrapartida, o tratamento T4, a menor (figura 16).

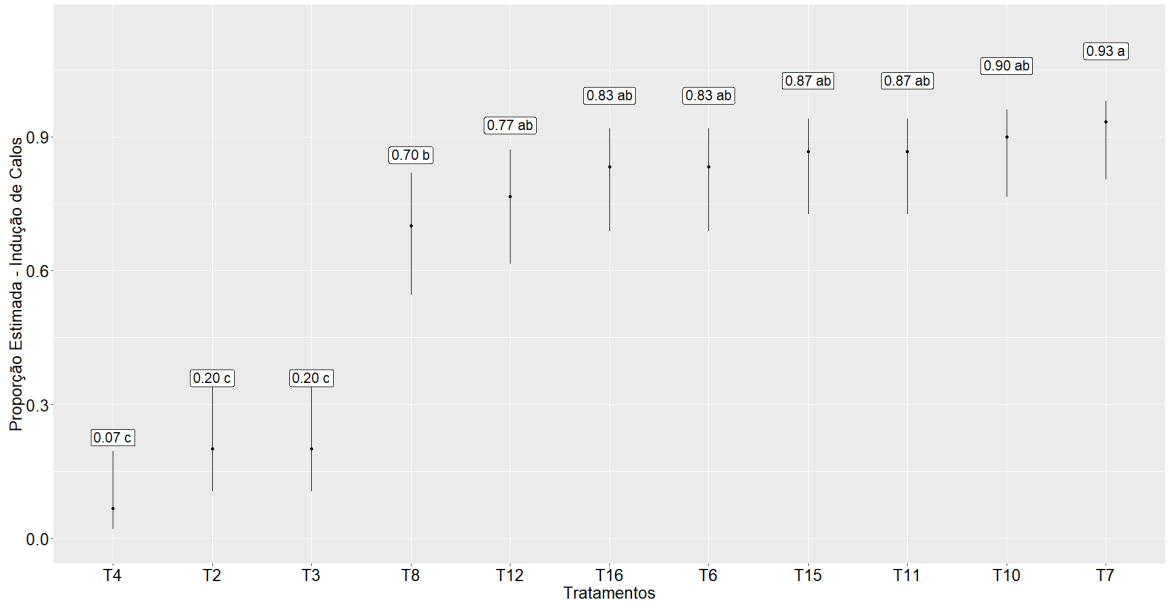


Figura 16. Indução de calos para o genótipo *S. polyrhiza* sob exposição a luz em diferentes tratamentos com adição de 2,4-D e TDZ. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si, e letras diferentes diferem entre si.

Para os dois genótipos de *Lemnas*, as folhas não induziram calos de imediato, e houve um entumecimento de suas folhas após cerca de 20 dias em exposição à luz. Esse entumecimento se caracteriza no aspecto globular, enrijecido e enrugado das folhas (figura 17A e B). Esse período inicial foi de 40 dias, denominado de R0. Essas folhas entumecidas foram então isoladas e subcultivadas em R1 tanto na condição de claro como na de escuro, e apenas ao fim deste período, ou seja, quase um mês depois do isolamento das folhas entumecidas em seus respectivos meios de cultura novos, é que se pode notar a ocorrência de indução de calos nos tratamentos T6, T7, T8, T10, T11, T12, T14, T15 e T16 (figura 17C e D). Parte das frondes entumecidas, porém, foram perdendo coloração e morreram sem induzir calos.

Os calos induzidos em R1 no escuro, apresentaram aparência similar aos induzidos em R0 no escuro: pequenos calos de coloração esbranquiçada. Já os induzidos ao fim de R1 na presença de luz, apresentaram coloração verde e aumento de tamanho (3-4 mm).

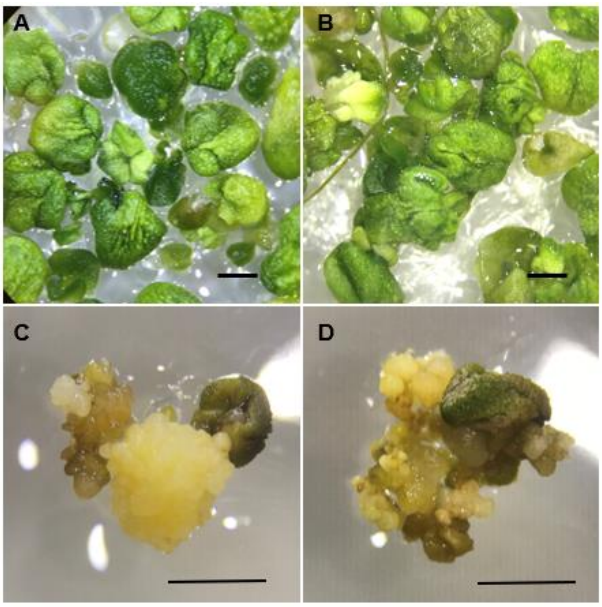


Figura 17. Folhas entumecidas de *Lemnas minor* após exposição a luz no período de indução (R0). A) folhas do genótipo 8627; B) folhas do genótipo DWC124; C) calos induzidos em R1 no escuro de 8627; D) calos induzidos em R1 no escuro de DWC124. (Barras = 1000μM).

Esses calos induzidos ao fim de R1 foram então isolados das plantas entumecidas e transferidos para R2, tanto na ausência como na presença de luz (figura 18) onde apresentaram desenvolvimento e crescimento normal (aumento de tamanho e divisão celular), se mostrando aptos para uso em testes de regeneração.

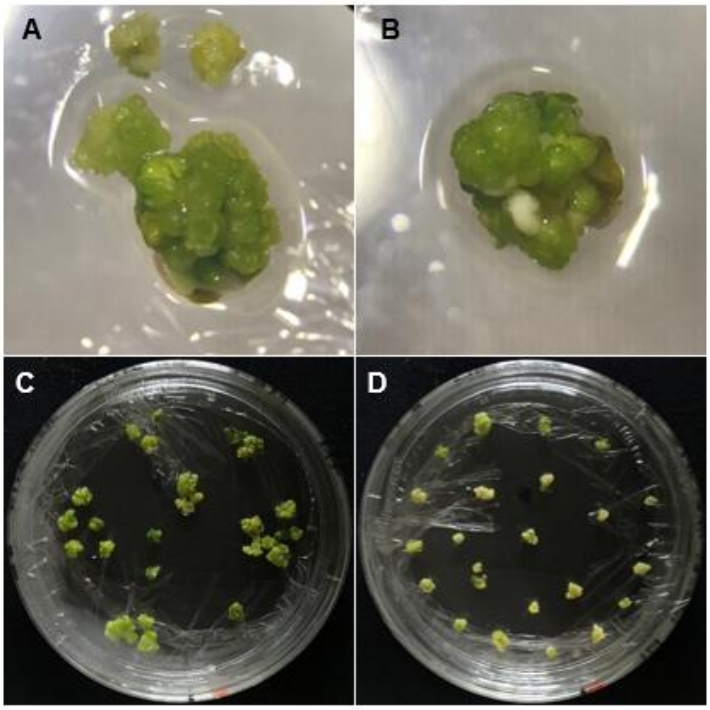


Figura 18. Aspecto dos calos dos genótipos de *Lemna minor* induzidos no claro. A) calo de 8627 isolado após indução em R1 na luz; B) calo de DWC124 isolado após indução em R1 na luz. C) desenvolvimento de calos de 8627 em R2 sob incidência luminosa D) desenvolvimento de calos de 8627 em R2 armazenados no escuro. (Barras = 1000μM).

Para o experimento 2, com plantas inoculadas em tratamento T14, foi avaliada a indução de calos ao fim de R0 para o genótipo de *S. polyrhiza* e ao fim de R1 para os genótipos das *Lemnas*, o teste F, considerando os genótipos em seus períodos, evidenciou um valor de 21,87 (p-valor < 0,0001) (maior que $F_{0,95;2,12}$=3,88) e a partir do teste de Tukey pôde-se observar que o genótipo de *S. polyrhiza* ao fim do período de R0 apresentou a maior proporção de calos induzidos, em contrapartida, o genótipo DWC124 de *L. minor*, ao fim do período de R1 no claro apresentou a menor proporção de calos induzidos (figura 19).

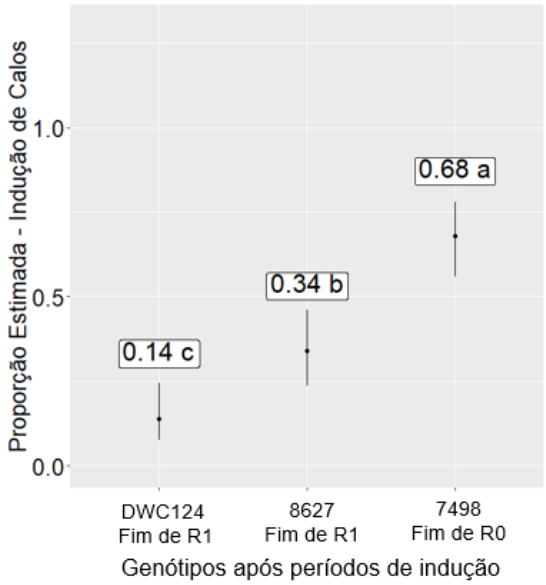


Figura 19. Proporção de calos induzidos na presença de luz ajustados com intervalos de confiança para os três genótipos após os respectivos períodos de indução de calos, fim de R0 para o genótipo 7498 de *S. polyrhiza*, e fim de R1 para os genótipos 8627 e DWC124 de *L. minor*. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si, e letras diferentes diferem entre si.

Como os calos de *S. polyrhiza* induzidos no claro se oxidaram ao fim do período de R0, estipulado em 30 dias, foi realizado um teste (experimento 3) de períodos de exposição a luz mais curtos de 10, 15 e 20 dias no claro no tratamento T14 para os três genótipos, e após esse período as plantas com os primórdios de calos (*S. polyrhiza*) ou entumecidas (*L. minor*) foram armazenadas em escuro para desenvolvimento.

Para *S. polyrhiza*, teste F, considerando o fator que contém os dias no claro e no escuro, evidenciou um valor de 0,67 (p-valor = 0,57), pequeno quando comparado com $F_{0,95;3,35}$=2,87, e por isso não rejeitou se a hipótese nula de efeitos. Assim, o teste de Tukey mostrou que os diferentes períodos de exposição a luz (10, 15 ou 20 dias) ou ausência de fonte luminosa, não diferem entre si (figura 20). Assim, a prolongação ou redução do tempo de exposição à luz não interferiu na formação de calos.

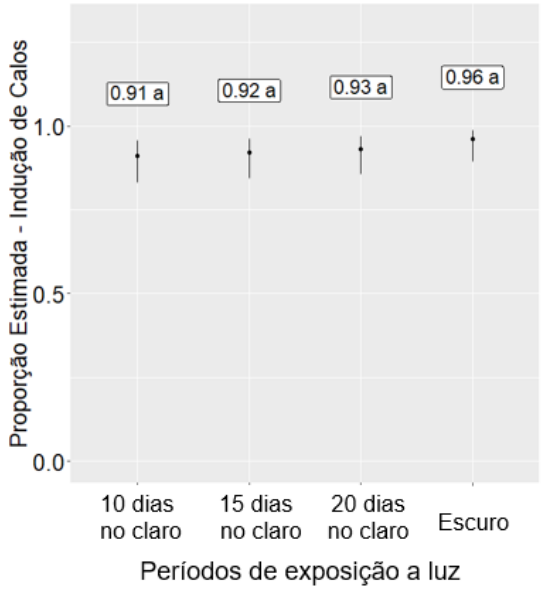


Figura 20. Proporção de calos induzidos de *S. polyrhiza* sob diferentes exposições luminosas: 10, 15 ou 20 dias no claro (e posterior privação de luz) e escuro, ajustados com intervalos de confiança. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si, e letras diferentes diferem entre si.

Os calos de *S. polyrhiza* induzidos em 20 dias no claro, oxidaram mais rapidamente e após um mês em R1, os calos que não oxidaram foram transferidos para R2, porém todos eles, inclusive os expostos a apenas 10 dias à luz, sofreram fortes oxidações nesse período e se tornaram inviáveis ao fim de R2.

No caso dos genótipos de *Lemnas*, as plantas entumecidas nesses períodos mais curtos de exposição a luz (10, 15 e 20 dias), também foram transferidas para R1 após completarem o tempo de R0 no escuro. A avaliação baseada na presença ou ausência de formação de calos ao fim do período de R1, demonstrou que, assim como no caso de *S. polyrhiza*, não se pode notar diferença na indução de calos nos diferentes períodos de exposição luminosa, e houve em todos os tratamentos, a formação de calos ao fim deste período. Esses se desenvolveram normalmente após isolados no subcultivo R2.

No experimento 4, o teste de indução de calos no claro realizado apenas com o genótipo DWC124 em diferentes tratamentos (T6, T7, T8, T10, T11, T12, T14, T15 e T16), devido ao fato deste genótipo ter apresentado as taxas mais baixas de indução quando comparado ao outro genótipo de *Lemna*. Neste experimento, obteve-se indução de calos em todos os tratamentos testados, com exceção do tratamento 8 (1 $mg.L^{-1}$ de 2,4-D e 0,25 $mg.L^{-1}$ de TDZ).

A partir do teste F, que evidenciou o valor de 7,75 (p-valor = 0,0003), maior que $F_{0,95;7,16}$=2,65, observou se, com o teste de Tukey, que o tratamento T11 apresentou a maior proporção de calos induzidos neste genótipo sob exposição luminosa, em contrapartida, o tratamento T14 apresentou a menor quantidade de calos induzidos nesta mesma condição de luz (figura 21).

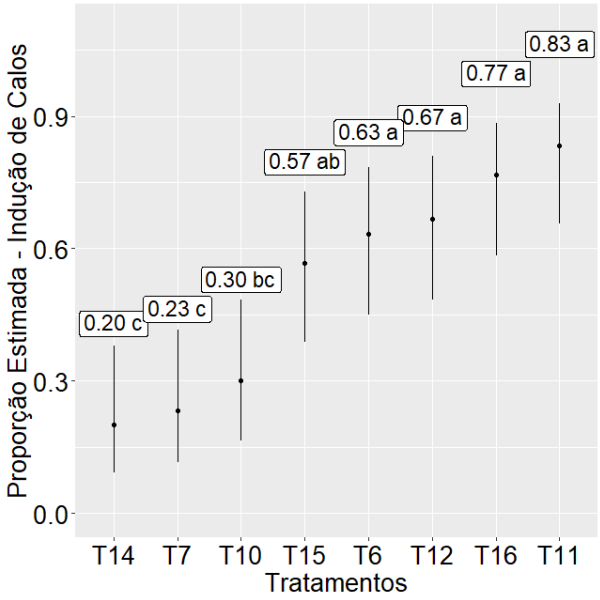


Figura 21. Proporção de calos induzidos do genótipo DWC124 de *L. minor* sob incidência luminosa ajustados com intervalos de confiança para os tratamentos. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si, e letras diferentes diferem entre si.

Os gráficos semi-normais de probabilidades com envelope simulado do modelo quasi-binomial para os experimentos de indução, apresentaram todos os pontos completamente dentro do envelope simulado, indicando a adequação do modelo (Apêndice A)

5.2. Regeneração de plantas

5.2.1. Regeneração de pantas a partir de calos induzidos no escuro

A combinação dos reguladores de crescimento BAP e ANA se mostrou eficaz na regeneração de plantas. A avaliação se deu em observação de presença ou ausência de formação de frondes nos calos.

As folhas regeneradas a partir dos calos não mostraram alteração morfológica quando comparadas com as plantas originais. A figura 22 mostra os calos regenerando frondes dos três genótipos.

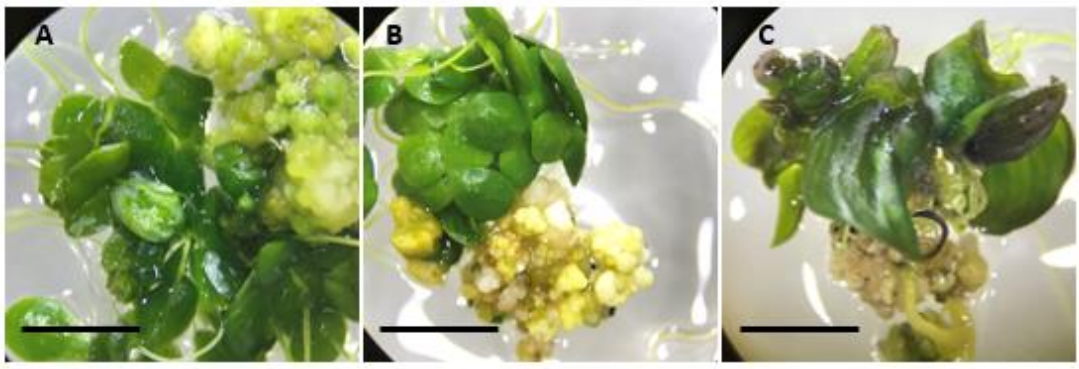


Figura 22. Plantas regenerando a partir de calos em tratamento MR2. A) do genótipo 8627 de *L. minor*; B) do genótipo DWC124 de *L. minor*; C) do genótipo 7498 de *S. polyrhiza*. (Barras = 5000µM).

No primeiro experimento, onde foram testados os 12 tratamentos com a combinação dos reguladores BAP e ANA, obteve-se para o genótipo de 8627 de *L. minor*, com calos no fim do subcultivo R3 (com 170 a 180 dias da indução) a maior taxa de regeneração (cerca de 60 %) de regeneração nos tratamentos MR1 (MS diluído sem adição de regulador), MR3 (adição de 0,5 mg.L^{-1} de BAP), MR6 (adição de 0,2 mg.L^{-1} de BAP e de 0,1 mg.L^{-1} de ANA), MR7 (adição de 0,5 mg.L^{-1} de BAP e 0,1 mg.L^{-1} de ANA) e MR9 (adição de 0,2 mg.L^{-1} de ANA). Para calos de *L. minor* DWC124 tambem ao fim de R3, as melhores taxas de regeneração (48%) se deram nos tratamento MR2 (adição de 0,2 mg.L^{-1} de BAP) e MR9 (adição de 0,2 mg.L^{-1} de ANA). Para *S. polyrhiza* 7498, a maior eficiência de regeneração (44%) se deu no tratamento MR2 tanto para calos no início do subcultivo R1 (com 45 a 55 dias) quanto para calos no fim de R4 (com 155 a 165 dias). As porcentagens de regeneração para cada uma das idades testadas em cada tratamento estão representadas na tabela da figura 23.

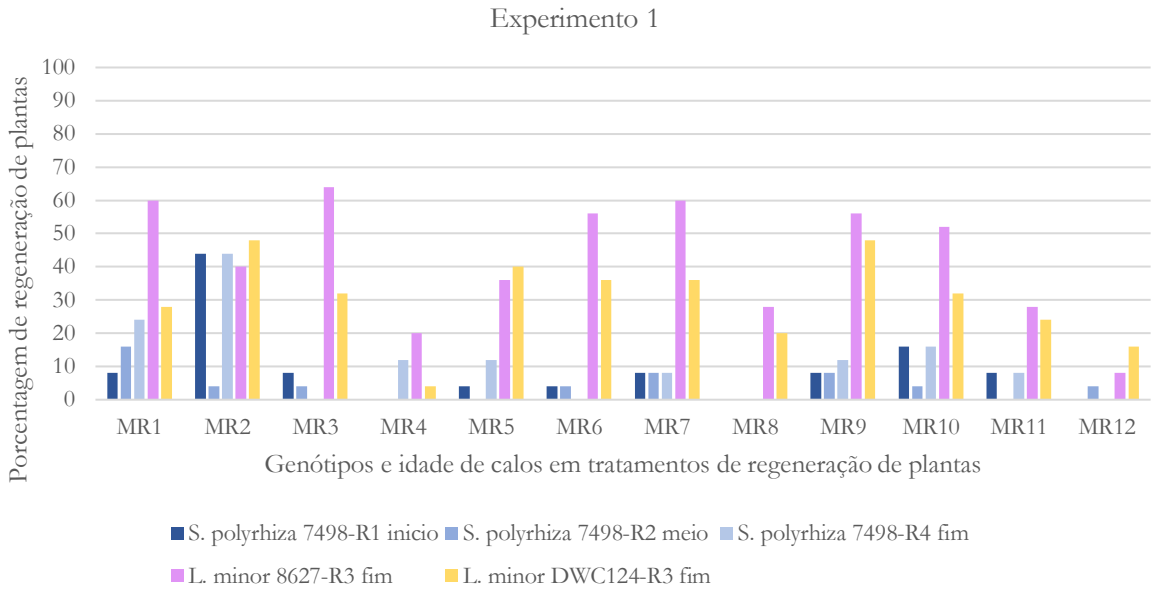


Figura 23. Resultados do experimento 1 de regeneração em diferentes tratamentos com adição de BAP e ANA (MR1 a MR12), considerando as diferentes idades de calos testados para cada um dos três genótipos: *Lemna minor* 8627 e *Lemna minor* DWC124 e *Spirodela polyrhiza* 7498.

No segundo e terceiro experimento, apenas os tratamentos que mostraram maior número de calos regenerados foram utilizados, MR1 (MS diluído sem adição de regulador vegetal), MR2 (MS diluído com adição de 0,2 mg.L^{-1} de BAP), e MR9 (1/2 MS com adição de 0,2 mg.L^{-1} de ANA).

No segundo experimento, calos de *L. minor* 8627 e de *L. minor* DWC124 apresentaram maiores porcentagens de regeneração no início do subcultivo R2 (com 120 a 130 dias), 88% e 74% respectivamente no tratamento MR1 (MS diluído sem regulador vegetal). Calos de *Spirodela* apresentaram menor eficiência de regeneração nas diferentes idades e nos três tratamentos testados, sendo que a máxima taxa de regeneração foi de 28 % para calos no fim de R2 (com 95 a 105 dias) (figura 24).

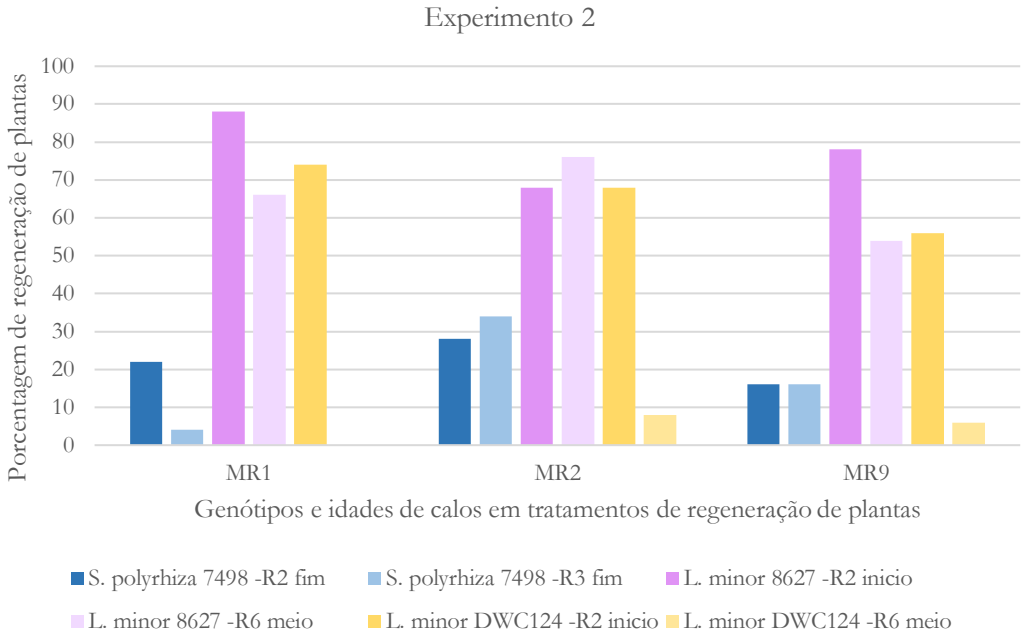


Figura 24. Resultados do experimento 2 de regeneração de plantas em diferentes tratamentos com adição de BAP e ANA (MR1, MR2 e MR9), considerando as diferentes idades de calos testados para cada um dos três genótipos: *Lemna minor* 8627 e *Lemna minor* DWC124 e *Spirodela polyrhiza* 7498.

No terceiro experimento, *L. minor* 8627 apresentou a melhor taxa de regeneração foi (70%) obtida a partir de calos no meio do subcultivo R4 (com 190 a 200 dias da indução) no tratamento MR1. *L. minor* DWC124 apresentou a melhor taxa de regeneração (38%) em calos no fim de R3 (com 170 a 180 dias) no tratamento MR2 (adição de 0,2 mg.L^{-1} de BAP). Enquanto *S. polyrhiza* apresentou 22% de regeneração tanto para calos no início de R4 (com 135 a 145 dias) no tratamento MR2 quanto para calos no fim de R2 (com 95 a 105 dias) em tratamento MR9 (com adição de 0,2 mg.L^{-1} de ANA) (figura 25).

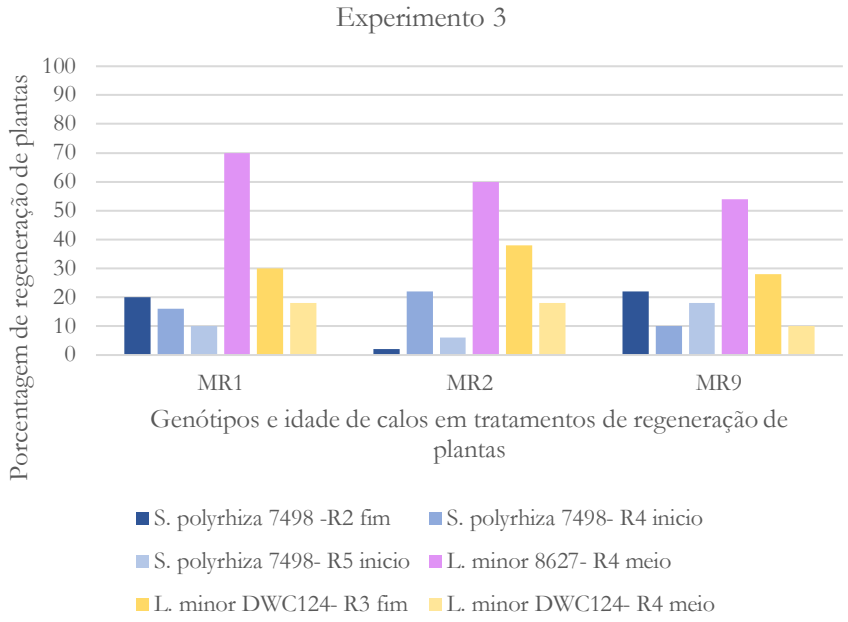


Figura 25. Resultados do experimento 3 de regeneração em diferentes tratamentos com adição de BAP e ANA (MR1, MR2 e MR3), considerando as diferentes idades de calos testados para cada um dos três genótipos *Lemna minor* 8627 e *Lemna minor* DWC124 e *Spirodela polyrhiza* 7498.

No quarto experimento foram testados somente os tratamentos MR1 e MR2. Calos de *L. minor* 8627 e de *L. minor* DWC124 no fim de R2 (com 140 a 150 dias) apresentaram as maiores taxas de regeneração de 88% e 30% respectivamente no tratamento MR2. Já *S. polyrhiza* apresentou apenas 10% de regeneração dos calos testados no início do subcultivo R3 (com 105 a 115 dias) no tratamento MR1 (figura 26).

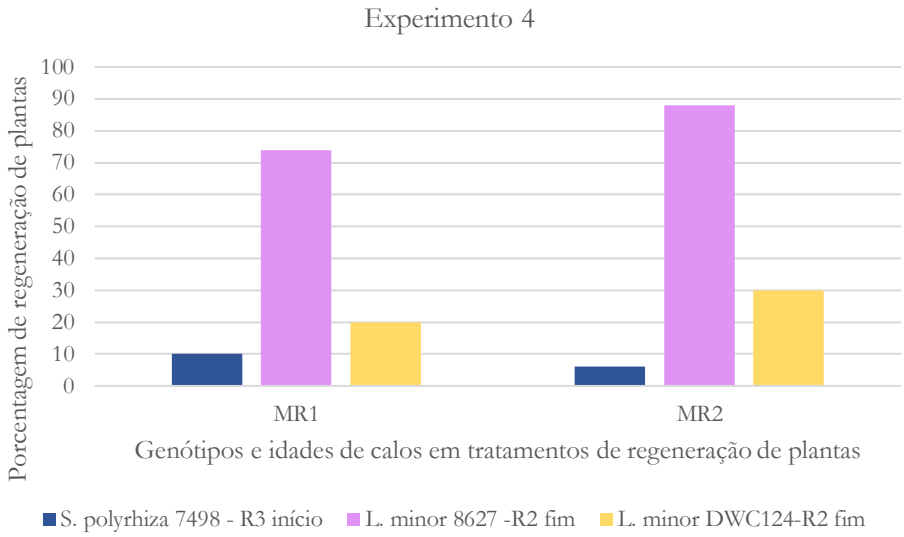


Figura 26. Resultados do experimento 4 de regeneração em diferentes tratamentos com adição de BAP e ANA (MR1 e MR2), considerando as diferentes idades de calos testados para cada um dos três genótipos: *Lemna minor* 8627 e *Lemna minor* DWC124 e *Spirodela polyrhiza* 7498.

Nos experimentos de regeneração de plantas a partir de calos induzidos no escuro (1, 2, 3 e 4), foram testados 1750 calos de *S. polyrhiza* e foi obtida a regeneração de 211 deles (12%). Para o genótipo *L. minor* 8627, do total de 850 calos testados, obteve-se a regeneração de 518 (61%) e para o genótipo *L. minor* DWC124 do total de 1000 calos testados, obteve-se a regeneração de 293 (29%). A tabela 6 mostra a quantidade de calos que regeneraram plantas nas diferentes idades para os três genótipos.

Tabela 6. Relação do número de plantas regeneradas nos experimentos de regeneração de plantas a partir de calos induzidos no escuro para os três genótipos com calos em diferentes idades em relação ao total de calos testados.

Experimento	Genótipo	Idades do calo	Número de calos que regeneraram plantas	Total de calos testados
1	*S. polyrhiza 7498*	Início de R1	27	300
		Meio de R2	22	300
		Fim de R4	31	300
	L. minor 8627	Fim de R3	130	300
	L. minor DWC124	Fim de R3	91	300
2	*S. polyrhiza* 7498	Fim de R2	33	150
		Fim de R3	27	150
	L. minor 8627	Início de R2	117	150
		Meio de R6	98	150
	L. minor DWC124	Início de R2	99	150
		Meio de R6	7	150
3	*S. polyrhiza* 7498	Fim de R2	22	150
		Início de R4	24	150
		Início de R5	17	150
	L. minor 8627	Meio de R4	92	150
	L. minor DWC124	Fim de R3	48	150
		Meio de R4	23	150
4	*S. polyrhiza* 7498	Início de R3	8	100
	L. minor 8627	Fim de R2	81	100
	L. minor DWC124	Fim de R2	25	100

5.2.2. Regeneração de plantas a partir de calos induzidos no claro

No experimento cinco, foram utilizados apenas calos dos genótipos de *Lemnas* induzidos no claro no tratamento T14. Esses calos foram mantidos sob luz em R1, e no período de R2, parte deles foi mantida sob condições

de luz e parte mantida em câmara escura. Os calos testados no fim do período de R2, armazenados tanto no claro como no escuro (figura 3) foram colocados em meios de regeneração MR1 e MR2 na presença de luz.

Pôde-se observar que calos dos dois genótipos de *Lemna* do subcultivo R2 no escuro apresentaram maior capacidade de regeneração no tratamento MR2 (figura 27). O genótipo *L. minor* 8627, apresentou 86% e 56% de regeneração de plantas partir de calos mantidos no escuro e claro, respectivamente. O genótipo *L. minor* DWC124 apresentou taxa de regeneração de 40% e 26% para calos mantidos no escuro e no claro, respectivamente.

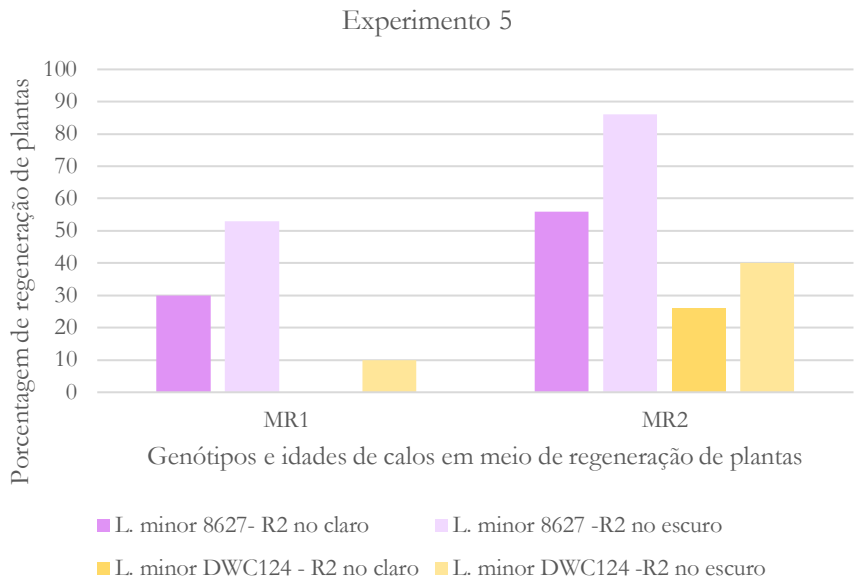


Figura 27. Resultados do experimento 5 de regeneração de calos dos genótipos *L. minor* 8627 e *L. minor* DWC124 induzidos no claro e mantidos em R2 no claro e no escuro, testados nos tratamentos MR1 e MR2.

Na tabela 7 está apresentado o número total de calos testados e o número de calos que regeneraram plantas nos meios MR1 e MR2 (tabela 7).

Tabela 7. Relação do número de plantas regeneradas nos experimentos de regeneração de plantas a partir de calos de *L. minor* 8627 e DWC124 induzidos no claro, no subcultivo R2 no claro ou no escuro, nos tratamentos MR1 (MS diluído) e MR2 (MS diluído com adição de 0,2 mg.L^{-1} de BAP) de regeneração em relação ao total de calos testados.

Experimento	Genótipo	Total de calos testados	Número calos com regeneração
5	*L. minor* 8627 – R2 no claro - MR1	30	9
	L. minor 8627 – R2 no claro - MR2	30	17
	L. minor 8627 – R2 no escuro -MR1	30	16
	L. minor 8627 – R2 no escuro -MR2	30	26
	L. minor DWC124 – R2 no claro – MR1	30	0
	L. minor DWC124 – R2 no claro – MR2	30	8
	L. minor DWC124 – R2 no escuro -MR1	30	3
	L. minor DWC124 – R2 no escuro -MR2	30	12

5.2.3. Sobrevivência das plantas regeneradas nos tratamentos BAP e ANA

A sobrevivência das plantas regeneradas no experimento 1 manteve os padrões de regeneração para as *Lemnas*, porém, as plantas regeneradas de *Spirodela* apresentaram uma redução de sobrevivência (taxa máxima de 8%) (figura 28).

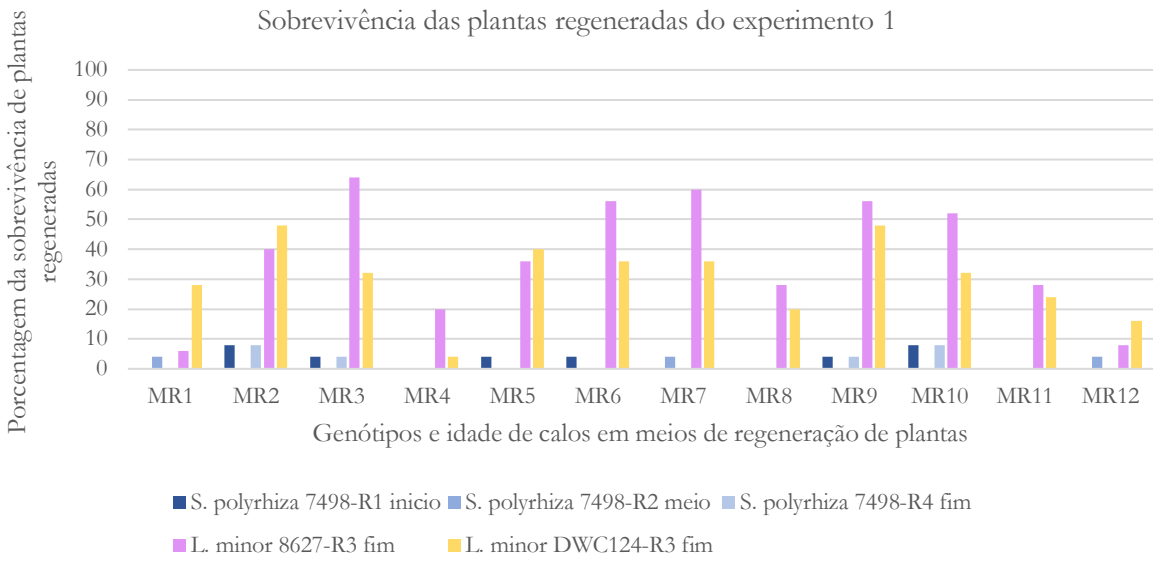


Figura 28. Sobrevivência de plantas do experimento 1 de regeneração em tratamentos com BAP e ANA (MR1 a MR12), provenientes de calos em diferentes idades para os três genótipos (*S. polyrhiza* 7498, *L. minor* 8627 e *L. minor* DWC124).

A sobrevivência das plantas regeneradas no experimento 2 coincidiu com as taxas de regeneração para os genótipos de *Lemna* e *Spirodela* apresentou diminuição de sobrevivência das plantas regeneradas (figura 29).

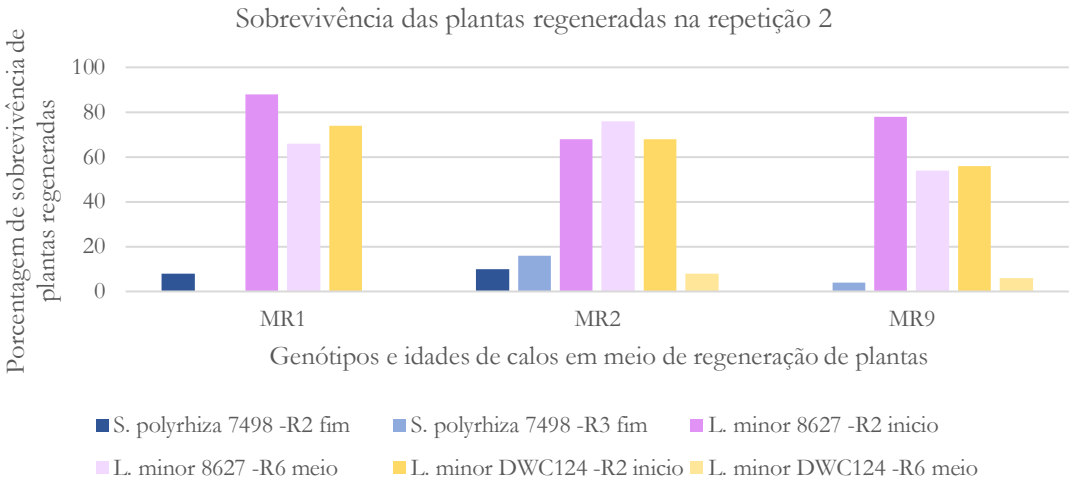


Figura 29. Sobrevivência de plantas do teste 2 de regeneração em tratamentos com BAP e ANA (MR1, MR2 e MR9), provenientes de calos em diferentes idades para os três genótipos (*S. polyrhiza* 7498, *L. minor* 8627 e *L. minor* DWC124).

Para o terceiro experimento, as plantas regeneradas de *Lemnas* mais uma vez mantiveram os padrões das taxas de regeneração, enquanto as de *Spirodela* sofreram mais mortes e consequentemente tiveram uma redução da sobrevivência, como mostra a tabela da figura 30.

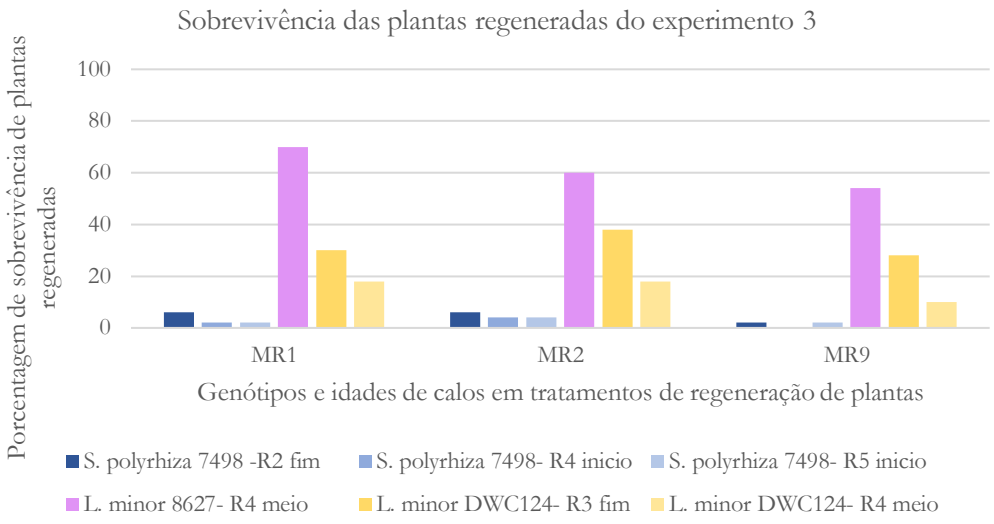


Figura 30. Sobrevivência de plantas do teste 3 de regeneração em tratamentos com BAP e ANA (MR1, MR2 e MR9), provenientes de calos em diferentes idades para os três genótipos (*S. polyrhiza* 7498, *L. minor* 8627 e *L. minor* DWC124).

Quanto a sobrevivência das plantas regeneradas do experimento 4, as taxas coincidiram com as de regeneração no caso das *Lemnas*, enquanto as plantas de *Spirodela* apresentaram maior mortalidade e taxas mais baixas de plantas sobreviventes (figura 31).

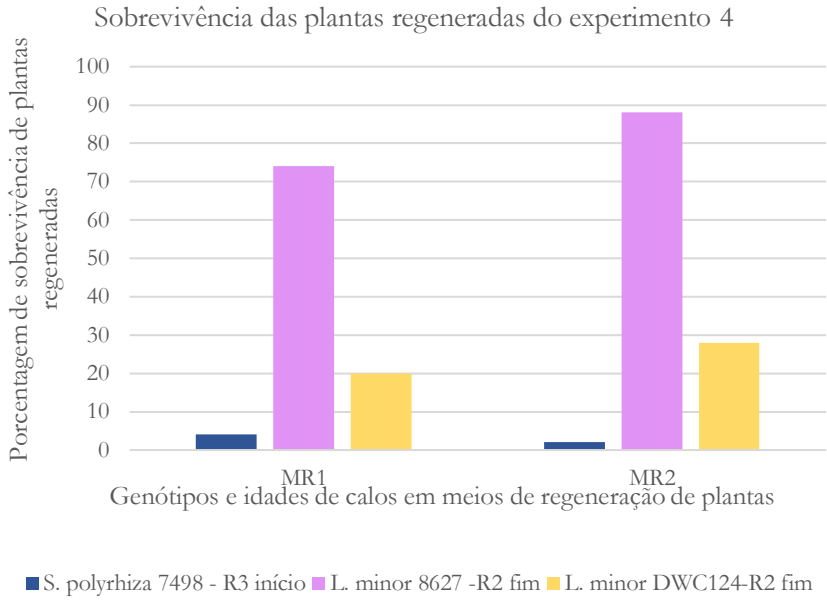


Figura 31. Sobrevivência de plantas do experimento 4 de regeneração em tratamentos com BAP e ANA (MR1 e MR2), provenientes de calos em diferentes idades para os três genótipos (*S. polyrhiza* 7498, *L. minor* 8627 e *L. minor* DWC124).

A sobrevivência das plantas, em números absolutos está apresentada na tabela 8. Para *S. polyrhiza*, do total de 211 calos que regeneraram plantas, houve a sobrevivência de 56 deles. Para o genótipo *L. minor* 8627, do total de 518 calos que regeneraram plantas, obteve-se a sobrevivência de 515 plantas, e para o genótipo *L. minor* DWC124, do total de 293 calos que regeneraram plantas, 292 deles sobreviveram (tabela 8).

Tabela 8. Relação do número de plantas sobreviventes dos experimentos de regeneração de plantas a partir de calos induzidos no escuro para os três genótipos com calos em diferentes fases em relação ao total de calos testados.

Experimento	Genótipo	Fase do calo	Número plantas regeneradas sobreviventes	Total de calos testados
1	*S. polyrhiza* 7498	Início de R1	8	300
		Meio de R2	3	300
		Fim de R4	6	300
	L. minor 8627	Fim de R3	127	300
	L. minor DWC124	Fim de R3	91	300
2	*S. polyrhiza* 7498	Fim de R2	9	150
		Fim de R3	10	150
	L. minor 8627	Início de R2	117	150
		Meio de R6	98	150
	L. minor DWC124	Início de R2	99	150
		Meio de R6	7	150
3	*S. polyrhiza* 7498	Fim de R2	10	150
		Início de R4	3	150
		Início de R5	4	150
	L. minor 8627	Meio de R4	92	150
	L. minor DWC124	Fim de R3	48	150
		Meio de R4	23	150
4	*S. polyrhiza* 7498	Início de R3	3	100
	L. minor 8627	Fim de R2	81	100
	L. minor DWC124	Fim de R2	24	100

A partir desses experimentos pode se notar que *L. minor* 8627 foi a que apresentou maior eficiência de regeneração de plantas a partir de calos, seguido de *L. minor* DWC124, enquanto *S. polyrhiza*, além de apresentar os

menores percentuais de regeneração, também apresentou as menores taxas de sobrevivência e multiplicação das folhas regeneradas.

5.3. Resistência das plantas à antibióticos

Nos experimentos realizados para se testar crescimento de plantas em diferentes concentrações de antibióticos, obteve-se, para cada um dos três genótipos estudados, uma resposta diferente para as concentrações de cada um dos antibióticos testados. Deste modo pôde-se concluir quais as concentrações dos antibióticos foram letais, e quais permitiram o desenvolvimento das plantas. Uma concentração foi considerada letal, quando aproximadamente 100% das plantas morreram após o período de avaliação de 30 dias em meio de cultura. Em termos de concentração ideal para uso em seleção de plantas, a concentração que permite cerca de 40-60% de sobrevivência de plantas foi considerada como ideal para seleção.

Conforme os resultados das tabelas 9, 10 e 11, obteve se que: para o genótipo *L. minor* 8627 concentrações de espectinomicina iguais ou superiores a 100 $mg.L^{-1}$ se mostraram letais. Para geneticina, as plantas desse genótipo se mostraram intolerante até mesmo na menor concentração de 10 $mg.L^{-1}$, e concentrações superiores a 300 $mg.L^{-1}$ de tobramicina se mostraram letais para as plantas. Para o genótipo de *Lemna minor* DWC124, geneticina se mostrou letal também na concentração de 10 $mg.L^{-1}$. Em espectinomicina e canamicina, concentrações a partir de 50 $mg.L^{-1}$ foram letais provocando a morte das plantas. Tetraciclina promoveu mortalidade das frondes na concentração de 100 $mg.L^{-1}$ e tobramicina se mostrou letal em 300 $mg.L^{-1}$. Para o genótipo *S. polyrhiza* 7498 a partir da concentração de 30 $mg.L^{-1}$ de tetraciclina, as plantas não se desenvolveram e tobramicina se mostrou letal em concentrações iguais ou superiores a 300 $mg.L^{-1}$. No teste com timentin, a concentração de 300 $mg.L^{-1}$ obteve-se crescimento e desenvolvimento normal das plantas em todos os genótipos. Este antibiótico é utilizado para controlar o crescimento da *Agrobacterium tumefaciens* na transformação genética de plantas e foi testado para avaliar o desenvolvimento das plantas em sua presença, para que, em experimentos de transformação, pudesse ser utilizado sem prejuízos à planta.

Em valores absolutos, a sobrevivência das plantas se deu como apresentado nas tabelas 9, 10, e 11 (referentes aos genótipos *L. minor* 8627, *L. minor* DWC124 e *S. polyrhiza* 7498, respectivamente). Em cada experimento, foram contadas quantas plantas do total inoculado por tratamento sobreviveram ao fim de 30 dias (avaliação final).

Tabela 9. Números absolutos de sobrevivência de plantas do genótipo *L. minor* 8627 nos tratamentos com diferentes concentrações de antibióticos a partir do total de plantas avaliadas em cada experimento.

Antibiótico	Concentrações ($mg.L^{-1}$)	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Experimento 5
Canamicina	0	60/60	30/30	30/30	-	-
	10	-	28/30	-	-	-
	20	-	23/30	-	-	-
	30	7/60	18/30	0/30	-	-
	50	0/60	-	0/30	-	-
	100	0/60	-	-	-	-
	300	0/60	-	-	-	-
	500	0/60	-	-	-	-
Estreptomicina	0	60/60	30/30	30/30	-	-
	30	59/60	-	-	-	-

	50	59/60	30/30	27/30	-	-
	100	59/60	30/30	29/30	-	-
	200	-	29/30	27/30	-	-
	300	46/60	-	0/30	-	-
	500	41/60	-	-	-	-
Geneticina	0	60/60	30/30	30/30	-	-
	10	-	0/30	0/30	-	-
	20	-	0/30	0/30	-	-
	30	0/60	0/30	-	-	-
	50	0/60	-	-	-	-
	100	0/60	-	-	-	-
	300	0/60	-	-	-	-
	500	0/60	-	-	-	-
Espectinomicina	0	60/60	30/30	30/30	30/30	30/30
	10	-	30/30	-	-	-
	20	-	30/30	30/30	30/30	-
	30	0/60	30/30	30/30	30/30	29/30
	50	0/60	-	11/30	25/30	27/30
	100	0/60	-	0/30	0/30	0/30
	300	0/60	-	-	-	-
	500	0/60	-	-	-	-
Tetraciclina	0	60/60	30/30	30/30	-	-
	30	53/60	0/30	0/30	-	-
	50	41/60	0/30	0/30	-	-
	100	1/60	0/30	0/30	-	-
	300	0/60	-	-	-	-
	500	0/60	-	-	-	-
Tobramicina	0	60/60	-	-	-	-
	30	60/60	-	-	-	-
	50	59/60	-	-	-	-
	100	33/60	-	-	-	-
	300	0/60	-	-	-	-
	500	0/60	-	-	-	-
Timentin	0	-	30/30	-	-	-
	300	-	30/30	-	-	-

Tabela 10. Números absolutos de sobrevivência de plantas do genótipo *L. minor* DWC124 nos tratamentos com diferentes concentrações de antibióticos a partir do total de plantas avaliadas em cada experimento.

Antibiótico	**Concentrações ($mg.L^{-1}$)**	**Experimento 1**	**Experimento 2**	**Experimento 3**	**Experimento 4**	**Experimento 5**
Canamicina	0	60/60	30/30	30/30	30/30	30/30
	10	-	-	30/30	-	-
	20	-	-	29/30	-	2/30
	30	11/60	23/30	26/30	0/30	2/30
	50	1/60	2/30	0/30	0/30	-

	100	0/60	0/30	-	-	-
	300	0/60	-	-	-	-
	500	0/60	-	-	-	-
Estreptomicina	0	60/60	30/30	30/30	30/30	-
	30	58/60	-	-	-	-
	50	58/60	26/30	-	27/30	-
	100	58/60	27/30	-	29/30	-
	200	-	24/30	25/30	27/30	-
	300	1/60	-	-	0/30	-
	500	1/60	-	-	-	-
Geneticina	0	60/60	30/30	30/30	-	-
	10	-	0/30	0/30	-	-
	20	-	0/30	0/30	-	-
	30	0/60	0/30	-	-	-
	50	0/60	-	-	-	-
	100	0/60	-	-	-	-
	300	0/60	-	-	-	-
	500	0/60	-	-	-	-
Espectinomicina	0	60/60	30/30	30/30	-	-
	10	-	30/30	-	-	-
	20	-	30/30	29/30	-	-
	30	0/60	5/30	11/30	-	-
	50	0/60	-	0/30	-	-
	100	0/60	-	0/30	-	-
	300	0/60	-	-	-	-
	500	0/60	-	-	-	-
Tetraciclina	0	60/60	30/30	-	-	-
	30	12/60	0/30	-	-	-
	50	2/60	0/30	-	-	-
	100	0/60	-	-	-	-
	300	0/60	-	-	-	-
	500	0/60	-	-	-	-
Tobramicina	0	60/60	-	-	-	-
	30	60/60	-	-	-	-
	50	60/60	-	-	-	-
	100	21/60	-	-	-	-
	300	0/60	-	-	-	-
	500	0/60	-	-	-	-
Timentin	0	-	30/30	-	-	-
	300	-	30/30	-	-	-

Tabela 11. Números absolutos de sobrevivência de plantas do genótipo de *S. polyrhiza* 7498 nos tratamentos com diferentes concentrações de antibióticos a partir do total de plantas avaliadas em cada experimento.

Antibiótico	**Concentrações ($mg.L^{-1}$)**	**Experimento 1**	**Experimento 2**	**Experimento 3**	**Experimento 4**

Canamicina	0	30/30	30/30	30/30	30/30
	10	-	29/30	-	-
	20	-	25/30	-	-
	30	29/30	23/30	23/30	28/30
	50	22/30	-	5/30	15/30
	100	0/30	-	-	-
	300	0/30	-	-	-
	500	0/30	-	-	-
Estreptomicina	0	30/30	30/30	30/30	30/30
	30	30/30	-	-	-
	50	28/30	27/30	-	30/30
	100	30/30	28/30	-	12/30
	200	-	25/30	0/30	2/30
	300	1/30	-	0/30	-
	500	3/30	-	-	-
Geneticina	0	30/30	30/30	30/30	30/30
	10	-	25/30	3/30	6/30
	20	-	10/30	0/30	0/30
	30	0/30	1/30	-	0/30
	50	0/30	-	-	-
	100	0/30	-	-	-
	300	0/30	-	-	-
	500	0/30	-	-	-
Espectinomicina	0	30/30	30/30	30/30	30/30
	10	-	29/30	-	-
	20	-	26/30	27/30	28/30
	30	0/30	20/30	18/30	18/30
	50	0/30	-	0/30	0/30
	100	0/30	-	0/30	-
	300	0/30	-	-	-
	500	0/30	-	-	-
Tetraciclina	0	30/30	30/30	-	-
	30	3/30	0/30	-	-
	50	0/30	0/30	-	-
	100	0/30	-	-	-
	300	0/30	-	-	-
	500	0/30	-	-	-
Tobramicina	0	30/30	-	-	-
	30	30/30	-	-	-
	50	30/30	-	-	-
	100	30/30	-	-	-
	300	0/30	-	-	-
	500	0/30	-	-	-
Timentin	0	30/30	-	-	-
	300	30/30	-	-	-

5.4. Regeneração de plantas a partir de calos cultivados em meios de cultura com antibióticos

O experimento de regeneração de plantas a partir de calos na presença de antibióticos (teste 1), utilizando a) 200 mg.L^{-1} de estreptomicina, b) 30 mg.L^{-1} de canamicina, e c) 50 mg.L^{-1} de espectinomicina, separadamente em meio de regeneração MR2, não apresentou regeneração de plantas no tratamento com adição de espectinomicina a 50 mg.L^{-1} nos três genótipos. A utilização de estreptomicina a 200 mg.L^{-1} não resultou em regeneração de plantas nos genótipos *L. minor* DWC124 e *S. polyrhiza* 7498, enquanto o genótipo *L. minor* 8627 apresentou 20% e 10% de regeneração nas repetições dois e três, respectivamente (tabela 12).

Pode-se notar que em todas as repetições, o genótipo *L. minor* 8627 foi o que apresentou as maiores taxas de regeneração de plantas no tratamento com adição de 30 mg.L^{-1} de canamicina, variando de 46% a 60% entre as idades de calos testadas. Já para o genótipo de *L. minor* DWC124 obteve-se de 0 a 23% de regeneração no mesmo tratamento, variando entre as idades de calos testadas, com a maior taxa de regeneração para calos no meio do subcultivo R2 (com 130 a 140 dias). Para *Spirodela polyrhiza* 7498 a maior eficiência de regeneração foi de 30% no meio de R2 (com 95 a 105 dias).

A primeira repetição utilizando calos no início de R5 (210-220 dias para os genótipos de *L. minor* e 165-175 dias para *S. polyrhiza*), o genótipo *L. minor* 8627 apresentou 46% de regeneração no tratamento com canamicina. O genótipo *L. minor* DWC124 não apresentou regeneração em nenhum dos tratamentos com antibióticos testados, e *S. polyrhiza* 7498 apresentou 7% de regeneração no tratamento com canamicina. Na segunda repetição, onde foram testados calos no meio de R2 (130-140 dias para ambos os genótipos de *L. minor* e 85-95 dias para *S. polyrhiza*), obteve-se para o genótipo *L. minor* 8627, a porcentagem de regeneração de 20% no tratamento com estreptomicina e 56% em canamicina. *L minor* DWC124 e *S. polyrhiza* 7498 apresentaram 23% e 30% de regeneração no tratamento com canamicina, respectivamente. Na terceira repetição, com calos no fim de R2 (140-150 dias para ambos os genótipos de *L. minor* e 95-105 dias para *S. polyrhiza*), observou-se que *L. minor* 8627 apresentou 10 % e 60 % de regeneração de plantas nos tratamento com 200 mg.L^{-1} de estreptomicina e 30 mg.L^{-1} de canamicina, respectivamente. *L. minor* DWC124 e *S. polyrhiza* 7498 apresentaram 13% de regeneração no tratamento com canamicina. Na quarta repetição, que se deu com calos no meio de R3 para as *L. minor* (160-170 dias) e no fim de R2 para *S. polyrhiza* (95-105 dias), apenas o tratamento com canamicina e o controle possibilitaram regeneração de frondes. As porcentagens de regeneração dos genótipos *L. minor* 8627, *L. minor* DWC124 e *S. polyrhiza* 7498 foram de 60% 7% e 7%, respectivamente, no tratamento com canamicina. Na quinta e última repetição onde foram utilizados calos no início de R3, para os genótipos de *Lemna* houve regeneração de plantas apenas nos tratamentos controle e com canamicina, em taxas de 60% e 13% para *L. minor* 8627 e *L. minor* DWC124, respectivamente. Já *S. polyrhiza* não apresentou regeneração em nenhum dos tratamentos com antibióticos testados. A tabela 12 mostra em números a regeneração de plantas nas cinco repetições do teste 1, a partir do total de 30 calos testados por tratamento.

Tabela 12. Número de calos que regenerarm plantas no teste 1 de regeneração de calos em diferentes idades (fases de subcultivo) na presença de antibióticos (estreptomicina a 200 mg.L^{-1}, canamicina a 30 mg.L^{-1}, espectinomicina a 50 mg.L^{-1} e controle – MR2 sem adição de antibiótico) para os três genótipos, do total de 30 calos por tratamento após 40 dias.

Repetições	**Genótipos e fase de subcultivo dos calos**	**Número de calos regenerados nos tratamentos:**			
		Controle	200 mg.L^{-1} de estreptomicina	30 mg.L^{-1} de canamicina	50 mg.L^{-1} de espectinomicina
1	*L. minor* 8627 -início de R5	26	0	14	0
	L. minor DWC124 -início de R5	6	0	0	0
	S. polyrhiza 7489 -início de R5	4	0	2	0
2	*L. minor* 8627- meio de R2	20	6	17	0
	L. Minor DWC124 -meio de R2	9	0	7	0
	S. Polyrhiza -meio de R2	6	0	9	0
3	*L. minor* 8627 -fim de R2	24	3	18	0
	L. minor DWC124 -fim de R2	9	0	4	0
	S. polyrhiza -fim de R2	4	0	4	0
4	*L. minor* 8627 -meio de R3	24	0	18	0
	L. minor DWC124 -meio de R3	4	0	2	0
	S. polyrhiza -fim de R2	2	0	2	0
5	*L. minor* 8627 -início de R3	22	0	18	0
	L. minor DWC124 -início de R3	5	0	4	0
	S. polyrhiza -início de R3	2	0	0	0

No teste 2 de regeneração de calos na presença de antibióticos, realizado apenas para o genótipo *Lemna minor* 8627 , no meio MR2 com adição de a) 300 mg.L^{-1} de timentin, b) 30 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin e c) 50 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin, além do controle (tratamento MR2 sem adição de antibiótico), pôde-se observar que para as três idades de calos testadas (fim de R2 – com 140 a 150 dias, início de R3 – com 150 a 160 dias, e meio de R3 – com 160 a 170 dias), o teste de Tukey mostrou que o tratamento somente com timentin, apresentou a maior taxa de regeneração de plantas. Entretanto, o tratamento com adição de 50 mg.L^{-1} de canamicina mais timentin, apresentou a menor proporção de plantas regeneradas (figura32).

Os valores obtidos a partir do teste F foi: para calos no fim de R2: teste F=11,50 (p-valor = 0,0002), maior que $F_{0,95;3,16}$=2,16; para calos no início de R3: teste F=24,18 (p-valor < 0,0001), maior que $F_{0,95;3,16}$=2,16; e para calos no meio de R3: teste F=15,82 (p-valor < 0,0001), também maior que $F_{0,95;3,16}$=2,16.

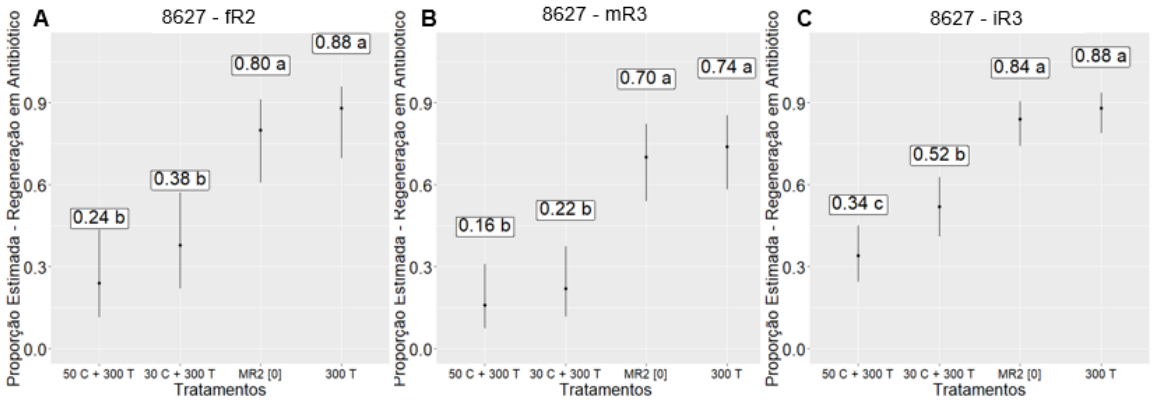


Figura 32. Proporções estimadas com intervalos de confiança para os tratamentos de regeneração de calos em antibióticos para calos do genótipo 8627 de *L. minor* no A) final de R2 (fR2); B) meio de R3 (mR3); C) início de R3 (iR3). MR2 [0]: controle; 300 T: tratamento com 300 mg.L^{-1} de timentin; 30 C + 300 T: tratamento com canamicina a 30 mg.L^{-1} mais 300 mg.L^{-1} de timentin; 50 C + 300 T: tratamento com canamicina a 50 mg.L^{-1} mais 300 mg.L^{-1} de timentin. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si, e letras diferentes diferem entre si.

Utilizando o gráfico semi-normal de probabilidades com envelope simulado, pode se notar por meio dos resíduos, baseados num modelo quasi-binomial, que os pontos estão completamente dentro do envelope simulado, indicando a adequação do modelo (Apêndice B).

Na primeira repetição, *L. minor* 8627 apresentou 88%, 38% e 24% de regeneração nos tratamentos com 300 mg.L^{-1} de timentin, 30 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin e 50 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin, respectivamente. Na segunda repetição, as porcentagens de regeneração nos mesmos tratamentos, foram de 74%, 22% e 16%, respectivamente. Na terceira e última repetição, a regeneração dos calos em plantas se deu a 88%, 52% e 34% nos tratamentos com 300 mg.L^{-1} de timentin, 30 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin e 50 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin, respectivamente.

Em números, a regeneração de calos em antibióticos, no teste 2, se deu como mostra a tabela 13. Os valores se deram a partir do total de 50 calos por tratamento que foram capazes de regenerar plantas.

Tabela 13. Número de calos que regenerarm plantas no teste 2 de regeneração de calos em diferentes idades (fases de subcultivo) na presença de antibióticos (timentin a 300 mg.L^{-1}, canamicina a 30 mg.L^{-1} mais 300 mg.L^{-1} de timentin, canamicina a 50 mg.L^{-1} mais 300 mg.L^{-1} de timentin e controle – MR2 sem adição de antibiótico) para os três genótipos, do total de 50 calos por tratamento

Repetição	**Genótipos e fase de subcultivo dos calos**	**Número de calos regenerados nos tratamentos**			
		Controle	300 mg.L^{-1} de timentin	30 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin	50 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin
1	*L. minor* 8627 - fim de R2	40	44	19	12
2	*L. minor* 8627 - meio de R3	35	37	11	8
3	*L. minor* 8627 - início de R3	42	44	26	17

5.4.1. Sobrevivência das plantas regeneradas nos tratamentos com antibióticos

As plantas regeneradas do teste 1 foram isoladas e transferidas para o meio MR2 sem antibióticos, e as regeneradas do teste 2 foram transferidas paraos respectivos tratamentos. As plantas foram avaliadas quanto a sobrevivência e desenvolvimento. Por falta de variabilidade, as análises de sobrevivência não puderam ser realizadas de modo estatístico. Desta forma, as análises se deram de maneira descritiva a partir dos dados, onde pôde-se revelar a proporção de plantas sobreviventes.

A primeira repetição do teste 1, com calos no início de R5 (210-220 dias para as *Lemnas* e 165-175 dias para *Spirodela polyrhiza* 7498) revelou que, para o genótipo *L. minor* 8627 a proporção de plantas sobreviventes no tratamento com 30 mg.L^{-1} de canamicina foi de 78% a partir do total de plantas regeneradas. *S. polyrhiza* 7498 apresentou 100 % de sobrevivência das plantas regeneradas no tratamento com canamicina. Na repetição dois, calos do genótipo de *Lemna minor* 8627 no meio do subcultivo R2 (130-140 dias), apresentaram taxa de sobrevivência de 100% das plantas regeneradas no tratamento com canamicina, já as plantas regeneradas na presença de estreptomicina apresentaram 83% de sobrevivência. Para o genótipo *L. minor* DWC124, também no meio do subcultivo R2, a porcentagem de plantas sobreviventes provindas do tratamento com 30 mg.L^{-1} de canamicina foi de 43%. *S. polyrhiza* 7498 não apresentou sobrevivência de nenhuma das plantas regeneradas no meio do subcultivo R2 (85-95 dias). A terceira repetição com calos de *L. minor* 8627 no fim de R2 (140-150 dias), apresentou 100% de sobrevivência das plantas regeneradas no tratamento com estreptomicina a 200 mg.L^{-1} e 88% no tratamento com canamicina (30 mg.L^{-1}). Para as plantas do genótipo *L. minor* DWC124, também no fim de R2, não houve sobrevivência de plantas regeneradas em meio com canamicina, e *S. polirhyza* 7498 no fim de R2 (95-105 dias) apresentou 75% de sobrevivência das plantas regeneradas no tratamento com canamicina. Na repetição 4, as plantas de *L. minor* 8627 regeneradas a partir de calos no meio do subcultivo R3 (160-170 dias) em 30 mg.L^{-1} de canamicina apresentaram 100% de sobrevivência. Os genótipos *L. minor* DWC124 (no meio do subcultivo R3 (160-170 dias)) e *S. polyrhiza* 7498 (no fim do subcultivo R2 (95-105 dias)), apresentaram 100% de sobrevivência das plantas regeneradas em 30 mg.L^{-1} de canamicina. Na quinta repetição deste experimento, plantas do genótipo *L. minor* 8627 (com calos no início de R3 (150-160 dias)), regeneradas no tratamento com canamicina (30 mg.L^{-1}), apresentaram 94% de taxa de sobrevivência. Para o genótipo *L. minor* DWC124, com mesma idade, a taxa de sobrevivência das plantas regeneradas neste mesmo tratamento foi de 75%.

A tabela 14 apresenta o número de plantas sobreviventes em cada repetição do teste 1 ao fim da avaliação. O total de calos testados foi de 30 em cada um dos tratamentos.

Tabela 14. Número de plantas sobreviventes (do total de 30 calos por tratamento) no teste 1 de regeneração de calos na presença de antibiótico em cada uma das cinco repetições, com: estreptomicina a 200 mg.L^{-1}, canamicina a 30 mg.L^{-1}, espectinomicina a 50 mg.L^{-1} e controle (tratamento MR2 sem adição de antibiótico).

Repetições	**Genótipos e fases de subcultivos dos calos**	**Número de plantas sobreviventes regeneradas a partir dos tratamentos:**			
		Controle	200 mg.L^{-1} de estreptomicina	30 mg.L^{-1} de canamicina	50 mg.L^{-1} de espectinomicina
1	*L. minor* 8627 - início de R5	26	0	11	0
	L. minor DWC124 - início de R5	4	0	0	0
	S. polyrhiza 7489 - fim de R4	0	0	2	0
2	*L. minor* 8627- meio de R2	20	5	17	0
	L. Minor DWC124 - meio de R2	4	0	3	0
	S. Polyrhiza - meio de R2	0	0	0	0
3	*L. minor* 8627 - fim de R2	23	3	16	0
	L. minor DWC124 - fim de R2	9	0	0	0
	S. polyrhiza - fim de R2	3	0	3	0
4	*L. minor* 8627 - início de R5	23	0	18	0
	L. minor DWC124 - início de R5	4	0	2	0
	S. polyrhiza - fim de R4	1	0	2	0
5	*L. minor* 8627 - início de R3	22	0	17	0
	L. minor DWC124 - início de R3	5	0	3	0
	S. polyrhiza – início de R3	2	0	0	0

No teste 2 de regeneração de calos do genótipo *L. minor* 8627 em antibióticos (300 mg.L^{-1} de timentin, 30 mg.L^{-1} de canamicina mais 300 mg.L^{-1} de timentin, e 50 mg.L^{-1} de canamicina mais 300 mg.L^{-1} de timentin), também não houve variabilidade, então as análises de sobrevivência não puderam ser realizadas de modo estatístico. Desta forma, as análises se deram de maneira análitica a partir dos dados, analisando-se a porcentagem de plantas sobreviventes.

Para calos no fim do subcultivo R2 (com 140 a 150 dias), obteve-ve 100% de sobrevivência de plantas regeneradas no tratamento com adição de apenas timentin na concentração de 300 mg.L^{-1}. Quanto aos tratamentos com adição de canamicina, as plantas regeneradas no tratamento com 30 mg.L^{-1} apresentaram uma proporção de plantas sobreviventes de 14% a partir do total de calos testados enquanto as regeneradas em tratamento com 50 mg.L^{-1}, apresentaram proporção de apenas 4%. Para calos no meio do subcultivo R3 (com 160 a 170 dias), observou-se 100% de sobrevivência das plantas regeneradas no tratamento com apenas timentin, 8% de sobrevivência das plantas regeneradas no tratamento com a menor concentração de canamicina (30 mg.L^{-1}) e não houve sobrevivência das plantas regeneradas no tratamento com a maior concentração de canamicina (50 mg.L^{-1}). Quanto aos calos no início

de R3 (com 150 a 160 dias), houve 100% de sobrevivência das plantas regeneradas no tratamentos com apenas timentin, enquanto nos tratamentos com canamicina obteve-se 42% e 6% de sobrevivência em 30 mg.L^{-1} e 50 mg.L^{-1}, respectivamente.

A tabela 15 apresenta o número de plantas sobreviventes em cada repetição do teste 2 ao fim da avaliação. O total de calos testados foi de 50 em cada tratamento.

Tabela 15. Número de plantas sobreviventes (do total de 50 calos por tratamento) no teste 2 de regeneração de calos na presença de antibiótico: timentin a 300 mg.L^{-1}, canamicina a 30 mg.L^{-1} mais 300mg.L^{-1} de timentin, canamicina a 50 mg.L^{-1} mais 300 mg.L^{-1} de timentin e controle (tratamento MR2 sem adição de antibiótico).

Repetição	**Genótipos e fases dos subcultivos dos calos**	**Número de plantas sobreviventes regeneradas a partir dos tratamentos:**			
		Controle	300 mg.L^{-1} de timentin	30 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin	50 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin
1	*L. minor* 8627 -fim de R2	40	44	7	2
2	*L. minor* 8627 -meio de R3	34	37	4	0
3	*L. minor* 8627 -início de R3	42	44	21	3

5.5. Transformação genética

5.5.1. Análise de expressão transiente do GUS em calos

Foi feito o teste histoquímico de GUS nos calos transformados com o vetor pCAMBIA2301 decorridos 12 dias da transformação (figura 33). Obteve-se 398 calos GUS positivos, do total de 484 calos transformados, correspondente a 82,2% de eficiência de expressão transiente do GUS, como mostra a tabela 16.

Tabela 16. Transformação genética para análise de expressão transiente de GUS em calos de *Lemna minor* 8627 via *Agrobacterium tumafaciens* EHA 105 contendo o vetor pCAMBIA2301.

Experimento	**Número de calos transformados**	**Número de calos GUS + (exp. transiente)**	**Eficiência de transformação***
1	196	143	72,9 %
2	144	126	87,5%
3	144	129	89,5%
TOTAL	**484**	**398**	**82,2%**

*Porcentagem do número de calos GUS positivas em relação ao total de calos transformados

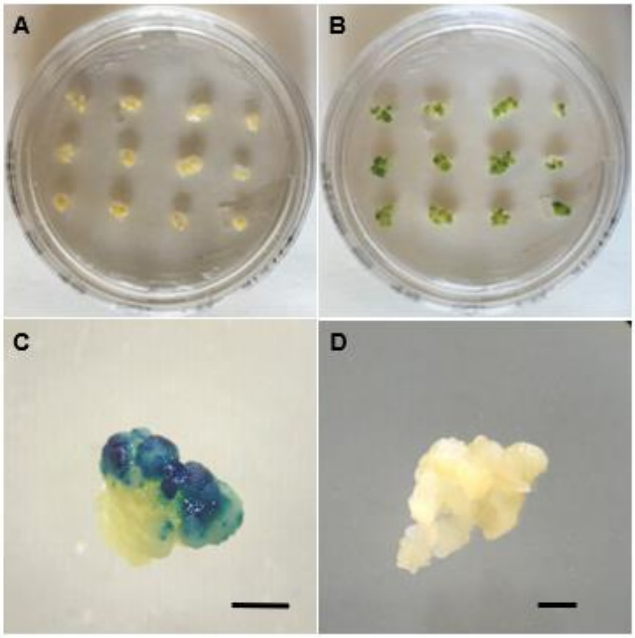


Figura 33. Análise de expressão transiente do GUS em calos de *Lemna minor* 8627 transformados com pCAMBIA2301 via *Agrobacterium tumefaciens*. A) calos transformados em meio de seleção após o co-cultivo; B) calos após 12 dias da transformação sob exposição luminosa em meios de seleção; C) calo GUS positivo; D) calo do controle negativo sem expressão do GUS. (Barras=1000μM).

5.5.1. Análise de expressão de GUS em folhas regeneradas

Os calos foram transferidos para meios de seleção contendo timentin (300 mg.L^{-1}) e canamicina (30 mg.L^{-1}) após o período de co-cultivo (figura 34A) e após cerca de 15 dias, pode-se começar a notar a regeneração de pequenas folhas em alguns calos. Após 25 dias, obteve-se taxa de regeneração de 74,76% dos calos transformados em meio seletivo (figura 34B), e após esse período as plantas regeneradas foram isoladas em novos meios de seleção (com adição de 30 mg.L^{-1} de canamicina e 300 mg.L^{-1} de timentin) – seleção 1. Cada calo regenerado foi considerado um evento, e eventualmente um calo possibilitou a regeneração de mais de uma fronde, em locais diferentes. Essas foram isoladas umas das outras para crescerem em colônias separadamente (figura 34C).

Após 15 dias, observou-se sobrevivência de 61,34% das plantas regeneradas a partir do total de calos transformados. Essas frondes foram coletadas aleatoriamente dentro de seu evento para realização do teste GUS. Este revelou a presença de quimeras, onde as frondes GUS positivas apresentaram um pequeno ponto azul em parte da folha, e não nela inteira (figura 34D e E). Obteve-se 2,7% de plantas GUS positivas, como mostra a tabela 17.

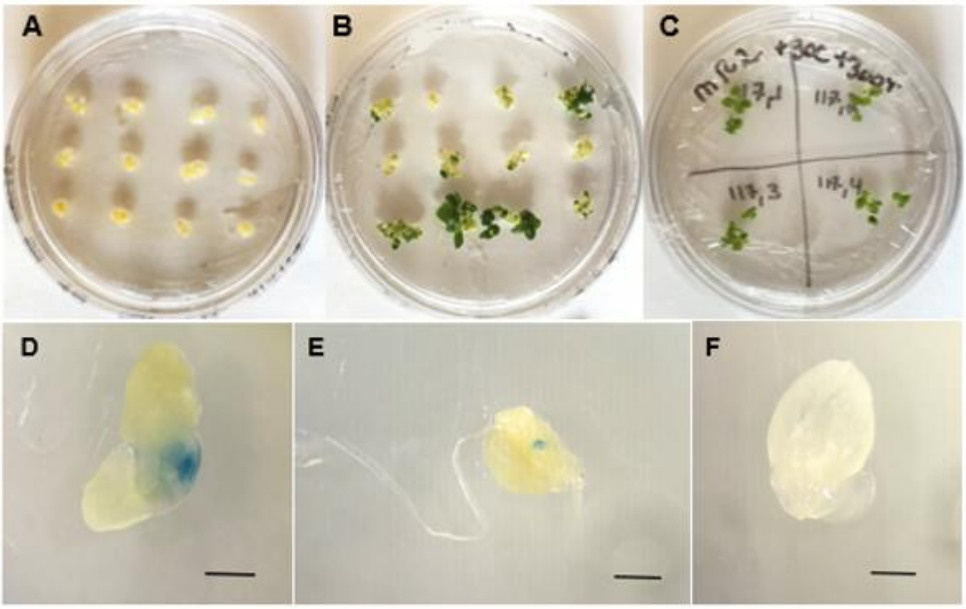


Figura 34. Transformacação genética de calos do genótipo 8627 de *L. minor* via *A. tumefaciens* contendo o vetor pCAMBIA2301. A) calos após co-cultivo, em meio de seleção; B) frondes regenerando a partir de calos transformados após 25 dias; C) isolamento das frondes transformadas em meio de seleção; D-E) frondes GUS positiva; F) fronde do controle negativo sem expressão do GUS. (barras = 1000μM).

Tabela 17. Transformação genética de calos de *Lemna minor* genótipo 8627 via *Agrobacterium tumafaciens* EHA 105 contendo o vetor pCAMBIA2301

Experimento	Número de calos transformados	Número de calos que regeneram plantas	Número de plantas sobreviventes	GUS Positivo	Eventos sobreviventes na seleção 2	PCR +	Eficiência de transformação*
1	144	113	90	6	2	2	4,1%
2	144	124	103	6	4	4	4,1%
3	144	86	72	0	0	0	0%
TOTAL	**432**	**323**	**265**	**12**	**6**	**6**	**2,7%**

*Porcentagem do número de plantas GUS positivas em relação ao total de calos transformados

Os 12 eventos GUS positivos foram transferidos para meios de seleção com aumento da concentração de canamicina, de 30 para 50 mg.L^{-1}, ainda com 300 mg.L^{-1} de timentin (seleção 2). Após 30 dias apenas 6 eventos sobreviveram nos meios de seleção, e algumas das plantas desses eventos foram coletadas para realização de extração de DNA e PCR, para amplificação dos genes *nptII* e *VirG*.

Os resultados obtidos no gel de agarose mostraram que houve amplificação da sequência envolvendo parte do promotor 35S e do gene *nptII*, que demonstrou que as plantas se encontraram positivas pela presença do gene (figura 35A). Entretanto, a amplificação do gene *VirG* da bactéria, indicou sua presença nas plantas (figura 35B).

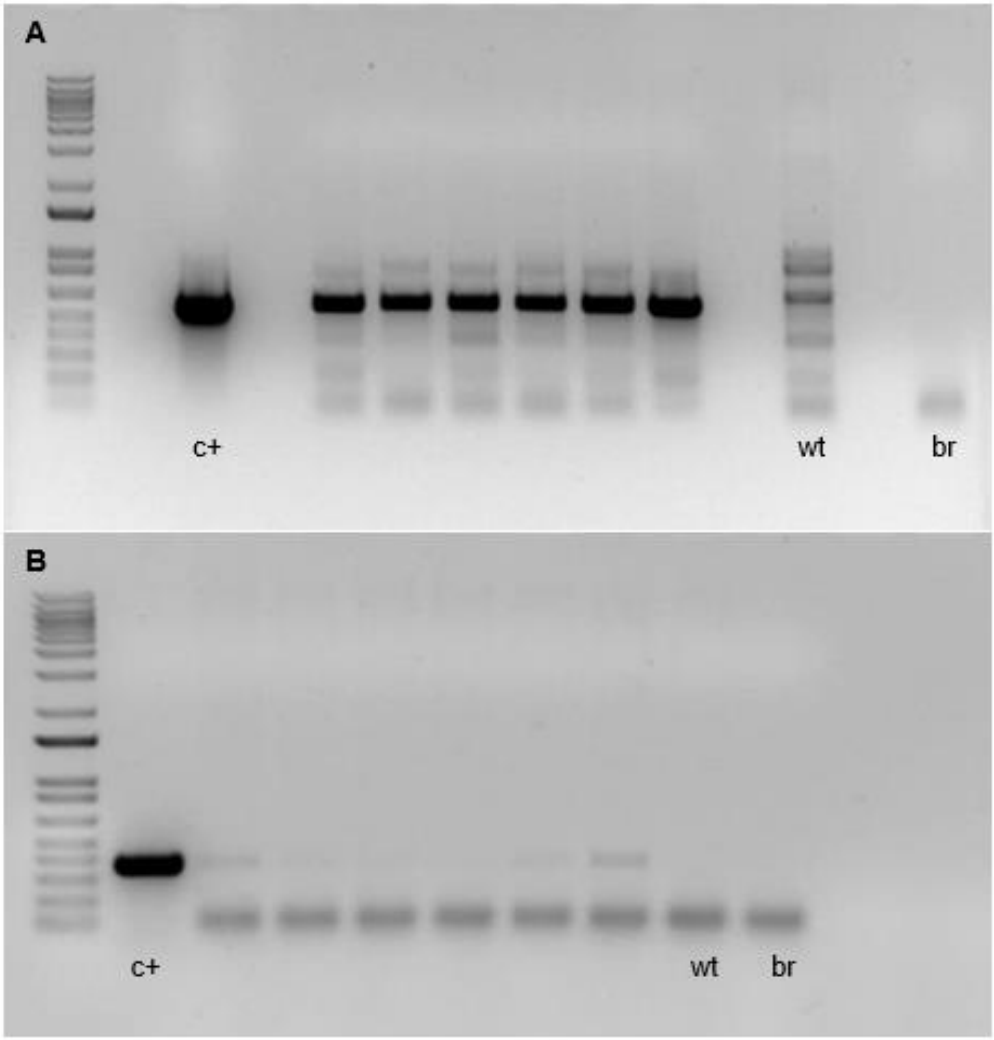


Figura 35. Gel de agarose 1% com amostras de plantas de *L. minor* genótipo 8627 transformadas via *A. tumefaciens*, para confirmação da transformação genética com vetor pCAMBIA2301. A) amplificação do fragmento entre o promotor 35S e o gene *nptII*; B) amplificação do gene *VirG*.). c+: controle positivo da bactéria (plasmídeo pCAMBIA2301); wt: controle negativo das amostras (planta não transformada); br: controle negativo da reação (água).

A presença da região *VirG* no gel de agarose, indicou que as amostras que se apresentaram positivas para o gene *nptII* devido a presença da bactéria nas plantas e não da inserção do plasmídeo no genoma das plantas.

Os 6 eventos foram então transferidos novamente para novos meios de seleção contendo 50 $mg.L^{-1}$ de canamicina e 300 $mg.L^{-1}$ de timentin, e após cerca de 30 dias, todos eles morreram, indicando que não houve inserção do plasmídeo no genoma da planta.

6. DISCUSSÃO

6.1. Indução de calos

A combinação de BAP e 2,4 D não resultou em indução de calos em nenhum dos genótipos testados neste trabalho, diferente dos resultados obtidos em trabalhos anteriores com combinações desses mesmos dois reguladores (Yang et al, 2018b). Estes autores, porém, utilizaram o genótipo 5543 de *Spirodela polyrhiza*, e como cada genótipo gera uma resposta diferente aos tratamentos (STOMP 2005; YANG 2018a), esta combinação de reguladores de crescimento não se mostrou eficiente para os genótipos estudados no presente trabalho.

Cantó-Pastor e colaboradores (2014) utilizaram 2,4 D e TDZ para indução de calos em *Lemna minor*. Outros autores também publicaram estudos de indução de calos com a combinação de 2,4 D e TDZ em *Lemna minor* (YAMAMOTO et al, 2001) e em *Spirodela* (HUANG et al, 2018) porém as concentrações dos reguladores variaram entre as espécies (STOMP, 2005).

No presente estudo se confirmou que os tratamentos que melhor induziram calos a partir de folhas, não apenas para os genótipos de *Lemnas* como para o genótipo de *Spirodela* também, se deram a partir da combinação dos reguladores vegetais 2,4-D e TDZ. Com base nos resultados dos testes de indução de calos no escuro, pôde-se notar que os tratamentos com a combinação desses dois reguladores vegetais, se mostraram eficientes na indução de calos, sendo estes os denominados T6, T7, T8, T10, T11, T12, T14, T15 e T16. A diferença estatística entre os que se destacaram entre eles, não demonstrou significância, e desta forma, o tratamento T14 foi eleito como indutor de calos, uma vez que, além de apresentar maior numero de plantas que induziram calos e maior quantidade de calos induzidos, possui concentração mais baixa de 2,4-D, quando comparado com os tratamentos T11, T12, T15 e T16. Este regulador, quando em doses mais elevadas, pode causar efeitos de variação somaclonal, danosos e indesejados ao desenvolvimento das plantas, tendo em vista sua ação herbicida (PAZMIÑO, ROMERO-PUERTAS e SANDALIO, 2012). Apesar do T10 também ter se mostrado eficiente, concentrações maiores de TDZ mostraram aumento da eficiência de indução.

A indução de calos também se mostrou possível a partir da combinação de mais de dois reguladores, como no caso da indução em *Spirodela polyrhiza* (Wang, 2016). O trabalho, utilizou ANA, TDZ e 2,4 D. Yang et al (2018b) apontaram em seu trabalho que a indução de calos em *S. polyrhiza* ocorre de maneira mais eficiente quando a concentração de auxina for igual ou superior a de citocinina. No entanto, foi testada a combinação de 2,4-D e 6-BA ou ANA e TDZ. No presente trabalho porem, o tratamento de indução utilizado para induzir calos possuia quatro vezes mais a concentração de citocinina (1 $mg.L^{-1}$ de TDZ) quando comparada a de auxina (0,25 $mg.L^{-1}$ de 2,4-D).

Os protocolos de cultura de tecidos já estabelecidos até o momento para espécies de lentilha d'água variam quanto a indução de calos ser no claro ou no escuro. No trabalho de Stefaniak et al (2002), a indução de calos ocorreu no escuro, já em trabalhos como os de Chhabra et al (2011), Yang et al (2014) e Huang et al, (2016), a indução ocorreu sob a presença de fonte luminosa, ou ainda em ambas as condições – parte no escuro, seguida de exposição à luz (HUANG et al, 2018).

No presente estudo, os calos de *S. polyrhiza* induzidos no claro, apesar de também apresentarem alta eficiência de indução (97% em tratamento T14), oxidaram e morreram, impedindo a possibilidade de regeneração de plantas.

O genótipo DWC124 de *L. minor*, apesar de induzir calos na presença de luz, apresentou baixas taxas de regeneração destes quando comparados a regeneração de calos induzidos no escuro, o que fez com que a indução de

calos na luz fosse ineficiente para fins de regeneração de plantas para estes genótipos. Quanto ao genótipo 8627 de *L. minor*, a indução de calos na condição de presença de luz foi similar a indução no escuro e a regeneração de plantas também se mostrou eficiente tanto para calos induzidos no claro como no escuro. Ainda, a regeneração de plantas a partir de calos induzidos no claro para este genótipo foi mais eficiente quando os calos foram mantidos no subcultivo R2 no escuro.

Quanto ao local de formação dos calos, em trabalhos como o de Huang e colaboradores (2018) foi mostrado o surgimento de calos no meristema apical da raiz (ponta das raízes) em *S. polyrhiza*, assim como observado no presente estudo. Porém em outros trabalhos, os calos de *Spirodela* apareceram no meio das folhas, assim como ocorreu nas *Lemnas*, por exemplo (LI et al, 2004; WANG, 2016).

Stefaniak e colaboradores (2002) relataram maior produção de calos a partir de folhas com incisão cirúrgica, e taxa nula em plantas inteiras de *Lemna minor* em tratamentos de indução com adição de 2,4-D. Entretanto, no presente estudo, a diferença estatística entre indução de calos a partir de folhas inteiras ("i") e com corte na região das gemas meristemáticas laterais ("f") demonstrou que amostras do tipo "i" apresentaram maior eficiência em induzir calos na repetição 1, enquanto na segunda repetição não houve diferença significativa entre "f" e "i". Por isso foi estabelecido o uso de frondes inteiras/intactas no processo de indução de calos.

Frondes de *S. polyrhiza* 7498 com duas semanas de idade se mostraram mais eficientes na indução de calos, o que condiz com diversos estudos já realizados (CHANG e HSING, 1978; STEFANIAK, WOŹNY e BUDNA 2002; LI et al*,* 2004).

O aparecimento dos calos ocorre em períodos diferentes para cada genótipo. No trabalho de Li e colaboradores (2004) e WANG (2016) calos de *Spirodela* surgiram após cerca de três a quatro semanas após a indução em meio específico. Já nas *Lemnas*, os calos só se tornaram visíveis após cerca de seis a oito semanas (LI et al, 2004). No presente estudo, os calos de *Spirodela* surgiram depois de cerca de quatro semanas e apresentaram maior crescimento ao fim da sexta semana no escuro. Já os calos dos genótipos das *Lemnas* só se desenvolveram e se tornaram aptos para serem isolados das plantas após cerca de 90 dias no escuro. Na condição de indução de calos dos genótipos de *Lemna minor* 8627 e DWC124 na presença de luz, o surgimento de calos ocorreu em menor tempo, cerca de 60 dias (40 dias no subcultivoe R0, onde as plantas entumeceram, e mais cerca de 20 dias no subcultivo R1).

Os resultados distintos de indução de calos entre os trabalhos já publicados, se deve ao fato de as Lemnaceaes possuírem alta plasticidade e características intrínsecas em cada genótipo, o que proporciona respostas diferentes a condições distintas (STOMP, 2005). Outro fator que pode alterar as respostas das plantas aos experimentos, é a origem de onde os ecótipos foram isolados, uma vez que o ambiente pode interferir no metabolismo e fisiologia das plantas.

6.2. Regeneração de plantas a partir de calos

Para que a cultura de tecidos de uma determinada planta seja considerada eficiente, a regeneração de plantas a partir de calos deve ocorrer de maneira uniforme e com alta taxa de formação de plantas. A regeneração de plantas deve ocorrer sob presença de fonte luminosa para que as gemas meristemáticas sejam estimuladas a se multiplicarem e se diferenciarem (MOON e STOMP, 1997).

O primeiro relato de regeneração de folhas de *S. polyrhiza* foi descrito por Wang (2016), utilizando zeatina adicionada ao meio de cultura. Já Huang et al (2018) observou altas taxas de regeneração de *S. polyrhiza* em diferentes

meios base com ou sem adição de diferentes citocininas. Yang (2018b) obteve maior taxa de regeneração de calos de *S. polyrhiza* em plantas com o regulador TDZ, ou com 6-BA.

O grupo de Stefaniak (2002) observou que para *Lemna minor*, a melhor taxa de regeneração foi obtida em meio de cultura com adição de combinação de auxina (AIA) e citocinina (KIN). Li et al, (2004) promoveram a regeneração de *Lemna gibba* e de *Spirodela oligorrhiza* com adição de TDZ, e de *Spirodela punctata* (atualmente *Landoltia punctata*) com adição de 2iP. Esses dados demonstram mais uma vez que cada genótipo possui peculiaridades e necessidades diferentes quanto a introdução em cultura de tecidos.

Moon e Stomp (1997) relataram regeneração de plantas de *Lemna gibba* em meios de cultura na ausência de reguladores de crescimento, entretanto, também obtiveram regeneração de plantas com adição de citocinina (6-BA) ao meio, o que coincide com o presente trabalho, onde apenas o meio MS diluído (tratamento MR1) também se mostrou eficiente para regeneração de folhas, e o tratamento com adição de BAP aumentou ainda mais esta eficiência.

Os tratamentos com combinações dos reguladores BAP e ANA no presente estudo, se mostraram eficientes na regeneração de folhas a partir de calos. Apesar dos tratamentos MR1, MR2 e MR9 não mostrarem diferença significativa em termos de regeneração, com exceção no primeiro teste, o MR2 (meio MS diluído com adição de 0,2 $mg.L^{-1}$ de BAP) foi estabelecido como o tratamento de regeneração, por promover um maior número de calos regenerados.

As idades dos calos testados também interferiram nos resultados de eficiência de regeneração. O genótipo *L. minor* 8627 apresentou regeneração em todas as idades de calos testadas, e maior número de plantas (88%) a partir de calos no início de R2 – com cerca de 120 a 130 dias desde a inoculação, e no fim do subcultivo R2 – com cerca de 140 a 150 dias desde a inoculação. O genótipo *L. minor* DWC124 apresentou 74% de taxa de regeneração a partir de calos no início de R2 – com cerca de 120 a 130 dias da inoculação, essa taxa de regeneração foi menor quando comparada ao outro genótipo da mesma espécie. Observou-se que os calos mais velhos (no meio de R6 – com cerca de 8 meses) não se mostraram aptos a regeneração para este genótipo (DWC124 de *L. minor*). Apesar de haver uma alta eficiência de indução de calos de no genótipo 7498 de *S. polyrhiza*, a taxa de regeneração desse genótipo foi a mais baixa, de 44% a partir de calos no início do subcultivo R1 (com 45 a 55 dias da inoculação) ou no meio do subcultivo R2 (com 85 a 95 dias da inoculação) - e as plantas regeneradas não sobreviveram.

A sobrevivência e desenvolvimento das plantas regeneradas é essencial para que se possa propagá-las em meios de cultivo *in vitro* (YANG et al, 2020). O genótipo 8627 de *Lemna minor* apresentou alta taxa de sobrevivência das plantas regeneradas (88% para plantas regeneradas a partir de calos no início ou no fim do subcultivo R2), o que demonstrou que as plantas regeneradas são perfeitamente capazes de continuar se desenvolvendo e formando colônias idênticas às frondes regeneradas, de maneira rápida e homogênea. Este resultado demonstrou que o genótip 8627 de *L. minor* apresentou um excelente desempenho tanto em induzir calos como em regenerá-los em plantas novas.

O genótipo DWC124 de *L. minor* também demonstrou considerável taxa de sobrevivência das plantas regeneradas (74% para as regeneradas a partir de calos no início de R2) a partir de calos no fim de R2 demonstrando que se pode obter grande quantidade de plantas a partir da regeneração e manutenção delas.

Já as plantas regeneradas do genótipo 7498 de *S. polyrhiza* apresentaram baixa taxa de sobrevivência (máximo de 10% das regeneradas a partir de calos no fim do subcultivo R2 – com 95 a 105 dias da indução). Essa baixa eficiência tanto de regeneração de plantas quanto de sobrevivência, indicam que mais testes com diferentes reguladores de crescimento devem ser realizados para que se possa aumentar a eficiência de regeneração de plantas a partir de calos para este genótipo.

Um outro fator que difere entre as espécies, é o tempo necessário para que as frondes se regenerem. Wang (2016) observou regeneração de *S. polyrhiza* após cerca de duas a três semanas em meo de cultura, assim como ocorreu no estudo de Yang et al (2018b), enquanto outros trabalhos com *Spirodela* relataram regeneração após 4-5 semanas (Li et al, 2004). Já em *Lemnas*, a regeneração começa a ocorrer entre 10 e 20 dias após a passagem dos calos para os meios de regeneração (STEFANIAK, WOŹNY e BUDNA 2002; LI et al, 2004). No presente trabalho, pode se notar o surgimento de pequenas frondes nos calos das *Lemnas* em cerca de 15 a 20 dias após a exposição a luz em meio de regeneração, já no caso da *Spirodela*, o surgimento de folhas nos calos se deu cerca de 30 dias após a exposição à luz, em meios de regeneração.

6.3. Crescimento em antibióticos

O agente de seleção mais comumente utilizado em estudos com as Lemnaceaes, é a canamicina, apesar deste antibiótico não ser amplamente empregada em monocotiledôneas devido a insensibilidade das células destas espécies a este antibiótico (WILMINK e DONS, 1993; YANG et al, 2018a). Em protocolos de transformações genéticas em *Lemna* a concentração de canamicina utilizada variou entre 50 e 125 $mg.L^{-1}$ (CHHABRA et al, 2011; Yamamoto et al, 2001).

Outros estudos, como o de Yang e colaboradores (2018a) utilizaram geneticina como agente seletivo de plantas transgênicas. No trabalho de Yang et al, (2018b) *Lemna minor* se mostrou intolerante a geneticina em concentrações maiores a 20 $mg.L^{-1}$, o que coincide com os resultados obtidos no presente estudo, onde com 10 $mg.L^{-1}$ já não foi possível notar desenvolvimento das plantas de *Lemna*, que pereceram ao longo dos dias em contato com este antibiótico. Já as plantas de *Spirodela* também se mostraram intolerante em concentrações superiores a 20 $mg.L^{-1}$.

Tetraciclina quando absorvida por *L. minor* pode alterar o metabolismo da planta acarretando redução drástica de desenvolvimento (BACIAK et al, 2016). Os testes com tetraciclina mostraram que as doses testadas foram todas letais, o que indica uma alta intolerância das plantas para este antibiótico.

Em transformações via biolística, principalmente de cloroplastos, a seleção das plantas transgênicas se dá pelo gene *aadA*, responsável por codificar um aminoglicosídeo adenil transferase que confere resistência aos antibióticos estreptomicina e espectinomicina (GOLDSCHMIDT-CLERMONT, 1991; SVAB e MALIGA, 1993; FISCHER et al, 1996). A capacidade de regeneração de calos em meios de cultura com adição de estreptomicina em concentração de 200 $mg.L^{-1}$ e espectinomicina em 50 $mg.L^{-1}$, se mostrou baixa ou nula respectivamente, o que comprova que os calos não suportam essas concentrações de antibióticos. O uso do antibiótico tobramicina nos testes de resistência a antibiótico no presente estudo se deu para se avaliar a eficiência deste como agente seletivo, uma vez que este vem se mostrando como uma alternativa eficiente ao antibiótico espectinomicina em transformação de cloroplastos (TABATABAEI, RUF e BOCK, 2017). Os presentes experimentos demonstraram que concentrações de 100 a 300 $mg.L^{-1}$ seriam as mais apropriadas em termos de seleção, uma vez que a partir da concentração de 300 $mg.L^{-1}$ já não houve desenvolvimento das plantas em nenhum dos três genótipos testados.

Nos testes realizados no presente trabalho, a canamicina se mostrou eficiente para ser utilizada como agente seletivo de lentilhas d'água. A partir do teste com calos no fim do subcultivo R2 (140 a 150 dias da inoculação), a concentração de 30 $mg.L^{-1}$, acompanhada de timentin permitiu a regeneração de cerca de 38% dos calos em plantas, e o aumento da concentração de canamicina de 30 para 50 $mg.L^{-1}$ promoveu a redução para cerca de 24% na eficiência de regeneração. O uso de canamicina como agente de seleção de plantas transformadas, nas concentrações de 30 $mg.L^{-1}$ e 50 $mg.L^{-1}$, se mostraram capazes de selecionar plantas transformadas e impedir que plantas não transformadas se desenvolvessem plenamente nos meios de seleção.

O uso do antibiótico timentin no meio de seleção, vai além de controlar o crescimento da *Agrobacterium*, e posteriormente eliminá-la. O timentin também auxilia no processo de regeneração de plantas, podendo aumentar significativamente a eficiência de regeneração (NAUERBY, BILLING e WYNDAELE, 1997; CHENG, SCHNURR e KAPAUN, 1998). No presente trabalho, no teste de regeneração de calos na presença de timentin, pode-se notar aumento que variou entre 4 e 8% (dependendo da idade dos calos testados) na taxa de regeneração de plantas deste tratamento quando comparado ao controle (meio de regeneração sem adição de nenhum antibiótico), o que demonstra, que o antibiótico timentin auxilia na regeneração de plantas.

6.4. Transformação genética

Diversos fatores alteram a eficiência de transformação genética de uma planta, como por exemplo o meio de pré-cultura, período de incubação da suspensão bacteriana em contato com a amostra vegetal, a densidade óptica, pH, o período de co-cultivo, a escolha da estirpe bacteriana, a dosagem de antibiótico e de acetoceringona, entre outros (GODWIN et al, 1991; CHHABRA et al, 2011; YANG et al, 2020).

A acetoceringona (AS) é adicionada ao meio de cultura com a suspensão bacteriana para melhorar a eficiência de transmissão do T-DNA bacteriano para o genoma da planta, pois ativa os genes de virulência do plasmídeo Ti (tumor inducing) da *Agrobacterium* que estão envolvidos na transferência do fragmento de T-DNA da bactéria para as células da planta (SHEIKHOLESLAM e WEEKS 1987; CHHABRA et al., 2011, YANG et al, 2020).

Chhabra et al (2011) e Cantó-Pastor et al (2014) testaram diferentes doses de AS (50 a 200 μM) em *Lemna minor* e a concentração de 100 μM levou ao maior número de plantas GUS positivas. Em outros estudos com *Lemna*, como o de Yang et al (2018b), também foi utilizada a concentração de 100 μM de AS, o que resultou em maior eficiência de transformantes. Devido a esses dados, no presente trabalho, a concentração de AS utilizada foi de 100 μM.

Um pH mais baixo, de cerca de 5,2 a 5,8 dos meios de cultura promove aumento da eficiência de transformação pois ativa a região de virulência (*Vir*) da bactéria, promovendo maior infecção da mesma e consequentemente aumentando a chance de inserção do plasmídeo na célula da planta (ANDRADE, SARTORETTO e BRASILEIRO, 2003; CHHABRA et al, 2011; YANG et al, 2018b). Desta forma, o pH dos meios de cultivo no presente trabalho, não apenas durante os experimentos de transformação, mas nos de manutenção de plantas e demais experimentos, foi mantido a 5,8.

O período de co-cultivo também varia de acordo com o protocolo de transformação. Cantó-Pastor et al (2014) transformou *L. minor* via *Agrobacterium* utilizando dois dias de co-cultivo, já Chhabra et al (2011) utilizou três dias. No presente estudo, foi utilizado dois dias de co-cultivo com uma suspensão de Agrobactéria de 0,5 (OD600 value). Estes fatores (período de co-cultivo e OD600) são essenciais, devido ao fato de que concentrações bacterianas muito altas podem levar a morte do tecido vegetal pela alta população de Agrobactéria, enquanto concentrações muito baixas acarretam a ineficiência de transformação (YANG et al, 2020).

A expressão transiente de GUS nos calos mostrou alta eficiência de transformação (82,2%). Em trabalhos como o de Cantó-Pastor et al (2014), a expressão transiente do gene repórter (GFP), em transformação de *L. minor* via *Agrobacterium* se deu a 59%. Isso demonstra que as taxas de expressão transiente em calos transformados desta espécie são relativamente altas. Em contrapartida, as taxas de sucesso de transformação genética estável nos estudos já publicados para *Lemna minor* é baixa, variando entre 0,24% e 3,8% (CHHABRA et al, 2011; YANG et al 2020).

Já no caso das frondes regeneradas, houve alta percentagem de regeneração de calos transformadas o que permitiu o desenvolvimento de escapes. Também, observou-se a presença de quimeras pela coloração pontual em regiões das frondes o que resulta na perda do transgene ao longo da multiplicação dos eventos positivos. Assim, ao se multiplicar, a planta não foi capaz de propagar esses genes para as próximas gerações de forma estável. Também pode ter ocorrido o desenvolvimento de plantas a partir de uma célula do calo que, apesar de ter recebido o plasmídeo, este não se inseriu no genoma da planta, o que implicou em conferência de resistência momentânea ao antibiótico de seleção (YANG et al, 2020).

As quimeras são um obstáculo para a obtenção de plantas transgênicas (CAO, FOUROUNJIAN e YANG, 2020), e os protocolos de transformação de Lemnaceae devem buscar reduzir-los devido a rapidez com que as plantas se multiplicam.

Para que haja redução de plantas escapes, o meio de seleção deve passar por melhorias para que possa permitir apenas a regeneração de folhas que possuam o gene de resistência ao antibiótico, e assim impedir a regeneração e o crescimento de plantas não transformadas, eliminando-as lentamente (YANG et al, 2020). Uma alternativa seria o aumento de concentração do antibiótico de seleção, ou até mesmo a troca de gene de seleção (CHEN, 2011; YANG et al, 2020), ou também a utilização de meio de cultura líquido para maior contato das células ao agente seletivo.

Os PCRs com iniciadores do gene *VirG* são utilizados para conferir se as plantas consideradas transgênicas não apresentam resquícios da Agrobactéria. Os resultados de PCR obtidos neste trabalho demonstraram a presença do gene *nptII* nos eventos que cresceram em meio seletivo com 30 $mg.L^{-1}$ de canamicina. Entretanto, o PCR também amplificou o gene VirG, confirmando a presença da Agrobactéria nas plantas, sendo assim, as plantas obtidas não eram transformadas de maneira estável, mas apresentavam expressão transiente do gene *uidA*. O resultado demonstrou que seriam necessárias mais passagens das plantas em meios de seleção para que se pudesse eliminar a bactéria completamente, evitando falsos positivos. Isso, porém requer sobrevivência das plantas, o que não ocorreu após a segunda seleção.

Isso mostra que, apesar de se haver protocolos de transformação genética de calos de lentilhas d'água, os mesmos ainda se apresentam ineficientes (YANG et al, 2020) e se mostraram de difícil reprodução uma vez que, devido ao período de duplicação de suas frondes ser extremamente rápido, há maiores chances de a célula transformada se perder nas multiplicações celulares.

Os resultados obtidos no presente trabalho devem auxiliar futuros estudos de cultura de tecidos e transformação genética para os genótipos de *Lemnoidea*e com amplo potencial para fins biotecnológicos.

7. CONCLUSÃO

A indução de calos foi obtida nos três genótipos (7498 de *Spirodela polyrhiza*, e 8627 e DWC124 de *Lemna minor*) a partir de plantas inteiras e o tratamento com adição de 0,25 $mg.L^{-1}$ de 2,4-D e 1 $mg.L^{-1}$ de TDZ foi o que demonstrou maior eficiência de indução de calos para os três genótipos testados. A indução de calos no escuro possibilitou a obtenção de um número de calos suficiente para estudos de regeneração de plantas para os três genótipos, enquanto a indução de calos na presença de luz somente ocorreu no genótipo 8627 de *L. minor*.

Os tratamentos que possibilitaram as melhores taxas de regeneração, foram: MS diluído sem adição de regilador, e MS diluído com adição de 0,2 $mg.L^{-1}$ de BAP (tratamento MR2). Quanto as idades dos calos, a melhor eficiência de regeneração para *L. minor* 8627, foi de 88% a partir de calos no início do subcultivo R2 (com 120 a 130 dias da inoculação) em no fim de R2 (com 140 a 150 dias). *L. minor* DWC124 apresentou a melhor taxa de regeneração (74%) a partir de calos no início do subcultivo R2 (com 120 a 130 dias). E *S. polyrhiza* 7498 apresentou 44% de regeneração a partir de calos no início do subcultivo R1 (com 45 a 55 desde a inoculação) e no meio do subcultivo R2 (com 85 a 95 dias), porém, este genótipo foi o que apresentou a taxa mais baixa de sobrevivência dessas plantas regenetadas (10%).

Os experimentos de resistência a antibióticos indicaram que, dos tratamentos testados, para o genótipo 8627 de *L. minor*, canamicina a 30 $mg.L^{-1}$ e tobramicina a 100 $mg.L^{-1}$ foram os apresentaram concentrações ideais para seleção de plantas com sobrevivência entre 40 e 60% das plantas. Para *S. polyrhiza*, os tratamentos com canamicina a 50 $mg.L^{-1}$, estreptomicina a 100 $mg.L^{-1}$ e espectinomicina a 30 $mg.L^{-1}$ foram o que permitiram a sobrevivência de cerca de metade das plantas. Já para o genótipo DWC124 de *L. minor* nenhuma concentração dos antibióticos testados se demosntraram ser eficiente em termos de seleção de plantas.

A eficiência de transformação genética transiente do genótipo 8627 de *L. minor* via *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor pCAMBIA2301 determinada pelo teste histoquímo do GUS, foi de 82,2% em calos e de 2,7% nas frondes regeneradas, resultados que indicam a necessidade de melhorias no protocolo visando buscar a obtenção da transformação estável para essa espécie de lentinlha d'água.

REFERÊNCIAS

AN, D.; ZHOU, Y.; LI, C.; XIAO, Q.; WANG, T.; ZHANG, Y.; WU, Y.; LI, Y.; CHAO, D. Y.; MESSING, J.; WANG, W. Plant evolution and environmental adaptation unveiled by long-read whole-genome sequencing of *Spirodela*, **PNAS**, v. 116, n. 38, p. 18893-18899, 2019.

ANDRADE, G. M.; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium spp*., **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 465-476. 2003.

ANDRADE, S. R. M. de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. 16 p. Planatina: Embrapa Cerrados, 2002.

APPENROTH, K. J.; BORISJUK, N.; LAM, E. Telling Duckweed Apart: Genotyping Technologies for the Lemnaceae, **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, v.19, p. 1-10, 2013.

APPENROTH, K. J.; SREE, K. S.; BÖHMC, V.; HAMMANND, S.; VETTER, W.; LEITERER, M.; JAHREIS, G. Nutritional value of duckweeds (*Lemnaceae*) as human food, **Food Chemistry**, v. 217, p. 266–273, 2017.

ASHBY, E.; WANGERMANN E.; WINTER, E. J. Studies in the Morphogenesis of Leaves. III. Preliminary Observations on Vegetative Growth in *Lemna minor*, **The New Phytologist**, v. 48, n. 3, p. 374-381, 1949.

BACIAK, M., SIKORSKIA, L., PIOTROWICZ-CIÉSLAK, A. I., ADOMAS B. Content of biogenic amines in *Lemna minor* (common duckweed) growing in medium contaminated with tetracycline, **Aquatic Toxicology**, v. 180, p. 95-102, 2016.

BEUKELAAR, M. F.A.; ZEINSTRAA, G. G.; MESA, J. J.; FISCHER, A. R. H. Duckweed as human food. The influence of meal context and information on duckweed acceptability of Dutch consumers, **Food Quality and Preference**, v. 71, p. 76–86, 2019.

BHANTHUMNAVIN, K.; MCGARRY, M. G. *Wolffia arrhiza* as a Possible Source of Inexpensive Protein, **Nature**, v. 232, p. 495, 1971.

BOGNER, J. The free-floating Aroids (Araceae) – living and fóssil, **Zitteliana**, v. 49, p 113-128, 2009.

BORISJUK, N.; CHU, P.; GUTIERREZ, R.; ZHANG, H.; ACOSTA, K.; FRIESEN, N.; SREE, K. S.; GARCIA, C.; APPENROTH, K. J.; LAM, E. Assessment, validation and deployment strategy of a two-barcode protocol for facile genotyping of duckweed species, **Plant Biology**, v. 17 (Suppl. 1), p. 42–49, 2015. doi:10.1111/plb.12229

BURNS, M.; HANSON, M. L.; PROSSER, R. S.; CROSSAN, A. N.; KENNEDY, I. R. Growth Recovery of *Lemna gibba* and *Lemna minor* Following a 7-Day Exposure to the Herbicide Diuron, **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 95, p. 150–156, 2015.

CANTÓ-PASTOR, A.; MOLLÁ-MORALES, A.; ERNST, E.; DAHL, W.; ZHAI, J.; YAN, Y.; MEYERS, B. C.; SHANKLIN, J.; MARTIENSSEN, R. Efficient transformation and artificial miRNA gene silencing in *Lemna minor*, **Plant Biology**, v. 17, p. 59–65, 2014.

CAO, X. H.; FOUROUNJIAN, P.; WANG, W. The Duckweed Genomes, Compendium of Plant Genomes, **Springer Nature Switzerland** AG, v. 1, p. 1-185, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11045-1

CERVERA, M. Histochemical and Fluorometric Assays for *uidA* (GUS) Gene Detection. In: PEÑA, L. **Transgenic Plants: Methods and Protocols**, Humana Press, v. 286, p. 203–214, 2005. doi:10.1385/1-59259-827-7:203

CHANG, W. C.; CHIU, P. L. Regeneration of *Lemna gibba* G 3 through Callus Culture. **Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie**, V. 89, p. 91–94, 1978. doi:10.1016/s0044-328x(78)80033-6

CHEN, G. Q. Effective Reduction of Chimeric Tissue in Transgenics for the Stable Genetic Transformation of *Lesquerella fendleri,* **American Society for Horticultural Science**, v. 46, p. 86-90, 2011 https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.1.86.

CHENG, Z. M., SCHNURR, J. A., KAPAUN, J. A. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation, **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 646-649, 1998.

CHHABRA, G.; CHAUDHARY, D.; SAINGER, M.; JAIWAL, P. K. Genetic transformation of Indian isolate of *Lemna minor* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and recovery of transgenic plants, **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, p. 129–136, 2011. DOI 10.1007/s12298-011-0059-5

DEMÉTRIO, C. G.; HINDE, J.; MORAL, R. A. Models for overdispersed data in entomology. In: Ferreira CP, Godoy WA (eds) Ecological modelling applied to entomology. **Springer**, p. 219-259, 2014.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue, **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.

FASAKIN, E. A.; BALOGUN, A. M.; FASURU, B. E. Use of duckweed, *Spirodela polyrrhiza* L. Schleiden, as a protein feedstuff in practical diets for tilapia, *Oreochromis niloticus* L, **Aquaculture Research**, v. 30, p. 313-318, 1999. https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00318.x

FIRSOV, A.; TARASENKO, I.; MITIOUCHKINA, T.; ISMAILOVA, N.; SHALOIKO, L.; VAINSTEIN, A.; DOLGOV, S. High-Yield Expression of M2e Peptide of Avian Influenza Virus H5N1 in Transgenic Duckweed Plants, **Molecular Biotechnology**, v. 57, p. 653–661, 2015.

FISCHER, N., STAMPACCHIA, O., REDDING, K., ROCHAIX, J. D. Selectable marker recycling in the chloroplast, **Molecular Genetics and Genomics**, v. 251, p. 373-380, I996.

GIMENES, L. L. S. **Avaliação do potencial de remoção de arsênio utilizando *Lemna minor* L.** 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2015.

GODWIN, I., TODD, G., FORD-LLOYD, B., NEWBURY, H. J. The effects of acetosyringone and pH on Agrobacterium-mediated transformation vary according to plant species, **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 671–675, 1991.

GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of chlamydomonas, **Nucleic Acids Research**, v 19, p. 4083–4089, 1991. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/19.15.4083

HAUSTETN, A. T.; GILMAN, R. H.; SKILLICORN, P.W.; VERGARA, V.; GUEVARA, V.; GASTAÑADUY, A. Duckweed, A Useful Strategy for Feeding Chickens: Performance of Layers Fed with Sewage-Grown Lemnacea Species, **Poultry Science**, v. 69, p. 1835-1844, 1990.

HE, Z.; DU, X.; YAO, W.; DAI, J. Pharmaceutical proteins produced in plant bioreactor in recent years, **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 4917-4925, 2008.

HEENATIGALA, P. P. M.; YANG, J.; BISHOPP, A.; SUN, Z.; LI, G.; KUMAR, S.; HU, S.; WU, Z.; LIN, W.; YAO, L.; DUAN, P.; HOU, H. Development of Efficient Protocols for Stable and Transient Gene Transformation for *Wolffia globosa* Using *Agrobacterium*. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, 2018.

HILLMAN W. S. The Lemnaceae, or duckweeds a review of the descriptive and experimental literature, **The botanical review**, p. 221-287, 1961.

HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. Overdispersion: models and estimation, Computational Statistics and **Data Analysis**, v. 27, p. 151-170, 1998.

HUANG, M.; FU, L.; SUN, X.; DI, R.; ZHANG, J. Rapid and highly efficient callus induction and plant regeneration in the starch-rich duckweed strains of *Landoltia punctata*, **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, p. 1-13, 2016. DOI 10.1007/s11738-016-2142-6

HUANG, M.; MA, X.; ZHONG, Y.; HU, Q.; FU, M.; HAN, YALI. Callus induction and plant regeneration of *Spirodela polyrhiza*, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 135, p. 445-453, 2018.

JEFFERSON, R. A. Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System, **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 5, p. 387-405, 1987.

LAM, ERIC. What is the true number of duckweed species? Disponivel em <http://www.ruduckweed.org/>. Acesso em: 27 jan. 2020.

LANDOLT, E. Anatomy of the Lemnaceae (duckweeds). Extreme adaptations in angiospermous hydrophytes, **Berlin:** GebruÈder Borntraeger, 1998.

LANDOLT, E.; KANDELER, R. The Family of Lemnaceae - A Monographic Study, Biosystematic Investigations in the Family of Duckweeds (Lemnaceae), Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH, Stiftung Rübel, **Zürich**, Swizerland, 1987.

LEMON, G. D.; POSLUSZNY, U. Comparative shoot development and evolution in the *Lemnaceae*, **International Journal of Plant Sciences**, v. 161, p. 733-748, 2000.

LEMON, G. D.; POSLUSZNY, U.; HUSBAND, B. C. Potential and realized rates of vegetative reproduction in *Spirodela polyrhiza*, *Lemna minor*, and *Wolffia borealis*, **Aquatic Botany**, v. 70, p. 79-87, 2001. doi.org/10.1016/S0304-3770(00)00131-5

LENG, R. A.; STAMBOLIE, J. H.; BELL, R. Duckweed - a potential high-protein feed resource for domestic animals and fish, **Livestock Research for Rural Development**, v, 7, n. 1, p. 1-11, 1995.

LES, D. H.; CRAWFORD, D. J.; LANDOLT, E.; GABEL, J. D.; KIMBALL, R. T.; Phylogeny and Systematics of *Lemnaceae*, the Duckweed Family, **Systematic Botany**, v. 27, n. 2, p. 221-240, 2002. https://doi.org/10.1043/0363-6445-27.2.221

LI, J.; JAIN, M.; VUNSH, R.; VISHNEVETSKY, J.; HANANIA, U.; FLAISHMAN, M.; PERL, A.; EDELMAN, M. Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna*, **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 457–464, 2004. DOI 10.1007/s00299-003-0724-4

LIMA, R. S. **Avaliação de Macrófitas Lemnaceas no Polimento de aguas residuárias e seu uso na cultura de feijão**. 2018. 67f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Irrigação e Drenagem) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP, 2018.

MCCULLAGH, P.; NELDER, J. A. Generalized linear models, **Chapman and Hall**, London, 1989. https://doi.org/10.1201/9780203753736

MOON, H. K.; STOMP A. M. Effects of medium components and light on callus induction, growth, and frond regeneration in *Lemna gibba* (duckweed), **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 33, p. 20-25, 1997.

MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R: The hnp Package, **Journal of Statistical Software**, v. 81, p. 1-23, 2017.

MURASHIGE T.; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, **Physiologia plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAHAR, K.; SUNNY, S. A. Duckweed-based clean energy production dynamics (ethanol and biogas) and phyto-remediation potential in Bangladesh, **Modeling Earth Systems and Environment**, v. 6, p. 1–11, 2020.

NAUERBY, B., BILLING, K., WYNDAELE R. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*, **Plant Science**, v. 123, p. 169- 177, 1997.

ORON, G. Duckweed culture for wastewater renovation and biomass production, **Agricultural Water Management**, v. 26, 27-40, 1994.

PĂCURAR, D. I.; THORDAL-CHRISTENSEN, H.; PĂCURAR, M. L.; PAMFIL, D.; BOTEZ, C.; BELLINI C. *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation, **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 76, p. 76-81, 2011. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2011.06.004

PAGLIUSO. D.; GRANDIS, A.; LAM, E.; BUCKERIDGE, M. S. High Saccharification, Low Lignin, and High Sustainability Potential Make Duckweeds Adequate as Bioenergy Feedstocks, **BioEnergy Research**, 2020. https://doi.org/10.1007/s12155-020-10211-x

PAZMIÑO, D. M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; SANDALIO, L. M. Insights into the toxicity mechanism of and cell response to the herbicide 2,4-D in plants, **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, p. 425–427, 2012. https://doi.org/10.4161/psb.19124

PERRY, T. O. Dormancy, Turion Formation, and Germination by Different Clones of *Spirodela polyrrhiza*, **Plant Physiology**, v. 43, p. 1866-1869, 1968. DOI: https://doi.org/10.1104/pp.43.11.186

R Core Team. (2020) R: a language and environment for statistical computing. **Vienna**, AT: R Foundation for Statistical Computing.

ROLFE, S. A.; TOBIN, E. M. Deletion analysis of a phytochrome-regulated monocot rbcS promoter in a transient assay system, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 2683-2686, 1991. DOI: 10.1073/pnas.88.7.2683

SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; CORDER, M. P. M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais, **Ciência Rural**, Santa maria, v. 38, n. 3, p. 861-871, 2008.

SHEIKHOLESLAM, S. N., WEEKS D. P. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*, **Plant Molecular Biology**, v. 8, p. 291-298, 1987.

SILVA, R. P. A.; SILVIA, E. L. G.; JUNIOR, J. A. S.; SOARES, C. P.; HENRIQUES, A. B.; ARAUJO, J. L. S.; VIDAL, M. S.; MENESES, C. H. S. G. Cultura de tecidos em feijão caupi, **Journal of Biology & Farmacy and Agricultural Management**, v. 13, n 2, 2017.

SMITH, C. Stable vs. Transient Transfection of Eukaryotic Cells, **Biocompare**, 2013. Disponível em: <https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/126324-Transfection/>. Acesso em: 09 jun 2021.

SONTÁ, M.; REKIEL, A.; BATORSKA, M. Use of duckweed (*Lemna* L.) in sustainable livestock production and aquaculture – a review, **Annals of Animal Science**, v. 19, n. 2, p. 257–271, 2019. DOI: 10.2478/aoas-2018-0048

SREE, K. S.; BOG, M.; APPENROTH, K. J. Taxonomy of duckweeds (*Lemnaceae*), potential new crop plants, **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 28, n. 5, p. 291-302, 2016.

STEFANIAK, B., WOŹNY, A., BUDNA, I. Callus Induction and Plant Regeneration in *Lemna Minor* L., **Biologia Plantarum**, v. 45, p. 469–472, 2002.

STOMP A. M. The duckweeds: A valuable plant for biomanufacturing, **Biotechnology Annual Review**, v. 11, p. 69-99, 2005. DOI: 10.1016/S1387-2656(05)11002-3

SVAB, Z.; MALIGA, P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 913-917, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.3.913

TABATABAEI, I., S. RUF, BOCK, R. A bifunctional aminoglycoside acetyltransferase/phosphotransferase conferring tobramycin resistance provides an efficient selectable marker for plastid transformation, **Plant Molecular Biology**, v. 93, p. 269–281, 2017. DOI 10.1007/s11103-016-0560-x

THU, P. T. L.; HUONG, P. T.; TIEN, V. V.; HAM, L. H. Regeneration and Transformation of Gene Encoding the Hemagglutinin Antigen of the H5N1 Virus in Frond of Duckweed (*Spirodela polyrhiza L.*), **Journal of Agricultural Studies**, v, 3, n. 1, p 48-59, 2015.

TUKEY, J. W. Comparing individual means in the analysis of variance, **Biometrics**, v. 5, n. 2, p. 99-114, 1949. https://doi.org/10.2307/3001913

WANG, W., HABERER, G., GUNDLACH, H., GUNDLACH, H., GLABER, C., BYRANT, T., NUSSBAUMER, M.C. LUO, A. LOMSADZE, M. BORODOVSKY, R.A. KERSTETTER, J. SHANKLIN, D.W. MOCKLER, T.C., APPENROTH, J. K GRIMWOOD, J., JENKINS, J., CHOW J., CHOI, C., ADAM, C., CAO, X.-H., FUCHS, J., SCHUBERT, I., ROKHSAR, D., SCHMUTZ, J., MICHAEL, T.P., MAYER, K.F.X., MESSING, J. The *Spirodela polyrhiza* genome reveals insights into its neotenous reduction fast growth and aquatic lifestyle. **Nature Communications**, 5:3311, 2014. https://doi.org/10.1038/ncomms4311

WANG, W.; KERSTETTER, R. A.; MICHAEL, T. P Evolution of Genome Size in Duckweeds (Lemnaceae), **Journal of Botany**, v. 2011, ID 570319, p 1-9, 2011 doi:10.1155/2011/570319

WANG, Y. Callus Induction and Frond Regeneration in *Spirodela polyrhiza*, **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 52, p. 114–119, 2016. doi: 10.17221/134/2015-CJGPB

WICKHAM, H. ggplot2: elegant graphics for data analysis, **Springer**, New York, 2016.

WILMINK, A.; DONS, J. J. M. Selective Agents and Marker Genes for Use in Transformation of Monocotyledonous Plants**, Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, p. 165-185, 1993.

XU, J.; CHENG, J. J.; STOMP, A. M. Growing *Spirodela polyrrhiza* in Swine Wastewater for the Production of Animal Feed and Fuel Ethanol: A Pilot Study, **Clean – Soil, Air, Water**, v. 40, p. 760–765, 2012.

YAMAMOTO, Y. T.; RAJBHANDARI, N.; LIN, X.; BERGMANN, B. A.; NISHIMURA, Y.; STOMP A. M. Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor*, **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 37, p. 349-353, 2001.

YANG, G.; FANG, Y.; XU, Y.; TAN, L.; LI, Q.; LIU, Y.; LAI, F.; JIN, Y.; DU, A.; HE, K.; MA, X.; ZHAO, H. Frond transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* for *Lemna Minor*. **Plant Molecular Biology**, v. 98, p. 319-331, 2018a.

YANG, G. L.; FENG, D.; LIU, Y. T.; LV, S.M.; ZHENG, M. M.; TAN, A. J. Research Progress of a Potential Bioreactor: Duckweed, **Biomolecules**, v. 11, p. 1-14, 2021a. https://doi.org/10.3390/biom11010093

YANG, J.; HU, S.; LI, G.; KHAN, S.; KUMAR, S.; HOU, H.; DUAN, P.; HOU, H. Transformation Development in Duckweeds, **The Duckweed Genomes**, v.1, p. 143-155, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11045-1_15

YANG, J.; LI, G.; HU, S.; BISHOPP, A.; HEENATIGALA, P.P.M. KUMAR, S., DUAN, P. YAO, L., HOU, H. A protocol for efficient callus induction and stable transformation of *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden using *Agrobacterium tumefaciens*, **Aquatic Botany**, v. 151, p. 80–86, 2018b.

YANG, J.; ZHAO, X.; LI, G.; HU, S.; CHEN, Y.; SUN, Z.; HOU, H. Research and application in duckweeds: A review, **Chinese Science Bulletin**, v. 66, p. 1026-1045, 2021b. https://doi.org/10.1360/TB-2020-0927

YANG, L.; HAN, H.; ZUO, Z.; ZHOU, K.; REN, C.; ZHU, Y.; BAI, Y.; YONGWANG. Enhanced plant regeneration in *Lemna minor* by amino acids, **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, n. 3, p.939-943, 2014.

YILMAZ, E.; AKYURT, I.; GÜNAL, G. Use of Duckweed, *Lemna minor*, as a Protein Feedstuff in Practical Diets for Common Carp, Cyprinus carpio, Fry, **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 4, p. 105-109, 2004.

YU, G.; LIU, H.; VENKATESHAN, K.; YAN, S.; CHENG, J.; SUN, X. S.; WANG, D. Functional, physiochemical, and rheological properties of duckweed (*Spirodela polyrhiza*) protein, **Transactions of the ASABE (American Society of Agricultural and Biological Engineers)**, v. 54, p. 555-561, 2011.

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

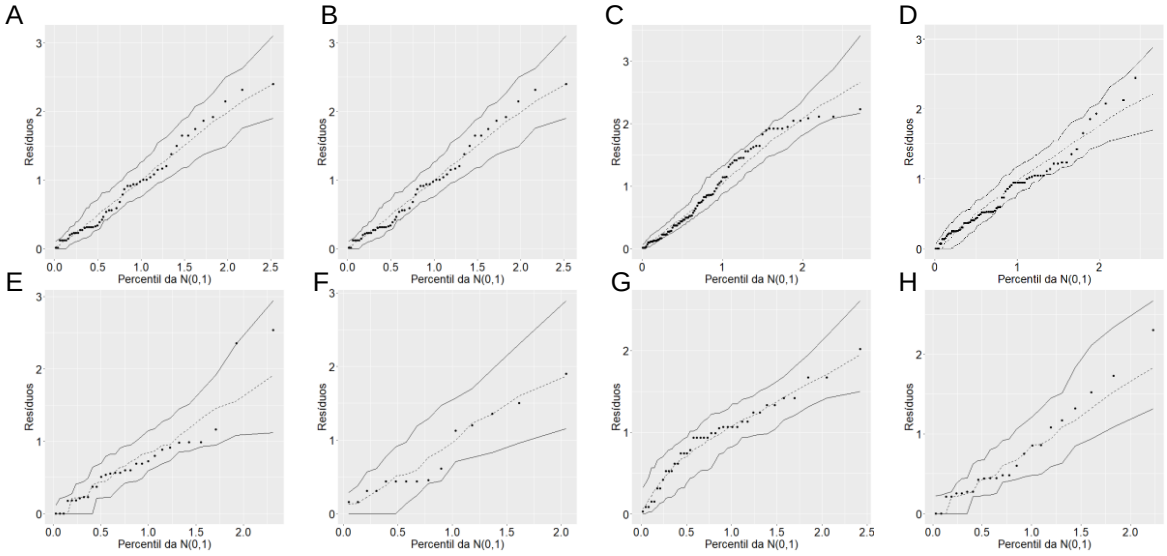
ZHAO, H.; APPENROTH, K.; LANDESMAN, L.; SALMEÁN, A. A.; LAM, E. Duckweed rising at Chengdu: summary of the 1st International Conference on Duckweed Application and Research. **Plant Molecular Biology**, v. 78, p. 627-632, 2012.

ZIEGLER, P.; ADELMANN, K.; ZIMMER, S.; SCHMIDT, C.; APPENROTH, K. J. Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae), the most rapidly growing higher plants. **Plant Biology**, v. 17 (Suppl. 1), p 33– 41, 2015.

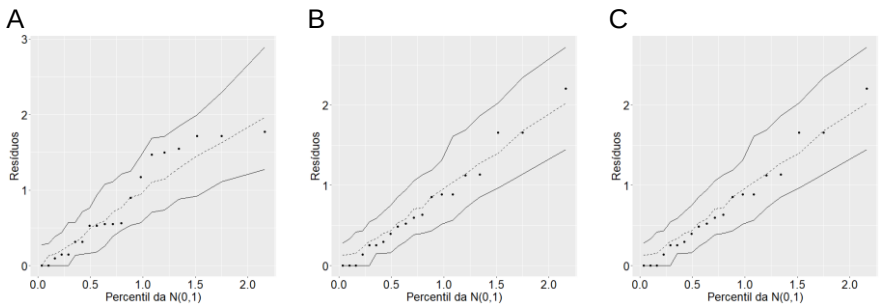
APÊNDICE

Gráficos semi-normais de probabilidades com envelope simulado do modelo quasi-binomial para experimentos de indução de calos, regeneração de calos em plantas, sobrevivência de frondes regeneradas, e regeneração de calos na presença de antibióticos, com resíduos, baseados num modelo quasi-binomial, com pontos completamente dentro do envelope simulado, indicando a adequação do modelo. Eixo y=resíduos e eixo x= percentil.

Apêndice A - Gráficos semi-normais de probabilidades com envelope simulado do modelo quasi-binomial para os experimentos de indução de calos: A) repetição 1 de indução de *S. polyrhiza* em tratamentos com diferentes concentrações de 2,4-D e TDZ; B) repetição 2 de indução de *S. polyrhiza* em tratamentos com diferentes concentrações de 2,4-D e TDZ; C) experimento com diferentes amostras foliares e idades de plantas de *S. polyrhiza*; D) indução de *S. polyrhiza* na presença de luz; E) indução de *S. polyrhiza* na ausência de luz; F) indução de calos no claro ao fim de R1 (genótipos de *Lemna minor*) e ao fim de R0 (*S. polyrhiza*). G) indução em diferentes períodos de acesso à fonte luminosa (10, 15 e 20 dias além de escuro); H) indução de DWC124 no claro.



Apêndice B - Gráficos semi-normais de probabilidades com envelope simulado do modelo quasi-binomial para os experimentos de regeneração de calos em antibióticos: Do teste 2: K) calos de 8627 no fim de R2; L) calos de 8627 no meio de R3; M) calos de 8627 no início de R3.



ANEXO

Meios de Cultura

Meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962): solução estoque

Composto	**mg.L^{-1-1}**
Ácido bórico	6,2
Cloreto de cálcio	440
Cloreto de cobalto	0,025
$FeSO_4.7H_2O$	27,84
Fosfato de potássio	170
Iodeto de potássio	0,83
Molibidado de sódio	0,25
Na_2EDTA	37,3
Nitrato de amônio	1650
Nitrato de potássio	1900
Sulfato de cobre	0,025
Sulfato de magnésio	370
Sulfato de manganês	16,9
Sulfato de zinco	8,6

O meio de cultura MS teve pH aferido para 5,8. A autoclavagem se deu em 20 minutos a 121 °C a 1 atm. Para MS sólido: adição do agente geleificante Phitagel: 2,3 g/L^{-1}.

No caso do meio MS diluido, foi adicionado 0,5 do volume de água deionizada.

Meio LB: solução estoque

Composto	**mg.L^{-1-1}**
Estrato de levedura	5
Cloreto de sódio	10
Triptona	10

O meio de cultura LB teve pH aferido para 7. A autoclavagem se deu por 20 minutos a 121 °C a 1 atm. Para LB sólido: adição de 15 g/L^{-1} de Agar microbiológico.