

JULIANA ROCHA VAEZ

AVALIAÇÃO DE FATORES ASSOCIADOS À REGENERAÇÃO *IN VITRO*  
E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CINCO  
CULTIVARES DE MANDIOCA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

V125r  
2007

Vaez, Juliana Rocha, 1978-  
Aavaliação de fatores associados à regeneração *in vitro* e transformação genética de cinco cultivares de mandioca / Juliana Rocha Vaez. – Viçosa, MG, 2007.  
xvii, 119f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Mandioca - Aspectos genéticos. 2. Mandioca –  
Propagação *in vitro*. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II.Título.

CDD 22.ed. 633.6823

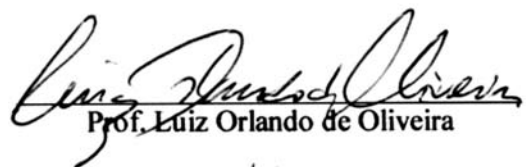
JULIANA ROCHA VAEZ

AVALIAÇÃO DE FATORES ASSOCIADOS À REGENERAÇÃO *IN VITRO*  
E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CINCO  
CULTIVARES DE MANDIOCA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 10 de dezembro de 2007.

  
Prof. Wagner Campos Otoni

  
Prof. Luiz Orlando de Oliveira

  
Profa. Andreia Barcelos Passos Lima

  
Profa. Valéria Monteze Guimarães  
(Co-Orientadora)

  
Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Orientador)

Aos meus pais Léo Vaez de Almeida e Edna Vaez e às minhas irmãs Luciana e Liliana Vaez, fontes de amor, apoio e incentivo, que me ajudaram a tornar mais este sonho em realidade.

Com muito carinho dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Bioquímica Agrícola, pela oportunidade de realização do curso.

Ao meu orientador professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela orientação, oportunidade, paciência, pelos ensinamentos e pela gentileza e amizade.

Ao professor Wagner Campos Otoni, pelos ensinamentos, pelo incentivo, pela amizade, confiança e por me receber em seu laboratório como se eu fosse uma orientanda sua e permitir a realização de parte dos experimentos desta tese.

Ao professor Francisco José Lima Aragão, pelos ensinamentos, pela atenção e por ter-me acolhido de forma receptiva em seu laboratório.

Ao professor Francisco Assis de Paiva Campos, pela gentileza em me receber em seu laboratório para o desenvolvimento desta tese.

À professora Andreia Barcelos, pelo carinho, pelas conversas, pelos ensinamentos e pela atenção e amizade.

Ao pesquisador Dr. Adilson Kenji Kobayashi, da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, por ter-me cedido as linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas nos experimentos deste trabalho.

Aos professores do Curso de Bioquímica Agrícola, em especial à professora Valéria Monteze Guimarães, pelo carinho.

À Claudia Fogaça, pela concessão de várias plantas das diferentes cultivares de mandioca (Mantiquira, Parazinho, Vassourinha e Urubu), que eram parte do seu material de tese de doutorado.

À minha família, pela força, em especial ao meu pai, pela imensa ajuda e pelo apoio em todos os momentos deste doutorado; e à minha irmã Liliana, pelas infundáveis correções das referências bibliográficas desta tese.

Aos meus amigos Thiago, Ana Karina, Fabíola Dias, Wlad, César, Marcelo Minerim, Paulinha, Akiriko, Sandra Eulália, Laudiene, Lourdes Iarema, Ana Rossi, Ana, Kenny e Elsa, pela amizade e pelo apoio e incentivo.

Aos meus colegas de laboratório Abdul, Camila, Cíntia, Eduardo, Emmanuel, Fábio, João Paulo, Júnior e Tiago, em especial às minhas amigas queridas Fabíola Heredia e Juliana Brasil, pelo carinho e agradável convívio.

Ao Júnior e à Tina, pelo amor incondicional.

Ao Eduardo, pelas incontáveis gentilezas e pela atenção e amizade.

À Lili, pela confiança, amabilidade, pelas incontáveis ajudas e pela amizade.

Ao professor Cascon, pelo uso da máquina fotográfica.

Ao Darwin, pelas fotos.

Ao Júnior, pelas análises estatísticas.

A Geovanna Navarro e Andréa Rachel Cruz, pelo carinho, apoio e pela amizade.

Ao meu padrinho Aloísio, pelo carinho e pela confiança e presença em todos os momentos importantes da minha vida.

Aos meus colegas do Curso de Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa e do Curso de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, pelo convívio.

Aos funcionários do Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal do Ceará, em especial ao Aloísio e à Verônica, pela colaboração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Pós-Graduação e pelo financiamento do projeto.

A todos que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

JULIANA ROCHA VAEZ, filha de Léo Vaez de Almeida e Edna Marta Rocha Vaez, nasceu em 27 de janeiro de 1978, em Pirassununga, no Estado de São Paulo.

De 1996 a 2000, cursou Engenharia Química na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRGN).

No ano de 2001, obteve o grau de especialista em Bioquímica pela UFRGN.

Em 2003, obteve o título de *Magister Scientiae* em Bioquímica Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

No segundo semestre de 2003, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de doutorado, em Bioquímica Agrícola da UFV, submetendo-se à defesa da tese em 10 de dezembro de 2007.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1.1. Mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	1
1.2. Cultura de tecidos de mandioca .....	3
1.3. Embriogênese somática.....	4
1.4. Embriogênese somática em mandioca .....	6
1.5. Organogênese.....	10
1.6. Organogênese em mandioca .....	11
1.7. Transformação genética .....	12
1.7.1. Agentes seletivos.....	14
1.7.2. Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	18
1.7.3. Transformação genética via SAAT ( <i>Sonication-assisted</i> <i>Agrobacterium-mediated transformation</i> ).....	19
1.7.4. Transformação genética da mandioca.....	21
REFERÊNCIAS.....	24

	Página
CAPÍTULO 1 .....	45
REGENERAÇÃO <i>in vitro</i> DE PLANTAS DE MANDIOCA ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz) VIA EMBRIOGÊNESE E ORGANOGÊNESE.....	45
1. INTRODUÇÃO .....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	49
2.1. Material vegetal.....	49
2.2. Indução de embriogênese somática primária da cultivar Rosinha .....	49
2.3. Indução de embriogênese somática primária das cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu.....	50
2.4. Embriogênese somática secundária da cultivar Rosinha .....	50
2.5. Maturação de embriões em estágio globular da cultivar Rosinha.....	51
2.6. Isolamento e alongamento dos embriões somáticos no estágio cotiledonar da cultivar Rosinha .....	51
2.7. Transformação via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	51
2.8. Avaliação da capacidade organogênica de diferentes regiões cotiledonares .....	52
2.9. Avaliação de qual período de maturação produziria a maior quantidade de brotos após a transformação por <i>Agrobacterium</i> .....	53
2.10. Avaliação do melhor meio de indução de organogênese .....	53
2.11. Análise Estatística .....	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
3.1. Indução de embriogênese somática primária das cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu a partir de plantas cultivadas <i>in vitro</i> .....	55
3.2. Avaliação do meio mais responsivo para o alongamento dos embriões somáticos da cultivar Rosinha .....	61
3.3. Avaliação da capacidade organogênica de diferentes regiões cotiledonares da cultivar Rosinha .....	62
3.4. Avaliação de qual período de maturação produziria a maior quantidade de brotos em cotilédones da cultivar Rosinha submetidos à transformação via <i>Agrobacterium</i> .....	64

	Página
3.5. Avaliação do melhor meio de indução de organogênese das cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha, Urubu e Rosinha ..	65
4. CONCLUSÕES .....	68
5. REFERÊNCIAS .....	70
CAPÍTULO 2 .....	80
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS DE MANDIOCA ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	80
1. INTRODUÇÃO .....	80
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	84
2.1. Material vegetal.....	84
2.2. Indução de embriogênese somática primária da cultivar Rosinha .....	84
2.3. Preparação da cepa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	85
2.4. Processo de transformação via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	86
2.4.1. Avaliação da interferência das etapas do processo de transformação por <i>Agrobacterium</i> sobre a embriogênese somática secundária .....	87
2.4.2. Influência da concentração de bactéria sobre a embriogênese somática secundária .....	87
2.5. Transformação via SAAT ( <i>Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation</i> ) .....	88
2.6. Efeito da concentração de canamicina .....	91
2.6.1. Sobre a embriogênese somática .....	91
2.6.2. Sobre a maturação dos embriões.....	91
2.7. Efeito da concentração de paramomicina .....	91
2.7.1. Sobre a embriogênese somática .....	91
2.7.2. Sobre a maturação dos embriões.....	92
2.8. Análise da expressão transiente .....	92
2.9. Análise Estatística .....	92
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	93

	Página
3.1. Avaliação de quais componentes das etapas do processo de agroinfecção poderiam estar afetando a regeneração por embriogênese somática.....	93
3.2. Influência da concentração de bactéria sobre a embriogênese somática secundária .....	96
3.3. Avaliação da expressão transiente de GUS em diferentes explantes das cultivares Rosinha, Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu, transformados via SAAT com diferentes tempos de sonicação.....	98
3.4. Efeito da concentração de canamicina sobre a indução de embriogênese somática e a maturação dos embriões somáticos.....	102
3.5. Efeito da concentração de paramomicina sobre a indução de embriogênese somática e sobre a maturação dos embriões somáticos	106
4. CONCLUSÕES .....	109
5. REFERÊNCIAS.....	111
CONCLUSÕES GERAIS .....	118

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ :	micro Einstein por metro quadrado por segundo
$\mu\text{M}$ :	micromolar
2,4-D:	ácido 2, 4-diclorofenoxiacético
2iP:	N-isopenteniladenina
$\text{AgNO}_3$ :	nitrito de prata
AIA:	ácido indol-3-acético
AIB:	ácido indol-3-butírico
ANA ou NAA:	ácido $\alpha$ -naftalenoacético
BA ou BAP:	6-benziladenina ou 6-benzilaminopurina
BIOAGRO:	Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária
CaMV:	vírus do mosaico da couve-flor
CBM:	meio básico de mandioca
CEM:	meio de alongamento da mandioca
CENARGEN:	Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia
CIAT:	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CIM:	meio de indução de mandioca
CMM:	meio de maturação de mandioca
COM:	meio de organogênese de mandioca
dicamba:	2-metóxi-3,6-diclorobenzóico
DNA:	ácido desoxirribonucléico
DO:	densidade ótica
EMBRAPA:	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESS:	embrião somático secundário
FAO:	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FEC:	calos embriogênicos friáveis
GA <sub>3</sub> :	ácido giberélico
GD:	meio Gresshoff & Doy
GUS:	β-glucuronidase
HIG:	higromicina
<i>hpt</i> :	gene da higromicina fosfotransferase
HPT:	proteína higromicina fosfotransferase
IBGE:	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KAN:	canamicina
KIN:	cinetina
LB:	meio Lúria & Bertani
mg/L:	miligramas por litro
mM:	milimolar
MS:	meio Murashige & Skoog
NaOH:	hidróxido de sódio
nm:	nanômetro
NOS:	gene da nopalina sintetase
NPT:	proteína neomicina fosfotransferase
<i>npt II</i> :	gene da neomicina fosfotransferase II
PAR:	paramomicina
PAT:	proteína fosfinotricina acetil transferase
picloram:	4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
PPT:	fosfinotricina
rpm:	rotações por minuto
PVC:	policloreto de vinila
s:	segundo
T-DNA:	DNA de transferência
TDZ:	tidiazuron
TMV:	vírus do mosaico do tabaco
X-gluc:	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronídeo

## RESUMO

VAEZ, Juliana Rocha, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2007.  
**Avaliação de fatores associados à regeneração *in vitro* e transformação genético de cinco cultivares de mandioca.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-Orientadores: Francisco de Assis Paiva Campos e Valéria Monteze Guimarães.

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das culturas fundamentais para a alimentação humana, visto que é a quarta fonte mais importante de carboidratos nos trópicos. Devido à importância que a cultura atingiu nos últimos anos, o interesse no melhoramento e desenvolvimento de novas cultivares vem crescendo. Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar fatores associados à regeneração *in vitro* e transformação genética de cinco cultivares de mandioca. Para tanto, explantes de mandioca de diferentes cultivares tiveram sua resposta embriogênica a dois reguladores de crescimento, picloram e 2,4 - D, avaliada em diversas concentrações. O regulador de crescimento 2,4 - D foi o que apresentou maior frequência embriogênica, e as suas concentrações mais indicadas para as cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu foram, respectivamente, 2, 1, 2 e 2 mg/L. A embriogênese somática é um processo pelo qual células haplóides se desenvolvem através de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta. Embriões em estágio cotiledonar podem ter seu alongamento induzido por diversas combinações de reguladores de crescimento. Com o intuito de avaliar o

meio que promoveria maior frequência de alongamento, foram testadas as seguintes combinações: 0,4 mg/L de BAP, 0,25 mg/L de BAP + 0,25 mg/L AIB, 0,4 mg/L de GA<sub>3</sub> e 0,25 mg/L de GA<sub>3</sub> + 0,25 mg/L AIB. Entre os meios avaliados, o mais adequado foi o que continha 0,4 mg/L de GA<sub>3</sub>. Para induzir organogênese, faz-se uso de combinações entre reguladores de crescimento. As combinações hormonais de 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L AIB e 1,6 mg/L BA + 1,6 mg/L AIB foram avaliadas e a maior frequência organogênica, obtida com o uso da primeira combinação citada. O processo de organogênese pode ser influenciado por vários fatores, por exemplo genótipo, tipo de explante e estágio de desenvolvimento do explante. Foram avaliadas diferentes regiões cotiledonares e período de maturação de embriões somáticos no estágio cotiledonar que produziram maior quantidade de brotos. Na cultivar Rosinha, a região cotiledonar central foi a mais adequada para indução de organogênese e o período de 15 dias de maturação, o que produziu a maior quantidade de brotos em cotilédones. Diversos protocolos de transformação de mandioca foram desenvolvidos, mas nenhum deles tem aplicabilidade universal e os sistemas de seleção utilizados ainda geram muitos escapes ou são deletérios. Há mais de 1.500 cultivares de mandioca, contudo apenas um pequeno número foi utilizado com sucesso em processos de transformação. Entre os sistemas de transformação utilizados, na cultura da mandioca há preferência pela transformação via *Agrobacterium tumefaciens* para a produção de plantas transgênicas. Com o intuito de aumentar a eficiência de transformação, foram avaliados os parâmetros que afetariam a transformação via *A. tumefaciens* da cultivar Rosinha, por diminuir a frequência de histodiferenciação. Os fatores que interferem no processo foram a paramomicina na concentração de 500 mg/L e a estirpe bacteriana EHA105. Um fator de grande importância a ser determinado no processo de transformação é a dose do antibiótico, de maneira a impedir o aparecimento de falsos positivos sem interferir, ao mesmo tempo, no potencial regenerativo dos explantes usados na transformação. Foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações dos antibióticos canamicina e paramomicina em embriões somáticos nos estádios globular e cotiledonar. Das concentrações avaliadas, as concentrações de 10 mg/L de canamicina e 20 mg/L de paramomicina foram as escolhidas para a seleção de embriões em estágio globular da cultivar Rosinha. Já das concentrações avaliadas a concentração de 10 mg/L de paramomicina foi a escolhida para a seleção de embriões em estágio cotiledonar da cultivar Rosinha. A transformação via SAAT

*(Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation)* utiliza pulsos de ultra-som para ferir o tecido-alvo da transformação. O ferimento é um fator que pode ser manipulado e ter como resposta direta o aumento na eficiência do processo de transformação. Para avaliar a eficiência desse sistema de transformação, foram realizados experimentos que analisassem a resposta regenerativa dos explantes submetidos a SAAT e a frequência da expressão do gene GUS. Foi verificado que SAAT aumentou de forma sensível a expressão transiente do gene GUS e a regeneração dos explantes foi pouco afetada pelo processo.

## ABSTRACT

VAEZ, Juliana Rocha, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, December of 2007.  
**Factor evaluations associated to *in vitro* regeneration of five cultivars of Cassava.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-Advisers: Francisco de Assis Paiva Campos and Valéria Monteze Guimarães.

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the most important crops for human consumption. It is considered the fourth most important source of carbohydrates in the tropics. The increasing importance of the culture achieved during the last years, raised the interest in the improvement and development of new cassava varieties. Therefore, the aims of the present work were to evaluate factors associated to the *in vitro* regeneration and genetic transformation of five cassava cultivars. Explants from different genotypes were evaluated for their embryogenic response to two growth regulators, picloram and 2,4 – D. The growth regulator 2,4 – D led to the best embryogenic response and the concentrations of this regulator for cultivars Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha and Urubu were two, one, two and two mg/L, respectively. Somatic embryogenesis is a process by which haploid cells develop through different embryogenic states, originating a plant. Embryos in the cotyledonary stage may have their development induced by several combinations of growth regulators. Aiming to evaluate which combination promotes the best stretching frequency, the following combinations were tested: 0.4 mg/L BAP; 0.25 mg/L BAP + 0.25 mg/L AIB; 0.4 mg/L GA<sub>3</sub> and 0.25 mg/L GA<sub>3</sub> + 0.25 mg/L AIB.

Among the evaluated media, the most adequate was the one which contained 0.4 mg/L GA<sub>3</sub>. In order to induce organogenesis, the following combinations of growth regulators were tested: 1 mg/L BAP + 0.5 mg/L AIB and 1.6 mg/L BA + 1.6 mg/L AIB were evaluated. The highest organogenic frequency was obtained with the use of the first combination mentioned. The organogenic process may be influenced by many factors, such as genotype, type of explants and developmental stage of the explants. Different cotyledonal regions and maturation periods of somatic embryos at the cotyledonal stage which produced the greatest amount of shoots were evaluated. In the case of cultivar Rosinha, the central cotyledonal region was the most adequate for organogenesis induction and the 15-day maturation period was the one which produced the highest amount of in cotyledons. Various protocols for manihot transformation were developed, however, none of them have universal applicability and the selection systems used still either generate many escapes or are deleterious. There are more than 1,500 manihot cultivars reported, however, only a few was successfully used for transformation. Among the transformation systems used, there is a preference for the transformation via *Agrobacterium tumefaciens* for the production of transgenic plants. To increase the transformation efficiency by *A. tumefaciens*, parameters which could decrease histodifferentiation were evaluated in cultivar Rosinha. The parameters that interfered in the transformation were paramomycin at a concentration of 500 mg/L and the bacterial strain EHA 105. Os fatores que interferem no processo foram a paramomicina na concentração de 500mg/L e a estirpe bacteriana EHA105. A major factor to be defined during the transformation process is the antibiotic dosage. The concentration defined should prevent false positives without interfering with the regeneration potential of the explants used in the transformation process. The effects of different concentration of kanamycin and paramomycin on somatic embryos were evaluated in globular and cotyledonal stages. The concentrations of 10mg/L (kanamycin) and 20 mg/L (paramomycin) were chosen for embryo selection in globular stage of cultivar Rosinha. For embryo selection in cotyledonal stage of cultivar Rosinha the concentration of 10mg/L paramomycin was chosen. The transformation via SAAT (Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation) uses ultrasound pulses to wound the tissue and this factor can affect transformation efficiency. In order to evaluate the efficiency of this transformation system, experiments were conducted which evaluated the regenerative response of explants that had undergone the SAAT

procedure as well as the frequency of the GUS gene expression. It was verified that SAAT caused an increase on the transient expression of the GUS gene and the regeneration of explants were slightly affected by the process.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

Mandioca é um arbusto perene lenhoso originário do continente latino-americano, provavelmente da Bacia Amazônica (OLSEN; SCHAAL, 1999). Pertence à família Euphorbiaceae, na qual outras plantas comercialmente importantes, como a mamona (*Ricinus communis* L.) e a seringueira (*Hevea brasiliensis*), também estão incluídas (PUONTI-KAERLAS, 1998; EL-SHARKAWY, 2004). Amplamente cultivada pelos aborígenes na época do descobrimento do Brasil, foi introduzida em quase toda a América e difundida para outros continentes, especialmente África e Ásia (FUKUDA; OTSUBO, 2003).

Atualmente, a mandioca é uma das culturas mais importantes para a alimentação humana nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, visto que aproximadamente 600 milhões de pessoas se alimentam dessa cultura diariamente. Em todo o mundo, há mais de 16 milhões de hectares plantados de mandioca, e anualmente são produzidas mais de 170 milhões de toneladas (ANDERSON et al., 2004). Entre os continentes, a África é o maior produtor mundial, seguido pela Ásia e América Latina (FUKUDA; OTSUBO, 2003). O Brasil ocupa a segunda posição na cultivo mundial de mandioca (13,46% do total) (GOMES; LEAL, 2003), com uma produção de 26.662.188 toneladas de raízes em 2006 (IBGE, 2007). Entre os principais estados produtores em 2005, destacam-se: Pará (4.797.757 t), Bahia (4.611.676 t), Paraná (3.308.000 t), Maranhão (1.529.986 t), São Paulo (1.144.880 t),

Rio Grande do Sul (1.129.500 t), Minas Gerais (927.515 t) e Ceará (826.017 t). A mandioca teve variação positiva de 3,6% na produção de 2006 em relação ao ano anterior e apresentou uma perspectiva positiva de 1,2% com relação à produção esperada em 2007 (IBGE, 2007).

Embora seja a quarta fonte mais importante de carboidratos nos trópicos, atrás apenas do arroz, da batata e do milho, essa cultura não recebe ainda a atenção dos órgãos de pesquisa, no sentido de aumentar a sua produtividade (SOUZA et al., 2002). Esse fato pode ser verificado pelo comportamento da produtividade média dos países latino-americanos na década de 1990. Nesses países, a média observada não sofreu nenhuma alteração no período, indicando que o padrão tecnológico utilizado na cultura não foi modificado e possíveis alterações na produção provavelmente estão associadas às mudanças na área plantada (CARDOSO; SOUZA, 2002).

Apesar de a tecnologia utilizada no plantio da mandioca não ter sido modificada nos anos de 1990, a área plantada aumentou, e com isso a produção da mandioca cresceu em mais de 75% nos últimos 30 anos, o que confirma o *estatus* de gênero de primeira necessidade dessa cultura (ANDERSON et al., 2004).

A cultura da mandioca é desenvolvida predominantemente por pequenos agricultores para a sua subsistência (MATTOS et al., 2002), uma vez que ela se adapta a uma ampla gama de condições climáticas. A mandioca adapta-se facilmente às áreas consideradas marginais caracterizadas pela baixa fertilidade do solo e à irregularidade do regime pluviométrico e apresenta certa tolerância ao estresse hídrico; suas raízes podem ser armazenadas no solo por um período considerável, sem que isso ocasione grandes perdas de qualidade e rendimento (ROCA, 1990; PUONTI-KAERLAS, 1998; CEBALLOS et al., 2004; EL-SHARKAWY, 2004). A época flexível de colheita e o fato de a mandioca produzir mais amido por unidade de área que qualquer outra cultura – à exceção da batata – tornam essa cultura bastante vantajosa em relação às demais fontes de carboidratos (FREGENE; PUONTI-KAERLAS, 2002).

Há, entretanto, fatores negativos, como o baixo conteúdo protéico (1-2%) e de aminoácidos sulfurosos (COCK, 1985; PUONTI-KAERLAS, 1998); a rápida deterioração das raízes após a colheita (PUONTI-KAERLAS, 1998; WENHAM, 1995); a presença de compostos fenólicos (SIRITUNGA; SAYRE, 2003), que dividem a mandioca em dois grandes grupos: a mandioca-mansa (mandioca-doce), não tóxica, destinada ao consumo humano; e a mandioca-brava (mandioca-amarga), tóxica, geralmente usada na indústria (FUKUDA; OTSUBO, 2003; PUONTI-

KAERLAS, 1998). E o grande número de pragas, doenças e vírus que atacam essa cultura (BELLOTTI et al., 1999; MATTOS et al., 2002) faz que haja a necessidade de se desenvolverem novas variedades que não apresentem tais características.

## **1.2. Cultura de tecidos de mandioca**

A multiplicação da mandioca é feita por propagação vegetativa, ou seja, manivas retiradas da planta-mãe são plantadas no campo, dando origem a novas plantas. Entretanto, a propagação por manivas ocasiona baixa produção devido a dois fatores: o envelhecimento fisiológico provocado pela constante multiplicação e a infestação por doenças que são transmitidas por sucessivas gerações (SILVA et al., 2002).

A importância que a cultura atingiu nos últimos anos foi acompanhada pelo aumento da sua produção. Diversos grupos no mundo inteiro estão trabalhando no desenvolvimento de novas cultivares de mandioca e melhorando as características das que já existem (SOUZA et al., 2005).

Entre as técnicas da biotecnologia vegetal empregadas na cultura da mandioca podem ser citadas: técnicas microbianas de bioprocessamento, técnicas de cultura de tecidos e procedimentos moleculares e celulares para caracterização e modificação de genomas (SOUZA et al., 2002). De todos esses procedimentos, a cultura de tecidos é o que provoca maior impacto na cultura da mandioca, por se tratar de uma técnica relativamente simples que não requer o uso de equipamentos muito caros e poder ser facilmente aplicada em países em desenvolvimento (SILVA et al., 2002).

Os primeiros registros da utilização das técnicas de cultura de tecidos em mandioca envolvendo estudos relacionados com o crescimento de calos (ESKES et al., 1974) e o cultivo de meristemas apicais datam de 1974 (KARTHA et al., 1974). Nos últimos anos, os trabalhos utilizando tais técnicas contemplam as mais diferentes áreas: uso da cultura de tecidos para aumentar a taxa de micropropagação (SOUZA et al., 2005), estabelecimento de protocolos de micropropagação (TORO et al., 1983; SMITH et al., 1986; STAMP; HENSHAW, 1986; ROCA et al., 1992; GARCIA et al., 1993; GUO; LIU, 1995; KONAN et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2000), limpeza clonal (KARTHA; GAMBORG, 1975; MOREIRA et al., 1977), transformação genética (FRANCHE et al., 1991; SCHÖPKE et al., 1996, 1997; ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; RAEMAKERS et al., 2001; SIRITUNGA; SAYRE, 2003;

SIRITUNGA et al., 2004; TAYLOR et al., 2004a; ZHANG; GRUISSEM, 2005) e conservação e transferência de germoplasma (DELGADO; ROJAS, 1993; CID; SILVA, 2007).

Técnicas de propagação rápida, como a propagação *in vitro*, permitem superar o problema da baixa taxa de multiplicação da mandioca. A taxa de multiplicação da mandioca pelo método convencional é de 1 para 8-12 por ano (OTOO, 1996; SOUZA et al., 2002), já por via cultura de tecidos é de aproximadamente 1 para 43 por ano (SOUZA et al., 2005).

Os pesquisadores que trabalham com a cultura da mandioca fazem uso da organogênese (PUONTI-KAERLAS et al., 1997; ZOK et al., 1993; GUOHUA, 1998; MUSSIO et al., 1998; LIMA et al., 2002; HANKOUA et al., 2005, 2006) e da embriogênese somática (STAMP; HENSHAW, 1982; SZABADOS et al., 1987; STAMP, 1987; RAEMAKERS et al., 1993abc; MATHEWS et al., 1993; KONAN et al., 1994a; TAYLOR et al., 1996; RAEMAKERS et al., 1997a, 1999ab; JOSEPH et al., 1999, 2000; WOODWARD; PUONTI-KAERLAS, 2001; DANSO; FORD-LLOYD, 2002; MA; XU, 2002; MEDINA et al., 2003; OGBURIA, 2003) como métodos regenerativos.

### **1.3. Embriogênese somática**

Descrita pela primeira vez em 1957 por Herry Waris, em *Oenanthe aquática*, e no ano seguinte pelos pesquisadores Reinert (1958) e Steward et al. (1958), em cenoura, a embriogênese somática pode ser definida como processo pelo qual células haplóides ou somáticas se desenvolvem através de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (LAUX et al., 2004).

O padrão de desenvolvimento de um embrião somático apresenta muitas características morfológicas semelhantes às do embrião zigótico. Inicialmente, ambos são caracterizados pela diferenciação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular. Ambos passam pelos estádios de desenvolvimento pró-embriônários e embriônários propriamente ditos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (ARNOLD et al., 2002). Os embriões somáticos se originam a partir de grupos de células e não apresentam conexão vascular com os tecidos (STAMP, 1987).

A embriogênese somática é altamente eficiente como processo de micropropagação porque permite altas taxas de multiplicação e resulta em embriões individualizados, que se desenvolvem em plantas (IBARAKI; MURATA, 2001).

A embriogênese pode ser influenciada por vários fatores; entre eles, citam-se o tipo de explante, a composição do meio nutritivo (sais minerais, carboidratos, hormônios), a concentração osmótica e a luz (FIGUEROA et al., 2006).

Em geral, quase todas as partes da planta podem ser usadas na indução da embriogênese somática: ápices caulinares, hipocótilos, discos foliares, segmentos foliares, inflorescências, raízes e outras (CARVALHO et al., 2006).

Meios com alta concentração salina como o de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), o SH (SCHENCK; HILDEBRANDT, 1972) e o B5 (GAMBORG et al., 1968) têm sido usados, pelos seus efeitos positivos, no crescimento e desenvolvimento de embriões somáticos, quando comparados com o desenvolvimento em meio de baixa concentração salina, como o de White (WHITE, 1943). Os carboidratos, como parte integrante do meio de cultura, têm na sacarose o seu exemplo mais utilizado para a embriogênese somática, embora outros monossacarídeos (glicose, frutose, manose, galactose e arabinose) e dissacarídeos (lactose e maltose) possam ser utilizados (GUERRA et al., 1999).

As auxinas são necessárias para a formação de agregados embriogênicos, pois estão envolvidas com a indução e iniciação da embriogênese somática (JENIK; BARTON, 2005). As citocininas podem favorecer a produção de calo embriogênico (CHUNG et al., 2005) e, em baixas concentrações, são necessárias para a embriogênese somática na maioria das culturas de células de dicotiledôneas (SCHENCK; HILDEBRANDT, 1972). Entretanto, em algumas famílias, como a Apiaceae, elas parecem não ser necessárias (AMMIRATO, 1983). Algumas espécies necessitam de que o meio seja suplementado com ácido giberélico ou ácido abscísico para o desenvolvimento de embriões somáticos, enquanto outras não necessitam dessa suplementação, uma vez que o processo de indução foi estabelecido (GUERRA et al., 1999).

Devido ao alto potencial osmótico apresentado pelo fluido do saco embrionário *in vivo*, adicionam-se substâncias como sacarose, sorbitol, polietilenoglicol, manitol ou glicerol ao meio de cultura de embriões somáticos para que a osmolaridade seja aumentada (GUERRA et al., 1999) e, conseqüentemente, a germinação precoce e o desenvolvimento anormal de embriões somáticos sejam prevenidos (AMMIRATO; STEWARD, 1971).

Sabe-se que a luz afeta o desenvolvimento dos embriões somáticos somente após a iniciação, todavia o processo de indução e iniciação de embriões somáticos geralmente é realizado no escuro (GAJ, 2004).

A embriogênese somática pode ocorrer através de duas vias distintas. A primeira é a chamada de embriogênese somática direta, em que os embriões somáticos se originam dos tecidos-matriz sem a formação de estágios intermediários de calos; a segunda é a embriogênese somática indireta, na qual os embriões somáticos se originam a partir de calo (GAJ, 2004).

#### **1.4. Embriogênese somática em mandioca**

Desde o primeiro artigo sobre embriogênese somática na mandioca (STAMP; HENSHAW, 1982), diversos outros foram publicados sobre o assunto, e a quantidade de publicações na área mostra claramente a aplicabilidade do método na cultura (Tabela1).

Apesar de diversos pesquisadores utilizarem a embriogênese como método regenerativo, o potencial embriogênico da mandioca é altamente genótipo dependente, fazendo que a regeneração de plantas por esse sistema seja possível apenas para um número limitado de cultivares (PUONTI-KAERLAS, 1998).

Diversas cultivares de mandioca já foram utilizadas no processo regenerativo via embriogênese; dentre elas, podem ser citadas: CM 430-37 (SZABADOS et al., 1987), CM 955-2 (SZABADOS et al., 1987), CMC 76 (STAMP, 1987), MCol 76 (MEDINA et al., 2003), MCol 1438 (SZABADOS et al., 1987), MCol 1684 (SZABADOS et al., 1987), MCol 1505 (SZABADOS et al., 1987; MATHEWS et al., 1993; TAYLOR et al., 1996; WOODWARD; PUONTI-KAERLAS, 2001; MEDINA et al., 2003), MCol 1468 (SZABADOS et al., 1987), MCol 2215 (SZABADOS et al., 1987; DANSO; FORD-LLOYD, 2002), Mmal 1 (SZABADOS et al., 1987), Mper 302 (SZABADOS et al., 1987), Mven 25 (SZABADOS et al., 1987), Mven 77 (RAEMAKERS et al., 1993b; DANSO; FORD-LLOYD, 2002); Mven 270 (SZABADOS et al., 1987), Nanzhi 188 (MA; XU, 2002), PRC 60a (JOSEPH et al., 1999) e Tjurug (RAEMAKERS et al., 1993b). Entretanto, as mais utilizadas são a MCol 22 (SZABADOS et al., 1987; RAEMAKERS et al., 1993abc; GROLL et al., 2001, 2002; DANSO; FORD-LLOYD, 2002) e a TMS 60444 (TAYLOR et al., 1996; RAEMAKERS et al., 1997a; SOFIARI et al., 1998; TAYLOR et al., 2001).

Tabela 1 – Tipos de reguladores de crescimentos (RC) e explantes utilizados para induzir embriogênese somática em mandioca, por referência analisada

RC	Explantes	Referências
2,4 – D	cotilédones, folhas jovens imaturas e eixos embrionários de sementes	Stamp e Henshaw, 1982
2,4 – D	cotilédones	Stamp e Henshaw, 1986
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Szabados et al., 1987
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Stamp, 1987
2,4 – D	cotilédones	Stamp e Henshaw, 1987
2,4 – D	cotilédones	Henshaw, 1989
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Mathews et al., 1993
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Raemakers et al., 1993a
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Raemakers et al., 1993b
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Raemakers et al., 1993c
2,4 – D	cotilédones	Konan et al., 1994a
2,4 – D e picloram	folhas jovens imaturas	Taylor et al., 1996
2,4 – D e picloram	folhas jovens imaturas	Raemakers et al., 1997a
2,4 – D e ANA	folhas imaturas	Sofiari et al., 1997
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Puonti-Kaerlas et al., 1997
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Mussio et al., 1998
2,4 – D, ANA e picloram	folhas imaturas	Guohua, 1998
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Li et al., 1998
2,4 – D e picloram	folhas jovens imaturas	Sofiari et al., 1998
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Joseph et al., 1999
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Raemakers et al., 1999a
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Joseph et al., 2000
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Raemakers et al., 2000
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Takahashi et al., 2000
picloram	meristemas apicais e folhas jovens imaturas	Zhang et al., 2000b
picloram	folhas jovens imaturas	Taylor et al., 2001
2,4 – D e picloram	folhas jovens imaturas	Groll et al., 2001
picloram	inflorescências imaturas	Woodward e Puonti-Kaerlas, 2001
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Groll et al., 2002
2,4 – D	folhas jovens imaturas	Ma e Xu, 2002
2,4 – D	cotilédones	Danso e Ford-Lloyd, 2002
2,4 – D, picloram e dicamba	folhas imaturas	Medina et al., 2003
picloram	meristemas apicais e folhas jovens imaturas	Hankoua et al., 2005
picloram	folhas jovens imaturas	Atehnkeng et al., 2006

Szabados et al. (1987) verificaram que a frequência embriogênica em meristemas foi de 29,55% e em folhas imaturas, de 47%. Uma vez que as folhas imaturas apresentaram a maior frequência, elas foram utilizadas como o explante para avaliar a capacidade embriogênica de 15 variedades distintas de mandioca. As variedades MCol 22, MCol 1505, MCol 1940 e Mven 270 exibiram alta capacidade embriogênica, enquanto as outras variedades mostraram resposta moderada (Mmal 1, Mbra 12, MGI 1940, MCol 1684, Mper 302 e CM 955-2) ou baixa (MCol 1468, MCol 1438, Mven25, CM 976-15 e CM430-37).

Mroginski e Scocchi (1993) ressaltaram a capacidade embriogênica da variedade MCol 1505, pois ela foi a única, entre 15 variedades testadas, que apresentou plantas regeneradas a partir de embriões. O potencial embriogênico dessa variedade também foi destacado por Medina et al. (2003), que, depois de avaliarem a frequência embriogênica de 12 cultivares, viram que a porcentagem de resposta da MCol foi superior a 50% e, entre as demais cultivares, apenas os clones CM 3306-4 e 76 tiveram um razoável percentual de embriogênese (23-27%).

Taylor et al. (1992) observaram que a cultivar venezuelana CMC 76 apresentou resposta embriogênica acima de 80%, sendo superior a 15 genótipos africanos de mandioca.

Em trabalho conduzido por Raemakers et al. (1993b) foram testadas quatro cultivares da Indonésia (Tjurug, Gading, Mangi e Faroka) e duas da América Latina (MCol 22 e Mven 77). A indução da embriogênese somática nos folhas jovens imaturas ocorreu em todas as cultivares testadas, mas foi maior nos genótipos MCol 22 e Tjurug, que tiveram frequências embriogênicas de 81% e 46%, respectivamente.

Sofiari et al. (1997), avaliando a capacidade de indução da embriogênese somática pelos hormônios ANA e 2,4 – D em sete cultivares (MCol22, MCol1505, TMS90853, Gading, Adira 1, Adira 4 e Line 11), viram que o ANA induzia maior quantidade de embriões nas cultivares testadas.

Joseph et al. (1999) desenvolveram um protocolo eficiente para indução de embriogênese na cultivar PRC 60a, com o qual obtiveram frequência embriogênica de 78%. No ano seguinte, pesquisadores (JOSEPH et al., 2000) descreveram um sistema embriogênico para *Manihot glaziovii* e, com ele, obtiveram uma frequência embriogênica de 75%.

Takahashi et al. (2000) induziram embriões somáticos na cultivar MCol 22 com meios de cultura líquido e semi-sólido com 2,4 – D. Com base nos resultados,

foi visto que o meio líquido era menos adequado, posto que a frequência embriogênica nesse meio foi de 24% e no semi-sólido, de 50%.

Woodward e Puonti-Kaerlas (2001), estudando o potencial embriogênico de tecido floral de mandioca da cultivar MCol 1505, obtiveram frequência de 78% de embriogênese.

Danso e Ford-Lloyd (2002) testaram a capacidade embriogênica de 33 acessos africanos e latino-americanos. Dos 18 acessos da África, 15 mostraram possuir competência embriogênica (TME 1808, TME 1801, TME 1939, TME 2019, TME 2037, TME 279, I 4 (2) 1425, TME 60444, TME 9, I 30572, TME 3, TME 24, Abasa fitaa, Santom e Tek bankye). Entre os acessos que responderam à embriogênese, o TME 2037 exibiu a menor competência (8,3%) e o TME 279, a mais alta (92,4%). Diferentemente dos africanos, todos os 15 acessos da América Latina (MCol 2215, MCol 22, CM 523-7, CM 3306-19, CM 3555-6, CM 4365-3, CM 6740-7, MCol 1468, Mbra 12, Mbra 191, Mbra 383, MCol 1505, Mven 77, Mper 183 e NGA-2) tiveram competência embriogênica. Mas, dos genótipos avaliados, os MCol da Venezuela e Colômbia apresentaram a mais alta competência embriogênica, enquanto os CM da Colômbia e o Mbra do Brasil mostraram média e baixa competências, respectivamente.

Machado (2004) avaliou a capacidade embriogênica de oito cultivares do Nordeste brasileiro (Rosinha, Água Morna, Amansa Burro, Aparecida, Mata Fome, Milagrosa, Rosa e Sacai). A menor capacidade embriogênica foi a da cultivar Água Morna, com 31,0%; e a maior, da cultivar Rosa, com 82,9%.

A embriogênese somática em mandioca é fortemente influenciada pela fonte de explante utilizada para a indução da embriogênese (SZABADOS et al., 1987) e pelo genótipo (SUDARMONOWATI; HENSHAW, 1993; PUONTI-KAERLAS, 1998).

Para a embriogênese somática, normalmente são empregados pelo menos dois diferentes meios de cultura. O primeiro é otimizado visando à indução da embriogênese somática, enquanto o segundo meio permite o desenvolvimento dos embriões somáticos até o estágio cotiledonar, processo conhecido como maturação (GUERRA et al., 1999). Esse primeiro meio em mandioca é conhecido como CIM (*Cassava Induction Medium*) e o segundo, como COM (*Cassava Maturation Medium*) (ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; ZHANG et al., 2000b).

Para induzir a embriogênese nos diversos tipos de explantes, eles são colocados num meio CIM suplementado com diferentes auxinas, como dicamba (SUDARMONOWATI; HENSHAW, 1993; MEDINA et al., 2003) e ANA (SOFIARI et al., 1997), nas mais diversas concentrações. Todavia, as mais utilizadas são o picloram (TAYLOR et al., 1996; RAEMAKERS et al., 1997a; ZHANG et al., 2000b; TAYLOR et al., 2001; MEDINA et al., 2003; HANKOUA et al., 2005; ATEHNKENG et al., 2006) e o 2,4 – D (STAMP; HENSHAW, 1982; SZABADOS et al., 1987; MUSSIO et al., 1998; RAEMAKERS et al., 1999a; JOSEPH et al., 2000; GROLL et al., 2001; GROLL et al., 2002).

A maturação dos embriões que se encontram no estágio globular ocorre quando estes são transferidos para meio COM, que pode estar sem reguladores de crescimento (MATHEWS et al., 1993), suplementado com baixas concentrações de citocinina (RAEMAKERS et al., 1993ac; JOSEPH et al., 2000; DANSO; FORD-LLOYD, 2002) ou com baixas concentrações de citocinina e auxina (STAMP, 1987; RAEMAKERS et al., 1993b).

Os cotilédones dos embriões maturados (RAEMAKERS et al., 1993a; RAEMAKERS et al., 1997a) ou embriões no estágio globular (SZABADOS et al., 1987; RAEMAKERS et al., 1993c; MATHEWS et al., 1993; RAEMAKERS et al., 1999a) podem ser colocados em um meio com a mesma auxina que promoveu a embriogênese somática primária e produzir novos embriões, num processo conhecido como embriogênese secundária ou cíclica.

## **1.5. Organogênese**

A organogênese é uma via de regeneração em que órgãos monopolares, como primórdios caulinares (cauligênese) ou raízes (rizogênese), são formados e desenvolvidos a partir de explantes diversos. Esses órgãos desenvolvem partes procambiais que estabelecem conexão com o tecido vascular pré-existente do explante (THORPE, 1994).

A organogênese pode ocorrer de forma indireta, em que os órgãos são gerados a partir de um grupo de células com crescimento desordenado que pode apresentar certo grau de diferenciação (calo), ou de forma direta, quando os órgãos são gerados sem passar pela fase de calo. Pode-se dividir a organogênese em três etapas distintas: 1) aquisição de competência, 2) indução da organogênese, 3)

diferenciação morfológica e desenvolvimento (CHRISTIANSON; WARNICK, 1985).

Tanto cauligênese quanto rizogênese podem ocorrer em explantes vegetais em respostas à manipulação dos níveis hormonais exógenos (SKOOG; MILLER, 1957), entretanto esses processos podem ocorrer na ausência de estimulação hormonal externa (CHRISTIANSON; WARNICK, 1985). Para induzir a organogênese, normalmente se usa uma combinação hormonal entre o grupo das citocininas, principalmente BAP e KIN, e o das auxinas, como ANA, AIA e 2,4-D (BOBÁK et al., 1995; KALLAK et al., 1997; JAIN et al., 1988; Tabei et al., 1998; BHAI; WAKHLU, 2001; MITRA; MUKHERJEE, 2001; BACCHETTA et al., 2003; PIRINÇ et al., 2003; SAIRAM et al., 2003; SCHWEEN; SCHWENKEL, 2003; BECERRA et al., 2004; MAKUNGA et al., 2005; PAEK et al., 2005; GILL et al., 2006; KATHIRAVAN et al., 2006; SUGIYAMA; IMAMURA, 2006; ZHANG et al., 2006).

### **1.6. Organogênese em mandioca**

Os primeiros trabalhos sobre organogênese em mandioca (TILQUIN, 1979; SHAHIN; SHEPARD, 1980) não apresentaram resultados reproduzíveis. Os primeiros desses resultados foram divulgados em 1994, por Konan et al. (1994abc). Em um dos trabalhos, os pesquisadores induzindo a formação de brotos em embriões zigóticos e meristemas axilares, sem a intervenção da fase de calo, obtiveram eficiência de regeneração de 95% (KONAN et al., 1994b).

Desde então, a organogênese tem sido o método regenerativo escolhido por diversos pesquisadores devido à rapidez com que a planta é obtida, o que provavelmente reduz o risco de variação somaclonal (Tabela 2).

Das cultivares de mandioca regeneradas via organogênese, a MCol 22 (PUONTI-KAERLAS et al., 1997; LI et al., 1998) e a TMS 60444 (LI et al., 1998; HANKOUA et al., 2006) têm sido as mais utilizadas.

Geralmente, uma combinação hormonal de citocinina e auxina é utilizada para induzir a organogênese em cotilédones ou em outros explantes na cultura da mandioca (Tabela 2).

Tabela 2 – Tipos de explantes e reguladores de crescimento (RC) utilizados em trabalhos com a organogênese de mandioca, por artigo-referência

Explante	RC	Referência
Meristemas	BAP e GA <sub>3</sub>	Zok et al., 1993
Cotilédones	BA, IBA	Puonti-Kaerlas et al., 1997
Calo	TDZ, cinetina, BA e 2iP	Guohua, 1998
Cotilédones	BA, 2,4 - D, GA <sub>3</sub> , cinetina, IBA, ANA	Li et al., 1998
Cotilédones	BA e IBA	Zhang et al., 2001
Cotilédones	BA e IBA	Hankoua et al., 2005

Konan et al. (1997) induziram organogênese em meristemas de cultivares latino-americanas, africanas e indianas (TMS 30555, Aipin Valenca, MBra 769, CMC 76, MCub 51, MCub 58, MMex 55, MPar 133, TMS 60444 Red, TMS 30395, TMS 50395, TMS 60142, TMS 83350, TMS 84537, TMS 90059, TMS 90853, Mpira), utilizando quatro diferentes citocininas (BAP, TDZ, zeatina e cinetina). Os melhores resultados foram obtidos com a cultivar TMS 30555 e com a citocinina BAP na concentração de 10 mg/L.

Puonti-Kaerlas et al. (1997) e Li et al. (1998) induziram organogênese em cotilédones verdes, utilizando 1 mg/L de BA e 0,5 mg/L de IBA.

Guohua (1998), avaliando o efeito de diferentes auxinas e citocininas na indução de organogênese na cultivar chinesa Nanzhi 188, obteve as mais altas frequências organogênicas quando fez uso de TDZ (56, 6% para 4,4 µM de TDZ).

### 1.7. Transformação genética

O melhoramento de plantas é bastante antigo, visto que os primeiros agricultores escolhiam as melhores sementes para a próxima safra, selecionando, assim, as variedades capazes de adaptar-se a condições adversas do ambiente (pragas, doenças, solos com baixa fertilidade e salinidade, entre outros) (MANSUR; MARGIS-PINHEIRO, 1995).

Entre 1950 e 2000, a área utilizada na agricultura praticamente não foi alterada, mas a quantidade de alimentos produzida mais do que duplicou, graças ao melhoramento genético clássico. Até 2050, as previsões de crescimento populacional

e o aumento do nível de vida da população indicam que a produtividade na lavoura deverá ser quase que duplicada novamente, para que não haja falta de alimentos. Entretanto, a aplicação exclusiva do melhoramento clássico não atenderá a essa demanda, pois o processo tem suas limitações, sendo a principal delas a impossibilidade de cruzar organismos de espécies distintas. Diante desse panorama, se se considerar somente o uso do melhoramento clássico, deverá ocorrer aumento na área cultivada, mas isso trará grande risco para áreas protegidas, como as florestas (BORÉM, 1999; BORÉM; MILACH, 1999).

O conhecimento advindo da descoberta da estrutura do DNA, da compreensão de mecanismos de controle e expressão de genes e do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular permitiu que técnicas de manipulação genética de plantas fossem desenvolvidas (BIRCH, 1997). Fazendo uso dessa ampla gama de conhecimentos gerados, foram desenvolvidas técnicas que permitem a introdução de fragmentos definidos de DNA em um genoma receptor, devendo ser a ele integrado. Nesse método pode ser evitada a transferência de características deletérias ou desfavoráveis (MA; CHEN, 2005).

As plantas modificadas geneticamente, também chamadas de transgênicas, podem ser obtidas pela introdução de genes de diferentes origens (animal, vegetal, leveduras ou bactérias) nas culturas, sem a necessidade de períodos extensos de cruzamentos (MANSUR; MARGIS-PINHEIRO, 1995).

A transferência de genes na transformação genética pode ser direta ou indireta. A transferência direta é baseada em métodos físicos ou químicos, como a biobalística e a eletroporação (SANTARÉM, 2000b), enquanto a indireta é aquela que utiliza um vetor para intermediar a transformação, como *Agrobacterium tumefaciens* (TZFIRA; CITOVSKY, 2006).

Para se ter um processo de transformação bem-sucedido, é necessário reunir diversos fatores, como: 1) o tecido-alvo da transformação deve ter competência para ser propagado ou regenerado; 2) ter agentes que selecionem os tecidos transgênicos; e 3) utilizar um processo de transformação que seja simples, eficiente, genótipo-independente e de baixo custo (HANSEN; WRIGHT, 1999).

Os ganhos que podem ser atingidos com a transformação genética de plantas têm reflexo sobre os agricultores, indústria alimentar, consumidores e, sobretudo, sobre o ambiente (OLIVEIRA, 2000). A transformação genética é uma ferramenta poderosa da biotecnologia vegetal, pois permite a produção de variedades com

qualidade nutricional superior às existentes, com características mais adequadas ao armazenamento, com o período de maturação aumentado, tolerantes à seca e resistentes a herbicidas, pragas e doenças (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

### 1.7.1. Agentes seletivos

Na transformação, o uso de antibióticos tem-se tornado rotina. No caso da agroinfecção, os antibióticos são adicionados ao meio de cultura, tanto para eliminar a *Agrobacterium* quanto para selecionar as plantas transformadas (SHAW et al., 1983). Nos demais tipos de transformação, os antibióticos são utilizados apenas para fim seletivo.

Como a cultura de tecidos é afetada pelos diferentes componentes presentes no meio de cultura, é importante a utilização de antibióticos que não afetem o sistema de regeneração das plantas. Para a eliminação da *Agrobacterium*, normalmente se utilizam os antibióticos cefotaxima e carbenicilina, pois ambos apresentam toxicidade mínima para a maioria dos tecidos vegetais (MATHIAS; BOYD, 1986). Entretanto, tem sido observado que esses dois antibióticos apresentam efeito hormonal sobre os tecidos cultivados *in vitro* e podem afetar a embriogênese em diversas plantas (NAUERBY et al., 1997).

A cefotaxima, em concentrações superiores a 500 mg/L, apresenta efeito inibitório em *Arabidopsis* (PATTON; MEINKE, 1988) e *Solanum tuberosum* (FREDERIKSEN, 1994). Em *Nicotiana tabacum*, a cefotaxima não afeta a produção de brotos provenientes de discos foliares, mas tem efeito inibitório na regeneração do explante cotiledonar (NAUERBY et al., 1997). Já em *Gossypium hirsutum* inibe ou estimula a formação de brotos, dependendo da cultivar (AGRAWAL et al., 1997).

A carbenicilina tem influência negativa em concentrações que vão desde 250-1.000 mg/L em *Arabidopsis* (PATTON; MEINKE, 1988), *Nicotiana tabacum* (LIN et al., 1995), *Solanum tuberosum* (PARK et al., 1995) e *Carica papaya* (YU et al., 2001).

Na transformação de mandioca via *Agrobacterium tumefaciens*, a carbenicilina foi utilizada na concentração de 500 mg/L (SARRIA et al., 1995, 2000; LI et al., 1996; GONZÁLEZ et al., 1998; ZHANG et al., 2000a, 2005; SIRITUNGA; SAYRE, 2003; SIRITUNGA et al., 2004; JØRGENSEN et al., 2005; IHEMERE et

al., 2006) e a cefotaxima, nas concentrações de 200 mg/L (SCHREUDER et al., 2001) e 250 mg/L (SARRIA et al., 1995, 2000).

Na seleção das células transformadas são utilizados genes conhecidos como marcadores de seleção. O gene marcador pode permitir que os transformantes tenham resistência a antibiótico ou a herbicida (SAWAHEL, 1994). Esses genes codificam proteínas com atividades enzimáticas que conferem às células transformadas a capacidade de crescer em uma condição específica (BRASILEIRO; DUSI, 1999). Tais marcadores são divididos em diferentes categorias, dependendo do tipo de seleção praticada, que pode ser positiva ou negativa. A seleção positiva é definida como aquela que permite o crescimento da planta transgênica na presença de determinado substrato (HALDRUP et al., 1998; ZHANG et al., 2000a; LUCCA et al., 2001; ARAGÃO; BRASILEIRO, 2002) e a negativa, na sua ausência (ZHANG et al., 2000a; ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; ARAGÃO; BRASILEIRO, 2002).

Os principais fatores considerados na escolha de determinado gene marcador são: a) a expressão dele não deve interferir no metabolismo normal das células transformadas; b) seu produto deve proteger, de modo efetivo, as células transformadas das propriedades inibitórias de crescimento do agente seletivo, além de permitir uma distinção fenotípica entre as células transformadas e as não-transformadas; c) a exposição do explante transgênico ao agente seletivo não deve afetar seu subsequente crescimento e regeneração em plantas inteiras e férteis (POTRYKUS; SPANGENBERG, 1995).

É importante determinar a dose do antibiótico ou do herbicida a ser utilizada e o tempo de exposição do explante ao agente seletivo, de maneira a impedir o aparecimento de falsos positivos sem interferir, ao mesmo tempo, no potencial regenerativo deles, de modo que o maior número de brotos transgênicos seja selecionado (BRASILEIRO; LACORTE, 1998).

Os genes marcadores mais utilizados são o *nptII* (BEVAN et al., 1983), *bar* (THOMPSON et al., 1987) e *hph* (WALDRON et al., 1985), que codificam, respectivamente, a enzima neomicina fosfotransferase (NPT), a qual confere resistência à canamicina (KAN) e outros aminoglicosídeos relacionados (gentamicina e paromomicina); a fosfinotricina acetil transferase (PAT), que confere resistência ao composto fosfinotricina (PPT); e a higromicina fosfotransferase (HPT), que proporciona resistência à higromicina (HIG).

A resposta da mandioca a diferentes antibióticos do grupo dos aminoglicosilados é muito variável e depende da variedade (FOURMY et al., 1996).

A canamicina é o antibiótico mais usado para a seleção de plantas transformadas com vetores que possuem o gene *nptII*, e normalmente a faixa de concentração utilizada na seleção varia de 50 a 500 mg/L. Esse antibiótico é eficiente na inibição do crescimento de células não transformadas, entretanto é ineficiente como marcador de seleção para diversas gramíneas e leguminosas (ROA-RODRÍGUEZ; NOTTENBURG, 2001). Na cultura da mandioca, esse antibiótico já foi utilizado em diversos trabalhos, em concentrações que variam de 5 até 1.000 mg/L (SCHÖPKE et al., 1996; SCHREUDER et al., 2001; SATO et al., 2004) (Tabela 3).

A paromomicina (PAR) tem sido usada por diversos pesquisadores (TORBERT et al., 1995, 1998; CHENG et al., 1997) e se mostrou mais eficiente que a canamicina como agente seletivo em algumas culturas, por afetar menos a indução embriogênica (WANG et al., 2005). Na cultura da mandioca, esse antibiótico já foi utilizado em uma série de trabalhos em diferentes concentrações: 25 mg/L (SCHREUDER et al., 2001) e 75 mg/L (SIRITUNGA; SAYRE, 2003; SIRITUNGA et al., 2004; IHEMERE et al., 2006) (Tabela 3).

A geneticina (GEN) já foi utilizada na seleção de transgênicos de mandioca na concentração de 20 mg/L (LI et al., 1996; JØRGENSEN et al., 2005) (Tabela 3).

O gene da higromicina fosfotransferase (*hpt* ou *hph*) tem sido usado como gene marcador de plantas transgênicas (ROA-RODRÍGUEZ; NOTTENBURG, 2001), quando não é possível a utilização do gene *nptII* (WILMINK; DONS, 1993). A higromicina (HIG) apresentou resultados positivos de sua utilização em protocolos de transformação de várias espécies, como tabaco, videira, pimentão, café e berinjela (MIHALKA et al., 1998; HATANAKA et al., 1999; PICOLI, 2000). O menor número de escapes e as menores concentrações de higromicina, comparadas com outros produtos utilizados para seleção de células transformadas, fazem desse antibiótico uma alternativa promissora a ser utilizada em protocolos de transformação genética (PICOLI; OTONI, 2001). Na cultura da mandioca, a higromicina foi utilizada em diferentes concentrações: 0,5 mg/L (SCHREUDER et al., 2001), 7,5 mg/L (ZHANG et al., 2000b; ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000), 15 mg/L (LI et al., 1996; ZHANG et al., 2000b; ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; JØRGENSEN et al., 2005), 25 mg/L (ZHANG et al., 2000a; ZHANG et al., 2003; ZHANG et al., 2005) e 50 mg/L (ZHANG et al., 2000a; ZHANG et al., 2005) (Tabela 3).

Tabela 3 – Trabalhos de transformação de mandioca apresentados por ordem cronológica. Genes marcadores: *gus* ( $\beta$ -glucuronidase), *luc* (luciferase), *nptII* (neomicina fosfotransferase II) e *hpt* (higromicina fosfotransferase).

Referência	Antibiótico	Gene Marcador	Gene Repórter	Transformação
Franche et al., 1991	—	—	<i>gus</i>	Biobalística
Sarria et al., 1995	Carbenicilina e cefatoxima	<i>bar</i>	<i>gus</i>	Agrobactéria
Li et al., 1996	Carbenicilina	<i>nptII, hpt</i>	<i>gus</i>	Agrobactéria
Schöpke et al., 1996	—	<i>nptII</i>	<i>gus</i>	Biobalística
Raemakers et al., 1996	—	—	<i>luc</i>	Biobalística
Schöpke et al., 1997	—	—	<i>gus</i>	Biobalística
González et al., 1998	Carbenicilina	<i>nptII</i>	<i>gus</i>	Agrobactéria
Munyikwa et al., 1998	—	<i>bar</i>	<i>luc</i>	Biobalística
Zhang et al., 2000a	Carbenicilina	<i>hph</i>	<i>gus</i>	Agrobactéria
Zhang et al., 2000b	—	<i>hph</i>	<i>gus</i>	Biobalística
Zhang e Puonti-Kaerlas, 2000	—	<i>hph</i>	<i>gus</i>	Biobalística
Sarria et al., 2000	Carbenicilina e cefatoxima	<i>bar</i>	<i>gus</i>	Agrobactéria
Schreuder et al., 2001	Cefatoxima	<i>nptII, hph</i>	<i>gus</i>	Agrobactéria
Siritunga e Sayre, 2003	Carbenicilina	<i>nptII</i>	—	Agrobactéria
Zhang et al., 2003	Carbenicilina	<i>hph</i>	<i>gus</i>	Agrobactéria
Siritunga et al., 2004	Carbenicilina	<i>nptII</i>	—	Agrobactéria
Sato et al., 2004	Cefatoxima	<i>nptII</i>	—	Agrobactéria
Zhang et al., 2005	Carbenicilina	<i>hph</i>	<i>gus</i>	Agrobactéria
Raemakers et al., 2005	—	—	<i>luc</i>	Biobalística
Jørgensen et al., 2005	Carbenicilina	<i>nptII, hpt</i>	—	Agrobactéria
Ihemere et al., 2006	Carbenicilina	<i>nptII</i>	—	Agrobactéria

O gene *bar* confere resistência aos herbicidas Liberty®, Finale® e Basta®, os quais apresentam fosfinotricina (PPT) como princípio ativo (DE BLOCK et al., 1987; WILMINK; DONS, 1993). Na mandioca, esse herbicida já foi utilizado nas concentrações de 16 e 32 mg/L (SARRIA et al., 1995; 2000) e na concentração de 20 mg/L (MUNYIKWA et al., 1998) (Tabela 3). Observou-se que a presença do herbicida no meio de indução de embriões em mandioca interfere negativamente na frequência de embriogênese (SARRIA et al., 2000).

Alternativamente, marcadores visuais como o GUS (glucuronidase) (JEFFERSON 1987), a luciferase (OW et al., 1986) e o GFP (*green fluorescent protein*) (CHALFIE et al., 1994) podem ser utilizados para detectar as plantas

transgênicas. Esses três marcadores foram utilizados para a seleção de mandioca transgênica por diversos grupos que trabalham com melhoramento genético de mandioca. Schöpke et al. (1996, 1997), Zhang e Puonti-Kaerlas (2000) e Raemakers et al. (2005) avaliaram a eficiência de sua metodologia de transformação usando GUS, Raemakers et al. (1996) e Munyikwa et al. (1998) empregando a luciferase e Vanitharani et al. (2004) utilizando o GFP (Tabela 3).

### **1.7.2. Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens***

As agrobactérias (*Agrobacterium* spp.) são microrganismos tipicamente de solo, gram-negativas, geralmente aeróbicas, pertencentes à família Rhizobiaceae (HOLT et al., 1994). O gênero *Agrobacterium* está subdividido em quatro espécies que diferem entre si pela patogenicidade e pelo modo de infecção em diferentes plantas: (i) *A. tumefaciens*, que provoca a doença conhecida como galha-da-coroa; (ii) *A. rhizogenes*, que causa a síndrome da cabeleira em raiz; (iii) *A. vitis*, que induz tumores em *Vitis* spp.; e (iv) *A. radiobacter*, que é uma bactéria não-patogênica (ANDRADE et al., 2001).

*Agrobacterium tumefaciens* é importante para os estudos de transformação de plantas devido à sua capacidade natural de introduzir DNA em plantas hospedeiras que, ao ser integrado, passa a ser expresso como parte do genoma dessas plantas (McCULLEN; BINNS, 2006).

Os processos de infecção e transferência da região do T-DNA para a célula vegetal iniciam-se com o reconhecimento e fixação da bactéria no tecido vegetal lesado por manipulações laboratoriais, tratos culturais, geadas ou insetos. A exudação de agentes quimiostáticos (compostos fenólicos, aminoácidos e monossacarídeos) pelas células da planta ferida atrai as agrobactérias (TZFIRA; CITOVSKY, 2002). Em laboratório, o uso de compostos fenólicos, em especial a acetosseringona durante o período de co-cultivo (STACHEL et al., 1986), alta pressão osmótica (USAMI et al., 1988), baixo pH (TURK et al., 1991) e temperatura (DILLEN et al., 1997), afeta positivamente a frequência de transformação.

As moléculas exsudadas em resposta ao ferimento da planta vão ativar a expressão dos genes de virulência que estão localizados na região *vir* do plasmídeo Ti. Após a indução, dá-se início à montagem do “complexo-T” (T-DNA associado a diversas proteínas), que é transferido para o núcleo da célula vegetal (GELVIN,

2000) e lá integrado ao genoma por recombinação. A inserção parece ser ao acaso, mas há preferência por regiões transcricionalmente ativas (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

A transformação via *Agrobacterium* apresenta diversas vantagens que permitem a ampla utilização desse processo na obtenção de plantas transgênicas. Entre elas, podem-se citar a sua fácil aplicabilidade, a eficiência de transformação, a inserção do gene presente na região T, geralmente em uma região transcricionalmente ativa no cromossomo vegetal, e a integração de uma única cópia no genoma vegetal (McCULLEN; BINNS, 2006).

A especificidade da interação entre a bactéria e a planta pode variar muito, mesmo dentro da mesma espécie. Essa diferença tem sido observada em milho (SCHLAPPI; HOHN, 1992), pinheiro (BERGMANN; STOMP, 1992), tomate (VANROEKEL et al., 1993), *Arabidopsis* (NAM et al., 1997), eucalipto (MULLINS et al., 1997), ervilha (SCHROEDER et al., 1993), noqueira (BENEDDRA et al., 1996) e feijão (NAGL et al., 1997), entre outras. Portanto, a determinação da melhor combinação patógeno-hospedeiro em qualquer espécie vegetal é essencial para o estabelecimento de um protocolo de transferência genética, usando-se o sistema *Agrobacterium* (McCULLEN; BINNS, 2006).

Muitos trabalhos demonstram que vários tecidos, órgãos e tipos de células dentro de uma planta podem diferir em sua suscetibilidade à transformação por *Agrobacterium* (BAILEY et al., 1994; NAM et al., 1997). Quanto à suscetibilidade de espécies, estudos recentes têm relatado a suscetibilidade de espécies anteriormente consideradas recalcitrantes, como é o caso do eucalipto (TOURNIER et al., 2003).

O principal requisito para o sucesso na obtenção de plantas transgênicas via *Agrobacterium* é a existência de uma metodologia eficiente de cultura de tecidos e regeneração da espécie-alvo (BRASILEIRO; LACORTE, 1998).

### **1.7.3. Transformação genética via SAAT (*Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation*)**

O sistema de transformação baseado no uso de agrobactérias tem sido utilizado nas mais diversas espécies vegetais. Entretanto, a maioria das monocotiledôneas e algumas dicotiledôneas não são suscetíveis à transformação por agrobactéria, fato esse facilmente comprovado pela baixa eficiência de

transformação e pelo pequeno número de plantas regeneradas (DE LA RIVA et al., 1998; PARROTT et al., 1989).

Para aumentar a eficiência da transformação genética, diversas estratégias têm sido propostas, como a utilização de vetores binários (HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996), a adição de acetosseringona ao meio de co-cultivo (STACHEL et al., 1985) e de antioxidantes (PERL et al., 1996) e o uso do bombardeamento de microprojéteis no tecido-alvo do processo de transformação para provocar ferimentos e induzir uma gama de agentes quimiostáticos, facilitando a agroinfecção (BIDNEY et al., 1992).

O ferimento é um fator que pode ser manipulado e ter como resposta direta o aumento na eficiência do processo de transformação. A injúria do tecido facilita a infecção pela bactéria *Agrobacterium*. O tipo de ferimento varia desde a simples manipulação do tecido até o ferimento obtido no bombardeamento do tecido-alvo com partículas de tungstênio; embora a frequência de transformação genética tenha sido aumentada a partir dessas modificações, ainda é necessário aperfeiçoar o processo (SANTARÉM, 2000a).

O uso de pulsos de ultra-som para ferir o tecido-alvo da transformação foi usado para aumentar a infecção por *Agrobacterium*. O efeito mais expressivo do ultra-som resulta de dois fenômenos de cavitação acústica. O primeiro descreve a cavitação transiente, no qual "microbolhas" são formadas e crescem até implodir, gerando pressão e temperatura altas durante os estágios finais da cavitação e causando danos às células e às macromoléculas circundantes. O segundo fenômeno, a cavitação estável, consiste em amplas e rápidas oscilações no tamanho da bolha, gerando forte fluxo de líquidos no meio que a circunda. Baixas velocidades desse fluxo resultam na mistura do meio circundante, enquanto altas velocidades podem ocasionar danos às células (SOLÍS et al., 2003). Essa técnica de transformação genética, mediada por ultra-som e *Agrobacterium*, foi denominada de SAAT.

O sistema de transformação via SAAT foi primeiramente descrito por Trick e Finer (1997). Nesse trabalho, seus autores demonstraram que diferentes espécies (*Glycine max*, *Triticum aestivum* e *Zea mays*) que apresentavam baixas frequências de transformação tiveram a eficiência do processo aumentada quando tratadas com SAAT. Ainda nesse trabalho, os explantes, independentemente de sua origem, que foram colocados em suspensão bacteriana e submetidos ao SAAT, tiveram um

aumento de 100 a 1.400 vezes nos níveis de expressão do gene GUS, dependendo da espécie.

Foi obtido sucesso com essa técnica em monocotiledôneas: *Triticum aestivum*, *Zea mays* (TRICK; FINER, 1997) e *Saccharum officinarum* (EFENDI, 2003); e em dicotiledôneas: *Glycine max* (SANTARÉM et al., 1998; TRICK; FINER, 1998), *Chenopodium rubrum* (SOLÍS et al., 2003) e *Vigna vulgaris* (ANDRADE et al., 2001).

Fazendo uso de pulsos de ultra-som, DNA exógeno foi introduzido em protoplastos de *Nicotiana tabacum* e *Beta vulgaris* (JOERSBO; BRUNSTEDT, 1990), e o gene da  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) foi introduzido em tecidos foliares de *Nicotiana tabacum* (ZHANG et al., 1991).

#### **1.7.4. Transformação genética da mandioca**

O melhoramento convencional da mandioca foi bem-sucedido (HERSHEY; JENNINGS, 1992), entretanto o alto grau de heterozigose, a floração irregular de algumas cultivares, a baixa taxa de germinação das sementes e a variável taxa de germinação têm impedido a geração de novas cultivares com características agronômicas desejáveis (JIN et al., 2005). Para contornar esses problemas, no início dos anos de 1990 técnicas de transformação da cultura foram desenvolvidas (SARRIA et al., 1995; LI et al., 1996; RAEMAKERS et al., 1996; SCHÖPKE et al., 1996).

Diante do potencial da engenharia genética sobre a cultura da mandioca, um grupo de pesquisadores criou a rede CBN (*Cassava Biotechnology Network*), que engloba centros de pesquisa localizados em diferentes partes do mundo: Estados Unidos (ILTA-International Laboratory for Tropical Agricultural Biotechnology), Suíça (Institute of Plant Sciences) e Colômbia (CIAT-Centro Internacional de Agricultura Tropical), e deu início a uma ampla e diversificada pesquisa sobre a aplicação das técnicas de transformação na cultura da mandioca (MASONA et al., 2001; TAYLOR et al., 2004ab). Essas pesquisas geraram transgênicos com diferentes características de interesse econômico, como variedades de mandioca resistentes a vírus e pragas (FAUQUET et al., 1992; LADINO et al., 2002; CHELLAPPAN et al., 2004; ZHANG et al., 2005), com modificações no conteúdo de amido (SALEHUZZAMAN et al., 1993; RAEMAKERS et al., 2001, 2005;

ZHANG et al., 2003; IHEMERE et al., 2006), com reduzidos níveis de compostos cianogênicos (KOCH et al., 1994; SIRITUNGA; SAYRE, 2003; JØRGENSEN et al., 2005), com aumento na meia-vida dos tubérculos colhidos (THRO et al., 1996) e com aumento no conteúdo protéico (ZHANG et al., 2003).

Vários ajustes na transformação via *Agrobacterium* (CALDERON, 1988; SARRIA et al., 1995; RAEMAKERS et al., 1993a; CABRAL et al., 1994), bombardeamento de partículas (CABRAL et al., 1994; ARIAS-GARZON; SAYRE, 1993) e eletroporação (LUONG et al., 1995) foram realizados fazendo uso da expressão transiente de genes reporteressantes das transformações com genes de interesse agronômico.

Antes das transformações com genes de interesse agronômico, vários ajustes foram realizados fazendo uso da expressão transiente na transformação via *Agrobacterium* (CALDERON, 1988; SARRIA et al., 1995; RAEMAKERS et al., 1993a; CABRAL et al., 1994), bombardeamento de partículas (CABRAL et al., 1994; ARIAS-GARZON; SAYRE, 1993) e eletroporação (LUONG et al., 1995).

As primeiras transformações em mandioca utilizando um gene agronomicamente importante foram realizadas por Arias-Garzon (1997) e White et al. (1998). Eles produziram uma variedade com teor reduzido de compostos fenólicos, e nesta a taxa de quebra dos compostos fenólicos era de 41 – 75% mais rápida que na mandioca não transformada (SIRITUNGA et al., 2004).

Há mais de 1.500 cultivares de mandioca (ALVES, 2000), contudo apenas pequeno número foi utilizado com sucesso em processos de transformação. Entre elas, podem-se citar: TMS 60444 (RAEMAKERS et al., 1996; SCHOPKE et al., 1996; GONZÁLEZ et al., 1998; ZHANG et al., 2000ab; ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; SCHREUDER et al., 2001; LADINO et al., 2002; ZHANG et al., 2003; CHELLAPPAN et al., 2004; RAEMAKERS et al., 2005; ZHANG et al., 2005), MCol 2215 (SIRITUNGA; SAYRE, 2003; SIRITUNGA et al., 2004), MCol 22 (LI et al., 1996; ZHANG et al., 2000b; ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; JØRGENSEN et al., 2005) e MPer 183 (SARRIA et al., 2000).

Somente as cultivares TMS 60444 (RAEMAKERS et al., 1996; SCHÖPKE et al., 1996; ZHANG et al., 2000b; ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; LADINO et al., 2002; CHELLAPPAN et al., 2004; RAEMAKERS et al., 2005) e MCol 22 (ZHANG et al., 2000b; ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000) tiveram sucesso com a transformação genética via bombardeamento. A transformação mediada por

*Agrobacterium tumefaciens* foi bem-sucedida somente nas cultivares MCol 22 (LI et al., 1996; JØRGENSEN et al., 2005), MCol 2215 (WHITE et al., 1998; SIRITUNGA; SAYRE, 2003; SIRITUNGA et al., 2004), MPer 183 (SARRIA et al., 2000) e TMS 60444 (GONZALEZ et al., 1998; ZHANG et al., 2000a; SCHREUDER et al., 2001; LADINO et al., 2002; ZHANG et al., 2003; ZHANG et al., 2005).

Nos protocolos de transformação de mandioca estabelecidos, os tecidos-alvo foram suspensões embriogênicas (SCHÖPKE et al., 1996; RAEMAKERS et al., 1996) ou cotilédones de embriões somáticos, dos quais plantas foram regeneradas por organogênese (LI et al., 1996) ou por embriogênese (SARRIA et al., 1995).

Independentemente do sistema de regeneração utilizado, na cultura da mandioca há preferência pela transformação via *A. tumefaciens* para a produção de plantas transgênicas (TAYLOR et al., 2004a). Entretanto, a eficiência de transformação em mandioca via agrobactéria é baixa (GONZÁLEZ et al., 1998), em torno de 1% (SARRIA et al., 2000).

O desenvolvimento de um sistema de transformação eficiente e genótipo independente é o objetivo de todos os programas de transformação genética, porém isso é impossibilitado pela variação de resposta morfogênica *in vitro*. Assim como em todas as culturas, existe grande variabilidade na resposta morfogênica entre as diferentes cultivares de mandioca aos protocolos de transformação genética existentes. Por esse motivo, é importante avaliar alguns critérios, como os fatores que possam estar interferindo no processo de transformação, quais dos sistemas de regeneração são os mais adequados e qual sistema de seleção apresenta menor interferência na regeneração (FREGENE; PUONTI-KAERLAS, 2002).

## REFERÊNCIAS

AGRAWAL, D. C.; BANEJEE, A. K.; KOLALA, R. R.; DHAGE, A. B.; NALAWADE, S.; KULKARNI, A. V.; HAZRA, S.; KRISHTAMURTHY, K. V. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 647- 652, 1997.

ALVES, J. Pesquisa revela: mandioca pode ter até 600 derivados. **Genebio**, v. 2, p. 5-7. 2000.

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture**. New York, NY: MacMillan Publishing Co., 1983.

AMMIRATO, P. V.; STEWARD, F. C. Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. **Botanical Gazette**, v. 132, p. 149-158, 1971.

ANDERSON, J. V.; DELSENY, M.; FREGENE, M. A.; JORGE, V.; MBA, C.; LOPEZ, C.; RESTREPO, S.; SOTO, M.; PIEGU, B.; VERDIER, V.; COOKE, R.; TOHME, J.; HORVATH, D. P. An EST resource for cassava and other species of Euphorbiaceae. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 527-539, 2004.

ANDRADE, S. R. M.; GOMES, D. G.; LABATE, M. T. V.; LABATE, C. A. **Transformação de *Phaseolus vulgaris* via SAAT (Sonication-Assisted *Agrobacterium*-Mediated Transformation)**. 2001. Disponível em: <[http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/posters/02/02pdf/02-019.pdf](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/02/02pdf/02-019.pdf)>. Acesso em: 14 maio 2007.

ARAGÃO, F. J. L.; BRASILEIRO, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, p. 1-10, 2002.

ARIAS-GARZON, D. I. **Genetic engineering approaches to improve agronomic traits in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)**. Columbus, OH: Ohio State University, 1997. Ph. D. thesis – The Ohio State University, Columbus.

ARIAS-GARZON, D. I.; SAYRE, R. T. Tissue specific inhibition of transient gene expression in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) tissues. **Plant Science**, v. 93, p. 121-130, 1993.

ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

ATEHNKENG, J.; ADETIMIRIN, V. O.; Ng, S. Y. C. Exploring the african cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm for somatic embryogenic competence. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1324-1329, 2006.

BACCHETTA, L.; REMOTTI, P. C.; BERNARDINI, C.; SACCARDO, F. Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 37-44, 2003.

BAILEY, M. A.; BOERMA, H. R.; PARROTT, W. A. Inheritance of *Agrobacterium tumefaciens*-Induced Tumorigenesis of Soybean. **Crop Science**, v. 34, p. 514-519, 1994.

BECERRA, D. C.; FORERO, A. P.; GÓNGORA, G. A. Age and Physiological Condition of Donor Plants Affect *in vitro* Morphogenesis in Leaf Explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 87-90, 2004.

BELLOTTI, A. C.; SMITH, L.; LAPOINTE, S. L. Recent advances in cassava pest management. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 343-370, 1999.

BENEDDRA, T.; PICARD, C.; PETIT, A.; NESME, X. Correlation between susceptibility to crown gall and sensitivity to cytokinin in aspen cultivars. **Phytopathology**, v. 86, p. 225-231, 1996.

BERGMANN, B. A.; STOMP, A. M. Effects of host plant genotype and growth-rate on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gall formation in *Pinus radiata*. **Phytopathology**, v. 82, p. 1457-1462, 1992.

BEVAN, M. W.; FLAVELL, R. B.; CHILTON, M. D. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. **Nature**, v. 304, p. 184-187, 1983.

BHAU, B. S.; WAKHLU, A. K. Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 25-29, 2001.

BIDNEY, D.; SCELONGE, C.; MARTICH, J.; BURRUS, M.; SIMS, L.; HUFFMAN, G. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, v. 18, p. 301-313, 1992.

BIRCH, R. G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 297-326, 1997.

BOBÁK, M.; BLEHOVÁ, A.; KRIŠTÍN, J.; OVEČKA, M.; ŠAMAJ, J. Direct plant regeneration from leaf explants of *Drosera rotundifolia* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 43, p. 43-49, 1995.

BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 817 p

BORÉM, A.; MILACH, S. C. K. Melhoramento de plantas. O melhoramento para o milênio. **Biotecnologia**, v. 7, p. 68-72, 1999.

BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPQ, 1999.

BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. (Eds.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-Cenargem, 1998.

CABRAL, G. B.; RECH, E. L.; BRASILEIRO, A. C. M. Cassava transformation by *Agrobacterium tumefaciens* and particle acceleration. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK (CBN), 2., 1994, Bogor. **Proceeding...** Bogor: Indonesia CIAT, 1994. (Working Document 150).

CALDERON, A. **Transformation of *Manihot esculenta* (cassava) using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the foreign genes in transformed cell lines**. Brussels, Belgium: Vrije Universiteit, 1988. M.S. thesis – Vrije Universiteit, Brussels, Belgium.

CARDOSO, C. E. L.; SOUZA, J. S. Importância, potencialidade e perspectivas do cultivo da mandioca na América Latina. In: CEREDA, M. et al. (Eds.). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americana..** [S.l.]: FUNDAÇÃO CARGILL, 2002. Capítulo 2.

CARVALHO, J. M. F. C.; LIMA, M. M. A.; AIRES, P. S. R. VIDAL, M. S.; PIMENTEL, N. W. **Embriogênese somática**. Campina Grande, Brasil: Embrapa Algodão, 2006. (Documentos, 152).

CEBALLOS, H.; IGLESIAS, C. A.; PÉREZ, J. C.; DIXON, A. G. O. Cassava breeding: opportunities and challenges. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 503-516, 2004.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PHRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802-805, 1994.

CHELLAPPAN, P.; MASONA, M. V.; VANITHARANI, R.; TAYLOR, N. J.; FAUQUET, C. M. Broad Spectrum Resistance to ssDNA Viruses Associated with Transgene-Induced Gene Silencing in Cassava. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 601-611, 2004.

CHENG, M.; FRY, J. E.; PANG, S.; ZHOU, H.; HIRONAKA, C. M.; DUNCAN, D. R.; CONNER, T. W.; WAN, Y. Genetic Transformation of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, v. 115, p. 971-980, 1997.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. **Developmental Biology**, v. 112, p. 494-497, 1985.

CHUNG, H. H.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of dendrobium chiengmai pink and subsequent plant regeneration. *In vitro* cellular and developmental biology. **Plant**, v. 41, p. 765-769, 2005.

CID, L. P. B.; SILVA, R. E. P. **Novas aplicações da cultura de tecidos na mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Disponível em: <<http://www.suct.ms.gov.br/mandioca/trabalhos/PASTA106.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2007.

COCK, J. H. **Cassava: new potential for a neglected crop**. Westview, London, 1985.

DANSO, K. E.; FORD-LLOYD, B. V. Induction of high-frequency somatic embryos in cassava for cryopreservation. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 226-232, 2002.

DE BLOCK, M.; BOTTERMAN, J.; VANDEWIELE, M.; DOCKX, J.; THOEN, C.; GOSSELE, V.; MOVVA, N. R.; THOMPSON, C.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. **The EMBO Journal**, v. 6, p. 2513-2518, 1987.

DE LA RIVA, G. A.; CABRERA, J. G.; PADRÓN, R. V.; PARDO, C. A. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 1-16, 1998.

DELGADO, G. E.; ROJAS, C. Cassava seed production program by meristem culture in UNPRG, Lambayeque (Peru). In: THRO, A. M.; ROCA, W. (Eds.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1993, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena, Colombia: CIAT, 1993. (Working Document, 123).

DILLEN, W.; DE CLERCQ, J.; KAPILA, J.; ZAMBRE, M.; VAN MONTAGU, M.; ANGENON, G. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. **Plant Journal**, v. 12, p. 1459-1463, 1997.

EFENDI transformation of sugarcane by sonication assisted-*Agrobacterium* transformation. **Institute for Science and Technology Studies**, v. 4, p. 36-46, 2003.

EL-SHARKAWY, M. A. Cassava biology and physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 481–501, 2004.

ESKES, A. B.; VARGA, A.; STARITSKY, G.; BRUINSMA, J. Callus growth and rooting of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) stem segments cultured *in vitro*. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 23, p. 315-320, 1974.

FAUQUET, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C.; CHAVARRIAGA, P.; SCHÖPKE, C.; BEACHY, R. N. Cassava viruses and genetic engineering. In: THOTTHAPILLY, G.; MONTI, L.; MOHAN RAJ, D. R.; MOORE, A. W. (Eds.). **Biotechnology: enhancing research on tropical crops in Africa**. Ibadan, Nigeria: CTA/IITA, 1992.

FIGUEROA, F. R. Q.; HERRERA, R. R.; AVALOS, R. M. G.; VARGAS, V. M. L. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 285-301, 2006.

FOURMY, D.; RECHT, M. I.; BLANCHARD, S. C.; PUGLISI, J. D. Structure of the A site of *E.coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. **Science**, v. 274, p. 1367-1371, 1996.

FRANCHE, C.; BOGUSZ, D.; SCHÖPKE, C.; FAUQUET, C.; BEACHY, R. N. Transient gene expression in cassava using high velocity micriprojectiles. **Plant Molecular Biology**, v. 17, p. 493-498, 1991.

FREDERIKSEN, C. G. **Transformation of pea and potato to obtain and analyse plants transgenic for the *rolB* gene from *Agrobacterium rhizogenes***. Denmark: University of Aarhus, 1994. Ph.D. thesis – University of Aarhus, Århus, Denmark.

FREGENE, M.; PUONTI-KAERLAS, J. Cassava biotechnology. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. C. (Eds.). **Cassava biology, production and utilization**. Oxon, NY: CABI Publishing, 2002.

FUKUDA, C.; OTSUBO, A. A. **Cultivo da mandioca na região centro sul do Brasil. Sistemas de Produção**, 7. EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA. 2003. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca\\_centrosul/index.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_centrosul/index.htm)>. Acesso em: 10 jan. 2007.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 27-47, 2004.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GARCIA, M. G.; VEGA, V. M.; MORALES, S. R. Effect of meristem culture micropropagation on the vigor and yield of the cassava clone "Señorita". In: THRO, A. M.; ROCA, W. (Eds.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1993, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena, Colombia: CIAT, 1993. (Working Document, 123).

GELVIN, S. B. *Agrobacterium* and plant proteins involved in T-DNA transfer and integration. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 223-256, 2000.

GILL, R.; MALHOTRA, P. K.; GOSAL, S. S. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 84, p. 100205-100209, 2006.

GOMES, J. C.; LEAL, E. C. **Cultivo da mandioca para a região dos tabuleiros costeiros. Sistemas de Produção, 11.** EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA. 2003. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca\\_tabcosteiros/index.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_tabcosteiros/index.htm)> Acesso em: 10 jan. 2007.

GONZÁLEZ, A. E.; SCHÖPKE, C.; TAYLOR, N. J.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. M. Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) through *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 827-831, 1998.

GROLL, J.; MYCOCK, D. J.; GRAY, V. M. Effect of medium salt concentration on differentiation and maturation of somatic embryos of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Annals of Botany**, v. 89, p. 645-648, 2002.

GROLL, J.; MYCOCK, D. J.; GRAY, V. M.; LAMINSKI, S. Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 201-210, 2001.

GUERRA, M. P.; TORRE, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa/CNPH, 1999.

GUO, J. Y.; LIU, Y. Q. Rapid propagation of cassava by tissue culture and its application in rural districts in China. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK (CBN), 2., 1995, Bogor. **Proceeding...** Bogor, Indonesia CIAT, 1995. (Working Document 150).

GUOHUA, M. Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 54, p. 1-7, 1998.

HALDRUP, A.; PETERSEN, S. G.; OKKELS, F. T. Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 76-81, 1998.

HANKOUA, B. B.; NG, S. Y. C.; FAWOLE, I.; PUONTI-KAERLAS, J.; PILLAY, M.; DIXON, A. G. O. Regeneration of a wide range of African cassava genotypes via shoot organogenesis from cotyledons of maturing somatic embryos and conformity of the field-established regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 221-231, 2005.

HANKOUA, B. B.; TAYLOR, N. J.; NG, S. Y. C.; FAWOLE, I.; PUONTI-KAERLAS, J.; PADMANABHAN, C.; YADAV, J. S.; FAUQUET, C. M.; DIXON, A. G. O.; FONDONG, V. N. Production of the first transgenic cassava in Africa via direct shoot organogenesis from friable embryogenic calli and germination of maturing somatic embryos. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1700-1712, 2006.

HANSEN, G.; WRIGHT, M. S. Recent advances in the transformation of plants. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 226-231, 1999.

HATANAKA, T.; CHOI, Y. E.; KUSANO, T.; SANO, H. Transgenic plants of coffee (*Coffea canephora*) from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 106-110, 1999.

HENSHAW, G. G. *In vitro* plant regeneration from somatic tissue in cassava. In: —. **Report on the founding workshop for the advanced cassava research**. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1989. (Working Document, 52).

HERSHEY, C. H.; JENNINGS, D. L. Progress in breeding cassava for adaptation to stress. **Plant Breeding Abstracts**, v. 62, p. 823-831, 1992.

HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **Plant Journal**, v. 6, p. 271-282, 1994.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Classification of Prokaryotic Organisms and the Concept of Bacterial Speciation. In: GARRITY, G. (Ed.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. New York, NY: Springer Verlag, 1994.

IBARAKI, Y.; MURATA, K. Automation of somatic embryo production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 179-199, 2001.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Lavoura temporária – Mandioca**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 12 jan. 2007.

IHEMERE, U.; ARIAS-GARZON, D.; LAWRENCE, S.; SAYRE, R. Genetic modification of cassava for enhanced starch production. **Plant Biotechnology Journal**, v. 4, p. 453-465, 2006.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 745-750, 1996.

JAIN, R. K.; CHOWDHURY, J. B.; FRIEDT, W. Organogenesis and plant formation from cotyledon explant cultures of wild turnip rape (*Brassica tournefortii* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 15, p. 107-111, 1988.

JEFFERSON, R. A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 5, p. 387-405, 1987.

JENIK, P. D.; BARTON, M. K. Surge and destroy: The role of auxin in plant embryogenesis. **Development**, v. 132, p. 3577-3585, 2005.

JIN, S.; ZHANG, X.; LIANG, S.; NIE, Y.; GUO, X.; HUANG, C. Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of Upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 229-237, 2005.

JOERSBO, M.; BRUNSTEDT, J. Direct gene transfer to plant protoplast by mild sonication. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 207-210, 1990.

JØRGENSEN, K.; BAK, S.; BUSK, P. K.; SØRENSEN, C.; OLSEN, C. E.; PUONTI-KAERLAS, J.; MØLLER, B. L. Cassava plants with a depleted cyanogenic glucoside content in leaves and tubers. Distribution of cyanogenic glucosides, their site of synthesis and transport, and blockage of the biosynthesis by RNA interference technology. **Plant Physiology**, v. 139, p. 363-374, 2005.

JOSEPH, T.; YEOH, H. H.; LOH, C. S. Cyanogenesis in somatic embryos and plantlets of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Food and Agriculture**, v. 79, p. 1071-1074, 1999.

JOSEPH, T.; YEOH, H. H.; LOH, C. S. Somatic embryogenesis, plant regeneration and cyanogenesis in *Manihot glaziovii* Muell. Arg. (ceara rubber). **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 535-538, 2000.

KALLAK, H.; REIDLA, M.; HILPUS, I.; VIRUMÄE, K. Effects of genotype, explant source and growth regulators on organogenesis in carnation callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 127-135, 1997.

KARTHA, K. K.; GAMBORG, O. L. Elimination of cassava mosaic disease by meristem culture. **Phytopathology**, v. 65, p. 826-828, 1975.

KARTHA, K. K.; GAMBORG, O. L.; CONSTABEL, F.; SHYLUK, J. P. Regeneration of cassava plants from apical meristems. **Plant Science Letters**, v. 2, p. 107-113, 1974.

KATHIRAVAN, K.; VENGEDESAN, G.; SINGER, S.; STEINITZ, B.; PARIS, H. S.; GABA, V. Adventitious regeneration *in vitro* occurs across a wide spectrum of squash (*Cucurbita pepo*) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 85, p. 285-295, 2006.

KOCH, B. M.; SIBBESEN, O.; SWAIN, E.; KAHN, R. A.; LIANGCHENG, D.; BAK, S.; HALKIER, B. A.; MOLLER, B. L. Possible use of a biotechnological approach to optimize and regulate the content and distribution of cyanogenic glycosides in cassava to increase food safety. In: BOKANGA, M.; ESSERS, A. J. A.; POULTER, N.; ROSLING, H.; TEWE, O. (Eds.). International Workshop on Cassava Safety. **Acta Horticulturae**, v. 375, p. 45-60, 1994.

KONAN, N. K.; SANGWAN, R. S.; SANGWAN-NORREEL, B. S. Efficient *In Vitro* Shoot-regeneration Systems in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Breeding**, v. 113, p. 227-236, 1994b.

KONAN, N. K.; SANGWAN, R. S.; SANGWAN-NORREEL, B. S. Nodal axillary meristems as target tissue for shoot production and genetic transformation in cassava *Manihot esculenta* Crantz. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK (CBN), 2., 1994, Bogor. **Proceedings...** Bogor, Indonesia. CIAT, 1994c. (Working Document 150).

KONAN, N. K.; SANGWAN, R. S.; SANGWAN-NORREEL, B. S. Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37, p. 91-102, 1994a.

KONAN, N. K.; SCHÖPKE, C.; CÁRCAMO, R.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristems. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 444-449, 1997.

LADINO, J. J.; ECHEVERRY, M.; MANCILLA, L. I.; LOPEZ, D.; CHAVARRIAGA, P.; TOHME, J.; ROCA, W. **Genetic transformation of cassava: confirmation of transgenesis in clone 60444 and analysis of CRY1Ab protein in transgenic lines.** Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2002.

LAUX, T.; WÜRSCHUM, T.; BREUNINGER, H. Genetic Regulation of Embryonic Pattern Formation. **The Plant Cell**, v. 16, p. S190-S202, 2004.

LI, H. Q.; HUANG, Y. W.; LIANG, C. Y.; GUO, J. Y.; LIU, H. X.; POTRYKUS, I.; PUONTI-KAERLAS, J. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 410-414, 1998.

LI, H. Q.; SAUTTER, C.; POTRYKUS, I.; PUONTI-KAERLAS, J. Genetic Transformation of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 736-740, 1996.

- LIMA, G. P. P.; BARSALOBRES, C.; PIZA, I. M. T.; CEREDA, M. P. Efeito do BAP e ANA e Atividade e a Peroxidase em Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz Cv Mcol 22) Cultivada *In Vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 8, p. 107-110, 2002.
- LIN, J. J.; ASSAD-GARCIA, N.; KUO, J. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. **Plant Science**, v. 109, p. 171-177, 1995.
- LUCCA, P.; YE, X.; POTRYKUS, I. Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. **Molecular Breeding**, v. 7, p. 43-49, 2001.
- LUONG, H. T.; SHEWRY, P. R.; LAZZERI, P. A. Transient gene expression in cassava somatic embryos by tissue electroporation. **Plant Science**, v. 107, p. 105-115, 1995.
- MA, G.; XU, Q. Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 70, p. 281-288, 2002.
- MA, H.; CHEN, G. Gene Transfer Technique. **Nature and Science**, v. 3, p. 25-31, 2005.
- MACHADO, T. F. **Regeneração *in vitro* e transformação genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do Nordeste brasileiro**. Fortaleza: UFCE, 2004. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- MAKUNGA, N. P.; JÄGER, A. K.; STADEN, J. An improved system for the *in vitro* regeneration of *Thapsia garganica* via direct organogenesis – influence of auxins and cytokinins. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 271-280, 2005.
- MANSUR, E.; MARGIS-PINHEIRO, M. **Plantas geneticamente modificadas: um caminho para o melhoramento vegetal**. [S.l.]: ABCTP Notícias 2-3, 1995.
- MASONA, M. V.; TAYLOR, N. J.; ROBERTSON, A. I.; FAUQUET, C. M. Transferring a cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genetic engineering capability to the African environment: Progress and prospects. **Euphytica**, v. 120, p. 43-48, 2001.
- MATHEWS, H.; SCHOPKE, C.; CARCAMO, R.; CHAVARRIAGA, P.; FAUQUET, L.; BEACHY, R. N. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 328-333, 1993.
- MATHIAS, T. J.; BOYD, L. A. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. EM. Thell). **Plant Science**, v. 46, p. 217-233, 1986.

MATTOS, P. L. P.; GOMES, J. C.; FARIAS, A. R. N.; FUKADA, C. Cultivo da mandioca nas regiões norte e nordeste do Brasil. In: **Cultura de tuberosas amiláceas latino americanas**. [S.l.]: Fundação Cargill, 2002. Cap. 14, v. 2.

MCCULLEN, C. A.; BINNS, A. N. Interactions between *Agrobacterium tumefaciens* and plant cells required for interkingdom macromolecular transfer. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 101-127, 2006.

MEDINA, R. D.; FALOCI, M. M.; SOLÍS NEFFA, V.; MROGINSKI, L. A. Embriogénesis somática y regeneración de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de cultivares de interés para Argentina. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v. 32, p. 132-136, 2003.

MIHALKA, V.; SZASZ, A.; FÁRI, M.; NAGY, I. Gene transfer in pepper: comparative investigations on tissue culture factors and vector systems. In: MUGNOZZA, G. T. S.; PORCEDDU, E. M. A.; PAGNOTTA, M. A. (Eds.). EUCARPIA CONGRESS, 15., 1998, Norwell – Genetics and breeding for crop quality and resistance. **Proceedings...** Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers, 1998.

MITRA, S. K.; MUKHERJEE, K. K. Direct organogenesis in Indian spinach. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 191-194, 2001.

MOREIRA, L. C.; TAKATSU, A.; CALDAS, L. S. Recuperação de plantas de mandioca livre de *Xanthomonas manihotis* através da cultura de meristemas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 2, p. 217-223, 1977.

MROGINSKI, L. A.; SCOCCHI, A. M. Somatic embryogenesis of Argentine Cassava varieties. In: THRO, A. M.; ROCA, W. (Eds.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1993, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena, Colombia: CIAT, 1993. (Working Document, 123).

MULLINS, K. V.; LLEWELLYN, D. J.; HARTNEY, V. J.; STRAUSS, S.; DENNIS, E. S. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 787-791, 1997.

MUNYIKWA, T. R. I.; REAMAKERS, C. C. J. M.; SCHREUDER, M.; KOK, R.; SCHIPPERS, M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Pinpointing towards improved transformation and regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Science**, v. 135, p. 87-101, 1998.

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

MUSSIO, I.; CHAPUT, M. H.; SERRAF, I.; DUCREUX, G.; SIHACHAKR, D. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of an African clone of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and analysis of the conformity of regenerated plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 53, p. 205-211, 1998.

NAGL, W.; IGNACIMUTHU, S.; BECKER, J. Genetic engineering and regeneration of Phaseolus and Vigna. State of the art and new attempts. **Journal of Plant Physiology**, v. 150, p. 625-644, 1997.

NAM, J.; MATTHYSSE, A. G.; GELVIN, S. B. Differences in susceptibility of Arabidopsis ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. **The Plant Cell**, v. 9, p. 317-333, 1997.

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.

OGBURIA, M. N. Somatic embryogenesis, plantlet regeneration and micropropagation of cultivars and F1 hybrids of *Manihot esculenta*. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 429-432, 2003.

OLIVEIRA, M. M. Aplicações e Avanços na Área da Biotecnologia Vegetal. Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia. **Boletim de Biotecnologia**, v. 66, p. 22-27, 2000.

OLIVEIRA, R. P.; GOMES, T. S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2329-2334, 2000.

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 96, p. 5586-5591, 1999.

OTOO, J. A. **Rapid multiplication of cassava**. IITA Research Guide, 51. 1996. Disponível em: <[http://www.iita.org/cms/details/trn\\_mat/irg51/irg51.htm](http://www.iita.org/cms/details/trn_mat/irg51/irg51.htm)>. Acesso em: 30 maio 2007.

OW, D.; WOOD, K.; DELUCA, M.; DEWET, J.; HELINSKI, D.; HOWELL, S. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. **Science**, v. 234, p. 856-859, 1986.

PAEK, K. Y.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E. J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 287-300, 2005.

PARK, Y. D.; RONIS, D. H.; BOE, A. A.; CHENG, Z. M. Plant regeneration from leaf tissues of north Dakota genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). **American Potato Journal**, v. 72, p. 329-338, 1995.

PARROTT, W. A.; HOFFMAN, L. M.; HILDEBRAND, P.; WILLIAMS, E. G.; COLLINS, G. B. Recovery of primary transformants of soybean. **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 615-617, 1989.

PATTON, D. A.; MEINKE, D. W. High-frequency plant regeneration from cultured cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 233-237, 1988.

PERL, A.; LOTAN, O.; ABU-ABIED, M.; HOLLAND, D. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): The role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 624-628, 1996.

PICOLI, E. A. T. **Morfogênese *in vitro* e transformação genética de berinjela (*Solanum melongena* L.) mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. Viçosa, MG: UFV, 2000. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PICOLI, E. A. T.; OTONI, W. C. Morfogênese *In Vitro* em Berinjela Influenciada por Higromicina e Períodos de Exposição em ANA. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, p. 1474-1481, 2001.

PIRINÇ, V.; ONAY, A.; YILDIRIM, H.; ADIYAMAN, F.; IŞIKALAN, Ç.; BAŞARAN, D. Adventitious Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Cotyledons of Diploid Diyarbakir Watermelon (*Citrullus lanatus* cv. “Sürme”). **Turkish Journal of Biology**, v. 27, p. 101-105, 2003.

POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. **Gene transfer to plants**. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1995.

PUONTI-KAERLAS, J. Cassava biotechnology. In: TOMBS, M. P. (Ed.). **Biotechnology and genetic engineering reviews**. Hants, UK: Intercept Ltd., 1998.

PUONTI-KAERLAS, J.; LI, H.-Q.; SAUTTER, C.; POTRYKUS, I. Production of transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz) via organogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation. **African Journal of Root and Tuber Crops**, v. 2, p. 181-186, 1997.

RAEMAKERS K. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Direct cyclic somatic embryogenesis of cassava for mass production purposes. **Methods in Molecular Biology**, v. 111, p. 61-70, 1999a.

RAEMAKERS K.; SCHREUDER, M.; SUURS, L.; FURRER-VERHORST, H.; VINCKEN, J.; VETTEN, N.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Improved cassava starch by antisense inhibition of granule-bound starch synthase. **Molecular Breeding**, v. 16, p. 163-172, 2005.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; AMATI, M.; STARITSKY, G.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Cyclic somatic embryogenesis in cassava. **Annals of Botany**, v. 71, p. 289-294, 1993a.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; BESSEMBINDER, J.; STARITSKY, G.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Induction, germination and shoot development of somatic embryos in cassava. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 33, p. 151-156, 1993b.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; ROZENBOOM, M. G. M.; DANSO, K.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Regeneration of plants from somatic embryos and friable embryogenic callus of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **African Journal of Root and Tuber Crops**, v. 2, p. 32-36, 1997a.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; SCHAVEMARKER, C. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Improvement of cyclic somatic embryogenesis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 226-229, 1993c.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; SOFIARI, E.; TAYLOR, N.; HENSHAW, G.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Production of transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants by particle bombardment using luciferase activity as selection marker. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 339-349, 1996.

RAEMAKERS, K. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Direct, cyclic somatic embryogenesis of cassava for mass production purposes. In: HALL, R. D. (Ed.). **Plant cell culture protocols**. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1999b.

RAEMAKERS, K.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. The use of somatic embryogenesis for plant propagation in cassava. **Molecular biotechnology**, v. 14, p. 215-221, 2000.

RAEMAKERS, K.; SCHREUDER, M.; PEREIRA, I.; MUNYIKWA, T.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. Progress made in FEC transformation of cassava. **Euphytica**, v. 120, p. 15-24, 2001.

REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle an geweberkulturen aus karotten. **Naturwissenschaften**, v. 45, p. 344-345, 1958.

ROA-RODRÍGUEZ, C.; NOTTENBURG, C. **Antibiotic resistance genes and their uses in genetic transformation, especially in plants**. 2001. Disponível em: <[http://www.patentlens.net/daisy/Antibiotic/3143/version/default/part/AttachmentData/data/patentlens\\_techlandscape\\_antibiotic.pdf](http://www.patentlens.net/daisy/Antibiotic/3143/version/default/part/AttachmentData/data/patentlens_techlandscape_antibiotic.pdf)>. Acesso em: 04 nov. 2007.

ROCA, W. M. **Cassava production and utilization problems and their biotechnological**. [S.l.], 1990. p. 215-219. (Workshop Resource Papers).

ROCA, W. M.; HENRY, G.; ANGEL, F.; SARRIA, R. Biotechnology research applied to Cassava improvement at the International Center of Tropical Agriculture (CIAT). **AgBiotech News and Information**, v. 4, p. 303-308, 1992.

SAIRAM, R. V.; FRANKLIN, G.; HASSEL, R.; SMITH, B.; MEEKER, K.; KASHIKAR, N.; PARANI, M.; ABED, D. A.; ISMAIL, S.; BERRY, K.; GOLDMAN, S. L. A study on the effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary nodal callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 79-85, 2003.

SALEHUZZAMAN, S. N. I. M.; JACOBSON, E.; VISER, R. G. F. Isolation and characterisation of a cDNA encoding granule-bound starch synthase in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and antisense expression in potatoes. **Plant molecular Biology**, v. 23, p. 947-962, 1993.

SANTARÉM, E. R. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 81-90, 2000b.

SANTARÉM, E. R. SAAT: Transformação de plantas mediada por ultra-som e *Agrobacterium*. **Ciência Rural**, v. 30, p. 725-730, 2000a.

SANTARÉM, E. R.; TRICK, H. N.; ESSIG, J. S.; FINER, J. J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 752-759, 1998.

SARRIA, R. A.; TORRES, E.; BALCÁZAR, N.; DESTÉFANO-BELTRAN, L.; ROCA, W. M. Progress in *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK – INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, 2., 1995, Bogor. **Proceedings...** Bogor, Indonesia: CIAT, 1995. (Working Document 150).

SARRIA, R.; TORRES, E.; ANGEL, F.; CHAVARRIAGA, P. Transgenic plants of cassava (*Manihot esculenta*) with resistance to Basta obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 339-344, 2000.

SATO, A. Y.; SEDIYAMA, T.; MARIA, J.; BORÉM, A.; CECON, P. R.; JUNQUEIRA, C. S. Transformação da mandioca via *Agrobacterium rhizogenes*. **Bioscience Journal**, v. 20, p. 161-170, 2004.

SAWAHEL, W. A. Transgenic plants: performance, release and containment. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 10, p. 139-144, 1994.

SCHENK, R. O.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, v. 50, p. 199-204, 1972.

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

SCHÖKPE, C.; TAYLOR, N. J.; CÁRCAMO, R.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. Optimization of parameters for particle bombardment of embryogenic suspension cultures of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using computer image analysis. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 526-530, 1997.

SCHÖPKE, C.; TAYLOR, N.; CÁRCAMO, R.; KONAN, N. K.; MARMEY, P.; HENSHAW, G. G.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 731-735, 1996.

SCHREUDER, M. M.; RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Efficient production of transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v. 120, p. 35-42, 2001.

SCHROEDER, H. E.; SCHOTZ, A. H.; WARDLEYRICHARDSON, T.; SPENCER, D.; HIGGINS, T. J. V. Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiology**, v. 101, p. 751-757, 1993.

SCHWEEN, G.; SCHWENKEL, H-G. Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in the greenhouse of *Primula* ssp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 53-61, 2003.

SHAHIN, E. A.; SHEPARD, J. F. Cassava mesophyll protoplasts: isolation, proliferation and shoot formation. **Plant Sci. Lettes**, v. 17, p. 459-465, 1980.

SHAW, C. H.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. A general method for the transfer of cloned genes to plant cells. **Gene**, v. 23, p. 315-330, 1983.

SILVA, M. N.; CEREDA, M. P.; FIORINI, R. A. Multiplicação rápida da mandioca. In: CEREDA, M. et al. (Eds.). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americana**. [S.l.]: FUNDAÇÃO CARGILL, 2002. Cap. 9.

SIRITUNGA, D.; ARIAS-GARZON, D.; WHITE, W.; SAYRE, R. T. Over-expression of hydroxynitrile lyase in transgenic cassava roots accelerates cyanogenesis and food detoxification. **Plant Biotechnology Journal**, v. 2, p. 37-43, 2004.

SIRITUNGA, D.; SAYRE, R. T. **Generation of cyanogens-free transgenic cassava** **Planta**, v. 217, p. 367-373, 2003.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-131, 1957.

SMITH, M. K.; BIGGS, B. J.; SCOTT, K. J. *In vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 6, p. 221-228, 1986.

SOFIARI, E.; RAEMAKERS, C. J. J. M.; BERGERVOET, J. E. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Plant regeneration from protoplasts isolated from friable embryogenic callus of cassava. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 159-165, 1998.

SOFIARI, E.; RAEMAKERS, C. J. J. M.; KANJU, E.; DANSO, K.; VAN LAMMEREN, A. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Comparison of NAA and 2,4-D induced somatic embryogenesis in cassava. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, v. 50, p. 45-56, 1997.

SOLÍS, J. I. F.; MLEJNEK, P.; STUDENÁ, K.; PROCHÁZKA, S. Application of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation in *Chenopodium rubrum* L. **Plant Soil Environment**, v. 49, p. 255-260, 2003.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G.; FUKADA, W. M. G. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em mandioca. In: CEREDA, M. et al. (Eds.). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americana**. [S.I.]: FUNDAÇÃO CARGILL, 2002. Cap. 7.

SOUZA, A. S.; SOUZA, F. V. D.; SEREJO, J. A. S.; JUNGHANS, T. G. **Biotechnologia como ferramenta para aumento de competitividade da mandioca**. 2005. Disponível em: <<http://www.suct.ms.gov.br/mandioca/palestras/Biotechnologia%20como%20ferramenta%20para%20aumento%20de%20competitividade%20da%20mandioca%20-%20Ant%C3%B4nio%20da%20Silva%20Souza.PDF>>. Acesso em: 20 maio 2007.

STACHEL, S. E.; MESSENS, E.; MONTAGU, M. V.; ZAMBRYSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, v. 318, p. 624-629, 1985.

STACHEL, S. E.; NESTER, E. W.; ZAMBRYSKI, P. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 83, p. 379-383, 1986.

STAMP, J. A. Somatic embryogenesis in cassava: the anatomy and morphology of the regeneration process. **Annals of Botany**, v. 59, p. 451-459, 1987.

STAMP, J. A.; HENSHAW, G. G. Adventitious regeneration in cassava. In: WITHERS, L. A.; ALDERS, P. G. (Eds.). **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London, UK: Butterworths, 1986.

STAMP, J. A.; HENSHAW, G. G. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, v. 10, p. 227-233, 1987.

STAMP, J. A.; HENSHAW, G. G. Somatic embryogenesis in cassava. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 105, p. 183-187, 1982.

STEWART, F. C.; MAPES, M. O.; SMLTH, J. Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v. 45, p. 693-703, 1958.

SUDARMONOWATI, E.; HENSHAW, G. G. The induction of somatic embryogenesis of recalcitrant cassava cultivars using picloram and dicamba. In: THRO, A. M.; ROCA, W. (Eds.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1993, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena, Colombia: CIAT, 1993. (Working Document, 123).

SUGIYAMA, M.; IMAMURA, K. Dose-, time-, and tissue-dependent effects of 5-bromo-2'-deoxyuridine on the *in-vitro* organogenesis of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 87, p. 17-25, 2006.

SZABADOS, L.; HOYOS, R.; ROCA, W. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 248-251, 1987.

TABEL, Y.; YAMADA, T.; MORISHITA, T.; OSAKI, T. **Plant regeneration via shoot organogenesis from cotyledons in two wild *Cucumis* species, *C. figarei* and *C. metuliferus***. 1998. Disponível em: <<http://www.jircas.affrc.go.jp/english/publication/jarq/32-4/tabei/tabei.htm>>.

TAKAHASHI, E. K.; KOBAYASHI, A. K.; VIEIRA, L. G. E. Induction of cassava somatic embryogenesis in liquid medium associated to floating membrane rafts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 35-39, 2000.

TAYLOR, N. J.; CLARKE, M.; HENSHAW, G. G. The induction of somatic embryogenesis in fifteen African and South American cassava cultivars. In: THRO, A. M.; ROCA, W. (Eds.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1992, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena, Colombia: CIAT, 1992. (Working Document, 123).

TAYLOR, N. J.; EDWARDS, M.; KIERNAN, R. J.; DAVEY, C. D. M.; BLAKESLEY, D.; HENSHAW, G. G. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 726-730, 1996.

TAYLOR, N. J.; MASONA, M. V.; CARCAMO, R.; HO, T.; SCHÖPKE, C.; FAUQUET, C. M. Production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v. 120, p. 25-34, 2001.

TAYLOR, N.; CHAVARRIAGA, P.; RAEMAKERS, K.; SIRITUNGA, D.; ZHANG, P. Development and application of transgenic technologies in cassava. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 671-688, 2004a.

TAYLOR, N.; KENT, L.; FAUQUET, C. Progress and challenges for the deployment of transgenic technologies in Cassava. **AgBioForum**, v. 7, p. 51-56, 2004b.

THOMPSON, C. J.; MOVVA, N. R.; TIZARD, R.; CRAMERI, R.; DAVIES, J. E.; LAUWEREYS, M.; BOTTERMAN, J. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. **The EMBO Journal**, v. 6, p. 2519-2523, 1987.

THORPE, T. A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Eds.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic, 1994.

THRO, A. M.; BEACHY, R. N.; BONIERBALE, M.; FAUQUET, C.; HENRY, G.; HENSHAW, G. G.; HUGHES, M. A.; KAWANO, K.; RAEMAKERS, C. J. J. M.; ROCA, W.; SCHOPKE, C.; TAYLOR, N.; VISSER, R. G. F. International research on biotechnology of cassava (tapioca, *Manihot esculenta* Crantz) and its relevance to Southeast Asian economics: a cassava biotechnology network review. **Asian Journal of Tropical Biology**, v. 2, p. 1-30, 1996.

TILQUIN, J. P. Plant regeneration from stem callus of cassava. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p. 1761-1763, 1979.

TORBERT, K. A.; RINES, H. W.; SOMERS, D. A. Transformation of Oat Using Mature Embryo-Derived Tissue Cultures. **Crop Science**, v. 38, p. 226-231, 1998.

TORBERT, K. A.; RINES, H. W.; SOMERS, D. A. Use of paromomycin as a selective agent for oat transformation. **Plant Cell Reports**, v. 14, p. 635-640, 1995.

TORO, J. C.; ROCA, W.; COCK, J. H. Multiplicación acelerada de material genético promisorio de yuca. In: DOMÍNGUEZ, C. (Comp.). **Yuca: investigación, producción y utilización**. Cali, Colombia: CIAT, 1983.

TOURNIER, V.; GRAT, S.; MARQUE, C.; EL KAYAL, W.; PENCHEL, R.; ANDRADE, G.; BOUDET, A.; TEULIÈRES, C. An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). **Transgenic Research**, v. 12, p. 403-411, 2003.

TRICK, H. N.; FINER, J. J. SAAT: Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. **Transgenic Research**, v. 6, p. 329-326, 1997.

TRICK, H. N.; FINER, J. J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 482-488, 1998.

TURK, S. C. H. J.; MELCHERS, L. S.; DULK-RAS, H.; REGENSGURG-TUINK, A. J. G.; HOOYKAAS, P. J. J. Environmental conditions differentially affect vir genes induction in different *Agrobacterium* strains. Role of the VirA sensor protein. **Plant Molecular Biology**, v. 16, p. 1051-1059, 1991.

TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 147-154, 2006.

TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. **Trends in Cell Biology**, v. 12, p. 121-129, 2002.

USAMI, S.; OKAMOTO, S.; TAKEBE, I.; MACHIDA, Y. Factor Inducing *Agrobacterium tumefaciens* vir Gene Expression is Present in Monocotyledonous Plants. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 85, p. 3748-3752, 1988.

VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J. S.; FAUQUET, C. M. Differential Roles of AC2 and AC4 of Cassava Geminiviruses in Mediating Synergism and Suppression of Posttranscriptional Gene Silencing. **Journal of Virology**, v. 78, p. 9487-9498, 2004.

VANROEKEL, J. S. C.; DAMM, B.; MELCHERS, L. S.; HOEKEMA, A. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 644-647, 1993.

WALDRON, C.; MURPHY, E. B.; ROBERTS, J. L.; GUSTAFSON, G. D.; ARMOUR, S. L.; MALCOLM, S. K. Resistance to hygromycin B: a new marker for plant transformation studies. **Plant Molecular Biology**, v. 5, p. 103-108, 1985.

WANG, Q.; LI, P.; HANANIA, U.; SAHAR, N.; MAWASSI, M.; GAFNY, R.; SELA, I.; TANNE, E.; PERL, A. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency and transgenic plant regeneration of *Vitis vinifera* L. by optimizing selection regimes and utilizing cryopreserved cell suspensions. **Plant Science**, v. 168, p. 565-571, 2005.

WARIS, H. A striking morphogenetic effect of amino acid in seed plant. **Suom Kemistil**, 30, 121, 1957.

WENHAM, J. E. **Post-harvest deterioration of cassava**: a biotechnology perspective. [S.l.]: FAO, 1995. 30 p. (Plant Production and Protection Paper).

WHITE, P. R. **A handbook of plant tissue culture**. [S.l.]: The Jacques Cattell Press, 1943.

WHITE, W. L. B.; ARIAS-GARZON, D. I.; MCMAHON, J. M.; SAYRE, R. T. Cyanogenesis in cassava: the role of hydroxynitrile lyase in root cyanide production. **Plant Physiology**, v. 116, p. 1219-1225, 1998.

WILMINK, A.; DONS, J. J. M. Selection agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, p. 165-185, 1993.

WOODWARD, B.; PUONTI-KAERLAS, J. Somatic embryogenesis from floral tissue of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v. 120, p. 1-6, 2001.

YU, T. A.; YEH, S. D.; YANG, J. S. Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 42, p. 281-286, 2001.

ZHANG, L. J.; CHENG, L. M.; XU, N.; ZHAO, N. M.; LI, C. G.; YUAN, J.; JIA, S. R. Efficient transformation of tobacco by ultrasonication. **Biotechnology**, v. 9, p. 996-997, 1991.

ZHANG, P.; GRUISSEM, W. Production of transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: CURTIS, I. S. (Ed.). **Transgenic crops of the world**: essential protocols. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2005.

ZHANG, P.; JAYNES, J. M.; POTRYKUS, I.; GRUISSEM, W.; PUONTI-KAERLAS, J. Transfer and expression of an artificial storage protein (ASP1) gene in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Transgenic Research**, v. 12, p. 243-250, 2003.

ZHANG, P.; LEGRIS, G.; COULIN, P.; PUONTI-KAERLAS, J. Production of stably transformed cassava plants via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 939-945, 2000b.

ZHANG, P.; PHANSIRI, S.; PUONTI-KAERLAS, J. Improvement of cassava shoot organogenesis by the use of silver nitrate *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 47-54, 2001.

ZHANG, P.; POTRYKUS, I.; PUONTI-KAERLAS, J. Efficient production of transgenic cassava using negative and positive selection. **Transgenic Research**, v. 9, p. 405-415, 2000a.

ZHANG, P.; PUONTI-KAERLAS, J. PIG-mediated cassava transformation using positive and negative selection. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 1041-1048, 2000.

ZHANG, P.; VANDERSCHUREN, H.; FÜTTERER, J.; GRUISSEM, W. Resistance to cassava mosaic disease in transgenic cassava expression antisense RNAs targeting virus replication genes. **Plant Biotechnology Journal**, v. 3, p. 385-397, 2005.

ZHANG, Y.; WEI, Z.; XI, M.; SHI, J. Direct organogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of masson pine (*Pinus massoniana* L.). **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, v. 84, p. 119-123, 2006.

ZOK, S.; NYOCHEMBENG, L. M.; TAMBONG, J.; WUTOH, J. G. Rapid seedstock multiplication of improved clones of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) through shoot tip culture in Cameroon. In: THRO, A. M.; ROCA, W. (Eds.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1993, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena, Colombia: CIAT, 1993. (Working Document, 123).

## **CAPÍTULO 1**

### **REGENERAÇÃO *in vitro* DE PLANTAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) VIA EMBRIOGÊNESE E ORGANOGÊNESE**

#### **1. INTRODUÇÃO**

A mandioca é uma das culturas mais importantes para a alimentação humana nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, visto que aproximadamente 600 milhões de pessoas se alimentam dela diariamente (ANDERSON et al., 2004).

Embora seja a quarta fonte mais importante de carboidratos nos trópicos, atrás apenas do arroz, da batata e do milho (SOUZA et al., 2002), a mandioca é desenvolvida predominantemente por pequenos agricultores para a sua subsistência (MATTOS et al., 2002), uma vez que se adapta à ampla gama de condições climáticas, se adapta facilmente às áreas consideradas marginais caracterizadas por baixa fertilidade do solo e irregularidade do regime pluviométrico, apresenta certa tolerância ao estresse hídrico, e as suas raízes podem ser armazenadas no solo por um período considerável (ROCA, 1990; PUONTI-KAERLAS, 1998; CEBALLOS et al., 2004; EL-SHARKAWY, 2004).

A multiplicação da mandioca é feita por propagação vegetativa, em que as manivas retiradas da planta-mãe são plantadas no campo para darem origem a novas plantas. Entretanto, a propagação por manivas ocasiona baixa produção por dois fatores: o envelhecimento fisiológico provocado pela constante multiplicação e a

infestação por doenças que são transmitidas por sucessivas gerações (SILVA et al., 2002).

Devido à importância que a cultura atingiu nos últimos anos, houve a necessidade de se aumentar a sua produção (MATTOS et al., 2002). Técnicas de propagação rápida, como a propagação *in vitro*, permitem superar o problema da baixa taxa de multiplicação da mandioca. A taxa de multiplicação da mandioca pelo método convencional é de 1 para 8-12 por ano (OTOO, 1996; SOUZA et al., 2002) e via cultura de tecidos, de aproximadamente 1 para 43 por ano (SOUZA et al., 2005).

Os primeiros registros da utilização das técnicas de cultura de tecidos em mandioca datam de 1974, envolvendo estudos relacionados com o crescimento de calos (ESKES et al. 1974) e o cultivo de meristemas apicais (KARTHA et al., 1974). Nos últimos anos, os trabalhos utilizando as técnicas de cultura de tecidos em mandioca atuam nas mais diferentes áreas: estabelecimento de protocolos de micropropagação (TORO et al., 1983; SMITH et al., 1986; STAMP; HENSHAW, 1986; ROCA, et al., 1992; GARCIA et al., 1993; GUO; LIU, 1995; KONAN et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2000), uso da cultura de tecidos para aumentar a taxa de micropropagação (SOUZA et al., 2005), limpeza clonal de cultivares com problemas fitossanitários (KARTHA; GAMBORG, 1975; MOREIRA et al., 1977), transformação genética (FRANCHE et al., 1991; SCHÖPKE et al., 1996; 1997b; ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; RAEMAKERS et al., 2001; SIRITUNGA; SAYRE, 2003; SIRITUNGA et al., 2004; TAYLOR et al., 2004; ZHANG; GRUISSEM, 2005) e conservação e transferência de germoplasma (DELGADO; ROJAS, 1993; CID; SILVA, 2007).

Na literatura, a embriogênese somática é amplamente citada como método regenerativo para a mandioca (STAMP; HENSHAW, 1982; STAMP; HENSHAW, 1986; SZABADOS et al., 1987; STAMP, 1987; STAMP; HENSHAW, 1987; RAEMAKERS et al., 1993abc; MATHEWS et al., 1993; KONAN et al., 1994a; TAYLOR et al., 1996; RAEMAKERS et al., 1997; SOFIARI et al., 1997; MUSSIO et al., 1998; GUOHUA, 1998; LI et al., 1998; SOFIARI et al., 1998; RAEMAKERS et al., 1999a; JOSEPH et al., 1999, 2000; RAEMAKERS et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2000; ZHANG et al., 2000b; TAYLOR et al., 2001; WOODWARD; PUONTI-KAERLAS, 2001; GROLL et al., 2001, 2002; DANSO; FORD-LLOD, 2002; MA; XU, 2002; MEDINA et al., 2003; OGBURIA, 2003; ATEHNKENG et al., 2006).

A embriogênese somática é altamente eficiente como processo de micropropagação, porque permite altas taxas de multiplicação. Entretanto, em mandioca é fortemente influenciada pela fonte de explante utilizada para indução da embriogênese, pelo genótipo e pelo tipo de explante (SZABADOS et al., 1987; SUDARMONOWATI; HENSHAW, 1993; PUONTI-KAERLAS, 1998).

Diversas cultivares já foram regeneradas via embriogênese, entretanto as mais usadas são a MCol 22 (SZABADOS et al., 1987; RAEMAKERS et al., 1993abc; GROLL et al., 2001, 2002; DANSO; FORD-LLOD, 2002) e a TMS 60444 (TAYLOR et al., 1996; RAEMAKERS et al., 1997; SOFIARI et al., 1998; TAYLOR et al., 2001).

Os reguladores de crescimentos mais utilizados para induzir a embriogênese nos diversos tipos de explantes são o picloram (TAYLOR et al., 1996; RAEMAKERS et al., 1997; ZHANG et al., 2001; TAYLOR et al., 2001; MEDINA et al., 2003; HANKOUA et al., 2005; ATEHNKENG et al., 2006) e o 2,4 - D (STAMP; HENSHAW, 1982; SZABADOS et al., 1987; MUSSIO et al., 1998; RAEMAKERS et al., 1999ab; JOSEPH et al., 2000; GROLL et al., 2001, 2002).

A organogênese em mandioca foi primeiramente descrita, em 1994, por Konan et al. (1994abc). Desde então, tem sido o método regenerativo escolhido para a mandioca por diversos pesquisadores (ZOK et al., 1993; PUONTI-KAERLAS et al., 1997; GUOHUA, 1998; LI et al., 1998; ZHANG et al., 2001; HANKOUA et al., 2005), devido à rapidez com que a planta é obtida, o que provavelmente reduz o risco de variação somaclonal (BOBÁK et al., 1995; KALLAK et al., 1997; JAIN et al., 1988; BHANU; WAKHLU, 2001; GILL et al., 2006; KATHIRAVAN et al., 2006; ZHANG et al., 2006).

Os processos de regeneração *in vitro* por embriogênese e a organogênese podem ser influenciados por vários fatores: genótipo, tipo de explante, idade e estágio de desenvolvimento do explante, composição do meio de cultura e as condições físicas a que esses explantes estão submetidos (temperatura, luminosidade) (THORPE, 1994; GAJ, 2004).

Considerando que a organogênese é o método regenerativo escolhido para os explantes de mandioca submetidos à transformação genética e da embriogênese somática e altamente eficiente como processo de micropropagação em mandioca, avaliou-se a capacidade embriogênica e organogênica das cultivares Mantiqueira, Vassourinha, Parazinho, Urubu e Rosinha. Na organogênese, além do meio mais

apropriado, foram avaliados a região cotiledonar mais apropriada para indução e o tempo mais adequado para que os embriões somáticos em estágio cotiledonar permanecessem em meio de maturação para produzirem maior quantidade de brotos depois de serem submetidos ao processo de transformação.

As variedades Mantiqueira, Vassourinha, Parazinho, Urubu e Rosinha foram escolhidas pela importância agrônômica nas Regiões Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste. A cultivar Mantiqueira, muito conhecida na literatura internacional com a sigla CMC 40 e com o código MCol 1468, foi desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Campinas e catalogada como IAC-24-2 (ABAM, 2007). A Vassourinha, catalogada como BGM-006 no banco de Germosplasma da EMBRAPA-CNPMF (EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical), é uma das mais utilizadas pelos agricultores da Região Centro-Oeste para a indústria (FUKUDA; OTSUBO, 2003). A Parazinho, também conhecida como cultivar precoce ou Flor de Boi, é originária do Pará e apresenta ciclo de apenas seis meses e grande produtividade, sendo particularmente recomendada para uso na agroindústria para a produção de farinha de mesa. A Urubu, originária do Estado de São Paulo, possui grande quantidade de antocianina, que lhe dá um aspecto arroxeadado, e é bastante utilizada pelos agricultores da Região Sudeste (ABAM, 2007). A Rosinha, catalogada como BGM 0394 no banco de Germosplasma da EMBRAPA-CNPMF e por BRA 008087 pela Embrapa-CENARGEN (Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia), é originária do Estado do Rio de Janeiro e uma das cultivares mais importantes para o Estado da Bahia.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal**

Os explantes de mandioca da cultivar Rosinha utilizados nos experimentos foram provenientes de plantas cultivadas *in vitro* no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Universidade Federal do Ceará. Já os das cultivares Mantiqueira, Vassourinha, Parazinho e Urubu foram oriundos de plantas cultivadas *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

### **2.2. Indução de embriogênese somática primária da cultivar Rosinha**

Ápices caulinares de plantas cultivadas *in vitro* contendo até dois primórdios foliares foram isolados sob condições assépticas e transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 25 mL do meio CIM (*Cassava Induction Medium*) (ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; ZHANG et al., 2000b). O meio CIM é constituído por meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 20 g/L de sacarose, 0,5 mg/L de sulfato de cobre, 8 g/L de ágar (Sigma, EUA) e 8 mg/L de picloram e apresenta pH 5,8. Os explantes foram incubados por 21 dias, no escuro, e a  $26 \pm 2$  °C. Após esse período, diversos embriões somáticos em estágio globular foram produzidos e permaneceram agrupados em diferentes conjuntos na superfície do explante. Esses conjuntos foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 25 mL do meio CMM

(*Cassava Maturation Medium*) (ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; ZHANG et al., 2000b) para maturarem, ou para placas com meio CIM para um ou mais ciclos de multiplicação. O meio CMM é constituído por meio MS, com 20 g/L de sacarose, 0,5 mg/L de sulfato de cobre, 0,1 mg/L de BAP e 8 g/L de ágar e possui pH 5,8. Todos os meios de cultivo utilizados tiveram o pH ajustado com NaOH 1 M e foram autoclavados a 120 °C, 1 kgf/cm<sup>2</sup>, por 15 min. Todos os reagentes utilizados nos experimentos relatados nesta tese possuíam grau analítico, e todas as placas foram vedadas com filme plástico PVC. Os embriões somáticos da cultivar Rosinha foram utilizados nos experimentos 1.2.6, 1.2.9 e 1.2.10.

### **2.3. Indução de embriogênese somática primária das cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu**

Ápices caulinares de plantas cultivadas *in vitro* contendo até dois primórdios foliares das cultivares foram isolados sob condições assépticas e transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 25 ml do meio CIM (pH 5,8) com diferentes concentrações de picloram (0; 0,2; 1; 2; 4; 6; 8; 10; e 12 mg/L) e de 2,4-D (0; 0,2; 1; 2; 4; 6; 8; 10; e 12 mg/L). Os explantes foram incubados por 21 dias, no escuro, e a 26 ± 2 °C. Após esse período, foi avaliada a frequência embriogênica (formação ou não de embriões somáticos, de forma que, se os 100 explantes de cada tratamento apresentassem formação de embriões, ter-se-ão 100% de embriogênese), bem como a quantidade média de embriões somáticos formados por explante. Para cada concentração hormonal utilizada foram realizadas 10 repetições com 10 explantes cada, totalizando 100 explantes por tratamento.

### **2.4. Embriogênese somática secundária da cultivar Rosinha**

Segmentos de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> de embriões somáticos em estágio cotiledonar foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 25 mL do meio CIM (pH 5,8) suplementados com 8 mg/L de picloram. A superfície abaxial do explante foi colocada em contato com o meio e lá permaneceu por 3-4 semanas, no escuro, e a 26 ± 2 °C. Os embriões somáticos produzidos foram continuamente subcultivados a cada 21 dias, no referido meio.

## **2.5. Maturação de embriões em estágio globular da cultivar Rosinha**

Grupos de aproximadamente 30 embriões somáticos em estágio globular foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 25 mL do meio CMM (pH 5,8). Após 25 dias de incubação, a  $26 \pm 2$  °C e com fotoperíodo de 16 h, fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas ( $25,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), os embriões atingiram o estágio cotiledonar.

## **2.6. Isolamento e alongamento dos embriões somáticos no estágio cotiledonar da cultivar Rosinha**

Embriões somáticos em estágio cotiledonar produzidos após 25 dias de maturação em meio CMM foram isolados e colocados, com o auxílio de bisturi e pinça, em magentas (77 mm × 77 mm × 97 mm) com 30 mL de diferentes meios CEM (*Cassava Elongation Medium*) (ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; ZHANG et al., 2000b). O meio CEM é constituído por meio MS, 20 g/L de sacarose, 0,5 mg/L de sulfato de cobre, 0,4 mg/L de BAP e 8 g/L de ágar (Sigma, EUA), possui pH 5,8 e reguladores de crescimento. As diferentes combinações de reguladores de crescimento avaliadas foram: meio 1 (0,4 mg/L de BAP), meio 2 (0,25 mg/L de BAP + 0,25 mg/L AIB), meio 3 (0,4 mg/L GA<sub>3</sub>) e meio 4 (0,25 mg/L de GA<sub>3</sub> + 0,25 mg/L AIB). Após 30 dias de incubação, a  $26 \pm 2$  °C e com fotoperíodo luminoso de 16 h, fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas ( $25,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), foram avaliadas as frequências de alongamento, de explantes que atingiram mais de 2 cm de altura e de enraizamento. Para cada concentração hormonal utilizada havia seis placas com 10 explantes, totalizando 60 explantes por tratamento.

## **2.7. Transformação via *Agrobacterium tumefaciens***

Um alíquota de 50 µL da suspensão bacteriana (EHA105/pBE2113-GUS) foi transferida para um frasco erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio LB líquido, com antibióticos, incubado a  $27 \pm 2$  °C em mesa agitadora orbital a 180 rpm, por 12-20 h até atingir uma absorbância a 600 nm igual a 1 ( $\text{D.O.}_{600} = 1$ ), medida em espectrofotômetro (Spectrometry Genegys 8). Ao final desse período, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 6.000 rpm (Sorvall RC5C Plus Super Speed

Refrigerated Centrifuge – Rotor 28) à temperatura de 4 °C, durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células, ressuspendidas com 50 mL de meio MS em erlenmeyer de 125 mL, pH 5,3, até alcançar D.O.<sub>600</sub> = 1,0. Incubou-se a solução bacteriana a 27 ± 2 °C em mesa agitadora orbital a 80 rpm, por aproximadamente 1 h.

Segmentos de embriões somáticos em estágio cotiledonar de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> foram excisados e deixados em placa de Petri (90 x 15 mm) com meio CBM líquido (Cassava Basic Medium: meio MS com 2% de sacarose e 2 mM de CuSO<sub>4</sub>) (ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000), pH 5,8, até que o número total de explantes desejados fosse adquirido. Em seguida, segmentos de embriões em estágio cotiledonar foram transferidos para erlenmeyer de 125 mL com 25 mL da suspensão bacteriana EHA105/pBE2113-*gus* com D.O.<sub>600</sub> ajustada para 1,0, que foram, então, colocados em mesa agitadora orbital a 80 rpm, a 27 ± 2 °C, por 45 min. Ao final desse período, o excesso de suspensão foi retirado com o auxílio de uma pipeta, os explantes foram secos em papel-filtro, autoclavados e transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 25 mL de meio CBM sólido para o período de co-cultivo. As placas foram incubadas por três dias a 27 ± 2 °C, na ausência de luz.

No final do período de co-cultivo, os explantes foram lavados por três vezes em água destilada estéril e uma vez com meio MS (pH 5,8) acrescido de 500 mg/L de cefotaxima. Em seguida, foram secos suavemente em papel-filtro estéril e transferidos para meio CIM suplementados com 8 mg/L de picloram (Sigma, EUA) e de 500 mg/L de cefotaxima (Hoechst, Alemanha), em pH 5, por uma semana e, então, submetidos ao ensaio histoquímico, para determinar a atividade da β-glucoronidase.

## **2.8. Avaliação da capacidade organogênica de diferentes regiões cotiledonares**

Com o intuito de determinar qual região cotiledonar produziria mais brotos, embriões somáticos no estágio cotiledonar em meio de maturação por 25 dias foram divididos em três regiões distintas: proximal (região próxima ao hipocótilo de comprimento equivalente a 1/3 do tamanho do explante), distal (região mais distante do hipocótilo de comprimento equivalente a 1/3 do tamanho do explante) e central (região localizada no terço central, entre a região proximal e a distal). Segmentos de

aproximadamente 0,25 cm<sup>2</sup> de cada região foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 25 mL do meio COM (*Cassava Organogenic Medium*) (ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000). O meio COM é constituído por meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 20 g/L de sacarose, 0,5 mg/L de sulfato de cobre, 8 g/L de ágar (Sigma, EUA), 1 mg/L de BAP e 0,5 mg/L de ácido indolbutírico (AIB), e o seu pH foi ajustado para 5,8. Durante o experimento, os explantes foram acondicionados no escuro e a 26 ± 2 °C. Para cada região avaliada havia cinco placas com 10 explantes cada, totalizando 50 explantes por tratamento.

### **2.9. Avaliação de qual período de maturação produziria a maior quantidade de brotos após a transformação por *Agrobacterium***

Para que fosse determinado o período de maturação (0, 10, 15, 20, 25 ou 30 dias) que produziria maior quantidade de brotos após a transformação por *Agrobacterium*, segmentos com aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> da região mediana de embriões no estágio cotiledonar foram colocados em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 25 mL do meio CMM, em pH 5,8, com fotoperíodo de 16 h, fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas (25,3 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) e 26 ± 2 °C. Terminados os diferentes períodos de maturação dos explantes, estes foram submetidos à transformação via agrobactéria (item 1.2.7.) e, após 10 dias do fim do período de co-cultivo, tiveram a quantidade produzida de brotos avaliada. Para cada tempo avaliado havia cinco placas com 10 explantes cada, totalizando 50 explantes por tratamento.

### **2.10. Avaliação do melhor meio de indução de organogênese**

Segmentos de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> da região mediana de embriões somáticos em estágio cotiledonar da cultivar Rosinha e segmentos internodais de plantas cultivadas *in vitro* das cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 25 mL do meio COM suplementado com 1 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de AIB (meio A) ou com 1,6 mg/L de BA + 1,6 mg/L de AIB (meio B). Os explantes foram acondicionados no escuro, a 26 ± 2 °C, e tiveram a frequência de organogênese avaliada após 20 dias. Para cada tratamento foram utilizadas três placas com 30 explantes cada, totalizando 90 destes por tratamento.

### **2.11. Análise estatística**

Todos os dados foram analisados pelo teste de Tukey com valor crítico de  $P = 0,05$ . Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa SAS, versão 8.1 (SAS, 2000).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Indução de embriogênese somática primária das cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu a partir de plantas cultivadas *in vitro***

A indução de embriões somáticos foi influenciada pelo genótipo e pela concentração de 2,4 - D utilizados (Tabelas 1 e 2). Após os 21 dias de cultivo, na maioria das placas contendo o hormônio 2,4 - D foi observada a presença de embriões somáticos no estágio globular (Tabela 2) e também a de calo, que aumentava gradativamente com o incremento da concentração do 2,4 - D (dados não mostrados).

A maioria das cultivares, nas menores (0,2 e 1 mg/L) e maiores concentrações (8 e 10 mg/L) de 2,4 - D, produziu quantidades de embriões inferiores à obtida nas concentrações de 2, 4 e 6 mg/L (Tabela 1). A pouca quantidade de embriões nas concentrações de 0,2 e 1 mg/L é provavelmente ocasionada pela baixa concentração do hormônio, já esse resultado nas altas concentrações de 2,4 - D pode ser explicado pela presença de calos.

O 2,4 - D demonstrou efeito positivo na indução de embriões, pois a produção destes foi constatada em todas as concentrações utilizadas. Das cultivares testadas, a mais responsiva foi a Mantiqueira e a menos responsiva, a Urubu.

Tabela 1 – Efeito de diferentes concentrações de 2,4 - D sobre ápices caulinares de diversas cultivares de mandioca. Os valores mostrados expressam a quantidade média de embriões somáticos formados por explante

	2,4 - D (mg/L)							
	0	0,2	1	2	4	6	8	10
Mantiqueira	0 <sup>d</sup>	30,68 ± 9,8 <sup>c</sup>	64,87 ± 6,1 <sup>b</sup>	97,59 ± 4,5 <sup>a</sup>	103,34 ± 6,6 <sup>a</sup>	98,29 ± 5,7 <sup>a</sup>	80,90 ± 6,2 <sup>b</sup>	53,12 ± 6,3 <sup>c</sup>
Parazinho	0 <sup>d</sup>	31,28 ± 6,6 <sup>c</sup>	96,65 ± 4,6 <sup>a</sup>	87,33 ± 4,3 <sup>b</sup>	80,75 ± 6,1 <sup>b</sup>	79,65 ± 6,8 <sup>b</sup>	67,16 ± 6,9 <sup>b</sup>	72,89 ± 4,2 <sup>b</sup>
Vassourinha	0 <sup>d</sup>	20,87 ± 6,7 <sup>d</sup>	68,37 ± 4,9 <sup>b</sup>	92,07 ± 4,3 <sup>a</sup>	88,30 ± 6,8 <sup>b</sup>	85,32 ± 8,6 <sup>b</sup>	67,54 ± 5,0 <sup>b</sup>	63,20 ± 7,0 <sup>b</sup>
Urubu	0 <sup>d</sup>	18,81 ± 9,3 <sup>d</sup>	32,90 ± 5,5 <sup>d</sup>	82,09 ± 6,3 <sup>b</sup>	75,20 ± 6,6 <sup>b</sup>	54,01 ± 7,2 <sup>c</sup>	40,25 ± 7,6 <sup>c</sup>	35,95 ± 9,0 <sup>c</sup>

As médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2 – Efeito de diferentes concentrações de 2,4 - D sobre explantes foliares de diferentes cultivares de mandioca. Os valores mostrados expressam a frequência embriogênica (%) com 21 dias de indução

	2,4 - D (mg/L)							
	0	0,2	1	2	4	6	8	10
Mantiqueira	0 <sup>d</sup>	46 <sup>c</sup>	85 <sup>b</sup>	95 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
Parazinho	0 <sup>d</sup>	39 <sup>c</sup>	79 <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
Vassourinha	0 <sup>d</sup>	28 <sup>d</sup>	85 <sup>b</sup>	71 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
Urubu	0 <sup>d</sup>	25 <sup>d</sup>	63 <sup>b</sup>	80 <sup>b</sup>	77 <sup>b</sup>	71 <sup>b</sup>	68 <sup>b</sup>	65 <sup>b</sup>

As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na cultivar Mantiqueira foi observada uma diferença significativamente inferior na frequência embriogênica na concentração de 0,2 mg/L de 2,4 - D, em relação às demais. Nas concentrações de 2, 4, e 6 mg/L, a quantidade média de embriões somáticos formados por explante (Tabela 1) foi estatisticamente idêntica, assim como a frequência embriogênica (Tabela 2). Entretanto, como a quantidade de calos foi menor na concentração de 2 mg/L, esta é a concentração mais indicada para a cultivar Mantiqueira.

Na cultivar Parazinho foi observado um padrão crescente da frequência embriogênica conforme aumentava a concentração de 2,4 - D (Tabela 2). Avaliando a quantidade média de embriões somáticos formados por explante, verificou-se que a concentração de 1 mg/L foi a mais adequada para essa cultivar, pois produziu a maior média (Tabela 1).

A cultivar Vassourinha apresentou boas frequências embriogênicas a partir da concentração de 1 mg/L de 2,4 - D (Tabela 2). Analisando esse dado conjuntamente com a média embriogênica e a produção de calo, percebeu-se que a concentração mais adequada para essa cultivar é a de 2 mg/L.

A cultivar Urubu apresentou frequência embriogênica menor do que a das demais cultivares em todas as concentrações de 2,4 - D. Os valores da frequência embriogênica a partir da concentração de 1 mg/L até 10 mg/L não indicaram diferenças significativas (Tabela 2). Contudo, o tratamento com 2 mg/L e 4 mg/L de 2,4 - D foi o que promoveu as maiores médias (Tabela 1). Entre essas concentrações,

a de 2 mg/L é a mais adequada para a indução embriogênica nessa cultivar, pela menor quantidade de calos.

A indução de embriões somáticos foi influenciada pela concentração do fitorregulador picloram e pelo genótipo (Tabelas 3 e 4). Ao final do período de indução embriogênica, a presença de embriões foi detectada na maior parte das placas em que o picloram se fazia presente, numa frequência e quantidade médias menores do que as observadas com o 2,4 - D. Das cultivares testadas, a mais responsiva ao fitorregulador picloram foi a Urubu e a menos responsiva, a Vassourinha.

Pode-se perceber que, conforme se elevava a concentração de picloram, aumentava a quantidade de calo nos explantes, numa proporção maior do que a observada com o hormônio 2,4 - D (dados não mostrados).

Avaliando os resultados da cultivar Mantiqueira, as concentrações de picloram de 4, 6, 8 e 10 mg/L apresentaram frequências embriogênicas estatisticamente iguais (Tabela 4), mas a quantidade média de embriões somáticos formados por explante foi estatisticamente superior na concentração de 8 mg/L de picloram (Tabela 3).

A cultivar Parazinho não apresentou diferença significativa entre frequências embriogênicas avaliadas (Tabela 4), entretanto a concentração que proporcionou a maior quantidade média foi a de 0,2 mg/L, com cerca de 66 (Tabela 3).

Na cultivar Vassourinha, a concentração de 2 mg/L de picloram foi a que apresentou maior frequência embriogênica (Tabela 4) e maior média de embriões, com cerca de 40 embriões por explante (Tabela 3).

A frequência embriogênica da cultivar Urubu não apresentou diferença significativa nas concentrações de 0,2 a 2 mg/L de picloram (Tabela 4), mas as quantidades médias de embriões somáticos formados foi estatisticamente superior na concentração de 0,2 mg/L (aproximadamente 69; Tabela 3).

Os resultados confirmam a genótipo dependência da cultura da mandioca (PUONTI-KAERLAS, 1998), visto a ampla gama de tipos e concentrações hormonais utilizadas para induzir a embriogênese relatada na literatura (STAMP; HENSHAW, 1982; STAMP; HENSHAW, 1986; SZABADOS et al., 1987; HENSHAW, 1989; MATHEWS et al., 1993; KONAN et al., 1994a; TAYLOR et al., 1996; SOFIARI et al., 1997; LI et al., 1998; JOSEPH et al., 1999, 2000; WOODWARD; PUONTI-KAERLAS, 2001; DANSO; FORD-LLOD, 2002; MEDINA et al., 2003; HANKOUA et al., 2005; ATEHNKENG et al., 2006).

Tabela 3 – Efeito de diferentes concentrações de picloram sobre explantes foliares de diferentes cultivares de mandioca. Os valores mostrados expressam a quantidade média de embriões somáticos formados por explante

	Picloram (mg/L)							
	0	0,2	1	2	4	6	8	10
Mantiqueira	0 <sup>d</sup>	31,07 ± 9,4 <sup>c</sup>	32,64 ± 10,5 <sup>b</sup>	35,87 ± 9,2 <sup>b</sup>	41,23 ± 10,1 <sup>b</sup>	47,37 ± 13,6 <sup>b</sup>	65,66 ± 12,1 <sup>a</sup>	49,90 ± 55,1 <sup>b</sup>
Parazinho	0 <sup>d</sup>	65,61 ± 8,5 <sup>a</sup>	33,86 ± 12,6 <sup>b</sup>	28,87 ± 11,6 <sup>c</sup>	27,31 ± 15,2 <sup>c</sup>	29,45 ± 10,6 <sup>c</sup>	22,48 ± 15,8 <sup>c</sup>	13,88 ± 16,2 <sup>d</sup>
Vassourinha	0 <sup>d</sup>	22,39 ± 18,2 <sup>c</sup>	28,65 ± 17,8 <sup>c</sup>	39,61 ± 14,9 <sup>b</sup>	30,09 ± 16,9 <sup>c</sup>	24,54 ± 17,0 <sup>c</sup>	17,92 ± 17,1 <sup>c</sup>	11,01 ± 25,1 <sup>d</sup>
Urubu	0 <sup>d</sup>	69,22 ± 7,1 <sup>a</sup>	49,81 ± 8,9 <sup>b</sup>	44,68 ± 11,4 <sup>b</sup>	40,31 ± 15,5 <sup>b</sup>	38,60 ± 12,2 <sup>b</sup>	31,74 ± 13,1 <sup>c</sup>	29,45 ± 15,9 <sup>c</sup>

As médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4 – Efeito de diferentes concentrações de picloram sobre explantes foliares de diversas cultivares de mandioca. Os valores mostrados expressam a frequência embriogênica (%) com 21 dias de indução

	Picloram (mg/L)							
	0	0,2	1	2	4	6	8	10
Mantiqueira	0 <sup>d</sup>	26 <sup>c</sup>	32 <sup>b</sup>	33 <sup>b</sup>	58 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>	69 <sup>a</sup>	51 <sup>a</sup>
Parazinho	0 <sup>d</sup>	56 <sup>a</sup>	57 <sup>a</sup>	66 <sup>a</sup>	61 <sup>a</sup>	59 <sup>a</sup>	54 <sup>a</sup>	51 <sup>a</sup>
Vassourinha	0 <sup>d</sup>	26 <sup>c</sup>	39 <sup>b</sup>	58 <sup>a</sup>	42 <sup>b</sup>	27 <sup>c</sup>	15 <sup>d</sup>	10 <sup>d</sup>
Urubu	0 <sup>d</sup>	81 <sup>a</sup>	68 <sup>a</sup>	59 <sup>a</sup>	46 <sup>b</sup>	45 <sup>b</sup>	31 <sup>c</sup>	30 <sup>c</sup>

As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na literatura, os reguladores de crescimento mais utilizados para induzir a embriogênese são o picloram (TAYLOR et al., 1996; RAEMAKERS et al., 1997; ZHANG et al., 2000b; TAYLOR et al., 2001; MEDINA et al., 2003; HANKOUA et al., 2005; ATEHNKENG et al., 2006) e o 2,4 - D (STAMP; HENSHAW, 1982; SZABADOS et al., 1987; MUSSIO et al., 1998; RAEMAKERS et al., 1999a; JOSEPH et al., 2000; GROLL et al., 2001, 2002).

Szabados et al. (1987) observaram que as concentrações de 8 mg/L de 2,4 - D proporcionavam as mais altas frequências embriogênicas na cultivar MCol 1505.

Avaliando seis cultivares de mandioca, Raemakers et al. (1993b) obtiveram diferentes respostas embriogênicas. As cultivares Tjurug, Gading e Mangi 4 tiveram maior frequência embriogênica com a concentração de 1 mg/L de 2,4 - D, a cultivar MCol 22 com 8 mg/L, a Faroka com 0,5 mg/L e a MVen 77 com as concentrações de 2 e 4 mg/L.

Sofiari et al. (1997) avaliaram o efeito dos reguladores de crescimento 2,4 - D e ANA sobre a embriogênese somática de sete cultivares (MCol 22, MCol 1505, TMS 90853, Gading, Adira 1, Adira 4 e Line 11). Dessas cultivares testadas, a mais responsiva foi a MCol 22 e a menos, a Adira 1, tendo apenas o 2,4 - D sido capaz de induzir embriogênese, cuja concentração mais adequada foi de 36,2 µM.

Taylor et al. (1996), comparando a frequência embriogênica promovida pelos reguladores de crescimento 2,4 - D e picloram, concluíram, pelos resultados, que o

picloram na concentração de 50  $\mu$ M é o mais indicado para a indução de calos embriogênicos friáveis nas cultivares MCol 1505 e TMS 60444.

Machado (2004), avaliando a frequência embriogênica induzida por diferentes concentrações de picloram (1, 3, 6, 9, 12 e 15 mg/L) em oito cultivares de mandioca (Amansa Burro, Aparecida, Mata Fome, Milagrosa, Rosa, Rosinha, Água Morna e Sacai), verificou que as mais responsivas foram a Rosinha na concentração de 12 mg/L e a Água Morna na concentração de 15 mg/L.

### 3.2. Avaliação do meio mais responsivo para o alongamento dos embriões somáticos da cultivar Rosinha

Após 25 dias de indução em meio CMM, embriões cotiledonares foram colocados em diferentes meios de alongamento para que fosse determinado qual seria o mais adequado para promover o alongamento dos cotilédones. Entre as condições testadas, o meio que promoveu maior frequência de alongamento e de embriões alongados com mais de 2 cm de altura foi o meio 3 (meio CEM com 0,4 mg/L de GA<sub>3</sub>); os demais apresentaram frequências de alongamento sem diferenças estatísticas entre eles (Tabela 5).

Tabela 5 – Influência de diferentes reguladores de crescimento sobre o alongamento de embriões em estágio cotiledonar.

Meios	Frequências (%)		
	Alongamento	Alongados com mais de 2 cm	Enraizamento
1	35 <sup>d</sup>	13 <sup>e</sup>	15 <sup>e</sup>
2	38 <sup>d</sup>	18 <sup>e</sup>	27 <sup>d</sup>
3	85 <sup>a</sup>	77 <sup>b</sup>	53 <sup>c</sup>
4	40 <sup>d</sup>	35 <sup>d</sup>	30 <sup>d</sup>

Meios CEM com diferentes reguladores de crescimento: meio 1 (0,4 mg/L de BAP), meio 2 (0,25 mg/L de BAP + 0,25 mg/L de AIB), meio 3 (0,4 mg/L de GA<sub>3</sub>) e meio 4 (+ 0,25 mg/L de GA<sub>3</sub> + 0,25 mg/L de AIB). Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos (Tukey 5%).

Diversos trabalhos utilizam a concentração de 0,4 mg/L de BAP para promover o alongamento de embriões em estágio cotiledonar (LI et al., 1996; ZHANG et al., 2000a; ZHANG et al., 2003a). Entretanto, neste trabalho esse foi o tratamento que gerou as mais baixas frequências de alongamento e enraizamento.

### **3.3. Avaliação da capacidade organogênica de diferentes regiões cotiledonares da cultivar Rosinha**

Em embriões zigóticos, conforme a cultura avaliada o potencial morfogênico é variado nas diferentes regiões das folhas de embriões em estágio cotiledonar (COMPTON; GRAY, 1993; DEBNATH, 2003; SUL; KORBAN, 1998, 2004). Foi visto que a região distal de cotilédones de embriões zigóticos em arândano vermelho apresentou frequência organogênica maior que as demais regiões (DEBNATH, 2003).

Sul e Korban (1998, 2004), avaliando três espécies diferentes de pinheiro, relataram que a organogênese, induzida em cotilédones de embriões zigóticos, iniciava-se pela região basal e prosseguia até a região distal do cotilédone.

Em melancia, a região proximal é a que apresenta maior competência, dado esse comprovado pela maior quantidade de brotos produzidos nessa região (COMPTON; GRAY, 1993).

Na embriogênese somática, diferentes explantes (DHANDAPANI et al., 2007) e regiões cotiledonares apresentam respostas morfogênicas distintas à indução de organogênese (SHARMA; MANCHIKATLA, 1995; LI et al., 2006).

Para avaliar o potencial morfogênico das regiões proximal, distal e mediana de embriões somáticos, segmentos cotiledonares dessas regiões foram colocados em meio de indução de organogênese (COM; ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000), para que a sua resposta organogênica fosse avaliada (Figura 2).

A região que apresentou maior potencial morfogênico e maior produção de brotos foi a mediana, provavelmente em razão de a área de contato com o meio ser maior que a das outras regiões (Figura 3).

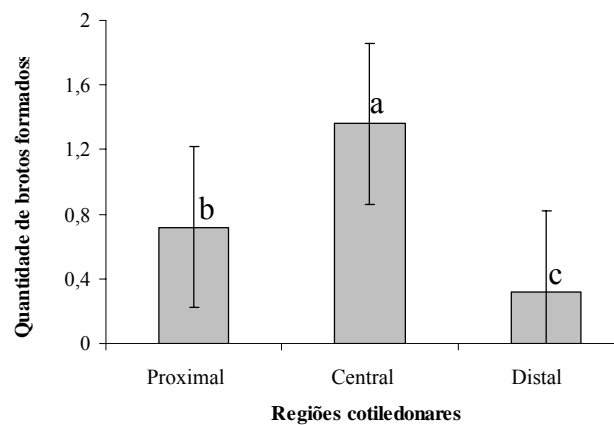


Figura 2 – Efeito da região cotiledonar sobre indução de organogênese em cotilédones da cultivar Rosinha. Médias com a mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. As barras verticais indicam o desvio-padrão obtido nos experimentos.

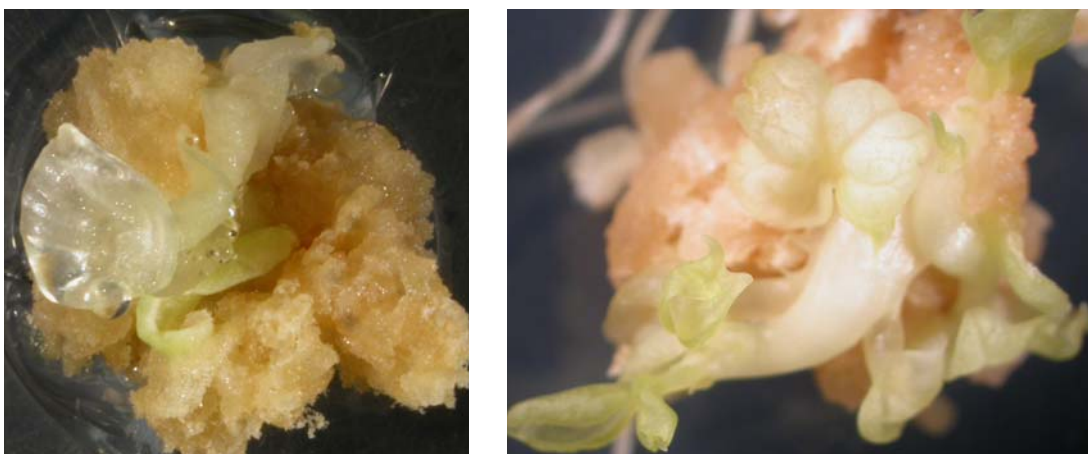


Figura 3 – Resposta morfogênica apresentada pelos segmentos cotiledonares medianos colocados em meio de indução de organogênese por 15 dias.

### 3.4. Avaliação de qual período de maturação produziria a maior quantidade de brotos em cotilédones da cultivar Rosinha submetidos à transformação via *Agrobacterium*

Sabendo a região cotiledonar que apresenta melhor resposta organogênica e que os experimentos de transformação de mandioca geralmente utilizam cotilédones como explantes para a transformação (SARRIA et al., 1995, 2000; LI et al., 1996; ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; ZHANG et al., 2000b; JØRGENSEN et al., 2005; IHEMERE et al., 2006), faz-se necessário também avaliar o tempo mais adequado de permanência do cotilédone no meio de maturação para que, quando for transferido para o meio de organogênese, produza a maior quantidade de brotos. Para tanto, segmentos cotiledonares da região mediana com diferentes dias de maturação foram transformados via *A. tumefaciens* e, após 10 dias do final do período de co-cultivo, tiveram a quantidade de brotos produzidos avaliada (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeito do tempo de maturação de embriões somáticos sobre a quantidade de brotos após serem submetidos à transformação por *Agrobacterium tumefaciens*

Quantidade de Brotos Produzidos	Número de Dias que os Embriões Permaneceram em Meio de Maturação					
	0	10	15	20	25	30
	0	0,98±1,20 <sup>b</sup>	1,92±1,69 <sup>a</sup>	1,08±1,21 <sup>b</sup>	0,68±0,78 <sup>c</sup>	0,16±0,22 <sup>d</sup>

Médias com a mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A baixa quantidade de brotos produzida pelos explantes que estiveram no meio de maturação por 10 dias pode ser explicada pela alta sensibilidade de cotilédones com poucos dias em meio de maturação às agrobactérias, como relatado por Li et al. (1996).

Como já foi visto que o estágio em que os explantes se encontram é um fator crítico na transformação de cotilédones e que embriões em meio de maturação por 20

dias já são considerados velhos (PUONTI-KAERLAS et al., 1997), os embriões que permaneceram no meio por esse período não são indicados para uso.

A maior quantidade de brotos produzida ocorreu quando os cotilédones submetidos à transformação foram maturados por 15 dias, e o resultado condiz com o relatado por outros autores (LI et al., 1996; PUONTI-KAERLAS et al., 1997; JØRGENSEN et al., 2005).

### 3.5. Avaliação do melhor meio de indução de organogênese das cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha, Urubu e Rosinha

A capacidade de organogênese *in vitro* de diferentes cultivares de mandioca é influenciada pelas proporções de auxina/citocinina utilizadas, composição do meio de cultivo e condições ambientais, além de ser genótipo-dependente (MA; XU, 2002). Por isso, foram avaliadas duas combinações de reguladores de crescimento para indução organogênica das cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu (Figura 4).

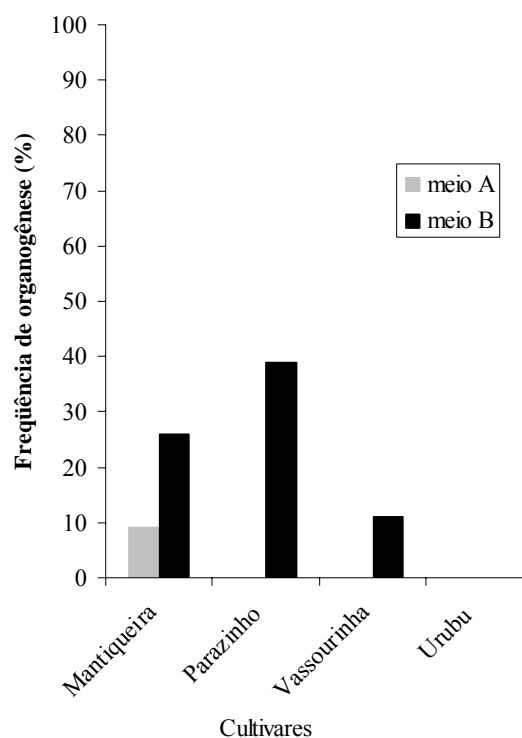


Figura 4 – Frequência organogênica das cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu. O meio A: 1 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de AIB; e meio B: 1,6 mg/L de BA + 1,6 mg/L de AIB.

Independentemente do tratamento a que estivessem sendo submetidos, todos os segmentos internodais das cultivares testadas apresentaram como resposta embriogênica inicial o intumescimento dos explantes de 10-15 após o cultivo *in vitro*.

O meio A apresenta a proporção de reguladores de crescimento mais relatada na literatura para a indução de brotos nas cultivares-modelo de mandioca, MCol22 (LI et al., 1998; PUONTI-KAERLAS et al., 1997; ZHANG et al., 2000b) e TMS60444 (ZHANG et al., 2000b). Entretanto, nas cultivares avaliadas neste trabalho esse meio foi o menos responsivo (Figura 4). A única cultivar que respondeu à indução com o meio A foi a Mantiqueira, que teve a frequência de organogênese similar à encontrada na menor resposta ao meio B (Figura 4).

O meio B foi o mais adequado para a indução de organogênese nas cultivares testadas, exceto a cultivar Urubu, que não apresentou resposta. Esse resultado condiz com o obtido por Machado (2004), em outras variedades de mandioca.

Outras combinações de reguladores de crescimento são encontradas na literatura. Guohua (1998), avaliando o efeito da combinação de diferentes auxinas e citocininas na frequência organogênica da cultivar chinesa Nanzhi 188, observou que diferentes combinações resultaram em respostas distintas, entre elas a de que 4,4 mM de TDZ em combinação com 1,1 mM de ANA e 4,4 mM de BAP com 1,1 mM de ANA induziram, em média, entre 70 e 80% de organogênese. Contudo, 4,6 mM de cinetina em combinação com 1,1 mM de ANA, ou 4,9 mM de 2iP em combinação com 1,1 mM de ANA, não resultou em organogênese, levando somente a uma baixa frequência de embriogênese.

Ponte (2002), avaliando a capacidade de indução de brotos das cultivares Amansa Burro e Rosa, relatou uma frequência organogênica de 20 e 56%, respectivamente, com o uso de 1 mg/L de BAP e 0,5 mg/L de AIB, em ambas as cultivares.

Bastos (2003) obteve a mais alta frequência de organogênese para a cultivar Tapicina (23%) utilizando 0,5 mg/L de BAP e 1 mg/L de AIB, enquanto para a cultivar Bujá Preta ele relatou uma frequência máxima de 14%, quando o meio foi suplementado com 0,25 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de AIB.

A organogênese obtida nas cultivares Parazinho, Mantiqueira e Vassourinha promoveu a formação de raízes (rizogênese), e essa formação ocorreu de forma indireta (Figura 5).

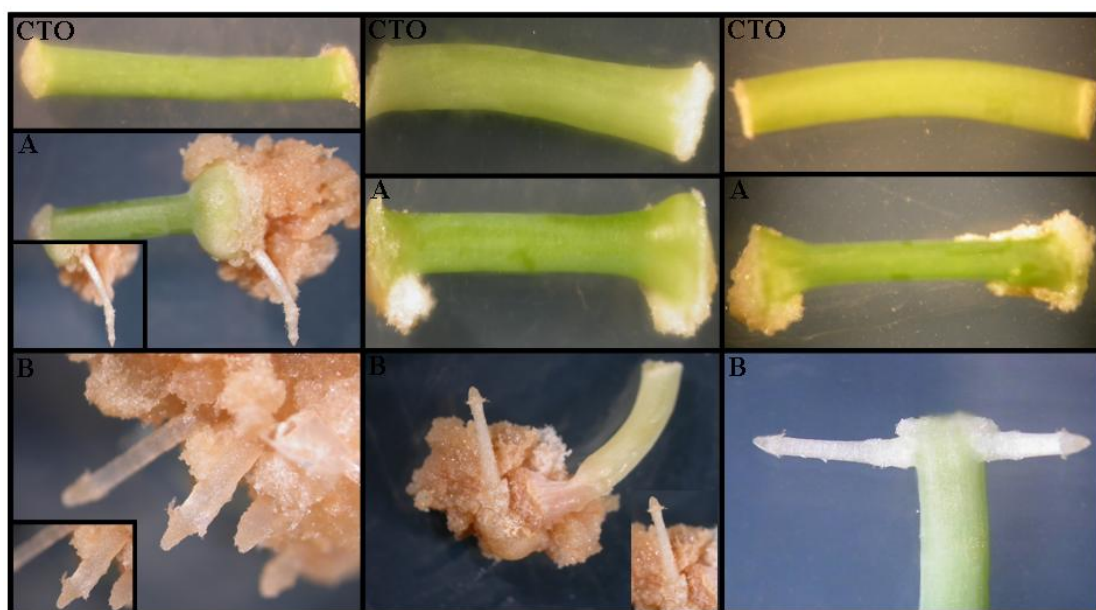


Figura 5 – Respostas morfológicas das cultivares de mandioca. A primeira coluna mostra o resultado obtido na cultivar Parazinho, a segunda na Mantiqueira e a terceira na Vassourinha. Letras: CTO – meio sem regulador de crescimento. A – meio de indução de organogênese com 1 mg/L de BA + 0,5 mg/L de AIB; e B – meio de indução de organogênese com 1,6 mg/L de BA + 1,6 mg/L de AIB.

#### 4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais estabelecidas neste trabalho, pode-se concluir que:

- Os explantes de mandioca das diferentes cultivares avaliadas responderam, de maneiras distintas, às auxinas utilizadas neste trabalho. A maior frequência e a média mais alta de embriões foram detectadas quando se empregou o hormônio 2,4 - D.

- A proporção de calos observada na embriogênese induzida por picloram foi maior do que a verificada com o hormônio 2,4 - D.

- As concentrações de 2,4 - D mais indicadas para as cultivares são: Mantiqueira - 2 mg/L, Parazinho - 1 mg/L, Vassourinha - 2 mg/L e Urubu - 2 mg/L.

- As concentrações de picloram mais indicadas para as cultivares são: Mantiqueira - 8 mg/L, Parazinho - 0,2 mg/L, Vassourinha - 2 mg/L e Urubu - 0,2 mg/L.

- O meio mais indicado para o alongamento de explantes em estágio cotiledonar da cultivar Rosinha é o que apresenta 0,4 mg/L GA<sub>3</sub>.

- Na cultivar Rosinha, a região cotiledonar mediana é a mais adequada para indução de organogênese, e o período de 15 dias de maturação é o que produziu a maior quantidade de brotos em cotilédones que foram submetidos à transformação via *Agrobacterium tumefaciens*.

- O meio no qual ocorreu maior frequência organogênica nas cultivares Parazinho, Mantiqueira e Vassourinha foi o de combinação hormonal 0,5 mg/L de BAP e 1 mg/L de AIB.

## 5. REFERÊNCIAS

ABAM – Associação Brasileira de Produtores de Amido de Mandioca. Disponível em: <[www.abam.com.br](http://www.abam.com.br)>. Acesso em: 20 nov. 2007.

ANDERSON, J. V.; DELSENY, M.; FREGENE, M. A.; JORGE, V.; MBA, C.; LOPEZ, C.; RESTREPO, S.; SOTO, M.; PIEGU, B.; VERDIER, V.; COOKE, R.; TOHME, J.; HORVATH, D. P. An EST resource for cassava and other species of Euphorbiaceae. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 527-539, 2004.

ATEHNKENG, J.; ADETIMIRIN, V. O.; NG, S. Y. C. Exploring the African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm for somatic embryogenic competence. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1324-1329, 2006.

BASTOS, J. L. P. **Estudos sobre a regeneração *de novo* de genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados no Estado do Ceará**. Fortaleza: UFCE, 2003. 91 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

BHAU, B. S.; WAKHLU, A. K. Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 25-29, 2001.

BOBÁK, M.; BLEHOVÁ, A.; KRIŠTÍN, J.; OVEČKA, M.; ŠAMAJ, J. Direct plant regeneration from leaf explants of *Drosera rotundifolia* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 43, p. 43-49, 1995.

CEBALLOS, H.; IGLESIAS, C. A.; PÉREZ, J. C.; DIXON, A. G. O. Cassava breeding: opportunities and challenges. **Plant Molecular Biology**, p. 56, v. 503-516, 2004.

CID, L. P. B.; SILVA, R. E. P. **Novas aplicações da cultura de tecidos na mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2007. Disponível em: <<http://www.suct.ms.gov.br/mandioca/trabalhos/PASTA106.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2007.

COMPTON, M. E.; GRAY, D. J. Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid, and tetraploid watermelon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 118, p. 151-157, 1993.

DANSO, K. E.; FORD-LLOYD, B. V. Induction of high-frequency somatic embryos in cassava for cryopreservation. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 226-232, 2002.

DEBNATH, S. C. Improved shoot organogenesis from hypocotyl segments of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 39, p. 490-495, 2003.

DELGADO, G. E.; ROJAS, C. Cassava seed production program by meristem culture in UNPRG, Lambayeque (Peru). In: THRO, A. M.; ROCA, W. (Eds.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1993, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena, Colombia: CIAT, 1993. (Working Document, 123).

DHANDAPANI, M.; KIM, D. H.; HONG, S. B. Efficient plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis from the explants of *Catharanthus roseus*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 44, p. 18-25, 2007.

EL-SHARKAWY, M.A. Cassava biology and physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 481-501, 2004.

ESKES, A. B.; VARGA, A.; STARITSKY, G.; BRUINSMA, J. Callus growth and rooting of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) stem segments cultured *in vitro*. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 23, p. 315-320, 1974.

FRANCHE, C.; BOGUSZ, D.; SCHÖPKE, C.; FAUQUET, C.; BEACHY, R. N. Transient gene expression in cassava using high velocity micriprojectiles. **Plant Molecular Biology**, v. 17, p. 493-498, 1991.

FUKUDA, C.; OTSUBO, A. A. **Cultivo da mandioca na região centro sul do Brasil**. Sistemas de Produção, 7; EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 2003. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca\\_centrosul/index.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_centrosul/index.htm)>. Acesso em: 20 jul. 2007.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 27-47, 2004.

GARCIA, M. G.; VEGA, V. M.; MORALES, S. R. Effect of meristem culture micropropagation on the vigor and yield of the cassava clone "Señorita". In: THRO, A. M.; ROCA, W. (Eds.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1993, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena, Colombia: CIAT, 1993. (Working Document, 123).

GILL, R.; MALHOTRA, P. K.; GOSAL, S. S. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 84, p. 100205-100209, 2006.

GROLL, J.; MYCOCK, D. J.; GRAY, V. M. Effect of medium salt concentration on differentiation and maturation of somatic embryos of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Annals of Botany**, v. 89, p. 645-648, 2002.

GROLL, J.; MYCOCK, D. J.; GRAY, V. M.; LAMINSKI, S. Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 201-210, 2001.

GUO, J. Y.; LIU, Y. Q. Rapid propagation of cassava by tissue culture and its application in rural districts in China. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK (CBN), 2., 1995, Bogor. **Proceeding...** Bogor, Indonesia CIAT, 1995. (Working Document 150).

GUOHUA, M. Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 54, p. 1-7, 1998.

HANKOUA, B. B.; NG, S. Y. C.; FAWOLE, I.; PUONTI-KAERLAS, J.; PILLAY, M.; DIXON, A. G. O. Regeneration of a wide range of African cassava genotypes via shoot organogenesis from cotyledons of maturing somatic embryos and conformity of the field-established regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 221-231, 2005.

HENSHAW, G. G. *In vitro* plant regeneration from somatic tissue in cassava. In: CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Report on the founding workshop for the advanced cassava research**. Cali, Colombia, 1989. (Working Document, 52).

IHEMERE, U.; ARIAS-GARZON, D.; LAWRENCE, S.; SAYRE, R. Genetic modification of cassava for enhanced starch production. **Plant Biotechnology Journal**, v. 4, p. 453-465, 2006.

JAIN, R. K.; CHOWDHURY, J. B.; FRIEDT, W. Organogenesis and plant formation from cotyledon explant cultures of wild turnip rape (*Brassica tournefortii* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 15, p. 107-111, 1988.

JØRGENSEN, K.; BAK, S.; BUSK, P. K.; SØRENSEN, C.; OLSEN, C. E.; PUONTI-KAERLAS, J.; MØLLER, B. L. Cassava Plants with a Depleted Cyanogenic Glucoside Content in Leaves and Tubers. Distribution of Cyanogenic Glucosides, Their Site of Synthesis and Transport, and Blockage of the Biosynthesis by RNA Interference Technology. **Plant Physiology**, v. 139, p. 363-374, 2005.

JOSEPH, T.; YEOH, H. H.; LOH, C. S. Cyanogenesis in somatic embryos and plantlets of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Food and Agriculture**, v. 79, p. 1071-1074, 1999.

JOSEPH, T.; YEOH, H. H.; LOH, C. S. Somatic embryogenesis, plant regeneration and cyanogenesis in *Manihot glaziovii* Muell. Arg. (ceara rubber). **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 535-538, 2000.

KALLAK, H.; REIDLA, M.; HILPUS, I.; VIRUMÄE, K. Effects of genotype, explant source and growth regulators on organogenesis in carnation callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 127-135, 1997.

KARTHA, K. K.; GAMBORG, O. L. Elimination of cassava mosaic disease by meristem culture. **Phytopathology**, v. 65, p. 826-828, 1975.

KARTHA, K. K.; GAMBORG, O. L.; CONSTABEL, F.; SHYLUK, J. P. Regeneration of cassava plants from apical meristems. **Plant Science Letters**, v. 2, p. 107-113, 1974.

KATHIRAVAN, K.; VENGEDESAN, G.; SINGER, S.; STEINITZ, B.; PARIS, H. S.; GABA, V. Adventitious regeneration *in vitro* occurs across a wide spectrum of squash (*Cucurbita pepo*) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 85, p. 285-295, 2006.

KONAN, N. K.; SANGWAN, R. S.; SANGWAN-NORREEL, B. S. Efficient *In Vitro* Shoot-regeneration systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Breeding**, v. 113, p. 227-236, 1994b.

KONAN, N. K.; SANGWAN, R. S.; SANGWAN-NORREEL, B. S. Nodal axillary meristems as target tissue for shoot production and genetic transformation in cassava *Manihot esculenta* Crantz. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK (CBN), 2., 1994, Bogor. **Proceeding...** Bogor, Indonesia: CIAT, 1994c. (Working Document 150).

KONAN, N. K.; SANGWAN, R. S.; SANGWAN-NORREEL, B. S. Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37, p. 91-102, 1994a.

KONAN, N. K.; SCHÖPKE, C.; CÁRCAMO, R.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristems. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 444-449, 1997.

LI, H. Q.; HUANG, Y. W.; LIANG, C. Y.; GUO, J. Y.; LIU, H. X.; POTRYKUS, I.; PUONTI-KAERLAS, J. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 410-414, 1998.

LI, H. Q.; SAUTTER, C.; POTRYKUS, I.; PUONTI-KAERLAS, J. Genetic Transformation of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 736-740, 1996.

LI, J.; HUANG, X. L.; WEI, Y. R.; HUANG, X.; LI, Z.; LI, X. J. Histological analysis of direct organogenesis from micro-cross-sections of cultures of the banana. **Australian Journal of Botany**, v. 54, p. 595-599, 2006.

MA, G.; XU, Q. Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 70, p. 281-288, 2002.

MACHADO, T. F. **Regeneração *in vitro* e transformação genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do Nordeste brasileiro**. Fortaleza: UFCE, 2004. 129 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará Fortaleza, Ceará.

MATHEWS, H.; SCHOPKE, C.; CARCAMO, R.; CHAVARRIAGA, P.; FAUQUET, L.; BEACHY, R. N. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 328-333, 1993.

MATTOS, P. L. P.; GOMES, J. C.; FARIAS, A. R. N.; FUKADA, C. Cultivo da mandioca nas regiões norte e nordeste do Brasil. In: **Cultura de tuberosas amiláceas latino americanas**. [S.l.]: Fundação Cargill, 2002. Cap. 14, v. 2.

MEDINA, R. D.; FALOCI, M. M.; SOLÍS NEFFA, V.; MROGINSKI, L. A. Embriogénesis somática y regeneración de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de cultivares de interés para Argentina. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v. 32, p. 132-136, 2003.

MOREIRA, L. C.; TAKATSU, A.; CALDAS, L. S. Recuperação de plantas de mandioca livre de *Xanthomonas manihotis* através da cultura de meristemas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 2, p. 217-223, 1977.

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

MUSSIO, I.; CHAPUT, M. H.; SERRAF, I.; DUCREUX, G.; SIHACHAKR, D. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of an African clone of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and analysis of the conformity of regenerated plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 53, p. 205-211, 1998.

OGBURIA, M. N. Somatic embryogenesis, plantlet regeneration and micropropagation of cultivars and F1 hybrids of *Manihot esculenta*. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 429-432, 2003.

OLIVEIRA, R. P.; GOMES, T. S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2329-2334, 2000.

OTOO, J. A. **Rapid multiplication of cassava**. 1996. IITA Research Guide, 51. Disponível em: <[http://www.iita.org/cms/details/trn\\_mat/irg51/irg51.htm](http://www.iita.org/cms/details/trn_mat/irg51/irg51.htm)>. Acesso em: 30 maio 2007.

PONTE, L. F. A. **Estudos sobre a embriogênese somática em variedades da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivadas no Estado do Ceará**. Fortaleza: UFCE, 2002. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

PUONTI-KAERLAS, J. Cassava biotechnology. In: TOMBS, M. P. (Ed.). **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**. Hants, UK: Intercept Ltd., 1998.

PUONTI-KAERLAS, J.; LI, H.-Q.; SAUTTER, C.; POTRYKUS, I. Production of transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz) via organogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation. **African Journal of Root and Tuber Crops**, v. 2, p. 181-186, 1997.

RAEMAKERS, K. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Direct cyclic somatic embryogenesis of cassava for mass production purposes. **Methods in Molecular Biology**, v. 111, p. 61-70, 1999a.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; AMATI, M.; STARITSKY, G.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Cyclic somatic embryogenesis in cassava. **Annals of Botany**, v. 71, p. 289-294, 1993a.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; BESSEMBINDER, J.; STARITSKY, G.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Induction, germination and shoot development of somatic embryos in cassava. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 33, p. 151-156, 1993b.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; ROZENBOOM, M. G. M.; DANSO, K.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Regeneration of plants from somatic embryos and friable embryogenic callus of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **African Journal of Root and Tuber Crops**, v. 2, p. 32-36, 1997.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; SCHAVEMARKER, C. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Improvement of cyclic somatic embryogenesis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 226-229, 1993c.

RAEMAKERS, K. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Direct, cyclic somatic embryogenesis of Cassava for mass production purposes. In: HALL, R. D. (Ed.). **Plant cell culture protocols**. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1999b.

RAEMAKERS, K.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. The use of somatic embryogenesis for plant propagation in cassava. **Molecular Biotechnology**, v. 14, p. 215-221, 2000.

RAEMAKERS, K.; SCHREUDER, M.; PEREIRA, I.; MUNYIKWA, T.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. Progress made in FEC transformation of cassava. **Euphytica**, v. 120, p. 15-24, 2001.

ROCA, W. M. Cassava production and utilization problems and their. Biotechnological. **Workshop Resource Papers**, p. 215-219, 1990.

ROCA, W. M.; HENRY, G.; ANGEL, F.; SARRIA, R. Biotechnology research applied to cassava improvement at the International Center of Tropical Agriculture (CIAT). **AgBiotech News and Information**, v. 4, p. 303-308, 1992.

SARRIA, R. A.; TORRES, E.; BALCÁZAR, N.; DESTÉFANO-BELTRAN, L.; ROCA, W. M. Progress in *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING – CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 2., 1995, Bogor. **Proceedings...** Bogor, Indonesia: CIAT, 1995. (Working Document 150).

SARRIA, R.; TORRES, E.; ANGEL, F.; CHAVARRIAGA, P. Transgenic plants of cassava (*Manihot esculenta*) with resistance to Basta obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 339-344, 2000.

SAS – Statistical Analysis System. **Statistics version 8.1**. North Carolina, USA: SAS Institute Inc, Cary, 2000.

SCHÖKPE, C.; TAYLOR, N. J.; CÁRCAMO, R.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. Optimization of parameters for particle bombardment of embryogenic suspension cultures of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using computer image analysis. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 526-530, 1997b.

SCHÖPKE, C.; TAYLOR, N.; CÁRCAMO, R.; KONAN, N. K.; MARMEY, P.; HENSHAW, G. G.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 731-735, 1996.

SHARMA, P.; MANCHIKATLA, V.; RAJAM, M. V. Genotype, explant and position effects on organogenesis and somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 46, p. 135-141, 1995.

SILVA, M. N.; CEREDA, M. P.; FIORINI, R. A. Multiplicação rápida da mandioca. In: CEREDA, M. et al. (Eds.). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americana**. [S.l.]: FUNDAÇÃO CARGILL, 2002. Cap. 9.

SIRITUNGA, D.; ARIAS-GARZON, D.; WHITE, W.; SAYRE, R. T. Over-expression of hydroxynitrile lyase in transgenic cassava roots accelerates cyanogenesis and food detoxification. **Plant Biotechnology Journal**, v. 2, p. 37-43, 2004.

SIRITUNGA, D.; SAYRE, R. T. **Generation of Cyanogens-Free Transgenic Cassava Planta**, v. 217, p. 367-373, 2003.

SMITH, M. K.; BIGGS, B. J.; SCOTT, K. J. *In vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 6, p. 221-228, 1986.

SOFIARI, E.; RAEMAKERS, C. J. J. M.; BERGERVOET, J. E. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Plant regeneration from protoplasts isolated from friable embryogenic callus of cassava. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 159-165, 1998.

SOFIARI, E.; RAEMAKERS, C. J. J. M.; KANJU, E.; DANSO, K.; VAN LAMMEREN, A. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Comparison of NAA and 2,4-D induced somatic embryogenesis in cassava. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 50, p. 45-56, 1997.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G.; FUKADA, W. M. G. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em mandioca. In: CEREDA, M. et al. (Eds.). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americana**. [S.l.]: FUNDAÇÃO CARGILL, 2002. Cap. 7.

SOUZA, A. S.; SOUZA, F. V. D.; SEREJO, J. A. S.; JUNGHANS, T. G. **Biotechnologia como ferramenta para aumento de competitividade da mandioca**. 2005 Disponível em: <<http://www.suct.ms.gov.br/mandioca/palestras/Biotechnologia%20como%20ferramenta%20para%20aumento%20de%20competitividade%20da%20mandioca%20-%20Ant%C3%B4nio%20da%20Silva%20Souza.PDF>>. Acesso em: 20 maio 2007.

STAMP, J. A. Somatic embryogenesis in cassava: the anatomy and morphology of the regeneration process. **Annals of Botany**, v. 59, p. 451-459, 1987.

STAMP, J. A.; HENSHAW, G. G. Adventitious regeneration in cassava. In: WITHERS, L. A.; ALDERS, P. G. (Eds.). **Plant tissue culture and its agricultural applications**, London, UK: Butterworths, 1986.

STAMP, J. A.; HENSHAW, G. G. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 10, p. 227-233, 1987.

STAMP, J. A.; HENSHAW, G. G. Somatic embryogenesis in cassava. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 105, p. 183-187, 1982.

SUDARMONOWATI, E.; HENSHAW, G. G. The induction of somatic embryogenesis of recalcitrant cassava cultivars using picloram and dicamba. In: THRO, A. M.; ROCA, W. (Eds.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1993, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena, Colombia: CIAT, 1993. (Working Document, 123).

SUL, I. W.; KORBAN, S. S. Effects of media, carbon sources, and cytokinins on shoot organogenesis in the christmas tree *Pinus sylvestris* L. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 73, p. 822-827, 1998.

SUL, I. W.; KORBAN, S. S. Effects of salt formulations, carbon sources, cytokinins, and auxin on shoot organogenesis from cotyledons of *Pinus pinea* L. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 197-205, 2004.

SZABADOS, L.; HOYOS, R.; ROCA, W. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 248-251, 1987.

TAKAHASHI, E. K.; KOBAYASHI, A. K.; VIEIRA, L. G. E. Induction of cassava somatic embryogenesis in liquid medium associated to floating membrane rafts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 35-39, 2000.

TAYLOR, N. J.; EDWARDS, M.; KIERNAN, R. J.; DAVEY, C. D. M.; BLAKESLEY, D.; HENSHAW, G. G. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava. **Nature biotechnology**, v. 14, p. 726-730, 1996.

TAYLOR, N. J.; MASONA, M. V.; CARCAMO, R.; HO, T.; SCHÖPKE, C.; FAUQUET, C. M. Production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v. 120, p. 25-34, 2001.

TAYLOR, N.; CHAVARRIAGA, P.; RAEMAKERS, K.; SIRITUNGA, D.; ZHANG, P. Development and application of transgenic technologies in cassava. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 671-688, 2004.

THORPE, T. A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Eds.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic, 1994.

TORO, J. C.; ROCA, W.; COCK, J. H. Multiplicación acelerada de material genético promisorio de yuca. In: DOMÍNGUEZ, C. (Comp.). **Yuca: investigación, producción y utilización**. Cali, Colombia: CIAT, 1983.

WOODWARD, B.; PUONTI-KAERLAS, J. Somatic embryogenesis from floral tissue of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v. 120, p. 1-6, 2001.

ZHANG, P.; GRUISSEM, W. Production of transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: CURTIS, I. S. (Ed.). **Transgenic crops of the world: essential protocols**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2005.

ZHANG, P.; JAYNES, J. M.; POTRYKUS, I.; GRUISSEM, W.; PUONTI-KAERLAS, J. Transfer and expression of an artificial storage protein (ASP1) gene in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Transgenic Research**, v. 12, p. 243-250, 2003a.

ZHANG, P.; LEGRIS, G.; COULIN, P.; PUONTI-KAERLAS, J. Production of stably transformed cassava plants via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 939-945, 2000b.

ZHANG, P.; PHANSIRI, S.; PUONTI-KAERLAS, J. Improvement of cassava shoot organogenesis by the use of silver nitrate *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 47-54, 2001.

ZHANG, P.; POTRYKUS, I.; PUONTI-KAERLAS, J. Efficient production of transgenic cassava using negative and positive selection. **Transgenic Research**, v. 9, p. 405-415, 2000a.

ZHANG, P.; PUONTI-KAERLAS, J. PIG-mediated cassava transformation using positive and negative selection. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 1041-1048, 2000.

ZHANG, Y.; WEI, Z.; XI, M.; SHI, J. Direct organogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of masson pine (*Pinus massoniana* L.) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 84, p. 119-123, 2006.

ZOK, S.; NYOCHEMBENG, L. M.; TAMBONG, J.; WUTOH, J. G. Rapid seedstock multiplication of improved clones of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) through shoot tip culture in Cameroon. In: THRO, A. M.; ROCA, W. (Eds.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1993, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena, Colombia: CIAT, 1995. (Working Document, 123).

## **CAPÍTULO 2**

### **AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

#### **1. INTRODUÇÃO**

A mandioca é uma das culturas mais importantes para a alimentação humana, uma vez que cerca 600 milhões de pessoas se alimentam dessa cultura diariamente. No mundo há mais de 16 milhões de hectares plantados e, anualmente, são produzidos mais de 170 milhões de toneladas (ANDERSON et al., 2004).

Apesar de as vantagens apresentadas pela cultura e de a produção ter crescido mais de 75% nos últimos 30 anos, há diversos fatores que limitam sua produção e o seu uso mais diversificado nas dietas humana e animal (ANDERSON et al., 2004). Dentre eles, podem ser citados o seu baixo conteúdo protéico (1-2%) e de aminoácidos sulfurosos (COCK, 1985; PUONTI-KAERLAS, 1998), a rápida deterioração das raízes após a colheita (PUONTI-KAERLAS, 1998; WENHAM, 1995), a presença de compostos fenólicos (SIRITUNGA; SAYRE, 2003) e o grande número de pragas, doenças e vírus que atacam essa cultura (BELLOTTI et al., 1999; MATTOS et al., 2002).

O desenvolvimento de novas variedades de mandioca pelo melhoramento convencional é dificultado pelo alto grau de heterozigose, floração irregular de

algumas cultivares e baixa taxa de germinação das sementes (JIN et al., 2005). Assim, a engenharia genética surge como uma alternativa que pode auxiliar o melhoramento da mandioca.

Os ganhos que podem ser atingidos com a transformação genética de plantas têm reflexo sobre os agricultores, a indústria alimentar, os consumidores e, sobretudo, sobre o ambiente. A modificação genética pode ser direcionada no sentido de a cultivar requerer menor quantidade de pesticidas, fertilizantes e água e permitir a produção de plantas com níveis mais reduzidos de compostos alérgenos ou tóxicos, com mais qualidade para armazenamento e, ou, processamento e melhores qualidades nutricionais (OLIVEIRA, 2000).

Cultivares de mandioca transgênicas já desenvolvidas apresentam as seguintes características: reduzido conteúdo cianogênico (KOCH et al., 1994; SIRITUNGA; SAYRE, 2003; SIRITUNGA et al., 2004; JØRGENSEN et al., 2005), resistência à infecção por geminivírus (CHELLAPPAN et al., 2004; ZHANG et al., 2005), resistência ao herbicida Basta<sup>®</sup> (SARRIA et al., 2000) expressão de proteínas Bt (LADINO et al., 2002), conteúdo de amido modificado (SALEHUZZAMAN et al., 1993; RAEMAKERS et al., 2001; RAEMAKERS et al., 2005; IHEMERE et al., 2006), aumento na meia-vida dos tubérculos colhidos (THRO et al., 1996) e o aumento do conteúdo protéico (ZHANG et al., 2003a).

Das mais de 1.500 cultivares de mandioca testadas (ALVES, 2000), apenas poucas, entretanto, foram utilizadas com sucesso em processos de transformação. Entre elas, podem ser citadas a TMS 60444 (RAEMAKERS et al., 1996; SCHOPKE et al., 1996; GONZÁLEZ et al., 1998; ZHANG et al., 2000ab; ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; SCHREUDER et al., 2001; LADINO et al., 2002; ZHANG et al., 2003a; CHELLAPPAN et al., 2004; RAEMAKERS et al., 2005; ZHANG et al., 2005), a MCol 2215 (SIRITUNGA; SAYRE, 2003; SIRITUNGA et al., 2004), MCol 22 (LI et al., 1996; ZHANG et al., 2000b; ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; JØRGENSEN et al., 2005) e a MPer 183 (SARRIA et al., 2000).

Somente as cultivares TMS 60444 (RAEMAKERS et al., 1996; SCHÖPKE et al., 1996; ZHANG et al., 2000b; ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; LADINO et al., 2002; CHELLAPPAN et al., 2004; RAEMAKERS et al., 2005) e MCol 22 (ZHANG et al., 2000b; ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000) foram transformadas com sucesso via bombardeamento. A transformação via *Agrobacterium tumefaciens* foi bem-sucedida apenas nas cultivares MCol 22 (LI et al., 1996; JØRGENSEN et

al., 2005), MCol 2215 (WHITE et al., 1998; SIRITUNGA; SAYRE, 2003; SIRITUNGA et al., 2004), MPer 183 (SARRIA et al., 2000) e TMS 60444 (GONZALEZ et al., 1998; ZHANG et al., 2000a; SCHREUDER et al., 2001; LADINO et al., 2002; ZHANG et al., 2003a; ZHANG et al., 2005).

O pré-requisito básico para a produção de plantas transgênicas é a existência de um sistema eficiente de regeneração e de seleção de plantas transformadas (CALDAS et al., 1998).

Existem três fatores que afetam a regeneração da planta *in vitro*: o genótipo, a fonte de explantes e a condição da cultura (CALDAS et al., 1998). Por isso, é importante determinar qual antibiótico será utilizado e a sua dose, de forma que a interferência no potencial regenerativo dos explantes seja mínima durante o processo de seleção dos transgênicos (BRASILEIRO; LACORTE, 1998).

A canamicina é o antibiótico mais freqüentemente utilizado para a seleção de plantas transformadas com vetores que possuem o gene *npt II*. Na cultura da mandioca, esse antibiótico já foi usado em diversos trabalhos, em concentrações que vão de 5 até 1.000 mg/L (SCHÖPKE et al., 1996; SCHREUDER et al., 2001; SATO et al., 2004).

A paromomicina já foi utilizada em vários trabalhos na cultura da mandioca e em diferentes concentrações (GONZÁLEZ et al., 1998; SIRITUNGA; SAYRE, 2003; SIRITUNGA et al., 2004; IHEMERE et al., 2006).

A resposta da mandioca a diferentes antibióticos do grupo dos aminoglicosilados é muito variável e depende da variedade (FOURMY et al., 1996). O amplo intervalo entre as concentrações utilizadas demonstra o comportamento distinto apresentado pelos antibióticos, podendo exercer um caráter fitotóxico e deletério, reduzir a eficiência da transformação de diversas espécies ou até favorecer a regeneração de plantas transformadas (NAUERBY et al., 1997).

Para aumentar a eficiência da transformação, diversas estratégias têm sido propostas, a exemplo da utilização de vetores binários modificados (HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996) e da adição de acetosseringona ao meio de co-cultivo (STACHEL et al., 1985) e de antioxidantes (PERL et al., 1996) e do uso do bombardeamento de microprojéteis no tecido-alvo do processo de transformação via agrobactéria (BIDNEY et al., 1992).

Recentemente, foi proposto o uso de pulsos de ultra-som para ferir o tecido-alvo, visando ao aumento da infecção por *Agrobacterium* (SANTARÉM, 2000ab). O

SAAT (*Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation*), primeiramente descrito por Trick e Finer (1997), tem gerado expectativas em relação à sua maior eficiência na transferência de genes usando *Agrobacterium*. Nessa técnica, independentemente da natureza do material vegetal a ser transformado, os tecidos vegetais em suspensão podem ser submetidos ao tratamento de ultra-som (SANTARÉM et al., 1998; TRICK; FINER, 1998).

Diversos protocolos de transformação de mandioca foram desenvolvidos, mas nenhum deles tem aplicabilidade universal, e os sistemas de seleção utilizados ainda geram muitos escapes ou são deletérios (ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000). Sabendo dessas deficiências, este trabalho teve como objetivos: avaliar quais seriam os parâmetros que afetam a transformação via *Agrobacterium tumefaciens* da cultivar Rosinha, qual seria o melhor agente seletivo e a concentração mais adequada para a seleção de embriões transformados de mandioca da cultivar Rosinha e qual dos sistemas de transformação é o mais adequado para as cultivares Mantiqueira, Parazinho Vassourinha e Urubu.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal**

Os explantes de mandioca da cultivar Rosinha utilizados nos experimentos foram provenientes de plantas cultivadas *in vitro*, no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Universidade Federal do Ceará, e os das cultivares Mantiqueira, Vassourinha, Parazinho e Urubu de plantas cultivadas *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos do BIOAGRO (Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária) da Universidade Federal de Viçosa.

### **2.2. Indução de embriogênese somática primária da cultivar Rosinha**

Ápices caulinares de plantas cultivadas *in vitro* contendo até dois primórdios foliares foram isolados sob condições assépticas e transferidos para placas de Petri contendo 25 mL do meio CIM (*Cassava Induction Medium*) (ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000; ZHANG et al., 2000b). O meio CIM é constituído do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 20 g/L de sacarose, 0,5 mg/L de sulfato de cobre e 8 g/L de ágar (SIGMA, EUA), suplementados com 8 mg/L de picloram, em pH 5,8. Os explantes foram incubados por 21 dias, no escuro, e a  $26 \pm 2$  °C. Após esse período, diversos embriões em estágio globular foram produzidos e permaneceram agrupados em diferentes conjuntos na superfície do explante. Esses conjuntos eram transferidos para meio CMM (*Cassava Maturation Medium*) (ZHANG; PUONTI-

KAERLAS, 2000; ZHANG et al., 2000b). O meio CMM é constituído por meio MS, com 20 g/L de sacarose, 0,5 mg/L de sulfato de cobre, 0,1 mg/L de BAP e 8 g/L de ágar, em pH 5,8, para maturar, ou para meio CIM suplementado com 8 mg/L de picloram, para um ou mais ciclos de multiplicação.

Os reagentes utilizados nos experimentos relatados possuíam grau analítico, e todos os meios de cultivo utilizados tiveram o pH ajustado com NaOH 1M e foram autoclavados a 120 °C, 1 kgf/cm<sup>2</sup>, por 15 min.

### 2.3. Preparação da cepa de *Agrobacterium tumefaciens*

A construção utilizada nos experimentos de agroinfecção, pBE2113-GUS, foi gentilmente cedida pelo Dr. Francisco de Assis Paiva Campos, da Universidade Federal do Ceará (Figura 1). O plasmídeo utilizado estava inserido na estirpe EHA105, de *Agrobacterium tumefaciens*.

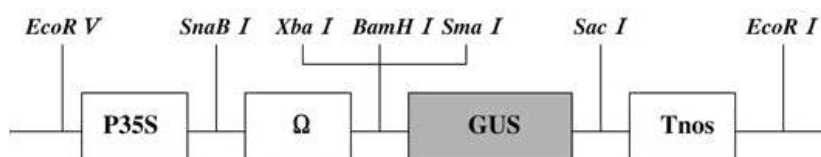


Figura 1 – Representação esquemática da região T-DNA dos plasmídios pBE2113-GUS. Abreviaturas: *P35S*, promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor;  $\Omega$ , seqüência 5' não traduzida do vírus do mosaico da couve-flor; *GUS*, gene da  $\beta$ -glucuronidase; *Tnos*, sinal de poliadenilação do gene da nopalina sintase. *EcoRV*, *SnaBI*, *XbaI*, *BamHI*, *SmaI*, *SacI* e *EcoRI*, enzimas de restrição.

A linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105/pBE2113-*gus* foi conservada em solução de glicerol (50%), à temperatura de -80 °C, mantendo-se um estoque de trabalho na geladeira (5 °C), em placas de Petri contendo meio com 25 mL de meio YMB (*Yeast Mannitol Broth*; Beringer, 1974; 100 mg/L de fosfato de potássio, 100 mg/L de sulfato de magnésio, 100 mg/L de cloreto de sódio, 5 g/L de glicose, 10 g/L de manitol, 400 mg/L de extrato de levedura e ágar de 20 mg/L,

pH 7,0) com 25 mg/L de rifampicina (Boehringer, Alemanha) e 50 mg/L de canamicina (Serva, Alemanha). Nos experimentos de transformação, as cepas mantidas na geladeira eram reativadas em novas placas com meio YMB sólido acrescido de 25 mg/L de rifampicina e 50 mg/L de canamicina incubadas na temperatura de  $27 \pm 2$  °C, por 48 h. Uma colônia isolada foi transferida para um erlenmeyer de 125 mL contendo 5 mL de meio LB (*Luria - Bertani*: 10 g/L de triptona (Sigma, USA), 5 g/L de extrato de levedura (Sigma, USA) e 10 g/L de cloreto de sódio, pH 7,0) suplementados com rifampicina (25 mg/L) e canamicina (50 mg/L) e incubados em mesa agitadora orbital (Tecnal, Brasil) a 180 rpm,  $27 \pm 2$  °C, por 24 h. Um alíquota de 50 µL da suspensão bacteriana foi transferida para um erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio LB líquido, com antibióticos, incubado a  $27 \pm 2$  °C, em mesa agitadora orbital a 180 rpm, por 12-20 h até atingir uma densidade ótica a 600 nm ( $D.O_{.600}$ ) entre 0,5 e 1,0, medida em espectrofotômetro (Spectrometry Genegys 8). Ao final desse período, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 6.000 rpm (Sorvall RC5C Plus Super Speed Refrigerated Centrifuge – Rotor 28), à temperatura de 4 °C, durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células obtidas, ressuspensas com 50 mL de meio MS (pH 5,3) até alcançar uma concentração celular que apresentasse densidade ótica à 600 nm igual a 1 ( $D.O_{.600} = 1$ ). Incubou-se a solução bacteriana a  $27 \pm 2$  °C, em mesa agitadora orbital a 80 rpm, por aproximadamente 1 h.

#### **2.4. Processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens***

Segmentos de embriões em estágio cotiledonar de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> foram excisados e deixados em placa de Petri com meio CBM líquido (*Cassava Basic Medium*: meio MS com 2% de sacarose e 2 mM de CuSO<sub>4</sub> (ZHANG; PUONTI-KAERLAS, 2000), em pH 5,8, até que o número total de explantes desejados fosse adquirido. Em seguida, os pedaços de cotilédones foram transferidos para erlenmeyers de 125 mL com 25 mL da suspensão bacteriana EHA105/pBE2113-*gus* com  $D.O_{.600}$  ajustada em 1,0 e colocados em mesa agitadora orbital a 80 rpm, a  $27 \pm 2$  °C, por 45 min. Ao final desse período, o excesso de suspensão foi retirado com o auxílio de uma pipeta, e os explantes foram secos em papel-filtro, autoclavados e transferidos para placas de Petri contendo 25 mL de

meio CIM suplementado com 8 mg/L de picloram, para o período de co-cultivo. As placas foram incubadas por três dias, a  $27 \pm 2$  °C, na ausência de luz.

No final do período de co-cultivo, os explantes foram lavados por três vezes em água destilada estéril; uma vez com meio MS (pH 5,8) acrescido de 500 mg/L de cefotaxima (Hoechst, Alemanha), foram secos suavemente em papel-filtro estéril e transferidos para meio CIM, em pH 5, suplementado com 8 mg/L de picloram e 500 mg/L de cefotaxima.

#### **2.4.1. Avaliação da interferência das etapas do processo de transformação por *Agrobacterium* sobre a embriogênese somática secundária**

Uma parcela de 30 explantes de cada etapa, destacada em negrito na Tabela 1, foi retirada e transferida, de forma que a proveniente das etapas 4 e 5 foi colocada em placas de Petri com meio CIM suplementado com 8 mg/L de picloram, e a oriunda das etapas 6 e 7 foi posta em meio CIM com 8 mg/L de picloram e 500 mg/L de cefotaxima.

Foram incluídos dois tratamentos-controle: explantes excisados e transferidos diretamente para meio CIM suplementado com 8 mg/L de picloram sem cefotaxima (controle 1) e explantes excisados e transferidos diretamente para meio CIM suplementado com 8 mg/L de picloram e 500 mg/L de cefotaxima (controle 2). Em cada tratamento foram feitas duas repetições. Após três semanas de incubação a  $28 \pm 2$  °C, na ausência de luz, a frequência de embriogênese somática foi avaliada.

#### **2.4.2. Influência da concentração de bactéria sobre a embriogênese somática secundária**

Fragmentos de cotilédones com aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> foram tratados conforme descrito no item 3.2.5., com a seguinte ressalva: a DO<sub>600</sub> foi ajustada para diferentes valores (0,1; 0,3; 0,7; e 1,0) e medida em espectrofotômetro (Spectrometry Genegys 8). Para cada tratamento teve duas repetições, e cada uma tinha três placas com 10 explantes cada, totalizando 60 explantes por tratamento. Após três semanas de incubação a  $27 \pm 2$  °C na ausência de luz, a frequência de embriogênese somática foi avaliada.

Tabela 1 – Etapas do processo de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

Etapas		Procedimentos
Ativação das linhagens (1)		Tempo: 48 horas Meio: YMB (25 mg/L rifampicina + 50 mg/L canamicina) Temperatura: 27 ± 2 °C
Crescimento da suspensão bacteriana (2)		Tempo: 24 horas Meio: LB (25 mg/L rifampicina + 50 mg/L canamicina) Temperatura: 27 ± 2 °C Agitação: 180 rpm
Centrifugação (3)		Tempo: 10 min. Temperatura: 4 °C Rotação: 6000 rpm
<b>Ressuspensão da bactéria</b> (4)		Meio: MS <sub>liq.</sub> (pH 5,3) D.O. <sub>600</sub> = 1,0
<b>Preparação dos explantes</b> (5)		Tempo: aprox. 1 hora Meio: CBM
<b>Agroinfecção</b> (6)	EHA105/pBE2113	Tempo: 45 min. Meio: MS (pH 5,3) Agitação: 80 rpm
<b>Co-cultivo</b> (7)	EHA105/pBE2113	Tempo: 3 dias Meio: CIM com 8 mg/L de picloram Escuro Temperatura: 27 ± 2 °C
Regeneração (8)		Tempo: 21 dias Escuro Meio: CIM com 8 mg/L de picloram (500 mg/L de cefotaxima)

Em negrito, encontram-se as etapas submetidas à avaliação no processo de transformação.

## 2.5. Transformação via SAAT (*Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation*)

Segmentos nodais das cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu e segmentos de embriões em estágio cotiledonar de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>

e conjuntos de embriões em estágio globular da cultivar Rosinha foram coletados e deixados em placa de Petri com meio CBM líquido em pH 5,8 até que o número 300 de cada tipo de explante fosse obtido. Cinquenta explantes foram transferidos para béqueres de 100 mL com 50 mL de diferentes soluções: meio CBM, sem *A. tumefaciens* e sem sonicação (controle 1; tratamento 0), suspensão bacteriana EHA105/pBE2113-*gus* com D.O.<sub>600</sub> = 1 e sem sonicação (controle 2; tratamento 1), meio CBM, sem *A. tumefaciens* e com sonicação por 10 s (controle 3; tratamento 2), suspensão bacteriana EHA105/pBE2113-*gus* com D.O.<sub>600</sub> = 1 e com sonicação por 10 s (tratamento 3), meio CBM, sem *A. tumefaciens* e com sonicação por 15 s (controle 4; tratamento 4) e suspensão bacteriana EHA105/pBE2113-*gus* com D.O.<sub>600</sub> = 1 e com sonicação por 15 s (tratamento 5) (Tabela 2).

Após os tratamentos, os explantes permaneceram em repouso por 30 min. Ao final desse período, o excesso de suspensão foi retirado com o auxílio de uma pipeta, e os explantes foram secos em papel-filtro autoclavado.

Os segmentos de embriões em estágio cotiledonar de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> da cultivar Rosinha foram transferidos para placas de Petri contendo 25 mL de meio CIM suplementado com 8 mg/L de picloram e 100 µM de acetosseringona. Os conjuntos de embriões em estágio globular da cultivar Rosinha foram transferidos para placas de Petri contendo 25 mL de meio CMM com 100 µM de acetosseringona. Os segmentos nodais das cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu foram colocados em placas de Petri contendo 10 mL de meio CBM com 100 µM de acetosseringona para o período de três dias de co-cultivo, a 27 ± 2 °C, na ausência de luz.

No final do período de co-cultivo, os explantes foram lavados por três vezes em água destilada estéril, uma vez com meio MS (pH 5,8) acrescido de 500 mg/L de cefotaxima e secos suavemente em papel-filtro estéril. Os segmentos de embriões em estágio cotiledonar da cultivar Rosinha foram transferidos para placas de Petri contendo 25 mL de meio CIM suplementado com 8 mg/L de picloram com 250 mg/L de cefotaxima. Os conjuntos de embriões em estágio globular da cultivar Rosinha foram transferidos para placas de Petri contendo 25 mL de meio CMM com 250 mg/L de cefotaxima. Os segmentos nodais das cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu foram colocados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) com 10 mL de meio CBM acrescido de 250 mg/L de cefotaxima.

Tabela 2 – Variáveis do processo de transformação genética via SAAT

Número do Tratamento	Cultivar	Tipo de Explante	Tratamentos	
			Tempo de Sonicação	Presença (+) ou Ausência (-) de <i>Agrobacterium</i>
0	Rosinha	Fragmentos de embriões em estágio cotiledonar	0 s	-
1			0 s	+
2			10 s	-
3			10 s	+
4			15 s	-
5		15 s	+	
0		Agregados de embriões em estágio globular	0 s	-
1			0 s	+
2			10 s	-
3			10 s	+
5	15 s		-	
5		15 s	+	
0	Mantiqueira	Segmentos internodais	0 s	-
1			0 s	+
2			10 s	-
3			10 s	+
4			15 s	-
5			15 s	+
0	Parazinho	Segmentos internodais	0 s	-
1			0 s	+
2			10 s	-
3			10 s	+
4			15 s	-
5			15 s	+
0	Vassourinha	Segmentos internodais	0 s	-
1			0 s	+
2			10 s	-
3			10 s	+
4			15 s	-
5			15 s	+
0	Urubu	Segmentos internodais	0 s	-
1			0 s	+
2			10 s	-
3			10 s	+
4			15 s	-
5			15 s	+

Os explantes permaneceram nos respectivos meios por uma semana e, então, foram submetidos ao ensaio histoquímico para determinar a atividade da  $\beta$ -glucoronidase, conforme o item 2.9.

## **2.6. Efeito da concentração de canamicina**

### **2.6.1. Sobre a embriogênese somática**

Pedaços de aproximadamente  $0,5 \text{ cm}^2$  de embriões somáticos no estágio cotiledonar foram transferidos para placas de Petri contendo 25 mL do meio CIM com diferentes concentrações de canamicina (0; 0,05; 0,5; 1; 2,5; 5; e 50 mg/L) e permaneceram incubados por 21 dias no escuro e a  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em cada tratamento, foram utilizadas três repetições, e em cada repetição havia uma placa com 10 explantes cada, gerando um total de 30 explantes por tratamento. A frequência de embriogênese somática foi avaliada ao término da incubação.

### **2.6.2. Sobre a maturação dos embriões**

Grupos de 15 a 20 embriões somáticos no estágio globular foram transferidos para placas de Petri contendo 25 mL do meio CMM com diferentes concentrações de canamicina (0,0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; e 75 mg/L) e permaneceram incubados por 25 dias, com fotoperíodo de 16 h claro/8 h escuro, fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas ( $25,3 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) e a  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em cada tratamento foram utilizadas três repetições, e em cada repetição havia uma placa com 10 explantes cada, gerando um total de 30 explantes por tratamento. A frequência de maturação foi avaliada após o período de incubação.

## **2.7. Efeito da concentração de paramomicina**

### **2.7.1. Sobre a embriogênese somática**

Segmentos de aproximadamente  $0,5 \text{ cm}^2$  de embriões somáticos no estágio cotiledonar foram transferidos para placas de Petri contendo 25 mL do meio CIM com diferentes concentrações de paramomicina (Sigma, Estados Unidos) (0; 0,1;

0,2; 0,5; 1; 1,5; 2,5; 5; 7,5; 10; 20; e 50 mg/L) e permaneceram incubados por 21 dias no escuro e a  $26 \pm 2$  °C. Em cada tratamento foram utilizadas três repetições, e em cada repetição havia uma placa com 24 explantes cada, totalizando 72 explantes por tratamento. A frequência de embriogênese somática foi avaliada ao término da incubação.

### **2.7.2. Sobre a maturação dos embriões**

Grupos de 15 a 20 embriões somáticos no estágio globular foram transferidos para placas de Petri contendo 25 mL do meio CMM com diferentes concentrações de paramomicina (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 1,5; 2,5; 5; 7,5; 10; 20; e 50 mg/L) e permaneceram incubados por 25 dias, com fotoperíodo de 16 h claro, fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas ( $25,3 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e a  $26 \pm 2$  °C. Em cada tratamento, foram utilizadas três repetições, e em cada repetição havia uma placa com 24 explantes cada, totalizando 72 explantes por tratamento. A frequência de maturação foi avaliada após o período de incubação.

### **2.8. Análise da expressão transiente**

Os explantes submetidos à transformação genética por *A. tumefaciens* e via SAAT foram imersos em 200 mL da mistura de reação histoquímica (JEFFERSON et al., 1987) e incubados à temperatura de 37 °C/escuro/24 h. Após esse período, o tampão foi descartado e o tecido, tratado com etanol 70% e observado sob estereoscópio, para a estimativa do número de manchas azuis. A mistura de reação foi constituída de 100 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,5 mM de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM de  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% de Triton<sup>®</sup> X-100 e 1 mM de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-glucurônico (X-Gluc).

### **2.9. Análise Estatística**

Todos os dados obtidos foram analisados pelo teste de Tukey, com valor crítico de  $P = 0,05$ . Os cálculos foram realizados utilizando-se o Programa SAS, versão 8.1 (SAS, 2000).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Avaliação de quais componentes das etapas do processo de agroinfecção poderiam estar afetando a regeneração por embriogênese somática**

Comparando as frequências embriogênicas apresentadas pelos controles 1 e 2, verificou-se que o antibiótico cefotaxima na concentração de 500 mg/L reduziu a frequência de indução de embriões (Figura 2), assim como foi observado em explantes cotiledonares de fumo (NAUERBY et al., 1997).

A pequena diminuição na frequência embriogênica pode ter sido causada pela presença de metabólitos com atividade regulatória no crescimento de plantas, gerados por esterases de plantas devido à presença de cefotaxima no meio (SARMA et al., 1995), uma vez que a estrutura química da cefotaxima não evidencia que os produtos de sua quebra tenham propriedades auxina-*like* (HOLFORD; NEWBURY, 1992).

A cefotaxima é um antibiótico pertencente à classe dos betalactâmicos, e essa classe atua especificamente na parede celular bacteriana, não apresentando, geralmente, efeito sobre as células vegetais (POLLOCK et al., 1983). No entanto, vários trabalhos têm apontado modificações morfogênicas em diversas espécies vegetais (MATHIAS; BOYD, 1986; MATHIAS; MUKASA, 1987; RAO et al., 1995), demonstrando, assim, a interferência da cefotaxima no desenvolvimento vegetal.

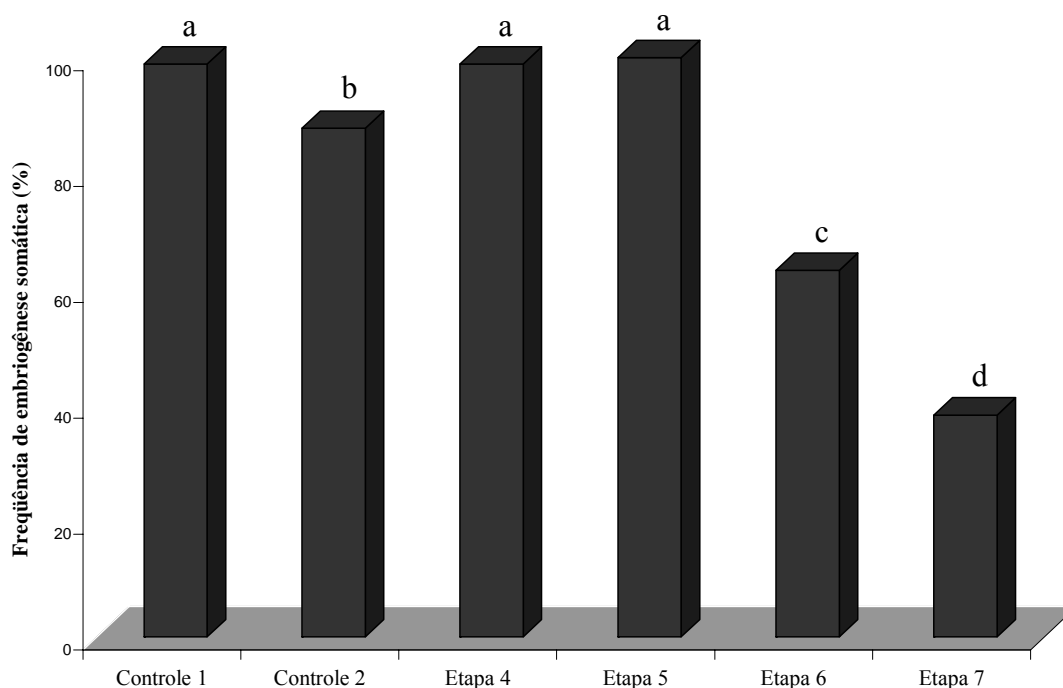


Figura 2 – Frequência embriogênica somática da cultivar Rosinha obtida nas etapas do processo agroinfecção. Controle 1: meio CIM + 8 mg/L de picloram. Controle 2: meio CIM + 8 mg/L de picloram + 500 mg/L de cefotaxima. Etapa 4: meio MS. Etapa 5: meio CBM. Etapa 6: agroinfecção. Etapa 7: co-cultivo. Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos (Tukey a 5% de probabilidade).

Em cevada e trigo foram relatados crescimento de calo e aumento na organogênese, devido à presença de cefotaxima no meio (MATHIAS; BOYD, 1986; MATHIAS; MUKASA, 1987). Aumentos na frequência da formação de calos embriogênicos e na regeneração de plantas foram observados em cevada (BORRELLI et al., 1992) e sorgo (RAO et al., 1995). Em embriões de algodão, a cefotaxima inibiu ou estimulou o desenvolvimento de brotos, dependendo da cultivar avaliada (AGRAWAL et al., 1997).

Analisando o efeito da cefotaxima em embriões somáticos de soja, percebeu-se que, independentemente da concentração desse antibiótico, ele causa a morte do tecido e, como consequência, reduz a capacidade proliferativa do embrião. Essa redução pode explicar a não-obtenção de transgênicos em tecidos submetidos à transformação (DROSTE et al., 2000).

Em mamão, a cefotaxima aumenta a capacidade embriogênica na concentração de 250 mg/L, reduz a concentração de 125 mg/L e não apresenta efeito observável nas concentrações de 375 e 500 mg/L (YU et al., 2001).

Como é imprescindível a presença de um antibiótico no final do período de co-cultivo para inibir o crescimento bacteriano, deve-se procurar utilizar outros antibióticos, como a carbenicilina – já usada em diversos trabalhos de transformação de mandioca (GONZÁLEZ et al., 1998; JØRGENSEN et al., 2005) –, o meropenem ou, até mesmo, a cefotaxima numa concentração menor, como 200 mg/L (SCHREUDER et al., 2001) ou 250 mg/L (SARRIA et al., 2000).

Foram realizados testes utilizando-se o meropenem para inibir o crescimento da Agrobactéria no final do período de co-cultivo, e os resultados foram bastante positivos, uma vez que o antibiótico aumentou a frequência embriogênica de explantes cotiledonares da cultivar Rosinha submetidos à transformação (dados não mostrados).

Como as etapas 4 e 5 (Figura 2) apresentaram frequência embriogênica similar à do controle 1, é provável que os meios MS e CBM não mostrem componentes que interfiram na embriogênese.

A diminuição da frequência embriogênica nas etapas 6 e 7 (Figura 2) possivelmente tenha ocorrido devido ao contato dos explantes com as estirpes bacterianas, visto que os embriões somáticos são sensíveis às agrobactérias (SCHÖPKE et al., 1993; LI et al., 1996; GONZÁLEZ et al., 1998).

Na etapa 6, o contato de 45 min dos explantes com a bactéria mostrou ter efeito negativo sobre a frequência embriogênica, e esse efeito foi acentuado quando os explantes foram submetidos ao período de co-cultivo (Figura 2).

A redução no potencial regenerativo quando o material vegetal se encontrava em presença de antibiótico já foi relatada em diversas espécies, como morango (ALSHEIKH et al., 2002) e crisântemos (YOUNG et al., 1998).

Sarria et al. (2000) associaram a redução da frequência de embriogênese em seus experimentos com a cultivar MPer183 à suscetibilidade do explante ao processo de infecção. Mais recentemente, Silva (2005) comprovou a interferência negativa do processo de agroinfecção no potencial de regeneração do fumo.

González et al. (1998) observaram que a taxa de crescimento das células transformadas por agrobactéria é menor do que a por bombardeamento, provavelmente devido a algum dano causado pela agrobactéria durante o co-cultivo.

Na mandioca, assim como observado em outras espécies vegetais, a taxa de sobrevivência das células que entram em contato com a agrobactéria é baixa. Fenômenos como a oxidação, a produção de compostos fenólicos e a subsequente morte celular são comuns durante o processo de agroinfecção (DE LA RIVA et al., 1998; EFENDI, 2003).

Com base nos dados obtidos, pode-se concluir que a redução na frequência embriogênica observada nos tratamentos em que os explantes entraram em contato com a bactéria foi em decorrência do dano causado por ela. Uma alternativa para evitar essa redução na embriogênese seria transferir a construção para outra estirpe bacteriana, como a LB 4404, já utilizada em diversos trabalhos de transformação de mandioca (LI et al., 1996; ZHANG et al., 2000a; ZHANG et al., 2003b; ZHANG et al., 2005; JØRGENSEN et al., 2005), uma vez que ela é menos virulenta que a EHA 105 (LI et al., 1996).

### **3.2. Influência da concentração de bactéria sobre a embriogênese somática secundária**

Dentre as variáveis (período de incubação em *Agrobacterium*, concentração de *Agrobacterium*, meio de co-cultivo, período de co-cultivo) que podem ser manipuladas, o número de células de agrobactéria do inoculo é considerado fator crítico na eficiência de transformação. O número excessivo de bactéria pode causar estresse às células vegetais, afetando o potencial de regeneração dos explantes, e baixas concentrações podem reduzir a frequência de T-DNA transferido (COSTA et al., 2002). Muitas vezes, o insucesso, ou a baixa eficiência de transformação de algumas culturas importantes, está relacionado com uma diminuição no potencial regenerativo causado pelas agrobactérias (BROOHAERTS et al., 2005).

Aumento na eficiência de transformação de algodão (JIN et al., 2005) e de tomate (IEAMKHANG; CHATCHAWANKANPHANICH, 2005) foi obtido quando a concentração das suspensões bacterianas foi reduzida.

Com o intuito de utilizar suspensões bacterianas com menor concentração de agrobactéria e minimizar interferências no processo regenerativo, foram avaliadas quatro concentrações bacterianas.

Os explantes que entraram em contato com a *Agrobacterium* e, independentemente da concentração de bactéria, apresentaram diminuição na

freqüência de embriogênese somática, na média de embriões produzidos (Tabela 3), e aumento na produção de calo (dados não mostrados).

Tabela 3 – Influência da concentração de bactéria sobre a embriogênese somática da cultivar Rosinha

D.O. <sub>600 nm</sub>	Freqüência Embriogênica (%)	Média de Embriões
0*	96,7 <sup>a</sup>	57,08 ± 7,77 <sup>a</sup>
0,100	56,7 <sup>b</sup>	9,08 ± 11,29 <sup>b</sup>
0,300	53,3 <sup>b</sup>	9,08 ± 11,63 <sup>b</sup>
0,700	40 <sup>b</sup>	6,33 ± 10,04 <sup>b</sup>
1	40 <sup>b</sup>	7,67 ± 11,81 <sup>b</sup>

Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos (Tukey a 5% de probabilidade). \* D.O.<sub>600 nm</sub> = 0 é o meio sem agrobactéria (controle).

Os resultados apresentados neste ensaio indicam a alta sensibilidade do explante utilizado (segmento de embriões somático em estágio cotiledonar) ao processo de infecção, evidenciando-se que esta seja uma das razões para a baixa produção de plantas transgênicas de mandioca.

Não foram encontrados trabalhos na literatura sobre a cultura da mandioca que tivessem investigado o efeito da concentração de bactéria no sistema de regeneração utilizado, e atualmente os diferentes protocolos empregados na transformação de mandioca fazem uso de inóculas com absorvância variando de 0,5 a 1 (LI et al., 1996; SIRITUNGA; SAYRE, 2003; SIRITUNGA et al., 2004; ZHANG et al., 2005).

Dessa forma, a concentração bacteriana sugerida para os ensaios de transformação da cultivar Rosinha foi a de densidade ótica a 600 nm igual a 1, pois nessa concentração a maior densidade bactéria provavelmente levaria a uma taxa superior de transformação.

### **3.3. Avaliação da expressão transiente de GUS em diferentes explantes das cultivares Rosinha, Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu, transformados via SAAT com diferentes tempos de sonicação**

As freqüências da indução de embriogênese em embriões somáticos em estágio cotiledonar e da maturação de embriões somáticos em estágio globular foram levemente reduzidas com a aplicação de sonicação e pela presença da *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 3).

Apesar de o SAAT diminuir a freqüência da indução de embriogênese em embriões somáticos em estágio cotiledonar e da maturação de embriões somáticos em estágio globular, a sua aplicação aumenta a freqüência de expressão do gene *gus* (Figura 3).

Nos embriões somáticos em estágio cotiledonar, a freqüência de explantes *gus* positivos aumenta conforme o tempo de sonicação, indo de 13% com 10 s de sonicação para 31% com 15 s (Figura 3).

Nos embriões somáticos em estágio globular, a aplicação de sonicação por 10 s aumenta em três vezes a freqüência de explantes *gus* positivos. Contudo, se o tempo de sonicação for aumentado para 15 s, haverá uma queda sensível nas freqüências de maturação e na presença de explantes GUS positivos (Figura 3).

A diferença na expressão transiente do gene *gus* com diferentes tipos de explantes e diversos tempos de SAAT já foi relatada em outras culturas (TRICK; FINER, 1997, 1998; ANDRADE et al., 2001).

De acordo com os resultados, pode-se perceber que, na cultivar Rosinha, o SAAT aplicado por 15 s nos embriões somáticos em estágio cotiledonar e por 10 s nos embriões somáticos em estágio globular apresentou os melhores resultados de freqüência de *GUS* positivos (Figura 3).

Nas cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu, a aplicação de SAAT por 10 s e 15 s diminui, mas não significativamente, a freqüência de regeneração (Figura 4).

Na cultivar Mantiqueira, a aplicação de SAAT por 10 s e 15 s reduziu a freqüência de regeneração, à semelhança do que ocorreu no controle 2 (tratamento 1, utilizando somente agrobactéria) (Figura 4). Quando o SAAT foi aplicado por 10 s nos segmentos internodais dessa cultivar, a expressão transiente do gene *gus* quase quadruplicou, em comparação com o controle 2, porém com o SAAT por 15 s a expressão foi quase 10 vezes maior.

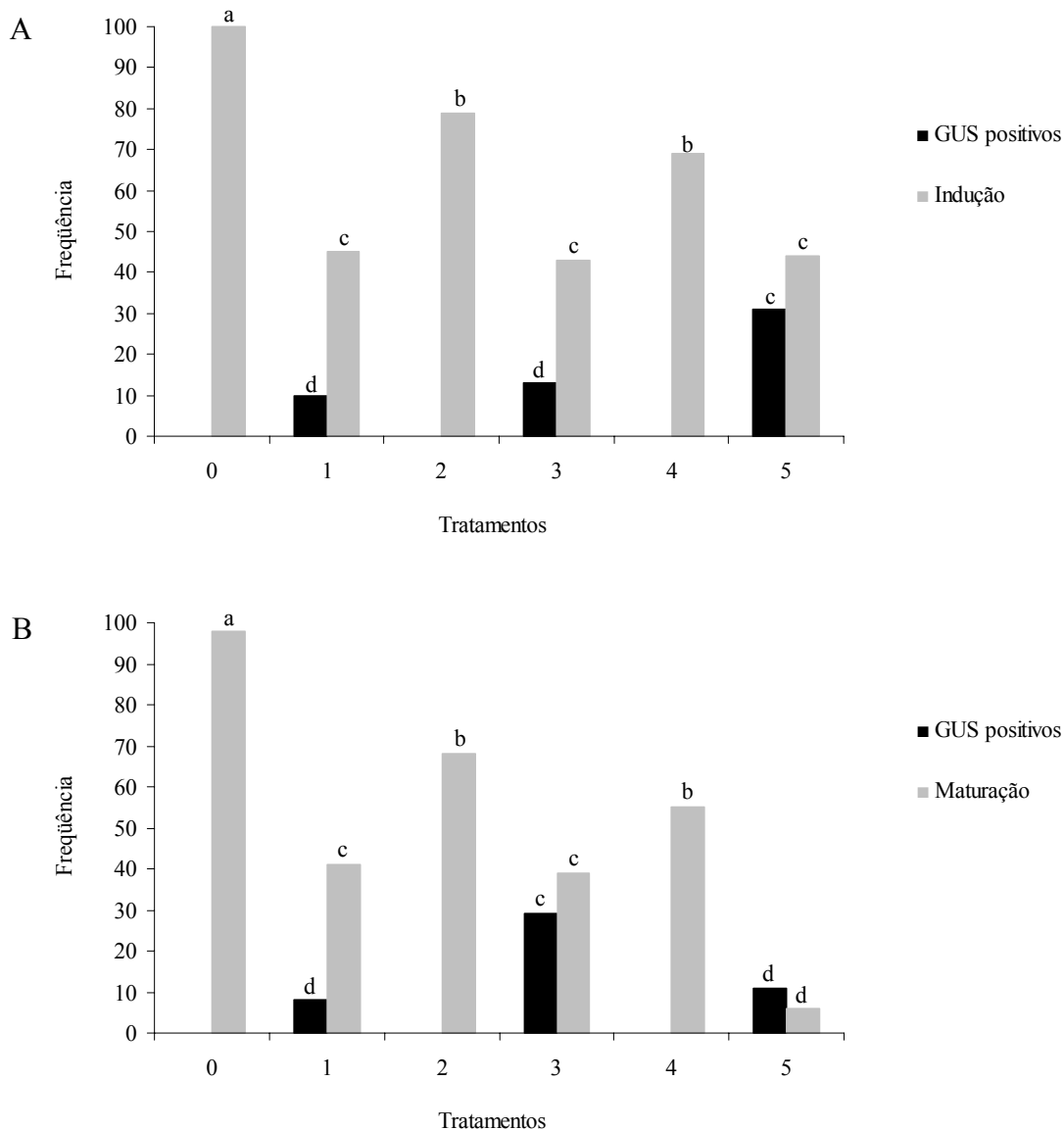


Figura 3 – Influência do SAAT sobre a frequência (%) de explantes gus positivos e de regeneração. Quadro A: indução de embriogênese em embriões somáticos em estágio cotiledonar. Quadro B: indução de maturação em embriões somáticos em estágio globular. Tratamento 0: meio CBM (controle 1); tratamento 1: suspensão bacteriana (controle 2); tratamento 2: meio CBM + sonicação por 10 s (controle 3); tratamento 3: suspensão bacteriana + sonicação por 10 s; tratamento 4: meio CBM + com sonicação por 15 s (controle 4) e tratamento 5: suspensão bacteriana + sonicação por 15 s. Letras iguais indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos (Tukey a 5% de probabilidade).

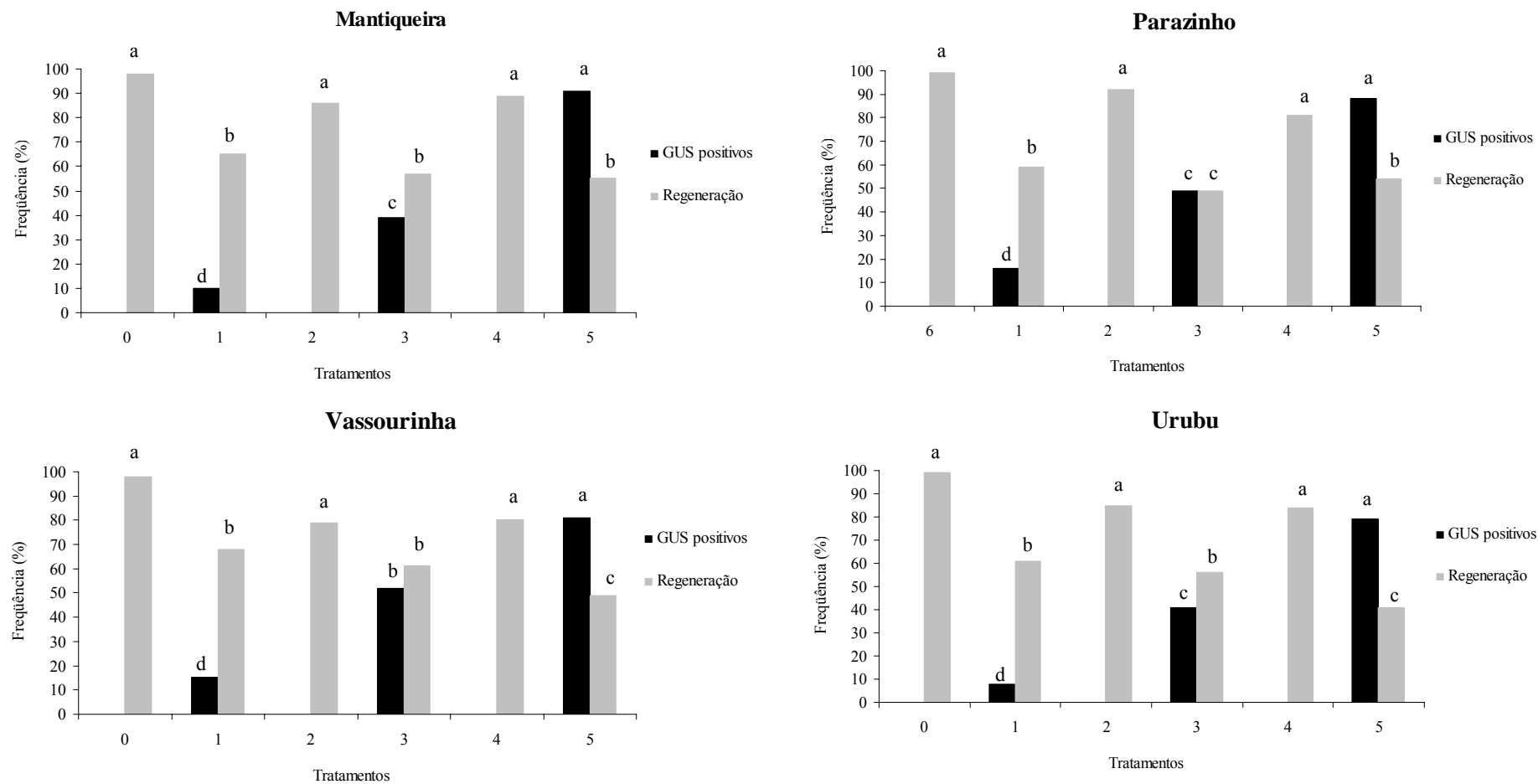


Figura 4 - Influência do SAAT sobre a frequência (%) de explantes gus positivos e de regeneração. Tratamento 0: meio CBM (controle 1); tratamento 1: suspensão bacteriana (controle 2); tratamento 2: meio CBM + sonicação por 10 s (controle 3); tratamento 3: SAAT por 10 s; tratamento 4: meio CBM + sonicação por 15 s (controle 4); e tratamento 5: SAAT por 15 s. Letras iguais indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos (Tukey a 5% de probabilidade).

A aplicação de SAAT por 30 s na cultivar Parazinho diminuiu a frequência de regeneração de forma similar à obtida no controle 2, entretanto com 10 s de SAAT essa redução foi maior. A expressão transiente do gene *gus* quando SAAT foi aplicado por 10 s na cultivar Parazinho triplicou, em comparação com o controle 2, e foi cinco vezes maior do que com a aplicação por 15 s.

A frequência de regeneração na cultivar Vassourinha, com a aplicação de SAAT por 10 s, reduziu de forma similar ao controle 2, mas com a aplicação de SAAT por 15 s a diminuição foi maior. A expressão transiente do gene *gus* na cultivar Vassourinha triplicou e quintuplicou, respectivamente, com a aplicação de SAAT por 10 s 15 s, em comparação com o controle 2.

Na cultivar Urubu, com a aplicação de SAAT por 10 s a frequência de regeneração foi similar ao controle 2, enquanto com a aplicação por 15 s houve redução significativa. A frequência de expressão transiente do gene *gus* com a aplicação de SAAT por 10 s teve seu valor quintuplicado e multiplicado por 10 com SAAT por 15 s, comparado ao controle 2.

A frequência de regeneração nas cultivares Mantiqueira, Vassourinha e Urubu diminuiu quando os explantes foram submetidos à sonicação e estatisticamente não houve diferença entre os tempos de 10 s e 15 s. Já na cultivar Parazinho essa frequência caiu com a sonicação por 10 s e houve redução ainda maior com 15 s.

Entre os tempos de sonicação testados, os resultados indicaram que 15 segundos de sonicação foram o tempo recomendado para transformação via SAAT de segmentos nodais de todas as cultivares avaliadas, pois foi o que apresentou maior frequência de GUS positivo.

Avaliando a frequência de expressão transiente do gene *gus* nas cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu, percebeu-se que a aplicação de SAAT aumenta as chances de obter mandioca transgênica.

A frequência de regeneração das cultivares avaliadas diminuiu com a aplicação da sonicação, entretanto essa redução não inviabilizou o processo de transformação via SAAT, visto que houve elevação de pelo menos 50% na frequência da expressão transiente do gene GUS em todas as cultivares.

### 3.4. Efeito da concentração de canamicina sobre a indução de embriogênese somática e a maturação dos embriões somáticos

O aumento na concentração de canamicina provocou declínio no potencial embriogênico dos cotilédones de embriões somáticos no estágio cotiledonar, sendo representado pela redução na frequência de embriogênese somática e na quantidade de embriões produzidos (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeito da concentração de canamicina sobre a embriogênese somática da cultivar Rosinha

Canamicina (mg/L)	Frequência Embriogênica	Média de Embriões
0	96,7 <sup>ab</sup>	51,67 ± 21,98 <sup>ab</sup>
0,05	96,7 <sup>ab</sup>	61,67 ± 19,67 <sup>a</sup>
0,5	100 <sup>a</sup>	40,67 ± 23,33 <sup>b</sup>
1	80 <sup>b</sup>	9,33 ± 8,68 <sup>c</sup>
2,5	20 <sup>c</sup>	2,00 ± 4,07 <sup>c</sup>
5	6,7 <sup>cd</sup>	0,67 ± 2,54 <sup>c</sup>
50	0 <sup>d</sup>	0 ± 0,0 <sup>c</sup>

\*Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença estatística entre os tratamentos (Tukey a 5% de probabilidade).

A produção de calo aumentou à medida que a concentração de antibiótico foi elevada (Figura 5).

Diversas concentrações de canamicina foram avaliadas (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 mg/L) (dados não mostrados), mas em todas elas a reduzida quantidade de calos nos explantes inviabilizava o uso dessas concentrações. Na concentração de 50 mg/L de canamicina, os explantes não apresentaram nenhum crescimento celular, e o cultivo dos cotilédones nessa concentração provocou a morte de todos os explantes.

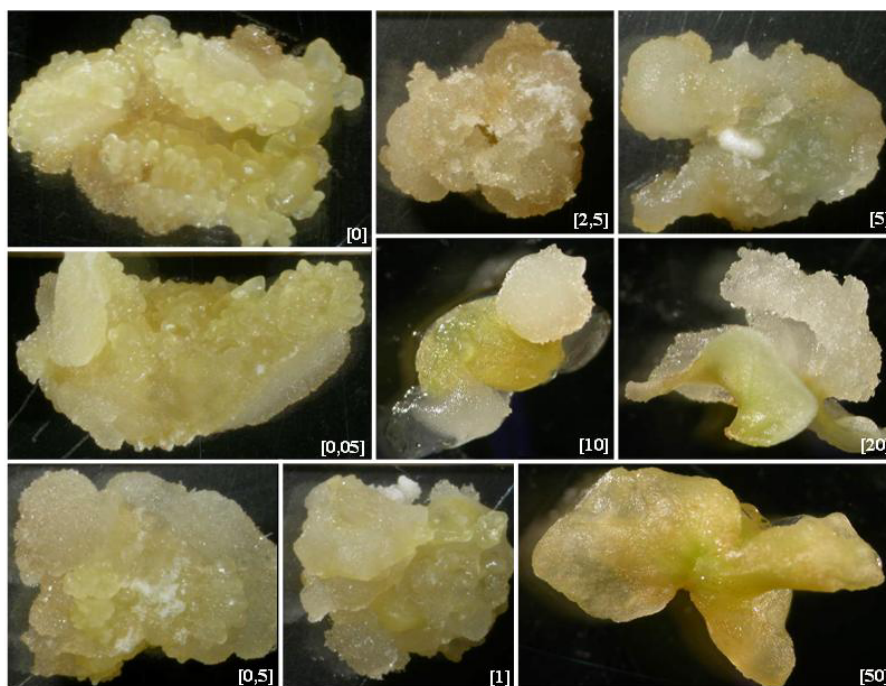


Figura 5 – Aspecto dos embriões em estágio cotiledonar da cultivar Rosinha em meio de indução da embriogênese somática em presença de diferentes concentrações do antibiótico canamicina após o período de 21 dias de cultivo. No canto inferior direito de cada foto, encontram-se as concentrações aplicadas no explante, em mg/L.

A redução de embriogênese somática acompanhada de aumento na produção de calo à medida que quantidades crescentes de canamicina foram acrescentadas ao meio pode estar relacionada com a hipermetilação do DNA pela canamicina, o que afetaria a expressão gênica das células embriogênicas (SCHMITT et al., 1997); ou com o desbalanço hormonal gerado pelos produtos resultantes da quebra do antibiótico pela célula vegetal, já que estes podem apresentar comportamento semelhante ao de reguladores de crescimento (HOLFORD; NEWBURY, 1992; LIN et al., 1995).

Diversas concentrações de canamicina foram avaliadas (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 mg/L) (dados não mostrados), mas em todas elas a reduzida quantidade de calos nos explantes inviabilizava o uso dessas concentrações. Na concentração de 50 mg/L de canamicina, os explantes não apresentaram nenhum crescimento celular, e o cultivo dos cotilédones nessa concentração causou a morte de todos os explantes.

A redução na embriogênese somática acompanhada pelo aumento na produção de calo à medida que quantidades crescentes de canamicina foram

acrescidas ao meio pode estar relacionada com a hipermetilação do DNA pela canamicina (SCHMITT et al., 1997), o que afetaria a expressão gênica das células embriogênicas; ou com o desbalanço hormonal gerado pelos produtos resultantes da quebra do antibiótico pela célula vegetal, já que estes podem apresentar comportamento semelhante ao de reguladores de crescimento (HOLFORD; NEWBURY, 1992; LIN et al., 1995).

O provável desbalanço hormonal no meio de indução de embriões em mandioca pode ter provocado produção excessiva de calo, o que prejudicou o desenvolvimento dos embriões. Por isso, não foi determinada a concentração mais adequada para a seleção de embriões em estágio cotiledonar submetidos à transformação via *Agrobacterium* e regenerados via indução de embriogênese.

A frequência de maturação de embriões somáticos em estágio globular diminuiu com o aumento da concentração de canamicina e foi inibida em até 93% com a concentração de 10 mg/L (Tabela 5).

Tabela 5 – Efeito da concentração de canamicina sobre a maturação de embriões somáticos de mandioca da cultivar Rosinha

Concentrações de Canamicina (mg/L)	Frequência de Maturação (%)
0	100 <sup>a</sup>
0,5	100 <sup>a</sup>
1	100 <sup>a</sup>
2,5	100 <sup>a</sup>
5	70 <sup>b</sup>
10	6,7 <sup>c</sup>
25	0 <sup>d</sup>
50	0 <sup>d</sup>

Letras iguais indicam não haver diferença estatística entre os tratamentos (Tukey a 5% de probabilidade)

A produção de calo na maturação permaneceu nas concentrações inferiores a 5 mg/L, sendo observado ligeiro aumento quando concentrações maiores foram utilizadas. Tanto a produção de calo quanto a maturação dos embriões foram completamente inibidas em concentrações de canamicina iguais ou superiores a 25 mg/L, nas quais os explantes apresentaram alguns pontos de oxidação, indicando necrose do tecido (Figura 6).



Figura 6 – Efeito do antibiótico canamicina sobre a maturação de conjuntos de embriões somáticos em estágio globular da cultivar Rosinha após o período de 25 dias de cultivo. No canto inferior de cada foto, encontram-se as concentrações aplicadas no explante em mg/L.

Schreuder et al. (2001), utilizando 25 mg/L de canamicina para selecionar calos embriogênicos friáveis transgênicos, demonstraram a sua aplicabilidade como agente seletivo.

Entre várias concentrações testadas (entre 0 e 1.000 mg/L), Sato et al. (2004) determinaram que a mais adequada para uso em discos foliares de mandioca foi a de 500 mg/L.

Schöpke et al. (1996), para determinarem a influência da canamicina na viabilidade de suspensões e a concentração mais adequada para ser utilizada num processo de seleção de embriões transgênicos de mandioca, avaliaram diversas concentrações desse antibiótico (0, 25, 50, 100, 200 e 300  $\mu\text{M}$ ). Entretanto, as concentrações avaliadas não alteraram em nada a viabilidade embriogênica dos explantes, indicando que esse antibiótico não é o mais adequado para seleção em mandioca.

Os resultados evidenciaram uma sensibilidade diferencial dos tecidos embriogênicos (cotilédones de embriões somáticos no estágio cotiledonar e embriões somáticos em estágio globular) de mandioca ao uso do antibiótico canamicina, confirmando dados obtidos por outros autores (SCHÖPKE et al., 1996; SCHREUDER et al., 2001; SATO et al., 2004). Tal fato já foi relatado, em amora-

branca, por Bhau e Wakhlu (2001), que observaram variações no efeito fitotóxico do antibiótico com a espécie, tipo de explante e, até mesmo, entre diferentes genótipos da mesma espécie.

Com esses resultados, pode-se sugerir que a concentração de canamicina de 10 mg/L poderia ser utilizada para a seleção de embriões em estágio globular, submetidos à transformação via *Agrobacterium*, colocados em meio de maturação.

### 3.5. Efeito da concentração de paramomicina sobre a indução de embriogênese somática e sobre a maturação dos embriões somáticos

Com o aumento na concentração de paramomicina houve diminuição na frequência da indução de embriões (Figura 7) e não ocorreu produção de calo (dados não mostrados) com o incremento na concentração do antibiótico.

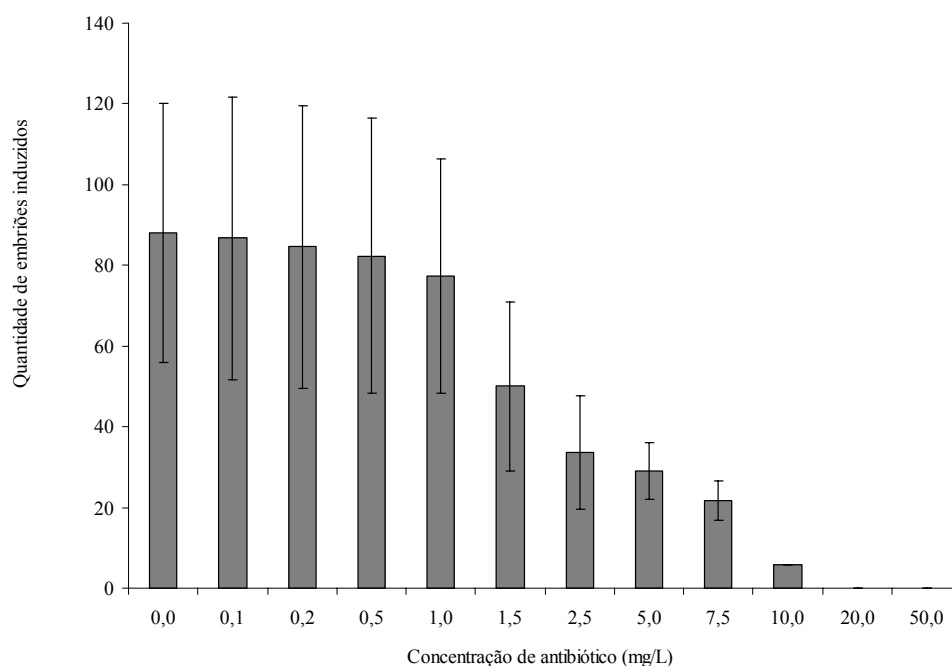


Figura 7 – Efeito do antibiótico paramomicina sobre a indução dos embriões somáticos da cultivar Rosinha após 21 dias de cultivo. As colunas em cada concentração indicam as três repetições do experimento.

Diversos autores já empregaram a paramomicina como agente seletivo em mandioca (SCHÖPKE et al., 1996; GONZÁLEZ et al., 1998; SCHREUDER et al., 2001; SIRITUNGA; SAYRE, 2003; SIRITUNGA et al., 2004; IHEMERE et al., 2006). González et al. (1998) utilizaram 25 µM desse antibiótico para selecionar embriões transgênicos em suspensões embriogênicas submetidas à transformação via *A. tumefaciens*.

Para a produção de mandioca sem compostos cianogênicos, Siritunga e Sayre (2003) selecionaram, com 75 mg/L de paramomicina, os cotilédones transgênicos. Siritunga et al. (2004) produziram mandioca com o teor de compostos cianogênicos diminuído, selecionando os cotilédones transgênicos com a mesma concentração de paramomicina.

Entre as diversas concentrações de paramomicina testadas para determinar qual a mais indicada para a seleção de embriões somáticos em estágio cotiledonar, a concentração de 10 mg/L foi a que gerou melhores resultados. Nessa concentração, o antibiótico utilizado reduziu de maneira drástica o crescimento das suspensões embriogênicas e não inibiu completamente o seu crescimento (Figura 7).

Ihemere et al. (2006) produziram mandioca com elevado conteúdo de amido através da seleção de cotilédones transgênicos com 75 mg/L de paramomicina.

Com o aumento na concentração de paramomicina houve declínio na frequência de maturação dos embriões somáticos no estágio globular (Figuras 8 e 9).

Entre as concentrações testadas de paramomicina, a de 20 mg/L foi a escolhida porque reduziu, de maneira drástica, a maturação dos embriões, mas não inibiu completamente o seu crescimento.

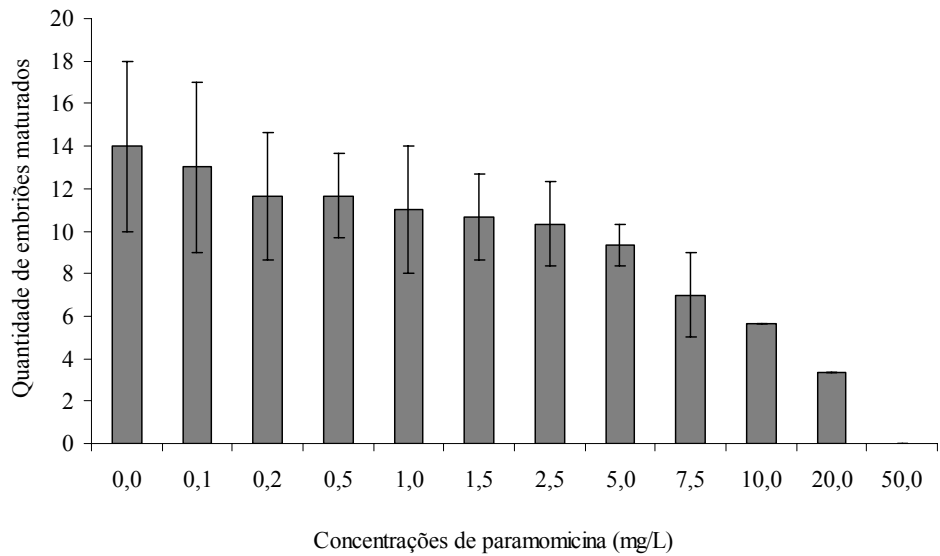


Figura 8 – Efeito do antibiótico paramomicina na maturação dos embriões somáticos da cultivar Rosinha após o período de 25 dias de cultivo.

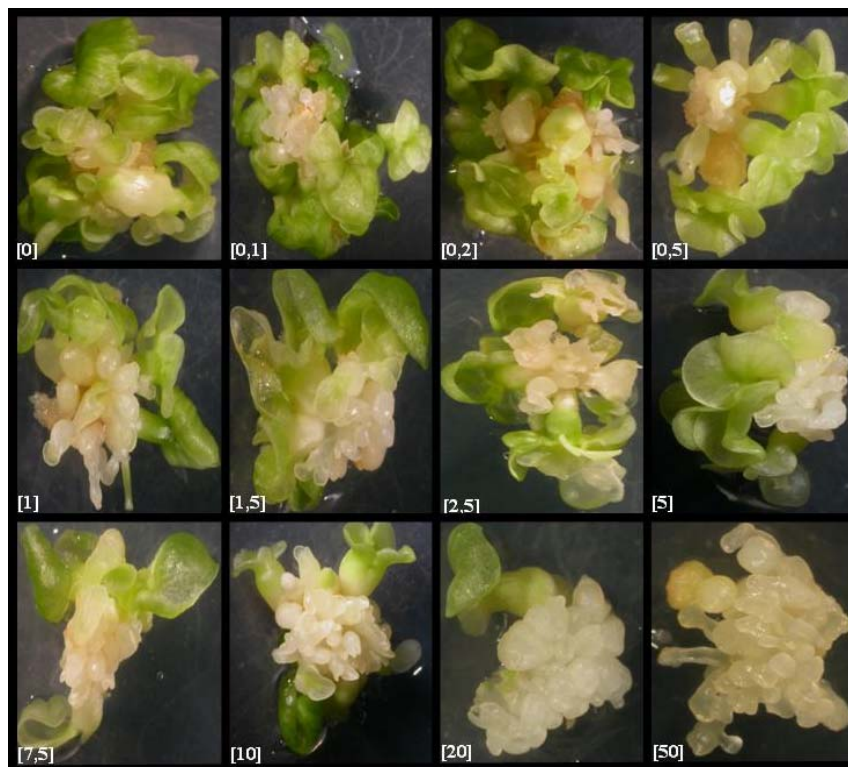


Figura 9 – Efeito do antibiótico paramomicina sobre a maturação de conjuntos de embriões somáticos da cultivar Rosinha. No canto inferior esquerdo de cada foto, encontram-se as concentrações aplicadas no explante, em mg/L.

#### 4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados das condições experimentais estabelecidas, pode-se concluir que:

- A paramomicina na concentração de 500 mg/L diminui a frequência de histodiferenciação dos embriões somáticos no estágio globular da cultivar Rosinha.

- Os meios MS e CBM não apresentam componentes que interfiram na embriogênese somática da mandioca da cultivar Rosinha.

- Houve redução acentuada na frequência embriogênica nos explantes da cultivar Rosinha que entraram em contato com *Agrobacterium*.

- A concentração bacteriana recomendada para a transformação de mandioca da cultivar Rosinha foi a de densidade ótica a 600 nm igual a 1.

- A aplicação de SAAT aumentou, de forma sensível, a expressão transiente do gene GUS nas cultivares Mantiqueira, Vassourinha, Parazinho e Urubu, e o melhor tempo de sonicação para a transformação de segmentos nodais das cultivares testadas foi de 15 s.

- A concentração de canamicina de 10 mg/L poderia ser utilizada para a seleção de embriões em estágio globular da cultivar Rosinha submetidos à transformação via *Agrobacterium* e colocados em meio de maturação.

- A concentração de paramomicina de 10 mg/L foi a escolhida para a seleção de embriões em estágio cotiledonar da cultivar Rosinha submetidos à transformação via *Agrobacterium* e regenerados via embriogênese somática.

- A concentração de paramomicina de 20 mg/L foi a escolhida para a seleção de embriões em estágio globular da cultivar Rosinha submetidos à transformação via *Agrobacterium* e colocados em meio de maturação

## 5. REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, D. C.; BANEJEE, A. K.; KOLALA, R. R.; DHAGE, A. B.; NALAWADE, S.; KULKARNI, A. V.; HAZRA, S.; KRISHTAMURTHY, K. V. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 647-652, 1997.
- ALSHEIKH, M. K.; SUSO, H. P.; ROBSON, M.; BATTEY, N. H.; WETTEN, A. Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic-sensitive *Fragaria vesca* and *F. v. semperflorens*. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1173-1180, 2002.
- ALVES, J. Pesquisa revela: mandioca pode ter até 600 derivados. **Genebio**, v. 2, p. 5-7, 2000.
- ANDERSON, J. V.; DELSENY, M.; FREGENE, M. A.; JORGE, V.; MBA, C.; LOPEZ, C.; RESTREPO, S.; SOTO, M.; PIEGU, B.; VERDIER, V.; COOKE, R.; TOHME, J.; HORVATH, D. P. An EST resource for cassava and other species of Euphorbiaceae. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 527-539, 2004.
- ANDRADE, S. R. M.; GOMES, D. G.; LABATE, M. T. V.; LABATE, C. A. **Transformação de *Phaseolus vulgaris* via SAAT (Sonication-Assisted *Agrobacterium*-Mediated Transformation)**. 2001. Disponível em: <[http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/posters/02/02pdf/02-019.pdf](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/02/02pdf/02-019.pdf)>. Acesso em: 14 maio 2007.
- BELLOTTI, A. C.; SMITH, L.; LAPOINTE, S. L. Recent Advances in Cassava Pest Management. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 343-370, 1999.
- BHAU, B. S.; WAKHLU, A. K. Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 25-29, 2001.

BIDNEY, D.; SCELONGE, C.; MARTICH, J.; BURRUS, M.; SIMS, L.; HUFFMAN, G. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, v. 18, p. 301-313, 1992.

BORRELLI, G. M.; DIFONZO, N.; LUPOTTO, E. Effect of Cefotaxime on Callus Culture and Plant Regeneration in Durum Wheat. **Journal of Plant Physiology**, v. 140, p. 372-374, 1992.

BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. (Eds.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-Cenargem, 1998.

BROOHAERTS, W.; MITCHELL, H. J.; WEIR, B.; KAINES, S.; SMITH, L. M. A.; YANG, W.; MAYER, J. E.; ROA-RODRÍGUEZ, C.; JEFFERSON, R. A. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. **Nature**, v. 433, p. 629-633, 2005.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética da plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998.

CHELLAPPAN, P.; MASONA, M. V.; VANITHARANI, R.; TAYLOR, N. J.; FAUQUET, C. M. Broad Spectrum Resistance to ssDNA Viruses Associated with Transgene-Induced Gene Silencing in Cassava. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 601-611, 2004.

COCK, J. H. **Cassava: new potential for a neglected crop**. Westview, London, 1985.

COSTA, M. G. C.; OTONI, W. C.; MOORE, G. A. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium* mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. **Plant Cell Report**, v. 21, p. 365-373, 2002.

DE LA RIVA, G. A.; CABRERA, J. G.; PADRÓN, R. V.; PARDO, C. A. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 1-16, 1998.

DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Integrated bombardment and *Agrobacterium* transformation system: an alternative method for soybean transformation. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 18, p. 51-59, 2000.

EFENDI, D. Transformation of Sugarcane by Sonication Assisted-*Agrobacterium* Transformation. **Institute for Science and Technology Studies**, v. 4, p. 36-46, 2003.

FOURMY, D.; RECHT, M. I.; BLANCHARD, S. C.; PUGLISI, J.D. Structure of the A site of *E.coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. **Science**, v. 274, p. 1367-1371, 1996.

GONZÁLEZ, A. E.; SCHÖPKE, C.; TAYLOR, N. J.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. M. Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) through *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 827-831, 1998.

HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **Plant Journal**, v. 6, p. 271-282, 1994.

HOLFORD, P.; NEWBURY, H. J. The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum majus*. **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 93-96, 1992.

IEAMKHANG, S.; CHATCHAWANKANPHANICH, O. Augmentin<sup>®</sup> as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato (*Lycopersicon esculentum*) transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 213-220, 2005.

IHEMERE, U.; ARIAS-GARZON, D.; LAWRENCE, S.; SAYRE, R. Genetic modification of cassava for enhanced starch production. **Plant Biotechnology Journal**, v. 4, p. 453-465, 2006.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 745-750, 1996.

JEFFERSON, R. A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 5, p. 387-405, 1987.

JIN, S.; ZHANG, X.; LIANG, S.; NIE, Y.; GUO, X.; HUANG, C. Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of Upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 229-237, 2005.

JØRGENSEN, K.; BAK, S.; BUSK, P. K.; SØRENSEN, C.; OLSEN, C. E.; PUONTI-KAERLAS, J.; MØLLER, B. L. Cassava Plants with a Depleted Cyanogenic glucoside content in leaves and tubers. Distribution of cyanogenic glucosides, their site of synthesis and transport, and blockage of the biosynthesis by RNA interference technology. **Plant Physiology**, v. 139, p. 363-374, 2005.

KOCH, B. M.; SIBBESSEN, O.; SWAIN, E.; KAHN, R. A.; LIANGCHENG, D.; BAK, S.; HALKIER, B. A.; MOLLER, B. L. Possible use of a biotechnological approach to optimize and regulate the content and distribution of cyanogenic glycosides in cassava to increase food safety. In: BOKANGA, M.; ESSERS, A. J. A.; POULTER, N.; ROSLING, H.; TEWE, O. (Eds.) International Workshop on Cassava Safety. **Acta Horticulturae**, v. 375, p. 45-60, 1994.

LADINO, J. J.; ECHEVERRY, M.; MANCILLA, L. I.; LOPEZ, D.; CHAVARRIAGA, P.; TOHME, J.; ROCA, W. **Genetic transformation of cassava: confirmation of transgenesis in clone 60444 and analysis of CRY1Ab protein in transgenic lines.** Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2002.

LI, H. Q.; SAUTTER, C.; POTRYKUS, I.; PUONTI-KAERLAS, J. Genetic Transformation of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 736-740, 1996.

LIN, J. J.; ASSAD-GARCIA, N.; KUO, J. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. **Plant Science**, v. 109, p. 171-177, 1995.

MATHIAS, R. J.; MUKASA, C. The Effect of Cefotaxime on the Growth and Regeneration of Callus from Four Varieties of Barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 454-457, 1987.

MATHIAS, T. J.; BOYD, L. A. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. EM. Thell). **Plant Science**, v. 46, p. 217-233, 1986.

MATTOS, P. L. P.; GOMES, J. C.; FARIAS, A. R. N.; FUKADA, C. Cultivo da mandioca nas regiões norte e nordeste do Brasil. In: ———. **Cultura de tuberosas amiláceas latino americanas.** [S.l.]: Fundação Cargill, 2002. Cap. 14, v. 2.

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

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.

OLIVEIRA, M. M. Aplicações e avanços na área da Biotecnologia Vegetal. Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia. **Boletim de Biotecnologia**, v. 66, p. 22-27, 2000.

PERL, A.; LOTAN, O.; ABU-ABIÉD, M.; HOLLAND, D. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 624-628, 1996.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D.G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Reports**, v. 2, p. 36-39, 1983.

PUONTI-KAERLAS, J. Cassava biotechnology. In: TOMBS, M. P. (Ed.). **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.** Hants, UK: Intercept Ltd., 1998.

RAEMAKERS, K.; SCHREUDER, M.; SUURS, L.; FURRER-VERHORST, H.; VINCKEN, J.; VETTEN, N.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Improved cassava starch by antisense inhibition of granule-bound starch synthase. **Molecular Breeding**, v. 16, p. 163-172, 2005.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; SOFIARI, E.; TAYLOR, N.; HENSHAW, G.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Production of transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants by particle bombardment using luciferase activity as selection marker. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 339-349, 1996.

RAEMAKERS, K.; SCHREUDER, M.; PEREIRA, I.; MUNYIKWA, T.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. Progress made in FEC transformation of cassava. **Euphytica**, v. 120, p. 15-24, 2001.

RAO, A. M.; SREE, K. P.; KISHOR, P. B. K. Enhanced plant regeneration in grain and sweet sorghum by asparagine, proline and cefotaxime. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 72-75, 1995.

SALEHUZZAMAN, S. N. I. M.; JACOBSON, E.; VISSER, R. G. F. Isolation and characterisation of a cDNA encoding granule-bound starch synthase in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and antisense expression in potatoes. **Plant molecular Biology**, v. 23, p. 947-962, 1993.

SANTARÉM, E. R. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 81-90, 2000b.

SANTARÉM, E. R. SAAT: Transformação de plantas mediada por ultra-som e *Agrobacterium*. **Ciência Rural**, v. 30, p. 725-730, 2000a.

SANTARÉM, E. R.; TRICK, H. N.; ESSIG, J. S.; FINER, J. J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 752-759, 1998.

SARMA, K. S.; EVANS, N. E.; SELBY, C. Effect of carbenicillin and cefotaxime on somatic embryogenesis of Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). **Journal of Experimental Botany**, v. 292, p. 1779-1781, 1995.

SARRIA, R.; TORRES, E.; ANGEL, F.; CHAVARRIAGA, P. Transgenic plants of cassava (*Manihot esculenta*) with resistance to Basta obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 339-344, 2000.

SAS (2000) – Statistical Analysis System. **Statistics version 8.1. SAS**. Cary, North Carolina, USA: Institute Inc., 2000.

SATO, A. Y.; SEDIYAMA, T.; MARIA, J.; BORÉM, A.; CECON, P. R.; JUNQUEIRA, C. S. Transformação da mandioca via *Agrobacterium rhizogenes*. **Bioscience Journal**, v. 20, p. 161-170, 2004.

SCHMITT, F.; OAKELEY, E. J.; JEAN PIERRE JOST, J. P. Antibiotics induce genome-wide hypermethylation in cultured *Nicotiana tabacum* plants. **The journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 1534-1540, 1997.

SCHÖPKE, C.; FRANCHE, C.; BOGUSZ, D.; CHAVARRIAGA, P.; FAUQUET, C.; BEACHY, R. N. Transformation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry, plant protoplasts and genetic engineering IV**. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1993.

SCHÖPKE, C.; TAYLOR, N.; CÁRCAMO, R.; KONAN, N. K.; MARMEY, P.; HENSHAW, G. G.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 731-735, 1996.

SCHREUDER, M. M.; RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Efficient production of transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v. 120, p. 35-42, 2001.

SILVA, J. A. T. Simple multiplication and effective genetic transformation (four methods) of in vitro-grown tobacco by stem thin cell layers. **Plant Science**, v. 169, p. 1046-1058, 2005.

SIRITUNGA, D.; ARIAS-GARZON, D.; WHITE, W.; SAYRE, R. T. Over-expression of hydroxynitrile lyase in transgenic cassava roots accelerates cyanogenesis and food detoxification. **Plant Biotechnology Journal**, v. 2, p. 37-43, 2004.

SIRITUNGA, D.; SAYRE, R. T. **Generation of Cyanogens-Free Transgenic Cassava Planta**, v. 217, p. 367-373, 2003.

STACHEL, S. E.; MESSENS, E.; MONTAGU, M. V.; ZAMBRYSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, v. 318, p. 624-629, 1985.

THRO, A. M.; BEACHY, R. N.; BONIERBALE, M.; FAUQUET, C.; HENRY, G.; HENSHAW, G. G.; HUGHES, M. A.; KAWANO, K.; RAEMAKERS, C. J. J. M.; ROCA, W.; SCHOPKE, C.; TAYLOR, N.; VISSER, R. G. F. International research on biotechnology of cassava (tapioca, *Manihot esculenta* Crantz) and its relevance to Southeast Asian economics: a cassava biotechnology network review. **Asian Journal of Tropical Biology**, v. 2, p. 1-30, 1996.

TRICK, H. N.; FINER, J. J. SAAT: Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. **Transgenic Research**, v. 6, p. 329-326, 1997.

TRICK, H. N.; FINER, J. J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 482-488, 1998.

WENHAM, J. E. **Post-harvest deterioration of cassava**: a biotechnology perspective. [S.l.]: FAO, 1995. p. 130. (Plant Production and Protection Paper).

WHITE, W. L. B.; ARIAS-GARZON, D. I.; MCMAHON, J. M.; SAYRE, R. T. Cyanogenesis in cassava: the role of hydroxynitrile lyase in root cyanide production. **Plant Physiology**, v. 116, p. 1219-1225, 1998.

YOUNG, K.J.; JUNG, P.S.; YOUNG, U.B.; HO, P.C.; SOO, C.Y.; SHEOP, S.J. Transformation of chrysanthemum by *Agrobacterium tumefaciens* with three different types of vectors. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 39, p. 360-366, 1998.

YU, T. A.; YEH, S. D.; YANG, J. S. Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 42, p. 281-286, 2001.

ZHANG, P.; BOHL-ZENGER, S.; PUONTI-KAERLAS, J.; POTRYKUS, I.; GRUISSEM, W. Two cassava promoters related to vascular expression and storage root formation. **Planta**, v. 218, p. 192-203, 2003b.

ZHANG, P.; JAYNES, J. M.; POTRYKUS, I.; GRUISSEM, W.; PUONTI-KAERLAS, J. Transfer and expression of an artificial storage protein (ASP1) gene in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Transgenic Research**, v. 12, p. 243-250, 2003a.

ZHANG, P.; LEGRIS, G.; COULIN, P.; PUONTI-KAERLAS, J. Production of stably transformed cassava plants via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 939-945, 2000b.

ZHANG, P.; POTRYKUS, I.; PUONTI-KAERLAS, J. Efficient production of transgenic cassava using negative and positive selection. **Transgenic Research**, v. 9, p. 405-415, 2000a.

ZHANG, P.; PUONTI-KAERLAS, J. PIG-mediated cassava transformation using positive and negative selection. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 1041-1048, 2000.

ZHANG, P.; VANDERSCHUREN, H.; FÜTTERER, J.; GRUISSEM, W. Resistance to cassava mosaic disease in transgenic cassava expression antisense RNAs targeting virus replication genes. **Plant Biotechnology Journal**, v. 3, p. 385-397, 2005.

## CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados das condições experimentais estabelecidas, pode-se concluir que:

- Os explantes de *Manihot esculenta* das diferentes cultivares avaliadas responderam, de maneiras distintas, às auxinas utilizadas neste trabalho. A maior frequência e a mais alta média de embriões foram detectadas quando o hormônio 2,4 D foi empregado.

- A proporção de calos observada na embriogênese induzida por picloram foi maior do que a verificada com o hormônio 2,4.

- As concentrações de 2,4 D mais indicadas para as cultivares Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu são, respectivamente, de 2, 1, 2 e 2 mg/L.

- As concentrações de picloram mais recomendadas para as cultivares são: Mantiqueira – 8 mg/L, Parazinho – 0,2 mg/L, Vassourinha – 2 mg/L e Urubu – 0,2 mg/L.

- O meio mais indicado para o alongamento de explantes em estágio cotiledonar da cultivar Rosinha é o que apresenta 0,4 mg/L de GA<sub>3</sub>.

- Na cultivar Rosinha, a região cotiledonar mediana é a mais adequada para indução de organogênese, e o período de 15 dias de maturação é o que produziu a maior quantidade de brotos em cotilédones submetidos à transformação via *Agrobacterium tumefaciens*.

- O meio no qual ocorreu maior frequência organogênica nas cultivares Parazinho, Mantiqueira e Vassourinha foi o de combinação hormonal 0,5 mg/L de BAP e 1 mg/L de AIB.

- A paramomicina na concentração de 500 mg/L diminui a frequência de maturação dos embriões somáticos no estágio globular da cultivar Rosinha.

- Os meios MS e CBM não apresentam componentes que interfiram na embriogênese somática da mandioca da cultivar Rosinha.

- Houve redução acentuada da frequência embriogênica nos explantes da cultivar Rosinha que entraram em contato com *Agrobacterium*.

- A concentração bacteriana recomendada para a transformação de mandioca da cultivar Rosinha foi a de densidade ótica a 600 nm igual a 1.

- A aplicação de SAAT aumentou, de forma sensível, a expressão transiente do gene GUS nas cultivares Mantiqueira, Vassourinha, Parazinho e Urubu, e o melhor tempo de sonicação para a transformação de segmentos nodais das cultivares testadas foi de 30 s.

- A concentração de canamicina de 10 mg/L poderia ser utilizada para a seleção de embriões em estágio globular da cultivar Rosinha submetidos à transformação via *Agrobacterium* e colocados em meio de maturação.

- A concentração de paramomicina de 7,5 mg/L foi a escolhida para a seleção de embriões em estágio cotiledonar da cultivar Rosinha submetidos à transformação via *Agrobacterium* e regenerados via indução de embriogênese.

- A concentração de paramomicina de 20 mg/L foi a utilizada na seleção de embriões em estágio globular da cultivar Rosinha submetidos à transformação via *Agrobacterium* e colocados em meio de maturação.