

DENISE FERNANDES

**MORFOGÊNESE *IN VITRO* EM TOMATEIRO E BERINJELA E
SILENCIAMENTO GÊNICO DA SINTASE DO *MIO*-INOSITOL-FOSFATO
POR RNAi EM TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2009

DENISE FERNANDES

**MORFOGÊNESE *IN VITRO* EM TOMATEIRO E BERINJELA E
SILENCIAMENTO GÊNICO DA SINTASE DO *MIO*-INOSITOL-FOSFATO
POR RNAi EM TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2009.

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel

Dra. Eveline Teixeira Caixeta

Dr. Reginaldo Alves Festucci-Buselli

Dra. Lourdes Iarema

Prof. Wagner Campos Otoni
(Orientador)

A Deus, meu anjo da guarda e minha mãe que me proporcionam esta incrível força que surge frente a grandes desafios, me deixando sempre certa da vitória e das maravilhas já conquistadas e outras a serem conquistadas no breve amanhã.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus por todas as bênçãos sobre tudo a da Vida e de poder continuar nela após tanta luta da minha família.

À toda a minha família, em especial a minha mãe Ana Maria Piroli, que com suas orações sempre me protegeram, estando perto ou longe.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudos, sem a qual não seria possível à conquista desse sonho.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade da realização do curso.

Ao amigo Marcelo Francisco Pompelli que acreditou em meu potencial, iniciando-me na vida acadêmica através da iniciação científica nos tempos da saudosa UNOESC.

Aos amigos e ex-chefes Marco Antonio Dalbó, Leandro Crestani e Osmar Crestani com os quais tive oportunidade de aperfeiçoar meus conhecimentos, crescer como profissional e como pessoa.

A meu orientador, Wagner Campos Otoni, que me proporcionou um incrível tema, do qual estudei e trabalhei com muito orgulho, e com calma e sabedoria soube compreender minhas necessidades e ritmo de trabalho, sabendo equilibrar seus anseios para com o tema de pesquisa sobre as respostas que no momento podia lhe proporcionar, primando pelo meu equilíbrio e bem estar, que sem sombra de dúvida foram essenciais para o término e conquista deste trabalho, bem como a orientação de caráter técnico para a efetivação da pesquisa.

Aos colegas de laboratório e Amigos Ana Cláudia, Cleber, Diego, Katryne, Lourdes, Marcos Vinicius que se fizeram presentes durante minhas pesquisas e na minha vida pessoal como verdadeiros amigos e companheiros de batalha.

Aos colegas do BIOAGRO Beatriz, Maria Andréia e Cyntia, pelas despenderem momentos valiosos de seu tempo em explicações sobre transformação genética e por transformar o *Agrobacterium*.

Ao Caio pelas análises estatísticas e sua disposição nas últimas horas da escrita da dissertação.

Em especial aos amigos Valdir Diola e Werner Antunes pelas discussões e correções no projeto e escrita final.

Aos novos Amigos da EMBRAPA-Cenargen, Aline, Emanuel, Andréia e Daniela, que me auxiliaram nos procedimentos laboratoriais, nas discussões dos resultados, pela boa companhia.

Ao meu co-orientador José Francisco Aragão, pessoa maravilhosa que com muita calma e sabedoria me passou a segurança e o conhecimento da parte molecular deste trabalho.

À Elsa Nogueira que me acolheu no Laboratório de Transferência de Genes no Cenargen, tornando possível a realização das análises moleculares.

Ao meu primo Evaldo Bazeggio que me acolheu em sua casa durante minha estada em Brasília, e me proporcionou momentos em família muito valorosos.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela infraestrutura oferecida para viabilização desse trabalho.

A todos que de alguma maneira passaram em minha vida durante esta estada em Viçosa no curso de Mestrado. Em especial às minhas amigas e companheiras de república Elaine, Juliana, Polyana, Marialva e Cristiane que sempre me proporcionaram uma feliz convivência em um ambiente agradável e de estudos; aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos II – LCT II/BIOAGRO e aos colegas de disciplina do curso de Fisiologia Vegetal a todos vocês meu Muito Obrigada e o desejo que tudo de bom na vida retorne em dobro.

BIOGRAFIA

Denise Fernandes nasceu em Caçador Santa Catarina em 19.12.1982, filha de Ana Maria Piroli Fernandes e Adão Fernandes.

Graduou-se como Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina no ano de 2006.

Iniciou o curso de mestrado em 2007 na Universidade Federal de Viçosa pelo programa de pós-graduação em Fisiologia Vegetal sob orientação do Prof. Wagner Campos Otoni, na linha de pesquisa morfogênese *in vitro* e transformação genética de plantas.

CONTEÚDO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
CAPÍTULO 1	8
Germinação e estabelecimento <i>in vitro</i> de berinjela e tomateiro e avaliação de qualidade de plântulas de tomateiro sob diferentes vedações	8
1.1 INTRODUÇÃO	9
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	11
1.2.1 Desinfestação de sementes de berinjela	11
1.2.2 Desinfestação de sementes de tomateiro	13
1.2.3 Efeito do tipo de vedação na qualidade de explantes de hipocótilos e cotilédones de tomateiro, visando à transformação genética	14
1.2.4 Efeito do genótipo em relação à aeração na obtenção de explantes de segmentos de hipocótilos e de cotilédones para a transformação genética	15
1.2.5 Análise de dados	15
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
1.3.1. Desinfestação de sementes de berinjela e de tomateiro	16
1.3.2 Efeito da aeração na obtenção de explantes de hipocótilos e cotilédones.	21
1.3.3 Efeito do genótipo de tomateiros crescidos <i>in vitro</i> sob os diferentes tipos de vedação, na obtenção de explantes de hipocótilos e cotilédones a serem utilizados na transformação genética	23
1.4 CONCLUSÕES	27
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO 2	31
Influência do ultra-som na morfogênese <i>in vitro</i> e expressão transiente do gene <i>Gus</i> em tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.)	31
2.1 INTRODUÇÃO	32
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	34
2.2.1 Ultra-som e a expressão transiente em tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Santa Clara)	34
2.2.2 Influência do ultra-som no processo regenerativo de explantes tomateiro	35
2.2.3 Influência da sonicação sobre a viabilidade de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . 36	
2.2.4 Análise de dados	36
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
2.3.1 Ultra-som e a expressão transiente em tomateiro	37
2.3.2 Influência do ultra-som no processo regenerativo de explantes de tomateiro	41
2.3.3 Influência da sonicação sobre o crescimento de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	44
2.4 CONCLUSÕES	46
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
CAPÍTULO 3	49
Silenciamento gênico mediado por RNAi da sintase do <i>mio</i> -inositol-fosfato em tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.) e berinjela (<i>Solanum melongena</i> L.) utilizando o gene <i>GmMIPSI</i>	49
3.1 INTRODUÇÃO	50
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	55

3.2.1	Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	55
3.2.2	Tranformação genética de berinjela e tomateiro mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	57
3.2.3	Caracterização fenotípica das plantas putativamente transformadas pelo teste histoquímico de <i>GUS</i>	61
3.2.4	Análise de PCR para verificação da integração do gene <i>GmMIPS1</i>	62
3.2.5	Análise de expressão gênica.....	63
3.2.6	Citometria de fluxo	65
3.2.7	Avaliações morfológicas descritivas da parte aérea de plantas transformadas	66
3.2.8	Avaliações morfológicas descritivas dos frutos e sementes de plantas transformadas de tomateiro	66
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.3.2	Dosagem de seleção ao antibiótico higromicina em <i>Solanum lycopersicum</i> .67	
3.3.4-	Teste histoquímico <i>in situ</i> para detecção da expressão de <i>GUS</i>	70
3.3.5	Análise de PCR para verificação da integração do gene <i>GmMIPS1</i>	72
3.3.6	Análise da expressão gênica.....	73
3.3.7	Citometria de fluxo.	74
3.3.8	Avaliações morfológicas descritivas da parte aérea de plantas transformadas	78
3.3.9	Avaliações morfológicas descritiva dos frutos e sementes de plantas transformadas	79
3.4	CONCLUSÕES	83
3.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
4	CONCLUSÕES GERAIS.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

- AF: Ácido fítico
- AIA: Ácido indol-3-acético
- cDNA: DNA complementar
- CHS: Sintase da chalcona
- dNTPs: Deoxinucleotídeos fosfato
- dsRNA: ‘Double-stranded RNA’
- ESTs: ‘Expressed Sequence Tag’
- GFP: ‘Green fluorescent protein’
- GmMIPS1: *Glycine max*-sintase do *mio*-inositol-1-fosfato
- MIPS: Sintase do *mio*-inositol-1-fosfato
- mRNA: RNA mensageiro
- PCR: Reação da Polimerase em Cadeia
- PP: Polipropileno
- PVC: Cloreto de polivinila
- RNAi : RNA de interferência
- rpm: Rotações por minuto
- SAAT: ‘Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation’
- siRNA: ‘Small interfering RNA’
- Taq polimerase: Enzima polimerase de *Thermofilus aquaticus*
- T-DNA: DNA de transferência
- TIGR: ‘The Institute for Genomic Research’

RESUMO

FERNANDES, Denise, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Morfogênese *in vitro* em tomateiro e berinjela e silenciamento gênico da sintase do mio-inositol-fosfato por RNAi em tomateiro.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-orientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Francisco José Lima Aragão.

Este trabalho teve como objetivo: i) a otimização das condições de desinfestação de sementes de tomateiros (*Solanum lycopersicum* Mill.) e berinjela (*Solanum melongena* L.); ii) a avaliação da influência do tipo de vedação sobre a qualidade das plântulas e explantes oriundos destas; iii) a avaliação do efeito da sonicação sobre a morfogênese *in vitro* de explantes de tomateiros e sobre a viabilidade de células de *Agrobacterium tumefaciens*; iv) o estabelecimento de parâmetros para possibilitar a transformação genética mediada por *A. tumefaciens* visando ao silenciamento gênico mediado por RNAi da sintase do mio-inositol-fosfato, utilizando-se o gene *GmMIPS1*. Na desinfestação das sementes de berinjela, comprovou-se que tratamentos utilizando imersão em água deionizada são mais eficientes que imersão em solução de 0,13% v/v de cloro. A utilização de desinfestação a seco, em câmara de gás cloro, não é indicada para a assepsia de sementes de tomate e berinjela, pela toxicidade do gás às sementes, comprometendo sua germinação. Observou-se que as trocas gasosas favorecem o desenvolvimento das plântulas e geram explantes em maior número e de melhor qualidade para utilização de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. Ao se utilizar a técnica de SAAT ('Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation'), os explantes e a suspensão bacteriana foram expostos a tempos de exposição ao ultra-som (0, 3, 6 e 9 segundos). Verificou-se que o intervalo de 3 a 6 segundos é o indicado para se utilizar em transformação genética, pois resultou nas maiores áreas de expressão transiente avaliada pela análise histoquímica *in situ* do gene *GUS*, maior número de estruturas regeneradas e menor mortalidade nas células de *A. tumefaciens*. O processo foi otimizado quando a imersão em suspensão de *A. tumefaciens* foi realizado após 24 horas de exposição ao ultra-som. Para ser possível a seleção de transformantes foi estabelecida a curva de letalidade ao agente higromicina e a concentração encontrada para seleção de células não transformadas foi de 7,5 mg.L⁻¹ em explantes cotiledonares, hipocotiledonares e foliares de tomateiro. Dosagens acima de 7,5 mg.L⁻¹ mostraram-se tóxicas, resultando em explantes com áreas cloróticas e necróticas. A fim de verificar a relação do gene *MIPS* com o desenvolvimento de sementes, a transformação genética foi

realizada com sucesso em tomateiro e berinjela, via *A. tumefaciens* contendo plasmídeo com construção de silenciamento por siRNA para o gene *MIPS*, utilizando uma seqüência conservada do gene de soja *GmMIPS*. A natureza transgênica dos regenerantes primários foi confirmada mediante o teste histoquímico *in situ* de *GUS* e análise de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos. A análise de expressão gênica confirmou o silenciamento do gene *MIPS*, e a análise morfológica dos frutos confirmou a hipótese do relacionamento da *mio*-inositol-fosfato-sintase com o desenvolvimento de sementes. Porém, conforme detectado pela técnica de citometria de fluxo, o processo de regeneração *in vitro* adotado no protocolo de transformação de tomateiro, ao contrário de berinjela, induziu poliploidia em algumas plantas transgênicas.

ABSTRACT

FERNANDES, Denise, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2009. ***In vitro* morphogenesis in eggplant and tomato plants and silencing of myo-inositol-fosfate sintase gene by RNAi in tomato plants.** Advisor: Wagner Campos Otoni. Co-advisors: Everaldo Gonçalves de Barros and Francisco José Lima Aragão.

The main objectives in this work were: i) to find the optimum conditions to disinfect tomato seeds (*Solanum lycopersicum* Mill.) and eggplant seeds (*Solanum melongena* L.); ii) to evaluate the influence of the type of sealing in the obtained seedlings and explants; iii) to evaluate the effect of sonication in the morphogenesis *in vitro* of the tomato explants and in the viability of *Agrobacterium tumefaciens* cells; iv) to establish the parameters that allow the genetic transformation mediate by *A. tumefaciens* aiming the genetic silencing mediate by RNAi from myo-inositol-phosphate synthase, using the *GmMPIS1* gene. It was checked that the use of deionized water was more efficient to disinfect eggplant seeds than 0.13% v/v chlorine solution. The use of dry disinfection in chlorine cameras is not appropriate to clean the tomato and eggplant seeds due to the gas toxicity and that it also compromises their germination. It was observed that gas exchange helps the seedlings development and leads to a bigger number of explants and with better quality to be used in the genetic transformation via *Agrobacterium tumefaciens*. Using the SAAT technique (Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation), the explants and the bacteria suspensions were exposed to ultrasound for 0, 3, 6 and 9 seconds. It was verified that the immersion time from 3 to 6 seconds was appropriate to be used in genetic transformation, since it shown the biggest transient expression areas evaluated by *in situ* histochemical analysis of the *GUS* gene, the biggest number of regenerated structures and less mortality in the *A. tumefaciens* cells. The process was optimized when the immersion of the *A. tumefaciens* suspension was made 24 hours after the exposition to ultrasound. To make possible to select the transformed plants it was established the dependence of the hygromycin agent lethality and the found concentration of the non-transformed selected cells was 7.5 mg.L⁻¹ in cotyledonary hipocotyledonary and leaf tomato explants. It was found that concentrations above this value were toxic, showing chlorotic and necrotic areas in the explants. A genetic transformation in tomato and eggplant plants was successfully made to check the relation between the *MIPS* gene and the seeds development by *A. tumefaciens* containing plasmids with silencing construction by siRNA to the *MIPS* gene using a conserved sequence of the

soy gene *GmMIPS*. The transgenic nature of the primary regenerators was confirmed by *in situ* histochemical tests of *GUS* and by PCR analysis with specific oligonucleotides initiators. The analysis of the genetic expression confirmed the *MIPS* gene silencing and the morphologic analysis of the fruits confirmed the hypothesis of the relationship between the myo-inositol-phosphate synthase and the seeds development. However, as shown by flow-citometry technique, the process of regeneration *in vitro* used in the tomato plants transformation protocol changed some transgenic plants to polypoids. This was not observed in eggplant plants.

INTRODUÇÃO GERAL

Em plantas, o *mio*-inositol-1-fosfato é sintetizado a partir de glicose-6-fosfato em uma reação catalizada pela enzima sintase do *mio*-inositol-1-fosfato (EC 5.5.1.4). O inositol pode ser convertido em ácido fítico (AF; fitato) (Insp₆), a forma mais abundante de fosfato em sementes de várias espécies. Tem sido sugerido que a rota para o fitato envolve uma seqüência de fosforilação do *mio*-inositol e, ou, por fosfatidilinositol-fosfato. Duas rotas paralelas de biossíntese de ácido fítico, uma lipídeo-independente e outra lipídeo-dependente, foram propostas para plantas superiores (Brearley e Hanke, 1996; Raboy *et al.*, 2002).

Apesar das numerosas investigações fisiológicas de acumulações e armazenamento de fitato (Raboy & Dicknson, 1987; Stevenson *et al.*, 2000; Hitz *et al.*, 2002), não é ainda completamente entendido como plantas sintetizam fitato e como o metabolismo de fitato é coordenado com a sinalização que envolve outros inositóis-fosfatos.

Além disso, a rota de biogênese do AF em sementes em desenvolvimento é pouco compreendida. Porém, é conhecido que fosfolipídeos de inositol exercem papéis na membrana exportando, sinalizando e regulando o metabolismo celular que controla o crescimento; assim como função de armazenamento de cátions (principalmente K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ e Zn²⁺), função essa que se torna possível pela alta densidade dos grupos fosfatos negativamente carregados, localizados ao redor do anel de *mio*-inositol (Smart & Fleming, 1993).

Em algumas espécies de plantas MIPS (sintase do *mio*-inositol-fosfato) pertence a uma família multigênica. Em *Arabidopsis thaliana* o gene MIPS (*Atmips*) é formado por três genes: *Atmips-1* que codifica uma proteínas de massa molecular de 56,5 kD (Johnson, 1994); *Atmips-2* com massa molecular de 56,3 kD (Johnson & Burk, 1995); e *Atmips-3*, para o qual não há referência de sua massa molecular (Ishitani *et al.*, 1996). Outras espécies, como soja e milho, contem de quatro e sete membros da família do gene MIPS, respectivamente (Larson & Raboy, 1998).

Alguns autores encontraram respostas interessantes sobre o *mio*-inositol e AF trabalhando com manipulação genética (Chiera *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2007; Polacco *et al.*, 2008). Esses estudos ajudam a hipotetizar a rota de biossíntese, seus precursores e destinos de catálise, bem como alguns genes envolvidos e as respostas morfológicas encontradas nas plantas devido a essas interações.

Chiera *et al.* (2004) utilizaram a estratégia de transgenia para dirigir expressão de uma fitase durante o desenvolvimento do embrião de soja no local de síntese ou de armazenamento de AF. Assim, alcançaram a expressão ectópica da fitase em plântulas de soja expressado por um promotor específico de sementes (β -conglucininina). Observaram redução de 8% de AF, aumentando 3 vezes em fósforo inorgânico (Pi), e aumentos na retenção total de fósforo (P) em sementes, sem, contudo, demonstrar efeitos deletérios na germinação e desenvolvimento de sementes.

Linhagens mutantes de milho (Raboy *et al.*, 2000), cevada (Larson *et al.*, 1998), arroz (Larson *et al.*, 2000) e soja (Wilcox *et al.*, 2000) que apresentavam redução acentuada nos níveis de fitato, não demonstraram efeito algum sobre o desenvolvimento das sementes. Assim como mutantes de milho que apresentam fenótipo com redução no conteúdo de AF apresentam aumento na quantidade de *mio*-inositol e redução no *mio*-inositol fosfato, mostrando efeito mínimo no crescimento e desenvolvimento da planta (Shi *et al.*, 2005).

Shi *et al.* (2007), ao utilizarem um promotor embrião-específico, obtiveram o silenciamento do transportador ABC em linhagens transgênicas de milho, com sementes com baixo nível de AF e alto nível de Pi, sem, contudo, demonstrar redução de massa seca e na germinação de sementes.

Richter *et al.* (2004), estudando sementes de três mutantes de cevada (*Hordeum vulgare* L.) e a redução na demanda de utilização de *mio*-inositol para a síntese de AF, encontraram associação entre o aumento no teor *mio*-inositol e o decréscimo da síntese de AF; as sementes mutantes também continham mais galactinol do que aquelas do tipo selvagem. Os resultados sugeriram que a acumulação da família oligossacarídeos é controlada pelos níveis dos substratos iniciais, *mio*-inositol e sacarose, e não ditado apenas pelos oligossacarídeos. Estes oligossacarídeos cumprem múltiplas funções nas plantas, e em sementes, possivelmente, protegem estruturas celulares durante a dessecação e constituem reservas de carbono para a germinação.

Em soja, foram encontrados quatro ESTs ('Expressed Sequence Tag') de *GmMIPS* com alta homologia: *GmMIPS1*, isolado de cotilédone imaturo; *GmMIPS2*, isolado de raiz, broto, flor e tegumento da semente; *GmMIPS3*, isolado de flor, folhas, gemas e cotilédone; e *GmMIPS4*, isolado de gemas e vagens jovens (Hegeman *et al.*, 2001). Esses genes poderiam ser relacionados aos altos conteúdos de fitato na biossíntese e reserva de AF nas sementes, bem como sua relação na possível necessidade das sementes para sua maturação ou germinação, realocando reservas de *mio*-inositol fosfato e minerais das moléculas de AF. Ao se identificar uma mutação

misense em soja no gene estrutural *MIPS* (*GmMIPS1*) e o *mips1* exibiram redução de 50% em AF em sementes, com concomitante aumento em Pi. Além disso, houve redução em galactinol e rafinossacarídeos anti-nutricionais, uma vez que *mio*-inositol-fosfato também pode ser desfosforilado a inositol, essencial para a síntese de oligossacarídeos sob certas condições (Richter *et al.*, 2004).

Os resultados anteriormente apresentados por várias pesquisas independentes sugerem que os altos níveis de fitato não são requeridos para germinação de sementes e crescimento de plântulas.

Nunes *et al.* (2006) produziram linhagens de soja usando RNA de interferência (RNA_i), construído para silenciar o gene *mio*-inositol-1 fosfato sintase. Observaram a ausência de desenvolvimento de sementes nas linhagens em que apresentaram forte expressão do gene inserido, i.e, ausência de detecção do mRNA do gene *GmMIPS1*. Além disso, redução drástica (de até 94,5%) no conteúdo de fitato foi alcançada em linhagens transgênicas. Contudo, os autores relatam que não está claro se a construção de RNA_i afeta os outros códigos da família MIPS expressos em tecidos vegetativos, pois as plantas transgênicas geradas se apresentaram normais, enquanto as sementes da progênie herdando o RNA_i apresentam previamente aborto de embrião. Os resultados demonstraram correlação positiva entre a expressão do gene *GmMIPS1* e desenvolvimento de semente. Reforçando a hipótese de que o gene *MIPS* esteja envolvido no desenvolvimento das sementes, Hegeman *et al.* (2001), também trabalhando com inositol, obtiveram níveis detectáveis de proteína de *MIPS*, principalmente durante o desenvolvimento da semente, indicando um nível de expressão elevado somente em fases anteriores à cotiledonar embrionária. Isso indica que a conversão de glicose-6-fosfato para *mio*-inositol-1-fosfato pode acontecer anteriormente ao desenvolvimento de sementes. Esses dados demonstram que a alta redução de AF em sementes pode ser prejudicial à planta.

Polacco *et al.* (2008) geraram uma linhagem de soja (CAPP) na qual uma fitase periplasmática de *Escherichia coli* foi integrada. O produto do gene *appA* foi uma fitase ativa, que resultou em redução de aproximadamente 90% de AF em sementes e aumentos concomitantes no fosfato livre total. Essas características se apresentaram estáveis e houve marcante redução na taxa de germinação, mas sem efeitos sobre a quantidade e massa das sementes.

Verifica-se que, enquanto a interferência com *MIPS* e *aappA* parecem ter conseqüências negativas sobre a germinação, a supressão núcleo-específica do transportador de ABC em linhagens de milho, a expressão embrião-específica de fitases

e mutantes com AF reduzido apresentam pouco ou nenhum defeito de germinação ou de rendimento. Efeitos deletérios em sementes, em relação à germinação e, ou, desenvolvimento são encontrados apenas com redução acima de 90% de conteúdo de AF.

Os genes e as correspondentes enzimas MIPS já foram isolados em mais de 70 organismos diferentes, incluindo procariotos, animais e plantas. Estudos realizados com as seqüências do gene e da proteína MIPS, encontradas em diferentes organismos, revelaram que seus domínios catalíticos funcionais encontram-se bastante conservados (Majumder *et al.*, 2003). Esta constatação indica que o gene praticamente não sofreu grandes mutações ao longo da evolução das espécies e, conseqüentemente, sua funcionalidade tornou-se indispensável para o metabolismo de diversos organismos.

A caracterização do gene *PeMIPS* de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e a análise filogenética, revelaram que a seqüência de nucleotídeos do gene que codifica a região *PeMIPS1* comparada com as seqüências de genes *MIPS* de 31 espécies de plantas disponíveis no GenBank e no TIGR (The Institute for Genomic Research), mostraram elevada similaridade na ordem de 74 a 86% (Abreu & Aragão 2006). Já as seqüências de aminoácidos deduzidas usadas para comparar a composição de aminoácidos do polipeptídeo de *PeMIPS1* com *MIPS* de outras plantas revelaram similaridade de 85-93%; dentre as famílias estavam Solanaceae e Fabaceae.

Uma possibilidade de encontrar respostas sobre a biossíntese do AF, seu papel no desenvolvimento de sementes e possíveis alterações no corpo vegetativo pode estar na supressão do gene *GmMIPS-1* em diferentes plantas; podendo ser realizado mediante a técnica de RNA_i utilizando transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* (Nunes *et al.*, 2006).

Para a obtenção de linhagens transgênicas foram escolhidas como plantas-alvo berinjela e tomateiro, por apresentarem ciclos relativamente curtos, e protocolos de regeneração *in vitro* já estabelecidos na rotina de nosso laboratório. Além da presença de muitas sementes que auxiliaram na correlação das análises moleculares com características fenotípicas apresentadas pelos transformantes, uma vez que o estudo visa o controle da expressão gênica e estabilidade de transgenes, de modo especial com ênfase no aborto de embriões e desenvolvimento de sementes.

Os dados encontrados no GenBank relacionando a homologia do gene isolado por Hegeman *et al.*(2001) *GmMIPS1* (DQ323905) e utilizado para silenciar soja (Nunes *et al.*, 2006) com os genes endógenos de MIPS de *Lycopersicon esculentum* (atualmente

Solanum lycopersicum) (AF293460.1) mostraram uma sintase de *mio*-inositol-1-fosfato (Inps) que apresenta 83% de homologia.

Utilizando a cultura de tecidos, o isolamento do gene *GmMIPS1* (que contém alta homologia com o gênero *Solanum*), a construção de plasmídeo contendo o cassete de interferência para silenciamento e transformação genética mediada por *A. tumefaciens*, propôs-se a transformação genética das espécies de *Solanum melongena* L. e *Solanum lycopersicum* L. com a técnica de siRNA utilizando o gene *GmMIPS-1*, a fim de estudar seu relacionamento com o aborto de embriões e o desenvolvimento de sementes.

A relação de redução acima de 90% no conteúdo de fitato em sementes com diminuição da quantidade e volume, sugere-se a possibilidade de utilizar a técnica de silenciamento gênico a fim de suprimir a expressão do gene *MIPS*, que expressa o *mio*-inositol-fosfato, precursor da síntese de fitato. Esse silenciamento poderá ser possível devido à alta homologia entre as sequências de *MIPS* em diversas espécies. Essa estratégia pode ser aplicada na obtenção de sementes abortadas e com reduzida quantidade de AF, indo de encontro às tendências comerciais atuais que visam ao incremento do valor nutricional pela redução de elevados níveis de fitato.

Dessa forma, o presente trabalho objetivou verificar se a alta homologia entre a sequência encontrada na família MIPS possibilita a utilização do gene isolado de soja *GmMIPS1* para o silenciamento do gene endógeno de outras espécies, e se o silenciamento da expressão da sintase do *mio*-inositol-fostado estaria de fato relacionado com o desenvolvimento de sementes em berinjela e tomateiro.

Para atingir tais objetivos, a presente dissertação foi dividida em 3 capítulos. O primeiro, consta da otimização das condições de desinfestação de sementes de tomateiros (*Solanum lycopersicum* Mill.) e berinjela (*Solanum melongena* L.) e avaliação da influência do tipo de vedação sobre a qualidade das plântulas e explantes oriundos das mesmas; o segundo, da avaliação do efeito da sonicação sobre a morfogênese *in vitro* de explantes de tomateiros e sobre a viabilidade de células de *Agrobacterium tumefaciens* durante a fase de aplicação de SAAT (‘Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation’); e o terceiro, da transformação genética mediada por *A. tumefaciens* visando ao silenciamento gênico mediado por RNAi da sintase do *mio*-inositol-fosfato, utilizando-se o gene *GmMIPS1*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, E.F.M.; Aragão, F.J.L. Isolation and characterization of a myo-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress. *Annals of Botany*, 2006.
- Brearley, C.A.; Hanke, D.E. Metabolic evidence for the order of addition of individual phosphate esters to the myo-inositol moiety of inositol hexakisphosphate in the duckweed *Spirodela polyrriza* L. *Biochemistry Journal*, 314:227-233, 1996.
- Chiera, J.M.; Finer, J.J.; Grabau, E.A. Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability. *Plant Molecular Biology*, 56: 895-904, 2004.
- Hegeman, C.E.; Good, L.L.; Grabau, E.A. Expression of D-myoinositol-3-phosphate synthase in soybean. Implications for phytic acid biosynthesis. *Plant Physiology*, 125:1941-1948, 2001.
- Hitz, W.D.; Carlson, T.J.; Kerr, P.S.; Sebastina, S.A. Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. *Plant Physiology*, 128:650-660, 2002.
- Ishitani, M.; Majumder, A.L.; Bornhouser, A.; Michalowski, C. B.; Jensen, R. G.; Bohnert, H. J. Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress. *Plant Journal*, 9:537-548, 1996.
- Larson, S.R.; Young, K.A.; Cook, A.; Blake, T.K.; Raboy, V. Linkage mapping of two mutations that reduce phytic acid content of barley grain. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 141-146, 1998.
- Larson, S.R.; Rutger, J.N.; Young, K.A.; Raboy, V. Isolation of genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) low phytic acid mutation. *Crop Science*, 40: 1397-1405, 2000.
- Johnson, M. D. The *Arabidopsis thaliana* myo-inositol 1-phosphate synthase (EC 5.5.1.4). *Plant Physiology*, 105: 1023-1024, 1994.
- Johnson, M. D.; Sussex, I. M. 1-L-myoinositol 1-phosphate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 107: 613-619, 1995.
- Majumder, A. L.; Chatterjee, A.; Dastidar, K. G.; Majee, M. Diversification and evolution of L -myoinositol 1-phosphate synthase. *FEBS Letters*, 553: 3-10, 2003.
- Nunes, A.; Vianna, G.; Cuneo, F.; Amaya-Farfán, J.; de Capdeville, G.; Rech, E.; Aragão, F. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPSI*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta*, 224: 125-132, 2006.
- Polacco, J.C.; Bilyeu, K.D.; Zeng, P.; Coello, P.; Zhang, Z.J.; Krishnan, H.B.; Bailey, A.; Beuselinck PR. Quantitative conversion of phytate to inorganic phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase. *Plant Physiology*, 146: 468-477, 2008.

- Raboy, V.; Dickinson, D.B. The timing rate of phytic acid accumulation in developing soybean seeds. *Plant Physiology*, 85:841-844, 1987.
- Raboy, V.; Gerbasi, P.F.; Young, K.A.; Stoneberg, S.D.; Pickett, S.G.; Bauman, A.T.; Murthy, P.P.N.; Sheridan, W.F.; Ertl, D.S. Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant Physiology*, 124:355–368, 2000.
- Raboy, V.; Young, K.A.; Larson, S.R.; Cook, A. Genetics of phytic acid synthesis and accumulation. In: Reddy, N.R.; Sathe, S.K. (eds). *Food Phytates*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 63–83. 2002.
- Shi, J.; Wang, H.; Hazebroek, J.; Ertl, D.E.; Harp, T. The maize low-phytic acid 3 encodes a myo-inositol kinase that plays a role in phytic acid biosynthesis in developing seeds. *Plant Journal*, 42: 708-719, 2005.
- Shi, J.; Wang, H.; Schellin, K.; Li, B.; Faller, M.; Stoop, J.M.; Meeley, R.B.; Ertl, D.S.; Ranch, J.P.; Glassman, K. Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nature Biotechnology*, 25: 930–937, 2007.
- Smart, C.C.; Fleming, A.J. A plant gene with homology to D-myo-inositol-3-phosphate synthase is rapidly and spatially upregulated during an abscisic-acid-induced morphogenic response in *Spirodela polyrrhiza*. *Plant Journal*, 4: 279–293, 1993.
- Stevenson, J.M.; Perera, I.Y.; Heilmann, I.; Persson, S.; Boss, W.F. Inositol signaling and plant growth. *Trends in Plant Science*, 5:252-258, 2000.
- Wilcox, J.; Premachandra, G.; Yound, K.; Raboy, V. Isolation of high seed inorganic P. Low-phytate soybean mutants. *Crop Science*, 40: 1601-1605, 2000.

CAPÍTULO 1

**Germinação e estabelecimento *in vitro* de berinjela e
tomateiro e avaliação de qualidade de plântulas de tomateiro
sob diferentes vedações**

1.1 INTRODUÇÃO

O tomateiro e a berinjela pertencem à família Solanaceae e podem ser consideradas espécies modelos para trabalhos de regeneração *in vitro* e transformação genética. Todavia, o sucesso dos protocolos de transformação genética dessas espécies é dependente de uma série de fatores dentre os quais pode-se citar o genótipo envolvido, o tipo de explantes, dentre outros (Otoni *et al.*, 2003; Collonier *et al.*, 2001., Costa *et al.*; 2007; Picoli *et al.*, 2007).

Sabe-se que os processos de morfogênese *in vitro* comumente são afetados por diversos fatores do meio de cultura, como os reguladores de crescimento, a composição salina e orgânica, o tipo de agente gelificante, dentre outros; e do ambiente físico como a irradiância, a temperatura, a umidade, o tipo de vedação e as trocas gasosas (Joy Iv & Thorpe, 1999; Piqueras & Debergh, 1999; Shim *et al.*, 2003; Chen, 2004; Zobayed, 2006; George, 2008). Além disso, segundo George (2008) outros fatores contribuem para o efeito do regulador de crescimento na organogênese do tecido ou órgão em cultivo, tais como: o tipo de cultivo (meio semi-sólido e líquido), o genótipo da planta matriz e fatores relacionados ao explante (posição e idade do tecido de origem).

A qualidade fisiológica da planta matriz é de fundamental importância ao sucesso das respostas morfogênicas *in vitro*. Diante disso, a adequação de fatores do meio de cultivo e do ambiente é imprescindível para a garantia de uma população de plantas com características morfológicas, nutricionais e fisiológicas adequadas. Dentre esses fatores do ambiente estão as trocas gasosas. É crescente o interesse e os trabalhos que têm revelado que fatores ambientais afetam consideravelmente o crescimento e desenvolvimento das plântulas *in vitro*. Estes estudos sugerem que o controle do ambiente pode vir a se tornar uma estratégia essencial para obter plântulas de elevada qualidade com sincronia no processo e baixos custos de produção (Nguyen & Kozai, 1998; Zobayed *et al.*, 2004; Zobayed, 2006).

A modificação da concentração de gases no espaço interno e a troca gasosa afetam o crescimento e a morfogênese de diversas espécies em diferentes sistemas da cultura *in vitro* (Marino & Berardi, 2004; Zobayed, 2006; Ribeiro *et al.*, 2009). O meio nutriente e a concentração de água proporcionam umidade relativa muito elevada no interior dos recipientes de cultivo, resultando na baixa transpiração, problemas fotossintéticos, baixas taxas de absorção de água e nutrientes e taxas de respiração elevadas, reduzindo conseqüentemente as taxas de crescimento do explante (Kozai *et al.*, 1997a). Pode-se reduzir a umidade relativa utilizando-se de filtros permeáveis a

gases, como o poliuretano e polipropileno (Zobayed, 2000) e ventilação forçada (Zobayed *et al.*, 2001; Zobayed, 2006). Dessa maneira, aumenta-se as trocas gasosas, e a atmosfera interna dos frascos de cultura fica menos contrastante daquela encontrada no ambiente externo (Gonçalves, 2008). Com o aumento das trocas gasosas, observa-se que o crescimento e a taxa de fotossíntese das plântulas *in vitro* aumentam (Nguyen *et al.*, 1999), os estômatos apresentam funcionamento normal (Zobayed *et al.*, 2001), e desenvolvimento da cutícula (Jeong *et al.*, 1995).

Em geral, os trabalhos que envolvem o cultivo *in vitro* e a transformação genética de tomateiro ou de berinjela baseiam-se em explantes juvenis, estabelecidos mediante a germinação *in vitro* de sementes (Collonier *et al.*, 2001; Otoni *et al.*, 2003; Bathia *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2007; Picoli *et al.*, 2007). Sendo assim, as variações decorrentes de diferentes origens e lotes de sementes são esperadas, uma vez que a época de produção, o local de cultivo e a ocorrência de pragas e doenças afetaram a qualidade fisiológica das sementes, bem como a ocorrência de microrganismos residentes nas mesmas, de modo especial endofíticos, patogênicos ou não.

É premissa da cultura *in vitro* o estabelecimento de material asséptico, isento de contaminações, para que haja sucesso nas manipulações. Há, portanto, necessidade de estabelecer plantas e avaliar metodologias eficientes de desinfestação para atender essas demandas. São variados os agentes desinfestantes, tanto em composição química, toxidez e eficiência relativa na desinfestação (Gamborg & Phillips, 1995; Rocha, 1999; Silva *et al.*, 2003; Moraes, 2007). Porém, o hipoclorito de sódio é o agente desinfestante mais amplamente utilizado, podendo variar a sua forma de tratamento, quer mediante a imersão em soluções ou em câmara de gases (Di *et al.*, 1996; Nogueira, 2000).

Dessa maneira, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência das técnicas de desinfestação na obtenção de plântulas isentas de contaminantes em tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill.) e berinjela (*Solanum melongena* L.) e do tipo de vedação nas características morfológicas de *S. lycopersicum* durante a fase de germinação a fim de melhorar a qualidade dos explantes para posterior utilização na transformação genética.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Desinfestação de sementes de berinjela

1.2.1.1 Teste de sanitização com câmara de gás de cloro.

As sementes de berinjela Long Purple foram selecionadas e dispostas sobre vidro relógio. A câmara de gás foi composta por um béquer de 1 litro de capacidade contendo 50 mL de solução hipoclorito a 2,5% de cloro e um suporte de elevação para o recipiente de vidro contendo as sementes. Adicionou-se a câmara de gás 3,0 mL de HCl 6N sobre a solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,5% e lacrou-se imediatamente com três camadas de plástico cloreto de polivinila (PVC).

O experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado e foi composto por quatro tratamentos assim distribuídos: (i) 24 horas em câmara de gás, vedação dos tubos de cultura com tampa rígida de polipropileno (PP) e selamento com plástico de PVC; (ii) 48 horas em câmara de gás, vedação dos tubos de cultura com tampa PP e selamento com PVC; (iii) 24 horas em câmara de gás, e vedação dos tubos de cultura com tampa de PP e selamento com fita Micropore[®]; (iv) 48 horas de gás, vedação dos tubos de cultura com tampa de PP e selamento com fita Micropore[®]. Cada tratamento foi composto por dez unidades experimentais, sendo cada unidade representada por um tubo contendo três sementes, totalizando 4 tratamentos, 40 tubos e 120 sementes.

O meio de germinação foi constituído dos sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) força total suplementado com vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 0,1 g.L⁻¹ de *mio*-inositol, 20 g.L⁻¹ de sacarose, 6,5 g.L⁻¹ de agar Merck[®] e pH 5,8 ± 0,2. O experimento foi mantido em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 26 ± 2 °C e irradiância de 37 ± 4 μmol.m²s⁻¹.

Foram avaliadas, ao vigésimo dia do início do experimento, as freqüências de contaminação e germinação.

1.2.1.2 Teste de sanitização com imersão em solução de hipoclorito

As sementes inicialmente foram selecionadas e acondicionadas em câmara perfurada feita de embalagem de filme fotográfico, onde permaneceram durante todo o

processo de desinfestação. A câmara perfurada foi mantida dentro de um frasco estéril tipo Magenta (Sigma Chem, EUA) com tampa, onde se realizou os banhos de esterilização e os molhos.

A primeira etapa para a sanitização ocorreu com a imersão em etanol 70% por 1 minuto, seguido por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1,25 % de cloro acrescido de 2 gotas de Tween 20 para cada 100 mL de solução e enxágües em água deionizada e estéril por três vezes consecutivas, representando o controle do experimento (tratamento 1). Esse processo repetiu-se a cada 12 horas sendo uma câmara mantida sob imersão em água deionizada estéril e outra câmara em solução de hipoclorito de sódio a 0,13% de cloro ativo (5 mL de solução de NaClO a 2,5% de cloro em volume final de 100 mL), compondo os tratamentos planejados em um fatorial 2 x 7 (2 soluções e 7 tempos) representados na tabela 1.

Durante o período de molho as Magentas estéreis contendo as câmaras perfuradas com as sementes foram mantidas sob agitação orbital de 100 rpm, à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tabela 1. Tratamentos utilizados para desinfestação de sementes de berinjela, testando submersão em água deionizada estéril ou solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,13% de cloro sob tempos crescentes de exposição. Tratamento 1: controle: desinfestação sem submersão; Tratamento 2: submersão de água deionizada estéril; Tratamento 3: submersão de solução de hipoclorito de sódio a 0,13% de cloro

	Tempo total de imersão	Quantidade total de desinfestações	Solução de imersão	
			Água destilada autoclavada	Hipoclorito de sódio 0,13%
Tratamentos	0	1	T1	
	12	2	T2	T8
	24	3	T3	T9
	36	4	T4	T10
	48	5	T5	T11
	60	6	T6	T12
	72	7	T7	T13

Cada tratamento foi composto por 10 unidades experimentais sendo cada unidade representada por 1 tubo contendo 3 sementes, totalizando 13 tratamentos, 130 unidades experimentais e 390 sementes.

O meio de germinação foi constituído como descrito no item 1.2.1.1. O experimento foi mantido em sala de crescimento conforme o item 1.2.1.1. Foram avaliadas, ao vigésimo dia do início do experimento, as freqüências de contaminação e de germinação.

1.2.2 Desinfestação de sementes de tomateiro

1.2.2.1 Sanitização com câmara de gás de cloro

Para a desinfestação de sementes de tomateiro testou-se o método câmara de gás (Di *et al.*, 1996) comparativamente ao descrito por Nogueira (2000).

Para esse experimento foram utilizadas sementes da cultivar Santa Clara obtida no comércio local. Inicialmente as sementes foram contadas e selecionadas. Estas sementes foram dispostas sobre vidro relógio a ser exposto em câmara de gás, como descrito no item 1.2.1.1.

O experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado e foi composto por três tratamentos assim distribuídos: (i) 30 horas de câmara de gás contendo vedação de PVC; (ii) 30 horas de câmara de gás contendo vedação com tampa PP contendo 1 membrana (1M); (iii) 30 horas de câmara de gás contendo vedação com tampa PP contendo 2 membranas (2M) MilliSeal[®] air vent de 0,22 μm de póro (Millipore, Japão).

Cada tratamento foi constituído de quatro unidades experimentais, cada unidade experimental foi representada por um frasco contendo 15 sementes em 40 mL de meio. O meio utilizado para a germinação foi constituído de sais MS meia força, vitaminas de Nitsch e Nitsch (Nitsch & Nitsch, 1969), 0,1 g.L^{-1} de *bio*-inositol, 20 g.L^{-1} de sacarose, 6,5 g.L^{-1} de agar Merck[®] e pH $5,8 \pm 0,2$. O experimento foi mantido em sala de crescimento como descrito no item 1.2.1.1. As avaliações ocorreram ao vigésimo dia após o início do experimento, e quantificou-se o número de sementes contaminadas e sementes germinadas nos diferentes tratamentos.

1.2.2.2 Sanitização com imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO)

As sementes inicialmente foram selecionadas e acondicionadas em câmara perfurada feita de embalagem de filme fotográfico, onde permaneceram durante todo o processo de sanitização. A câmara perfurada foi mantida dentro de um frasco estéril tipo Magenta com tampa. A primeira etapa para a sanitização ocorreu com a imersão em etanol 70% por 1 minuto, seguido por 20 minutos em solução de NaClO a 1,25 % de cloro acrescido de 2 gotas de Tween 20 para cada 100 mL de solução, e enxágüe em água deionizada e estéril três vezes seguidas; em seguida as sementes permaneceram em

molho em solução de NaClO a 0,13% de cloro (5 mL de solução de NaClO a 2,5% de cloro em volume final de 100 mL) durante 12 horas mantidos em agitação orbital de 100 rpm à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Após a permanência nessa solução, nova desinfestação foi realizada como descrito anteriormente. Decorridos os três enxágües em água deionizada autoclavada as sementes foram cultivadas em meio de cultura referente aos tratamentos.

O delineamento aplicado foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram assim distribuídos: (i) imersão em cloro a 1,25% e vedação com PVC; (ii) imersão em cloro a 1,25% e vedação com tampa PP contendo 1M MilliSeal®; (iii) imersão em cloro a 1,25% e vedação com tampa PP contendo 2M MilliSeal®.

Cada tratamento foi constituído de quatro unidades experimentais, e cada unidade experimental representada por um frasco de 250 mL de capacidade, contendo cada um 15 sementes. O meio utilizado para a germinação foi constituído como descrito no item 1.2.2. O experimento foi mantido em sala de crescimento como descrito no item 1.2.1.1. As avaliações ocorreram ao vigésimo dia após o início do experimento, e quantificou-se o número de sementes contaminadas e sementes germinadas nos diferentes tratamentos.

1.2.3 Efeito do tipo de vedação na qualidade de explantes de hipocótilos e cotilédones de tomateiro, visando à transformação genética

As sementes do cultivar de tomateiro Santa Clara foram desinfestadas conforme Nogueira (2000). Em seguida, foram cultivadas em frascos contendo 40 mL de meio nutritivo. O meio utilizado para a germinação foi constituído como descrito no item 1.2.2.1.

Os frascos de cultivo *in vitro* de 250 mL de capacidade foram vedados com diferentes sistemas, constituindo os seguintes tratamentos: (i) tampas de PP; (ii) tampas de PP contendo 1M MilliSeal®; e (iii) Tampas de PP contendo 2M MilliSeal®. Cada tratamento conteve quatro unidades experimentais e cada unidade experimental foi representada por um frasco contendo 20 sementes das quais foram retiradas 15 plântulas e avaliadas as características morfogênicas. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado.

O experimento foi mantido em sala de crescimento como descrito no item 1.2.1.1.

Após 15 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliadas as variáveis: área cotiledonar (cm²); comprimento do hipocótilo (cm); massa fresca de raiz (g); massa fresca de hipocótilo (g); massa fresca de cotilédone (g); massa seca de raiz (g); massa seca de hipocótilo (g) e massa seca de cotilédone (g).

1.2.4 Efeito do genótipo em relação à aeração na obtenção de explantes de segmentos de hipocótilos e de cotilédones para a transformação genética

As sementes das cultivares de tomateiros Moneymaker, NCEBR-2 e Santa Clara foram desinfestadas de acordo com metodologia proposta por Nogueira (2000) e, em seguida, cultivadas em frascos contendo 40 mL de meio nutritivo. O meio utilizado para a germinação foi constituído como descrito no item 1.2.2.1.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4 sendo três genótipos: ('Moneymaker', 'NCEBR-2' e 'Santa Clara') e quatro vedações (tampas rígidas de PP, contendo uma ou duas membranas MilliSeal[®] e plástico PVC), onde cada tratamento conteve quatro unidades experimentais e cada unidade experimental foi representada por um frasco de 250 mL de capacidade contendo 20 sementes. As características morfogênicas foram avaliadas a partir da retirada de 15 plântulas. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado.

O experimento foi mantido sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 26 ± 2°C e irradiância de 37 ± 4 μmol m⁻² s⁻¹

Após 15 dias de cultivo *in vitro* foram avaliadas as variáveis área cotiledonar (cm²) e comprimento hipocótilo (cm).

1.2.5 Análise de dados

As variáveis foram analisadas e quantificadas e os dados dos experimentos foram submetidos ao teste de Lilliefors, para verificação da homogeneidade de variância e da distribuição normal dos dados; comprovado a distribuição normal, os dados experimentais foram submetidos ao teste de variância ANOVA a 5% de probabilidade e as médias foram analisadas pelo teste estatístico de comparação de médias Tukey, a 5% de significância. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Genes (Cruz, 2006).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1. Desinfestação de sementes de berinjela e de tomateiro

Na esterilização superficial de sementes de berinjela, ao se realizar o teste de imersão em solução de cloro comprovou-se que o tempo necessário de desinfestação pode ser menor de 72 horas evidenciadas através de modificações no protocolo inicial. Estas modificações empregaram imersões de desinfestação a cada 12 horas e variação no tempo de exposição ao tratamento e à solução de imersão.

A resposta das variáveis contaminação e germinação em relação à aplicação dos diferentes tempos de imersão com água deionizada estéril pode ser observada nas figuras 1 e 3A-B. A variável germinação não foi afetada, não demonstrando variação significativa entre os tratamentos; comprovando que a composição da solução de imersão e os tempos submetidos não prejudicaram a germinação *in vitro*; ao contrário, percebe-se acréscimo nas médias de germinação em relação ao acréscimo do tempo de imersão no desinfestante.

A variável contaminação mostrou-se significativa entre os tempos de exposição ao tratamento e teve a menor média com o tempo de imersão de 72 horas em conjunto com desinfestações a cada 12 horas durante este período, apesar de não diferir estatisticamente aos tratamentos de 36, 48 e 60 horas de imersão.

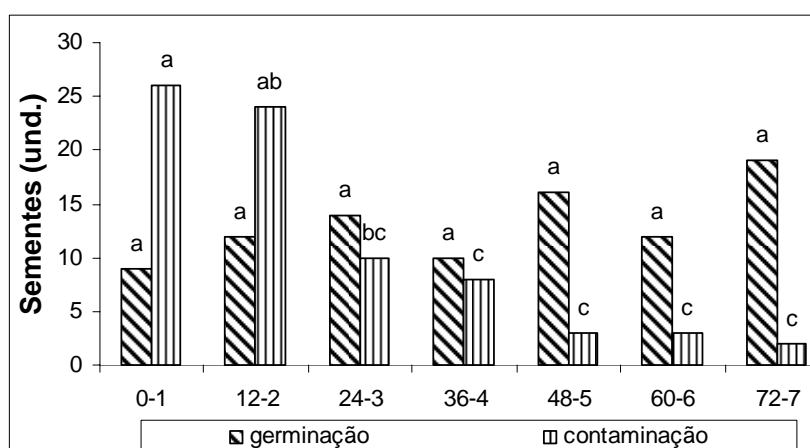


Figura 1 - Tratamento de sementes de berinjela com imersão em água deionizada autoclavada e desinfestação a cada 12 horas. Médias de germinação e médias de contaminação em unidades de sementes. No eixo das abcissas o primeiro algarismo corresponde ao tempo de imersão em horas e o segundo algarismo corresponde a quantidade de desinfestações. Médias seguidas de mesmas letras, para uma mesma variável, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

Na imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,13% de cloro, a variável germinação foi afetada pelos tratamentos (Figuras 2 e 3C-D), apresentando diminuição em sua média em relação ao acréscimo ao tempo de imersão, sugerindo que a composição da solução é prejudicial ao embrião, não sendo contabilizado germinação nas imersões com tempos superiores a 36 horas (Figura 2), resposta contrária aquela das sementes expostas ao tratamento com água deionizada (Figura 1).

No entanto para a variável contaminação, as médias foram decrescendo à medida que aumentaram o tempo de exposição ao desinfestante, não sendo encontradas contaminações em tratamentos com tempos superiores a 36 horas.

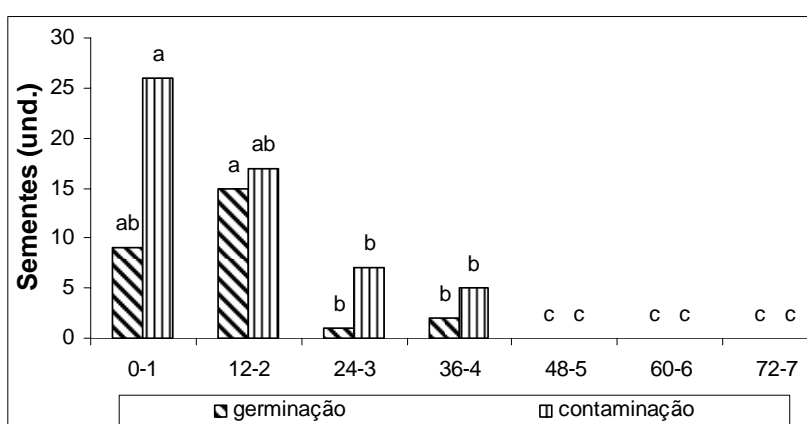


Figura 2 - Tratamento de sementes de berinjela com imersão em solução de 0,13% de cloro e desinfestação a cada 12 horas. Médias de germinação e médias de contaminação em unidades de sementes. No eixo das abcissas o primeiro algarismo corresponde ao tempo de imersão em horas e o segundo algarismo corresponde a quantidade de desinfestações. Médias seguidas de mesmas letras, para uma mesma variável, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

Os resultados sugerem que os tratamentos com imersão em solução de hipoclorito de sódio acima de 36 horas afetam drasticamente a viabilidade das sementes, porém propiciam uma melhor desinfestação, evidenciando a interação agente desinfestante x tempo de exposição. Dessa forma, sugere-se a realização da desinfestação de sementes de berinjela, utilizando a desinfestação mediante imersão em água deionizada durante 36 horas, realizando desinfestação com NaClO 1,25% de cloro durante 20 minutos a cada 12 horas até a finalização do tempo de imersão.

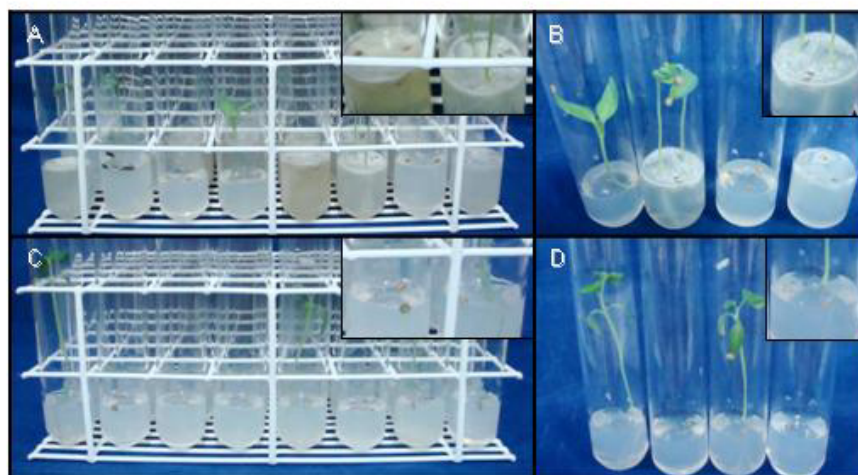


Figura 3 – Aspecto da germinação *in vitro* de sementes de berinjela submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação. **A e B** - Tratamentos conduzidos com imersão em água deionizada autoclavada; **C e D** - Tratamentos conduzidos com imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,13% de cloro.

Para tomateiro, a metodologia de desinfestação descrita por Nogueira (2000) confirmou-se como sendo a melhor indicada, apresentando contaminação entre 0 a 5% e germinação entre 85 a 100%. As plântulas apresentaram morfologia normal e sincronia na germinação (Figura 4).



Figura 4 - Teste de desinfestação utilizando imersão com hipoclorito de sódio a 1,25% de cloro (Nogueira, 2000) e diferentes sistemas de vedação (**A**) vedação com plástico PVC; (**B**) vedação com tampa PP com 1M; (**C**) vedação com tampa PP com 2M. Barra = 1 cm.

No experimento para a sanitização das sementes de berinjela, após verificar a ineficiência do procedimento usual de imersão em 1 minuto em etanol 70%, 20 minutos de hipoclorito de sódio a 1,25 % de cloro, buscou-se protocolos alternativos que propiciassem plântulas saudáveis e com sincronização no processo germinativo, portanto com reflexos positivos sobre o potencial regenerativo *in vitro*.

Nesse sentido, foi empregada a câmara de gás de cloro e a vedação, de maneira a avaliar possíveis incrementos no desenvolvimento das plântulas de berinjela. Todavia, nesse teste não houve diferença entre os tratamentos, resultando em taxas de 100% de descontaminação e 0% de germinação das sementes em todos os tratamentos,

evidenciando que a câmara de gás de cloro mostrou-se muito tóxica para tal finalidade, ocasionando provavelmente a morte dos embriões. Isso inviabilizou a avaliação de características morfológicas das plântulas em resposta às vedações.

Resultados semelhantes aos encontrados em sementes de berinjela foram encontrados em sementes de tomate, quando o processo de desinfestação realizou-se com gás cloro. A desinfestação envolvendo a câmara de gás como procedimento de desinfestação se apresentou prejudicial à germinação, impossibilitando qualquer quantificação de germinação nos dos tratamentos envolvendo o cloro gasoso.

Segundo Domini *et al.* (2005), o mecanismo de ação do cloro não é bem conhecido, embora algumas hipóteses sugiram que há uma combinação com proteínas da membrana celular, formando compostos tóxicos e levando à inibição de enzimas essenciais, provocando assim a necrose não só dos agentes infestantes, mas também do material biológico. Os autores recomendam que seja utilizada uma solução de NaClO com a menor concentração possível de cloro, para evitar danos ao tecido do explante.

Em soja têm sido, principalmente, usados para a desinfestação superficial de sementes a esterilização a seco (gás cloro) ou úmida (à base de hipoclorito de sódio a 1%) (Di *et al.*, 1996). A desinfestação a seco é vantajosa porque requer pouco trabalho e possibilita a armazenagem das sementes desinfestadas. Entretanto, prolongadas exposições das sementes pode causar efeitos adversos na germinação e, ou regeneração. A diferença da eficiência do protocolo de desinfestação entre as sementes de soja (Di *et al.*, 1996), berinjela e tomateiro pode ser explicada pelas características morfológicas das sementes; como a soja contém um endosperma de maior volume, poderia ter fornecido ao embrião proteção ao agente desinfestante gás de cloro. Assim, o tipo e os parâmetros de desinfestação devem ser determinados para cada tipo de explante.

Em cultura de tecidos, a eliminação de macro ou microrganismos localizados sobre o explante é efetuada mediante a imersão do propágulo em substâncias químicas, quer líquidos ou gases (George, 1983). A contaminação, freqüentemente, origina-se pela introdução em cultura de explantes contaminados com microrganismos endofíticos ou microrganismos resistentes ao processo de desinfestação. O manejo de contaminantes na cultura *in vitro* de células e tecidos vegetais depende do uso de plantas estoques livres de patógenos e da combinação de métodos de desinfestação e/ou cultura de meristemas para o estabelecimento de culturas livres de patógenos e contaminantes (Cassells, 2000; Leifert & Cassels, 2001).

De acordo com George (1993) a concentração e o tempo de exposição aos agentes desinfestantes dependem do material vegetal e diferentes partes da planta

apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos. Para isso os produtos químicos utilizados na desinfestação devem ser avaliados previamente dentro de um esquema fatorial, concentração versus tempo, para verificar o seu impacto sobre o explante. A descontaminação do explante bem como todo o processo de assepsia é um desafio para o início de uma cultura de tecidos vegetais na fase de estabelecimento *in vitro* (Moraes *et al.*, 2007).

Apesar de simples, a má escolha do método de desinfestação pode prejudicar etapas essenciais para o estabelecimento e condução de cultivo *in vitro* de explantes vegetais como a germinação de sementes e desenvolvimento de explantes (Barrueto Cid & Zimmermann, 2006).

Segundo Grattapaglia e Machado (1998) o processo de desinfestação dos explantes é fator fundamental para as demais etapas do estabelecimento *in vitro*. O etanol e os compostos à base de cloro são as substâncias com ação germicida mais utilizado nesse processo. O hipoclorito de sódio ou de cálcio mostra grande eficiência na desinfestação de sementes, eliminando fungos e bactérias, promovendo aumento no total de plântulas germinadas a partir de sementes tratadas.

Moraes (2007) testou diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempo de exposição ao hipoclorito e concluiu que as concentrações de 2, 3 e 4% NaClO reduzem substancialmente a contaminação das gemas axilares, porém a sobrevivência das gemas axilares é afetada com o aumento da concentração e do tempo de exposição ao NaClO; resultando em uma concentração de 2% de hipoclorito de sódio durante 10 minutos um índice aceitável de contaminação e sobrevivência das gemas axilares do abacaxizeiro testado.

Sem dúvidas, a contaminação microbiana é um dos mais sérios problemas afetando a cultura *in vitro* de células e tecidos vegetais. Embora o entendimento sobre a identidade, fontes e epidemiologia dos diferentes contaminantes microbianos tenham avançado consideravelmente nos últimos anos (Leifert *et al.*, 1994; Leifert & Cassels, 2001), a detecção de contaminantes bacterianos latentes e a eliminação da contaminação fúngica e bacteriana de culturas estabelecidas *in vitro* permanecem à espera do desenvolvimento de melhores estratégias.

Dessa forma, verifica-se que diferentes métodos de desinfestação não se empregam a todos os tipos de explantes ou materiais vegetais, sendo necessária adequação do sistema de desinfestação em relação ao explante utilizado.

1.3.2 Efeito da aeração na obtenção de explantes de hipocótilos e cotilédones.

A aeração aplicada na etapa de germinação da semente comprova a associação de desenvolvimento x aeração. Essa condição de cultivo pode aumentar a transpiração favorecendo as características estruturais da parte aérea, resultando em ganhos significativos de área cotiledonar (Figura 5) e comprimento de hipocótilo (Figura 6).

As maiores massas fresca e seca de cotilédones podem ser reflexo de maiores trocas gasosas permitidas pelo tipo de vedação, resultando em maior transpiração e efetiva elevação de água e minerais do meio, favorecendo o desenvolvimento da plântula (Figuras 7-11).

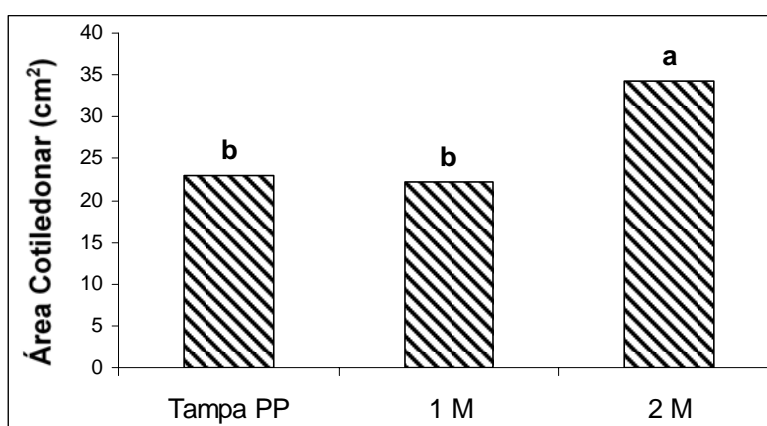


Figura 5 - Médias de área cotiledonar (cm²) de tomateiro relacionadas aos tratamentos de aeração: tampa de polipropileno (Tampa PP), tampa de PP com 1 membrana (1M) e tampa de PP com 2 membranas (2M). Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

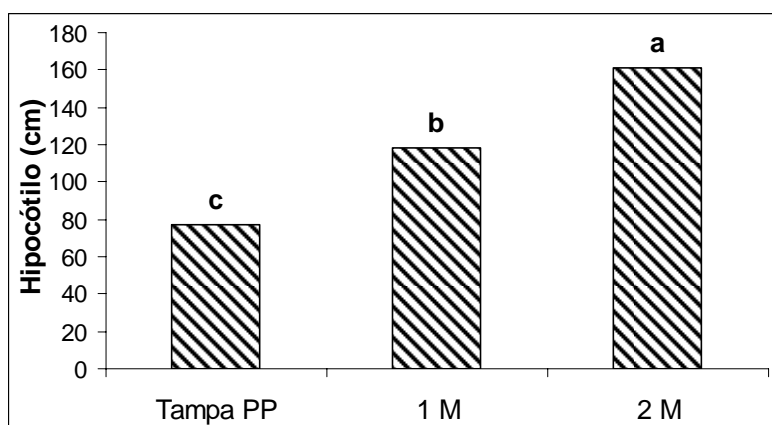


Figura 6 - Médias de comprimento de hipocótilo de tomateiro em centímetros relacionadas aos tratamentos de aeração: tampa de polipropileno (Tampa PP), tampa de PP com 1 membrana (1M) e tampa de PP com 2 membranas (2M). Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

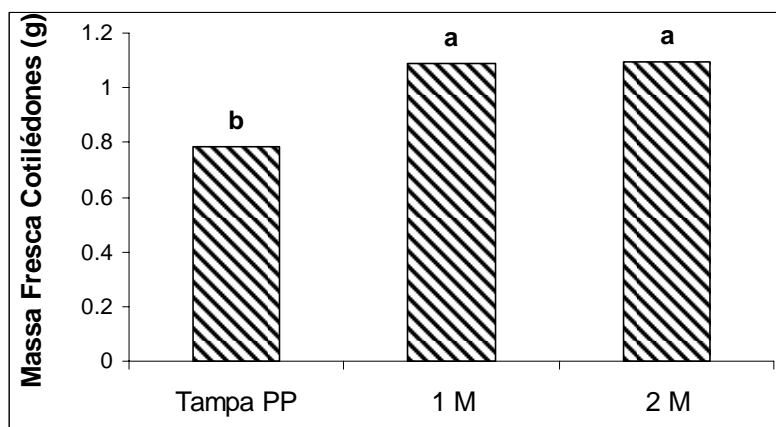


Figura 7 - Médias de massa fresca do cotilédone de tomateiro em gramas relacionadas aos tratamentos de aeração: tampa de polipropileno (Tampa PP), tampa de PP com 1 membrana (1M) e tampa de PP com 2 membranas (2M). Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

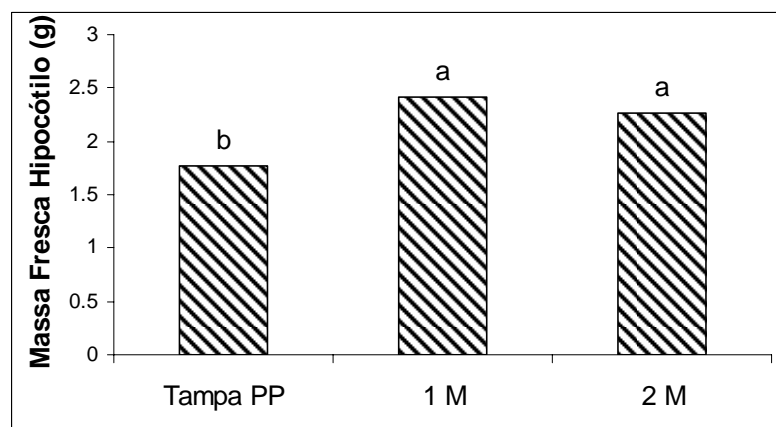


Figura 8 - Médias de massa fresca do hipocótilo de tomateiro em gramas relacionadas aos tratamentos de aeração: tampa de polipropileno (Tampa PP), tampa de PP com 1 membrana (1M) e tampa de PP com 2 membranas (2M). Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

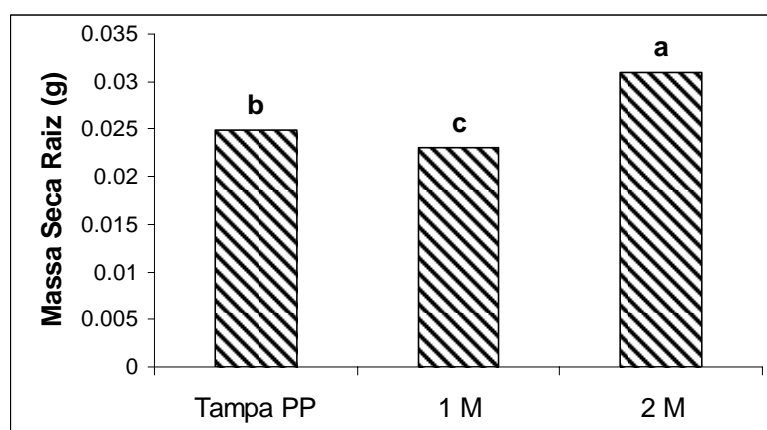


Figura 9 - Médias de massa seca de raiz de tomateiro em gramas relacionadas aos tratamentos de aeração: tampa de polipropileno (Tampa PP), tampa de PP com 1 membrana (1M) e tampa de PP com 2 membranas (2M). Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

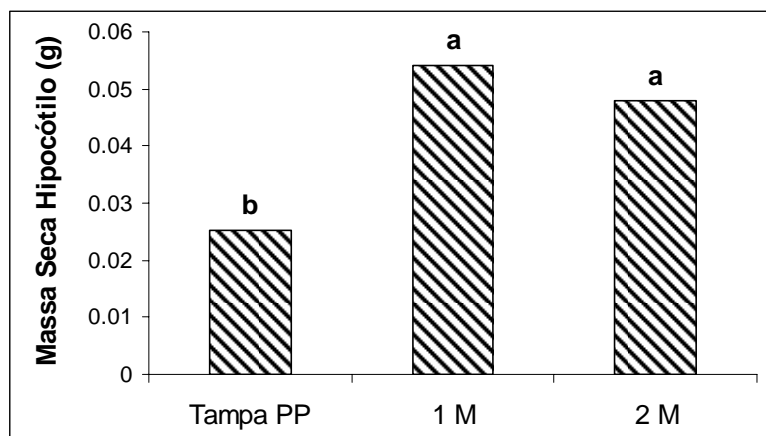


Figura 10 - Médias de massa seca do hipocótilo de tomateiro em gramas relacionadas aos tratamentos de aeração: tampa de polipropileno (Tampa PP), tampa de PP com 1 membrana (1M) e tampa de PP com 2 membranas (2M). Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

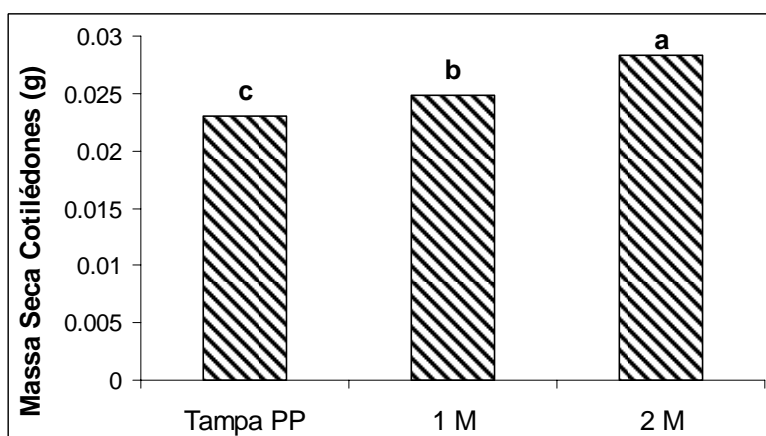


Figura 11 - Médias de massa seca dos cotilédones de tomateiro relacionadas aos tratamentos de aeração: tampa de polipropileno (Tampa PP), tampa de PP com 1 membrana (1M) e tampa de PP com 2 membranas (2M). Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

1.3.3 Efeito do genótipo de tomateiros crescidos *in vitro* sob os diferentes tipos de vedação, na obtenção de explantes de hipocótilos e cotilédones a serem utilizados na transformação genética

Sabe-se que diferentes espécies ou até mesmo cultivares dentro da mesma espécie podem se comportar de maneira variada quanto às respostas da indução ao cultivo *in vitro*. Dessa forma, para se comprovar que os ganhos morfogênicos relacionados aos diferentes sistemas de vedação respondem predominantemente as características de ambiente *in vitro* e não ao fator genótipo, o teste de trocas gasosas foi repetido utilizando as cultivares Moneymaker, NCEBR-2 e Santa Clara.

Confirmou-se a tendência de resposta morfogênica entre os explantes e o ambiente *in vitro* produzidos pelos diferentes tipos de vedação. Houve acréscimos na variável área cotiledonar, onde se verifica aumento significativo com o aumento da aeração do sistema (Figura 13), mesmo a área cotiledonar sendo fortemente determinada pelo fator genótipo (Figura 14),

Para comprimento de hipocótilo, foram observadas diferenças entre os sistemas de vedação dentro de um mesmo genótipo (Figura 15), porém esse não seguiu a tendência em relação à maior aeração, sendo encontradas maiores médias em sistema de vedação 'tampa PP' para as cultivares Moneymaker e NCEBR-2. O fator genótipo também demonstrou diferenças significativas entre as cultivares (Figura 16).

Como se pode verificar na figura 12, há um acréscimo de estrutura e expansão nos explantes à medida que o sistema *in vitro* possui maiores trocas gasosas, possibilitadas pelas membranas utilizadas nas tampas de vedação. Visualiza-se o favorecimento das características estruturais da parte aérea como maior área cotiledonar e a qualidade dos ápices caulinares formados. Os ápices caulinares ainda que não sejam foco do estudo, representam visualmente as respostas das plântulas ao ambiente *in vitro* sendo estas apresentadas com melhores estruturas e desenvolvimento quando o emprego de aeração é maior.

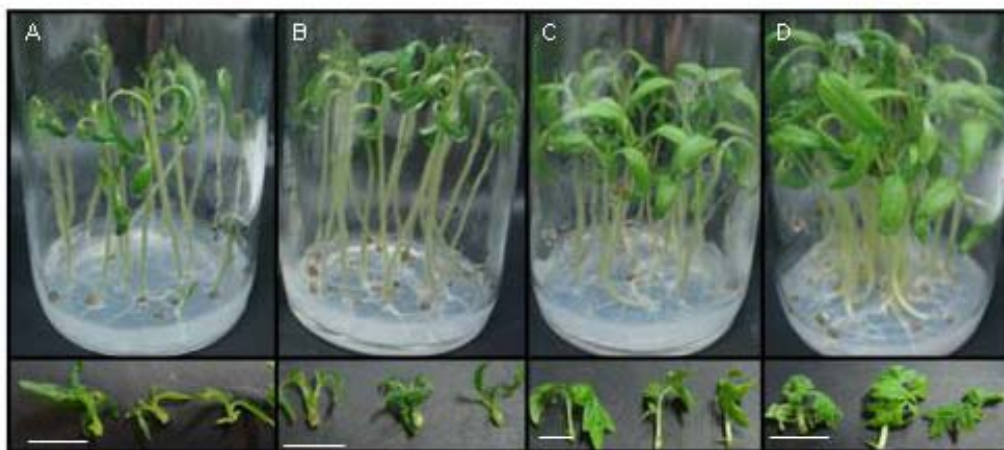


Figura 12 - Frascos de cultura *in vitro* representando o desenvolvimento de plântulas de tomateiros desenvolvidas sob diferentes sistemas de vedação e detalhes dos respectivos ápices caulinares. **A** - filme plástico PVC; **B** - tampa rígida de polipropileno (PP); **C** - tampa PP com 1 membrana e **D** - tampa PP contendo 2 membranas. Barra = 0,2 cm.

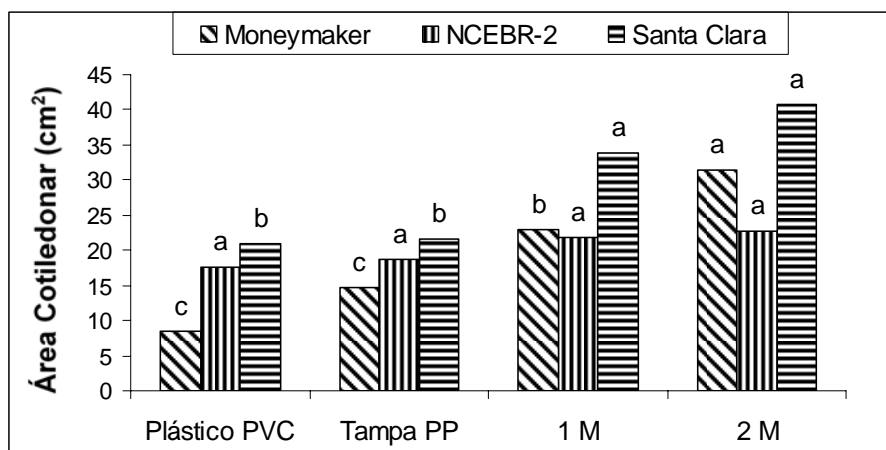


Figura 13 - Médias de área cotiledonar de tomateiros relacionadas aos tratamentos de sistemas de vedação: filme plástico PVC (Plástico PVC), tampa de polipropileno (Tampa PP), tampa de PP com 1 membrana (1M) e tampa de PP com 2 membranas (2M). Médias seguidas de mesmas letras, dentro de cada vedação, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

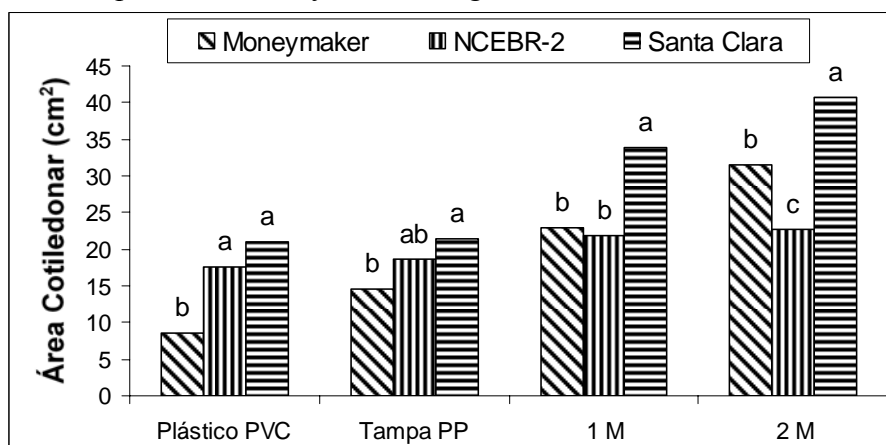


Figura 14 - Médias de área cotiledonar de tomateiros relacionadas aos genótipos de tomateiros 'Money maker', 'NCEBR-2' e 'Santa Clara'. Médias seguidas de mesmas letras, dentro de cada vedação, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

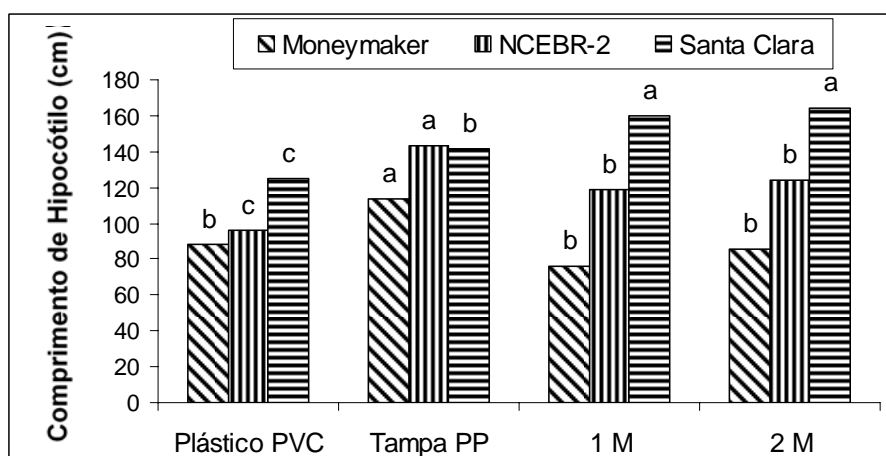


Figura 15 - Médias de comprimento de hipocótilo de tomateiros relacionadas aos tratamentos de sistemas de vedação: filme plástico PVC (Plástico PVC), tampa de polipropileno (Tampa PP), tampa de PP com 1 membrana (1M) e tampa de PP com 2 membranas (2M). Médias seguidas de mesmas letras, dentro de cada vedação, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

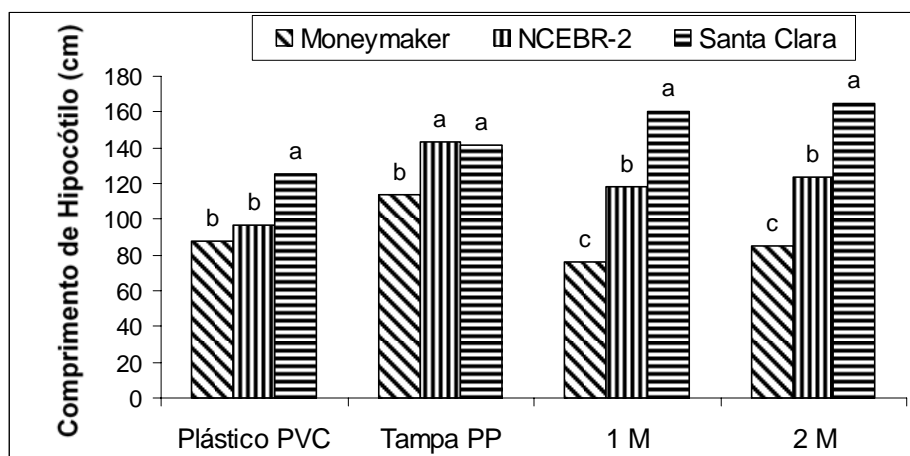


Figura 16 - Médias de comprimento de hipocótilos relacionadas aos genótipos de tomateiros ‘Moneymaker’, ‘NCEBR-2’ e ‘Santa Clara’. Médias seguidas de mesmas letras, dentro de cada vedação, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

Resultados semelhantes foram obtidos por Lai *et al.* (1998) onde foi demonstrado que o controle de gases na atmosfera interna dos frascos, através de sistemas de ventilação, pode resultar em melhor rendimento e qualidade dos brotos de *Carica papaya*. Esses sistemas consistem na utilização de tampas com membranas facilitadoras de trocas gasosas, impedindo o acúmulo de gases, entre estes o etileno.

Sob um grande número de trocas gasosas, Nguyen *et al.* (1999) observaram aumento na massa fresca, no comprimento dos brotos e na raiz e na área foliar das plântulas *ex vitro* de café cultivadas fotoautotroficamente no substrato Florialite®, resultado que indica que o micro-ambiente dos frascos, incluindo atmosfera e rizosfera, tem funções decisivas no crescimento das plântulas. Essas condições de cultivo podem aumentar a absorção de água e minerais devido à evapotranspiração ocorrer em maior intensidade.

Em jojoba, a comparação entre propágulos crescidos em condições de ventilação restrita e os propágulos sob aeração, mostrou que os últimos tornam-se menos propensos a hiperidricidade, mais lignificados e mais resistentes à perda de água para o ambiente. Em adição, nos cultivos aerados, os autores observaram que a deposição de parede celular na superfície da folha foi maior, o sistema vascular mais desenvolvido com incrementos na área foliar e massa seca (Mills *et al.*, 2004).

No cultivo *in vitro* de *Herreria salsaparilha*, a vedação com tampa com filtro facilitou a perda de água do sistema e permitiu que a concentração de oxigênio no interior dos frascos fosse semelhante à encontrada no ambiente externo. Utilizando-se esse tipo de vedação, as condições de cultivo se mantiveram mais próximas às

condições do ambiente externo, se comparadas a outros tratamentos (Gonçalves *et al.*, 2008).

Sciuti & Morini (1995) relataram que a elevada umidade relativa no interior dos frascos pode influenciar características anatômicas fisiológicas e morfológicas. Kozai *et al.* (1997b) reforçaram os estudos sobre as diferenças anatômicas, afirmando diferenças na organização celular das células do parênquima, como maior espaçamento entre as células conferindo maior espaço apoplasmático, gerado por alta umidade refletindo em explantes sensíveis e de textura tenra.

1.4 CONCLUSÕES

Para a desinfestação das sementes de berinjela, comprovou-se que tratamentos utilizando imersão em água deionizada em conjunto com a desinfestação com hipoclorito de sódio a 1,25% de cloro são mais eficientes do que a desinfestação pela imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,13% de cloro, em conjunto com a desinfestação com hipoclorito de sódio a 1,25% de cloro. Tempos de imersão acima de 36 horas não diferem estatisticamente nos fatores avaliados germinação e contaminação, no tratamento com imersão em água deionizada, podendo ser empregados com sucesso.

A utilização de desinfestação a seco, em câmara de gás cloro, não é indicada para a assepsia de sementes de tomate e berinjela, pela toxicidade do gás às sementes, comprometendo sua germinação; logo a desinfestação descrita por Nogueira em 2000 para tomate, foi a mais adequada.

As trocas gasosas favorecem o desenvolvimento das plântulas e geram explantes em maior número e de melhor qualidade para utilização de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barrueto, C.; Zimmermann, M.J.A. Contaminação *in vitro* de plantas. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 122 p., 2006.

Cassels, A.C. Contamination and its impact in tissue culture. *Acta Horticulturae*, 560: 353-359, 2001.

Chen, C. Humidity in plant tissue culture vessels. *Biosystems Engineering*, 88:231-241, 2004.

Collonier, C.; Fock Kashyap, V.; Rotino, G.L.; Daunay, M.C.; Lian, Y.; Mariska, I.K.; Rajam, M.V.; Servaes, A.; Ducreux, G.; Sihachakr, D. Applications of biotechnology in eggplant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65:91-107, 2001.

Costa, M.G.C.; Guimarães, L.M.S.; Guimarães, G.A.M.; Nogueira, F.T.S. Transformação genética de tomateiro. In: Torres, A.C.; Dusi, A.N.; Santos, M.D.M. (Eds.). *Transformação genética de plantas: teoria e prática*. Brasília: Embrapa Hortaliças. p. 145-161, 2007.

Di, R.; Purcell, V.; Collins, G.B.; Ghabrial, S.A. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. *Plant Cell Reports*, 15:746-750, 1996.

Domini, L. P.; Ferreira-Moura, I.; Guisso, A. P.; Souza, J. A. de.; Viégas, J. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72: 517-522, 2005.

Gamborg, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50:151-158, 1968.

Gamborg, O.L.; Phillips, G. C. *Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods*. Germany: Springer. 359 p., 1995.

George, E.F. *Plant propagation by tissue culture*. Part 1. The technology. 2 ed. Exegetics Limited, Edington. 380 p., 1993.

George, E.F. *Plant propagation by tissue culture*. 3rd Edition, 504 p. 2008.

Gonçalves, L.A.; Geraldine, R.M.; Picoli, E.A.T.; Vendrame, W.A.; Carvalho, C.R.; Otoni, W.C. *In vitro* propagation of *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92:243-250, 2008.

Grattapaglia, D.; Machado, M. A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA/CBAB. p. 183-260, 1998.

- Jeong, B.R.; Fujiwara, K.; Kozai, T. Environmental control and photoautotrophic micropropagation. *Horticultural Reviews*, 17:123-170, 1995.
- Joy Iv, R.W.; Thorpe, T.A. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry and molecular biology. In: Soh, W.Y. & Bhojwani, S.S. (eds.) *Morphogenesis in Plant Tissue Cultures*. Kluwer:Dordrecht, p. 171-214, 1999.
- Kozai, T.; Kubota, C.; Jeong, B.R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51:49-56, 1997a.
- Lai, C.-C.; Yu, T. A.; Yeh, S.D.; Yang, J.S. Enhancement of *in vitro* growth of papaya multishoots by aeration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53:221-225; 1998.
- Kozai, T., Quynh, N.T.; Kubota, C. Environmental control and its effects in transplant production under artificial light. *Journal of the Korean Society of Horticultural Science*, 38:194-199, 1997b.
- Leifert, C.; Cassells, A.C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 37:133-138, 2001.
- Marino, G.; Berardi, G. Different sealing materials for Petri dishes strongly affect shoot regeneration and development from leaf explants of Quince 'BA 29'. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 40:384-388, 2004.
- Mills, D.; Yanqing, Z.; Benzioni A. Improved of jojoba shoot multiplication *in vitro* by ventilation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 40:396-402, 2004.
- Moraes, A. M.; Almeida, F. A. C.; Cazé Filho, J. desinfestação e estabelecimento *in vitro* 1 de gemas axilares de abacaxizeiro. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, 1: 39-44, 2007.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497, 1962.
- Nascimento, P.K.V; Franco, E.T. H; Frassetto, E. G. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rigida* Bentham (Brenam). *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 141-143, 2007.
- Nguyen, Q.T.; Kozai, T.; Nguyen, U.V. Effects of sucrose concentration, supporting material and number of air exchanges of the vessel on the growth of *in vitro* coffee plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58:51-57, 1999.
- Otoni, W.C.; Picoli, E.A.T.; Costa, M.G.C.; Nogueira, F.T.S.; Zerbini, F.M. (2003) Transgenic tomato. In: Singh, R.P.; Jaiwal, P. J. (Eds.) *Plant genetic engineering: Improvement of vegetables*, v.5. Houston:Sci Tech Publishing LLC, .p.40-131.
- Picoli, E.A.T.; Ribeiro, A.P.O.; Otoni, W.C. Transformação genética de berinjela. In: Torres, A.C.; Dusi, A.N.; Santos, M.D.M. (Eds.). *Transformação genética de plantas: teoria e prática*. Brasília: Embrapa Hortaliças. p. 165-177, 2007.

Piqueras, A.; Debergh, P. Morphogenesis in micropropagation. In: Soh, W.Y. & Bhojwani, S.S. (Eds.) *Morphogenesis in Plant Tissue Cultures*. Kluwer:Dordrecht, p. 443-462, 1999.

Ribeiro, A.P.O. Influência de genótipo, agentes gelificantes, precursor (ACC) e inibidores (AVG e STS) do etileno e tipo de vedação na morfogênese *in vitro* de berinjela (*Solanum melongena* L.). Tese de Doutorado. Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa. UFV. 2006.

Ribeiro, A.P.O.; Picoli, E.A.T.; Lani, E.R.G.; Vendrame, W.A.; Otoni, W.C. The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 2009.

Rocha, M.T.R. Cultura de tecidos: uma alternativa para a multiplicação dos gêneros *Anthurium* e *Caladium*. Dissertação - Universidade Federal de Pelotas. 1999.

Silva, R.S.; Blank, M.F.A.; Ângelo, P.C.S. Desinfestação de explantes de inhame roxo (*Dioscorea rotundata*, Poir) coletados no campo para micropropagação. In: Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 14; Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos, Resumos. Lavras: UFLA/FAEPE. 2003.

Sciuti, R.; Morini, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, 70:221-228, 1995.

Shim, S.W.; Hahn, E.J.; Paek, K.Y. *In vitro* and *ex vitro* growth of grapevine rootstock '5BB' as influenced by number of air exchanges and the presence or absence of sucrose in culture media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75:57-62, 2003.

Zobayed, S.M.A. Aeration in plant tissue culture. In: Dutta Gupta, S. & Ibaraki, Y. (eds.) *Plant tissue culture engineering*. Springer:Netherlands. p. 313-327, 2006.

Zobayed, S.M.A.; Afreen, F.; Xiao, Y.; Kozai, T. Recent advances in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37:450-458, 2004

Zobayed, S.M.A. *In vitro* propagation of *Lagerstroemia* spp. from nodal explants and gaseous composition in the culture headspace. *Environmental Control Biology*, 38:1-11; 2000.

Zobayed, S.M.A.; Afreen, F.; Kozai, T. Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37:807-813; 2001.

CAPÍTULO 2

**Influência do ultra-som na morfogênese *in vitro* e expressão
transiente do gene *Gus* em tomateiro (*Solanum lycopersicum*
Mill.)**

2.1 INTRODUÇÃO

Os trabalhos pioneiros de transformação genética do tomateiro datam de 1985 (Hosrsch *et al.*, 1985) e 1986 (McCormick *et al.*, 1986). Desde então, foram publicados muitos trabalhos na área, com a introdução de genes conferindo várias características de interesse, incluindo resistências a herbicidas, a viroses, a insetos e a fungos, tolerância a estresses abióticos e qualidade de frutos (Otoni *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2008). Apesar do tomateiro ser considerado uma espécie modelo para trabalhos de regeneração *in vitro* e de transformação genética, a eficiência de transformação depende de vários fatores, dentre esses o genótipo, a idade da planta matriz, o tamanho, a posição dos explantes, e a fonte de explantes. Além desses, fatores relacionados à virulência de *Agrobacterium*, a temperatura e tempo de co-cultivo, pré-cultura dos explantes e componentes do meio de cultivo, conforme revisto por Otoni *et al.*(2003) e Costa *et al.* (2008).

Todavia, até o momento não se tem relato do efeito de pulsos de ultra-som sobre a morfogênese *in vitro* de explantes de tomateiro, bem ainda o seu efeito sobre a eficiência de transformação genética pela sonicação. A sonicação é um método para transferência de genes facilitando a captação de ácidos nucléicos em protoplastos e células de plantas intactas (Fechheimer *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 2005). Nesse sentido, foi proposto o uso de pulsos de ultra-som para ferir e modificar o tecido alvo, visando o aumento da infecção por *Agrobacterium*. Essa técnica foi denominada de SAAT (*Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation*) (Trick & Finer, 1997).

A técnica de SAAT é o uso mais importante do ultra-som na cultura de tecidos vegetais (Gaba *et al.*, 2006) e o aumento na expressão transiente e estável devido ao seu uso, já foi relatado para outras espécies como *Glycine max* (Meurer *et al.*, 1998; Santarém *et al.*, 1998), *Pinus taeda* (Tang *et al.*, 2001), *Triticum aestivum* (Amoah *et al.*, 2001), *Chenopodium rubrum* (Flores Solís *et al.*, 2003), *Robinia pseudoacacia* (Zaragoza *et al.*, 2004), *Phaseolus vulgaris* (Liu *et al.*, 2005), *Cucurbita pepo* (Ananthkrishnan *et al.*, 2007), *Cicer arietinum* (Pathak & Hamzah, 2008), *Linum usitatissimum* (Beranová *et al.*, 2008) e *Citrus* (Oliveira *et al.*, 2009).

Em decorrência da exposição dos tecidos e órgãos vegetais a pequenos períodos de ultra-som na presença de *Agrobacterium tumefaciens*, em todos os tecidos testados, o tratamento de SAAT aumentou grandemente os níveis de expressão transiente de genes (Trick & Finer, 1997).

As respostas de captação de ultra-som são dependentes da frequência e duração, sendo que tratamentos com maior tempo de captação ocasionaram ruptura de protoplastos (Liu *et al.*, 2005).

Até o presente momento, o mecanismo da permeabilização acústica não está completamente esclarecido. Porém, Joersbo & Brunstedt (1992) hipotetizaram que seu efeito pode estar relacionado ao violento colapso das bolhas, gerando pressão e temperatura altas. Isso poderia causar ruptura localizada da plasmalema e levar à absorção das substâncias dissolvidas na solução onde as células se encontram, com a posterior restauração da integridade da membrana. De acordo com Miller *et al.* (1974) os efeitos fisiológicos do ultra-som estão relacionados à parede celular, à membrana plasmática e ao crescimento.

Desta forma o presente estudo pretende avaliar o efeito do ultra-som no processo de transformação genética mediante a avaliação da expressão transiente, do processo de regeneração dos explantes e do seu efeito sobre a viabilidade de células de *Agrobacterium tumefaciens*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Ultra-som e a expressão transiente em tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara)

Sementes de tomateiro ‘Santa Clara’ foram obtidas no comércio local e desinfestadas de acordo com Nogueira (2000) para estabelecimento *in vitro*. Essas foram germinadas em frascos de 250 mL de capacidade contendo 40 mL de meio de germinação MS (Murashige & Skoog, 1962) meia força, vitaminas de Nitsch e Nitsch (Nitsch & Nitsch, 1969), 0,1 g.L⁻¹ de *mio*-inositol, 20 g.L⁻¹ de sacarose e 6,5 g.L⁻¹ de agar Merck[®], com seu pH ajustado para 5,8 ± 0,2. Os frascos foram vedados com tampas de PP contendo 2 membranas MilliSeal[®] air vent de 0,22 µm (Japão). Após 15 dias de cultivo *in vitro* as plântulas foram seccionadas em segmentos de hipocótilos e cotilédones entre 0,7 a 1 cm.

Os explantes foram expostos a quatro diferentes tempos de sonicação (0, 3, 6 e 9 segundos); dois diferentes formas de imersão em *Agrobacterium tumefaciens* (imersão de 5 minutos juntamente com a sonicação e imersão de 5 minutos após 24 horas da exposição a sonicação) resultando em um fatorial 4 x 2 x 2. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, onde cada tratamento foi constituído de 4 unidades experimentais sendo cada unidade experimental representada por 4 explantes.

Após a sonicação e imersão em suspensão de *A. tumefaciens*, os explantes permaneceram em meio de regeneração durante 4 dias, sendo mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 24 µmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas a temperatura de 26 ± 2 °C.

O meio de regeneração foi composto de sais MS força total, vitaminas Nitsch e Nitsch, 0,1 g.L⁻¹ *mio*-inositol, 2,0 mg.L⁻¹ de zeatina, 0,1 mg.L⁻¹ de ácido indol-3-acético (AIA), 20g.L⁻¹ sacarose, 6,5 g.L⁻¹ agar Merck[®] e pH 5,8 ± 0,2.

Após este período, os explantes foram submetidos aos ensaios histoquímicos da atividade de *GUS*, sendo transferidos para o mix contendo solução de reação X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronídeo) (Jefferson, 1987) e incubados a 37°C, em ausência de luz, *overnight*. Posteriormente, os embriões foram enxaguados com etanol 70%.

Após a reação com X-GLUC, o mix de *GUS* foi removido e os explantes passaram por uma etapa de descoloração dos pigmentos naturais, tendo as clorofilas

solubilizadas por solução composta por acetona e etanol 3:1 (v/v). Os explantes foram imersos nessa solução por 4 vezes durante 5 minutos cada imersão. Esse tratamento de descoloração possibilitou a contrastação das imagens para a quantificação dos setores azuis pela expressão do gene *uidA* ao reagente X-GLUC, permanecendo nos explantes a coloração branca do explante e azul típico da expressão transiente do gene *GUS*.

As imagens foram capturadas em microscópio estereoscópico (Olympus SZX-7) acoplada a câmera digital (Olympus E-330) e a atividade de *GUS* foi determinada mediante a quantificação da área de expressão transiente, através do programa Image Pro-Plus.

2.2.2 Influência do ultra-som no processo regenerativo de explantes tomateiro

Cotilédones e hipocótilos do tomateiro ‘Santa Clara’ provenientes de diferentes sistemas de vedação [tampa PP, tampa PP com 1 membrana (1M) e tampa PP com 2 membranas (2M)] foram expostos a diferentes tempos ultra-som: 0, 3, 6 e 9 segundos com auxílio de sonicador (Branson Ultrasonic Cleaner, modelo B1210E-Mt, potência de 80W) e cronômetro digital. Em seguida, transferidos para meio indutor de regeneração.

O delineamento foi inteiramente casualizado, onde cada tratamento foi constituído de 4 unidades experimentais, sendo cada unidade experimental representada por 10 explantes dispostos em placa de Petri de 90 x 15 mm de poliestireno cristal (J. Prolab, Brasil), contendo 25 mL de meio de regeneração.

Após o tratamento de sonicação, os explantes permaneceram em meio de regeneração, como descrito em 2.2.1, e foram mantidos em sala de crescimento como descrito em 2.2.1 durante 80 dias, sendo recultivados em novo meio a cada 20 dias.

Após período ao longo da indução de regeneração foram avaliados a massa fresca dos explantes viáveis por unidade experimental, o número de ramos acima de 0,5 cm, o número de folíolos, a fim de se estabelecer as razões explantes ramos/explantes viáveis, folíolos/explantes viáveis e massa fresca/explantes viáveis.

2.2.3 Influência da sonicação sobre a viabilidade de *Agrobacterium tumefaciens*

A linhagem de *A. tumefaciens* GV3101 cresceu em meio líquido YEP, suplementado com os antibióticos seletivos canamicina a 50 mg.L⁻¹ e gentamicina 50 mg.L⁻¹, mantido a 28 °C sob agitação orbital de 150 rpm, até obter densidade óptica de 0,4, em leitura espectrofotométrica de comprimento de onda a 600 nm.

Uma bateria de diluições foi realizada para se determinar o limite de contagem de células entre 30 e 300 células. Dessa bateria, diluições de 0 a 1x10⁻¹⁰ foram plaqueados 100 µL as diluições de 1x10⁻⁶, 1x10⁻⁷ e 1x10⁻⁸ em triplicata e, após 3 dias de crescimento, as células foram contabilizadas, sendo a diluição de 1x10⁻⁷ a adequada para conduzir o teste de sonicação.

O teste foi conduzido por DIC (delineamento inteiramente casualizado) contendo quatro tratamentos com os tempos de sonicação 0, 3, 6 e 9 segundos, sendo cada tratamento constituído de 3 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi representada por uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio sólido YEP suplementado com os agentes seletivos da linhagem de *A. tumefaciens* GV3101.

Uma nova cultura da linhagem GV3101 foi estabelecida como descrito anteriormente e dessas culturas realizou-se a diluição de 1x10⁻⁷; essa suspensão foi então fracionada em 12 Eppendorfs de 1,5 mL contendo 1 mL da suspensão cada; estes Eppendorfs contendo a suspensão bacteriana foram submetidos aos tempos de exposição ao ultra-som 0, 3, 6 e 9 segundos e plaqueados 100 µL em meio YEP seletivo. Após 6 dias de cultivo em BOD a 28°C as células crescidas foram quantificadas.

2.2.4 Análise de dados

As variáveis foram analisadas e quantificadas e os dados dos experimentos foram submetidos ao teste de Lilliefors, para verificação da homogeneidade de variância e da distribuição normal dos dados; comprovado a distribuição normal, os dados experimentais foram submetidos ao teste de variância ANOVA a 5% de probabilidade e as médias foram analisadas pelo teste estatístico de comparação de médias Tukey, a 5% nas análises de expressão transiente e crescimento das células de *A. tumefaciens* e 10% de significância nas análises de regeneração. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Genes (Cruz, 2006).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Ultra-som e a expressão transiente em tomateiro

As áreas de expressão transientes avaliadas pela quantificação de áreas de setores azuis resultantes da expressão do gene *uidA* em células transformadas transitoriamente foram avaliadas pelo teste Tukey a 5% de significância. Dessa forma, a variável área de expressão transiente foi avaliada estatisticamente pelos fatores individuais explante (hipocótilo e cotilédone), sonicação (0, 3, 6 e 9 segundos) e forma de exposição do explante ao *Agrobacterium tumefaciens* (imersão em associação a sonicação e imersão após 24 horas da sonicação).

A área de expressão transiente, avaliada pelo fator explante, mostrou diferença significativa de forma que os explantes cotiledonares apresentaram as maiores médias em relação aos de segmentos de hipocótilos (Figura 1).

A maior média de área de expressão transiente foi atingida com 6 segundos de sonicação, quando avaliado o fator tempo de sonicação (Figuras 2 e 3). Os diferentes tempos de sonicação não foram estatisticamente diferentes para segmentos de hipocótilos. Porém, houve acréscimo de área de expressão transiente no tempo de sonicação de 6 segundos, sendo correlato com a resposta obtida nos explantes cotiledonares, em que o tempo de 6 segundos proporcionou a maior média, não diferindo daquele de 3 segundos.

Em relação ao fator forma de exposição do explante ao *A. tumefaciens*, houve diferença nas médias somente com a ausência da sonicação, sendo a imersão após 24 horas com a bactéria inferior àquela realizada logo após a realização dos cortes. Não houve diferença entre as médias dos diferentes tempos de imersão (em conjunto ou após 24 h) quando a sonicação foi empregada, mas verifica-se que quando o explante é exposto ao ultra-som e imerso em *Agrobacterium* após 24 horas, a área de expressão transiente foi maior (Figura 4).

A interação entre a imersão após 24 horas de exposição ao ultra-som entre os tempos de sonicação apresentou diferenças nas médias de área de expressão transiente. Onde o tempo de 6 segundos apresentou a maior média (Figura 5) e a interação entre a imersão em suspensão de *A. tumefaciens* em conjunto a exposição à sonicação não apresentaram diferenças estatísticas entre as médias dos diferentes tempos de exposição ao ultra-som (Figura 6).

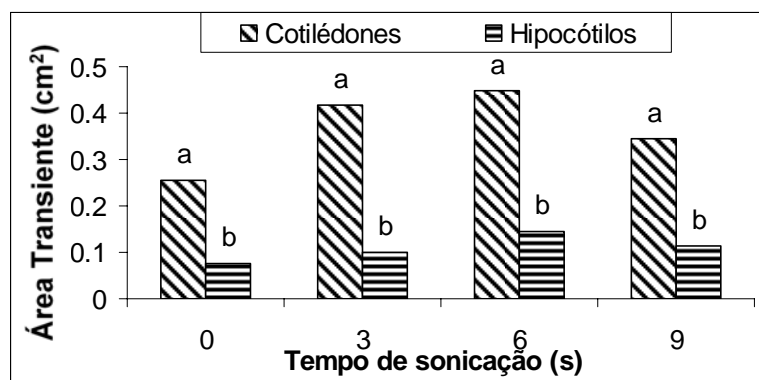


Figura 1 - Valores médios das áreas de expressão transitente em relação ao tipo de explante utilizado (cotilédones ou hipocótilos). Médias seguidas de mesma letra, dentro do mesmo tempo de sonicação, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

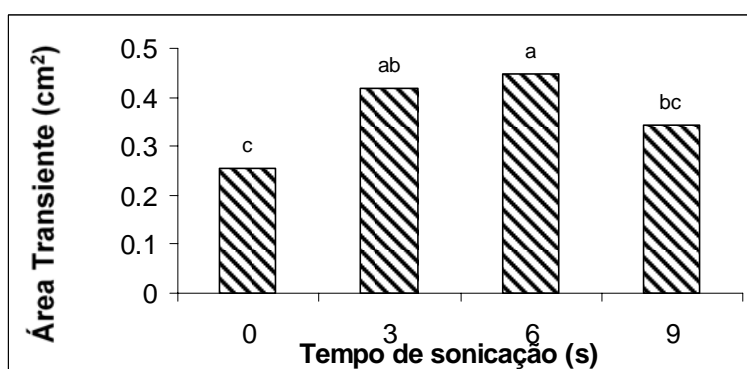


Figura 2 - Valores médios das áreas de expressão transitente em relação ao tempo de sonicação nos explantes cotiledonares. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

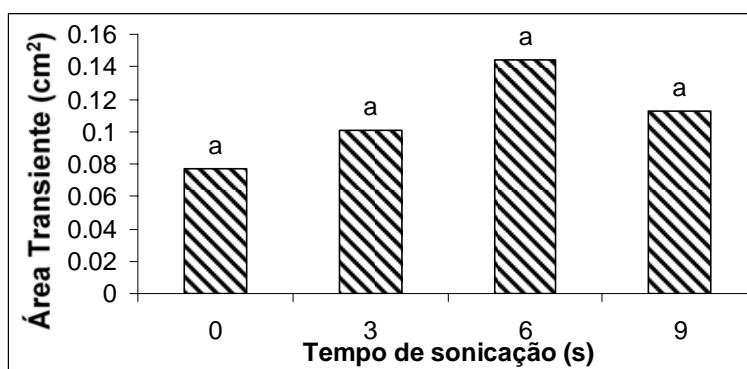


Figura 3 - Valores médios das áreas de expressão transitente em relação ao tempo de sonicação nos explantes de hipocótilos. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

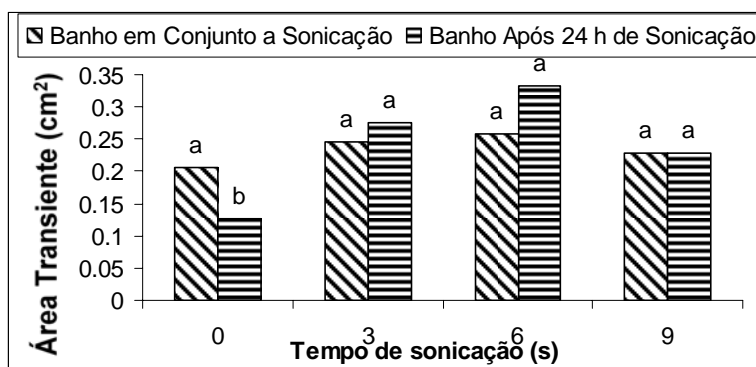


Figura 4 - Valores médios das áreas de expressão transiente em relação aos tipos de imersão com suspensão de *Agrobacterium tumefaciens*: imersão em associação a sonicação e imersão após 24 horas da sonicação. Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada tempo de sonicação, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

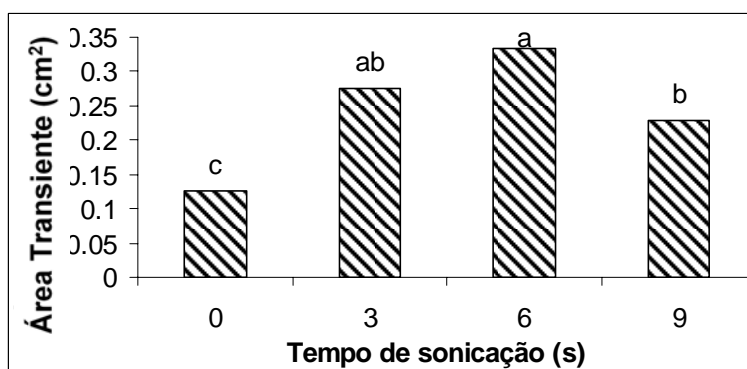


Figura 5 - Valores médios das áreas de expressão transiente em relação aos tempos de sonicação aplicados com a imersão em suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* após 24 horas da sonicação. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

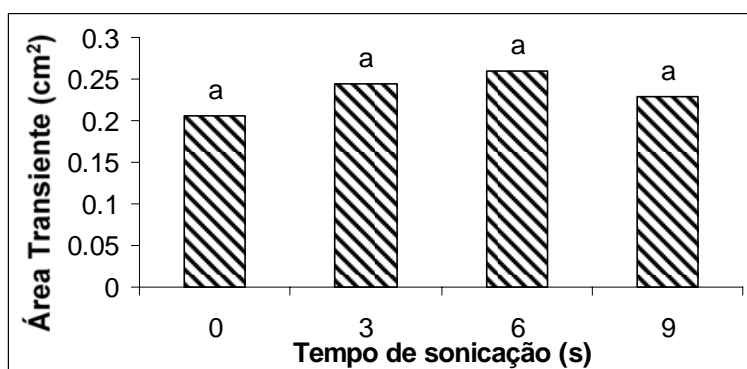


Figura 6 - Valores médios das áreas de expressão transiente em relação aos tempos de sonicação aplicados em conjunto com a suspensão de *Agrobacterium tumefaciens*. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

Santarém *et al.* (1998), utilizando cotilédones imaturos de soja, demonstraram a eficiência da técnica SAAT quanto à expressão transiente do gene *GUS*. Variações na densidade óptica da suspensão bacteriana, duração do tratamento de ultra-som e tempo

de co-cultivo foram alguns dos parâmetros testados para maximizar a expressão transitória do gene repórter. As melhores condições de tratamento e cultivo foram pulsos de 2 segundos de ultra-som em OD_{600nm} 0,1 e 3 dias de co-cultivo, em presença de acetosiringona, resultando em 22% da superfície dos explantes com expressão do gene *GUS*. A duração dos pulsos de ultra-som foi o parâmetro que mais afetou a expressão transitória e quanto mais longo o pulso, maior a área do cotilédone com setores azuis. Porém, quando tratamentos mais longos que 5 segundos foram aplicados, a competência para a formação de embriões somáticos, foi diminuída ou eliminada.

Os tecidos submetidos à SAAT foram analisados por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura por Trick & Finer (1998) e Santarém *et al.* (1998) e revelaram a formação de grande quantidade de microferimentos na superfície dos tecidos e microcanais que permitiram o acesso da bactéria a tecidos subepidérmicos. Esses autores afirmaram que o sistema tem o potencial de transformar o tecido meristemático encontrado sob várias camadas de células e observaram que SAAT remeteu maior eficiência de transformação transitória de diferentes tecidos vegetais, como folhas, cotilédones imaturos, embriões somáticos e zigóticos, ápices caulinares, entre outros.

Entende-se por expressão transiente de genes, aquela detectada precocemente (no intervalo de alguns dias) após a inoculação. Nesse ponto, a expressão de um gene repórter, existente no T-DNA pode ser de cópias integradas e/ou não-integradas; a atividade do gene *uidA* é facilmente avaliada, pela clivagem de um substrato cromogênico X-gluc (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-ácido glucurônico) produzindo cor azul, porém isto não garante a regeneração de plantas transgênicas.

No primeiro trabalho utilizando SAAT (Santarém *et al.*, 1998), os autores testaram diferentes espécies e explantes para a aplicação de pulsos de ultra-som (55 KHz). Testaram tecido foliar de caupi, embriões imaturos de *Zea mays*, sementes de *Triticum aestivum* e *Picea glauca* e variaram os pulsos de ultra-som entre 2 a 100 segundos, dependendo da espécie e do tecido testado. Em todos os tecidos testados, o tratamento com SAAT aumentou os níveis de expressão transitória do gene *GUS*. Na maioria dos tecidos inoculados com *Agrobacterium* e sem SAAT, a expressão transitória do gene *GUS* foi muito baixa ou nula. Aplicando-se pulsos de ultra-som, a expressão aumentou de 100 a 1400 vezes dependendo da espécie.

Desta forma comprova-se que explantes de hipocótilos e cotilédones da espécie *Solanum lycopersicum* respondem de maneira semelhante às espécies e tecidos já estudados, sendo também beneficiados pela técnica de SAAT apresentando maiores

áreas de setores azuis resultantes da expressão transiente de gene reporte *uidA* sugerindo sua utilização em processos de obtenção de plantas por meio da transformação estável.

2.3.2 Influência do ultra-som no processo regenerativo de explantes de tomateiro

As relações entre ramos/explantes viáveis, folíolos/explantes viáveis, massa fresca/explantes viáveis foram significativas e submetidas ao teste de médias Tukey a 10% de significância devido ao alto coeficiente de variação contido nos procedimentos de cultura de tecidos; coeficientes de variação em torno de 10 a 25% são aceitáveis devido as inúmeras variáveis acometidas nesta técnica. O teste apontou diferença entre as médias.

O fator independente explante se mostrou significativo para todas as variáveis, resultando em maior número de ramos/explantes viáveis e maior massa fresca/explantes viáveis em explantes cotiledonares. Para a variável folíolos/explantes viáveis, o explante que apresentou a maior média foi o hipocótilo (Figuras 7 e 8).

O fator independente sonicação mostrou-se significativo entre os tempos de exposição aos explantes em todas as variáveis analisadas. As maiores médias foram obtidas no tempo de sonicação de 3 segundos, evidenciando um acréscimo na quantidade de estrutura em relação aos explantes viáveis quando comparado ao controle sem a exposição ao ultra-som, mas forte decréscimo em relação a tempos superiores de exposição ao ultra-som (Figuras 9 e 10).

O fator independente tipo de vedação não resultou em diferenças significativas quando avaliado em ANOVA a 5% de probabilidade.

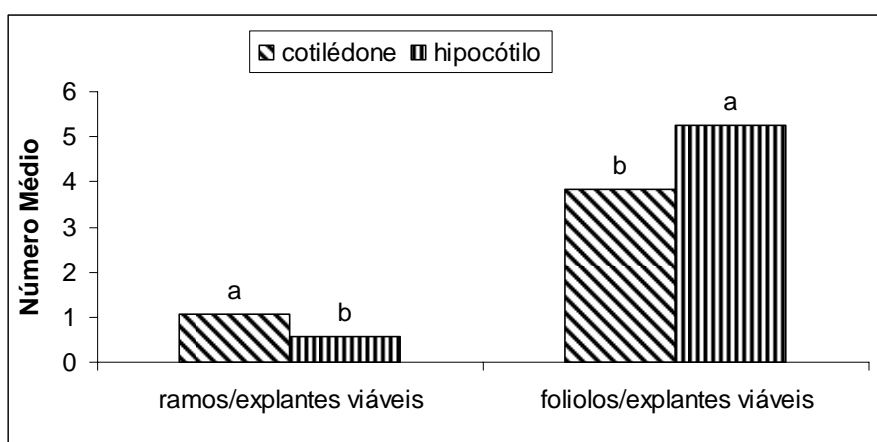


Figura 7 - Médias das razões ramos/explantes viáveis e folíolos/explantes viáveis em relação ao tipo de explante. Médias seguidas com letras iguais, para uma mesma variável, não diferem estatisticamente entre os explantes pelo teste Tukey a 10% de significância.

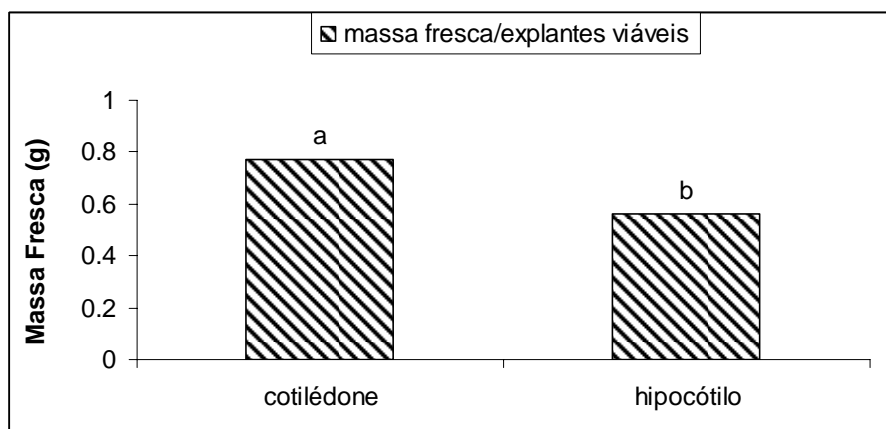


Figura 8 - Médias da razão massa fresca/explantes viáveis em relação ao tipo de explante. Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente entre os explantes pelo teste Tukey a 10% de significância.

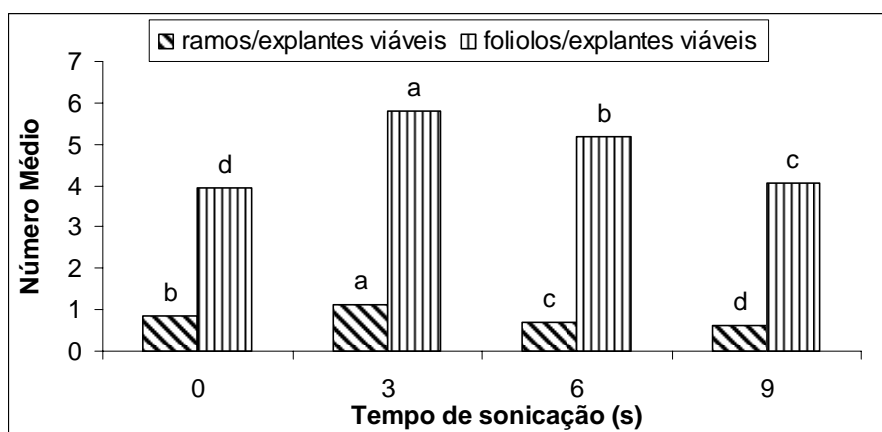


Figura 9 - Médias das razões ramos/explantes viáveis e folíolos/explantes viáveis em relação ao tempo de sonicação. Médias seguidas pelas mesmas letras, para cada variável, não diferem estatisticamente entre os tempos de sonicação pelo teste Tukey a 10% de significância.

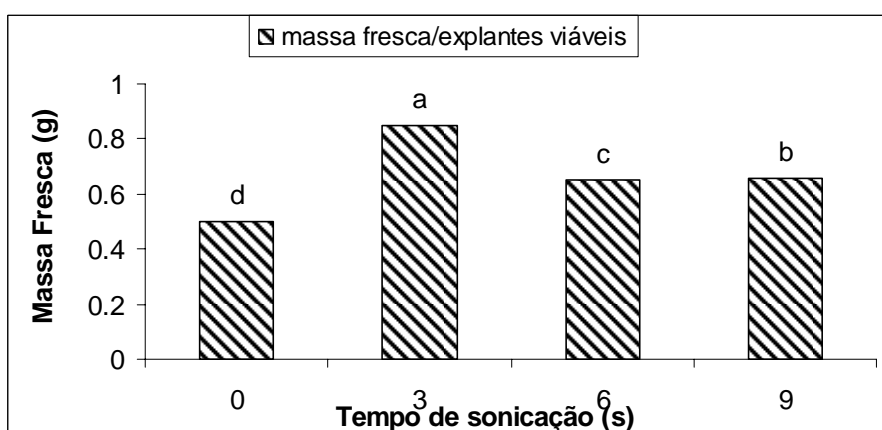


Figura 10 - Médias da razão massa fresca/explantes viáveis em relação ao tempo de sonicação. Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente entre os tempos de sonicação pelo teste Tukey a 10% de significância. (ver dados originais e separação de médias)

Um dos resultados imediatos da aplicação do ultra-som de alta intensidade é o rompimento celular. Entretanto, a exposição das células a baixas intensidades ou doses subletais tem revelado outros efeitos no metabolismo e estrutura celular (Joersbo & Brunstedt, 1992). A aplicação de ultra-som apresenta efeitos químicos, bioquímicos e fisiológicos. Nos sistemas biológicos, os efeitos químicos do ultra-som envolvem a formação de radicais livres, que são formados nos estágios finais de cavitação transiente (Makino *et al.*, 1982).

Aparentemente, em estudos com células de mamíferos, os radicais livres liberados não são os responsáveis pelo rompimento celular, já que o tratamento das células, com um sequestrador desses radicais, não aumentou a eficiência de plaqueamento das mesmas. No entanto, os radicais livres podem ter efeito na capacidade de divisão das células intactas remanescentes, por afetar a integridade das membranas (FU *et al.*, 1979).

Miller *et al.* (1974), utilizando o ultra-som, relataram a ocorrência de ruptura nas paredes celulares na zona de alongamento da raiz primária de *Vicia*. As observações histológicas demonstraram um grau mais alto de dano na face das células que estava orientada em direção ao transdutor.

A exposição das células ao ultra-som pode causar a degradação de macromoléculas, tais como, polissacarídeos, proteínas, DNA e, provavelmente, RNA. Miller *et al.* (1976) observaram a inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas em meristemas radiculares de *Pisum sativum*, logo após a exposição a 1 minuto de ultra-som (1MHz; 30 Watts/cm²). A síntese de RNA e de proteínas foi diminuída em 60 a 70% 1 hora após a exposição, mas foram recuperadas 4 horas mais tarde. De maneira similar, o índice mitótico foi reduzido depois do tratamento de ultra-som e recuperado após 6 a 7 horas.

O crescimento do tecido embriogênico foi inicialmente reduzido cerca de 30%, como resultado do uso de ultra-som. Porém, após duas semanas, a taxa de crescimento foi recuperada assemelhando-se a tecidos não tratados (Trick & Finer, 1998).

Santarém *et al.* (1998), relataram que quando tratamentos superiores a 5 segundos foram aplicados, a competência para a formação de embriões somáticos foi diminuída ou eliminada. Dessa forma, os pesquisadores buscaram minimizar os efeitos prejudiciais causados pelo ultra-som nos explantes. Para tal, adotaram a incubação dos explantes em meio com controle osmótico hipertônico constituído de 0,4 M de manitol, visando à desidratação parcial do tecido alvo. As observações realizadas, utilizando

microscopia eletrônica de varredura, indicaram que o tratamento de ultra-som na presença de manitol resultou em menor dano ao tecido cotiledonar, quando comparado àquele tratamento sem condicionamento osmótico. Entretanto, a expressão transiente de *GUS* também foi reduzida com essas condições. O meio com manitol poderia estar causando a plasmólise celular. Sendo assim, a perda da turgidez das células poderia estar diminuindo a cavitação e, conseqüentemente, o nível de ferimento causado pelo ultra-som, reduzindo a expressão transiente (Santarém *et al.*, 1998).

Vaz (2007) relatou que a utilização de 10 segundos de sonicação diminuiu a frequência da indução a embriogênese em embriões somáticos em estágio cotiledonar, bem como a diminuição da maturação de embriões somáticos em estágio globular de cultivares de mandioca. Observou também, diminuição significativa na frequência de maturação e regeneração quando relaciona explantes sonicados e explantes sonicados com imersão em *Agrobacterium*; indicando um maior grau de morte celular ou dano celular causado por esta interação. Porém, quando comparado o SAAT com transformação apenas com imersão, as médias não diferiram entre si nas variáveis regeneração e maturação, mas variaram em área de expressão transiente, resultando em acréscimo significativo quando a sonicação é empregada. Esse autor relata ainda a utilização de quatro cultivares de mandioqueira expostas a sonicação, onde encontra valores diferentes de área de expressão transiente entre as cultivares, apresentando cultivares com maior expressão transiente em relação a outra, porém as áreas de expressão transiente em relação ao tempo de sonicação apresentaram a mesma tendência, sendo correlato com a literatura existente, mostrando que a técnica de ultra-som é igualmente aplicada em diferentes explantes, espécies e cultivares.

2.3.3 Influência da sonicação sobre o crescimento de células de *Agrobacterium tumefaciens*

Após verificar relatos sobre ruptura de protoplastos, ferimentos em tecidos vegetais causados pelo ultra-som, questionou-se a sua influência na célula do *Agrobacterium*. Se o ultra-som é drástico o bastante para causar danos em células vegetais constituídas de parede celular e disposta em tecidos organizados, o efeito causado em células individualizadas poderá ser maior e prejudicial ao *Agrobacterium*.

Desta forma, os tempos de sonicação utilizados nos explantes vegetais foram aplicados em suspensão de células de *Agrobacterium* e sua influência avaliada através da viabilidade deste *Agrobacterium* a crescer após a exposição ao ultra-som.

Verificou-se que o efeito da sonicação influencia a viabilidade das células de *Agrobacterium tumefaciens* (Figuras 11 e 12) quanto maior a exposição das células ao ultra-som, menor a quantidade de células sobreviventes ao processo.

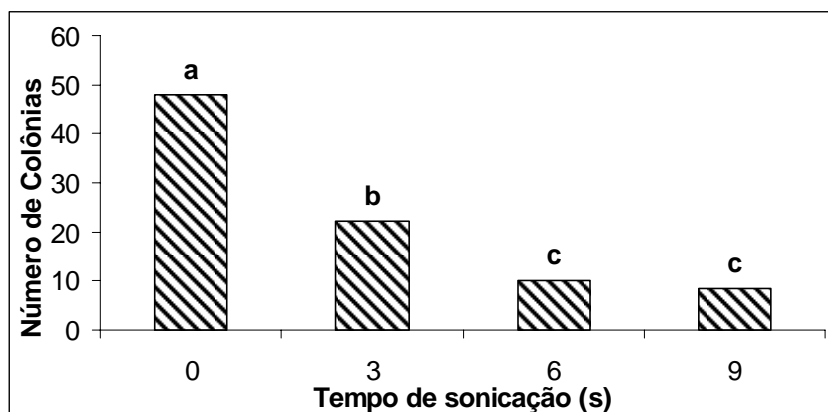


Figura 11 - Efeito da sonicação sobre o crescimento de colônias de *Agrobacterium tumefaciens*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

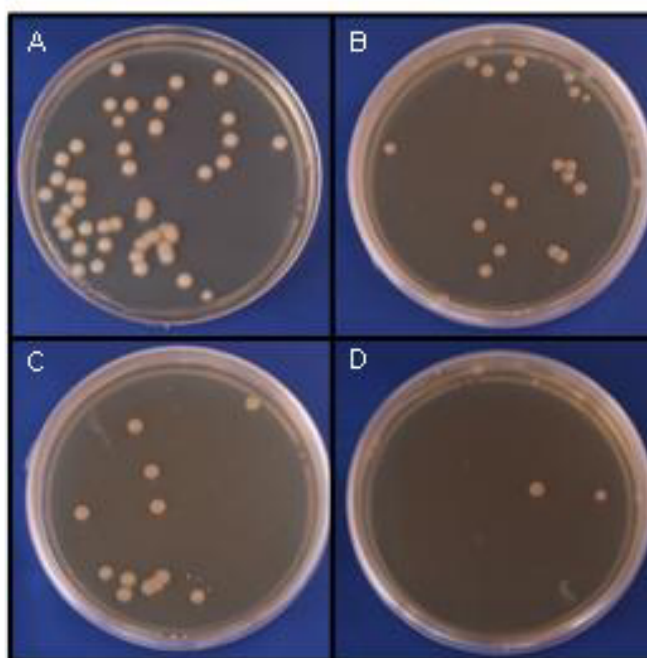


Figura 12 - Crescimento das colônias isoladas de *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 (OD_{600} 0,4 e diluído a 1×10^{-7}) plaqueadas em meio YEP, após serem submetidas aos tempos de sonicação (A) 0 segundos, (B) 3 segundos, (C) 6 segundos e (D) 9 segundos.

Efeitos deletérios do ultra-som haviam sido relatados por Santarém *et al.* (1998) que avaliaram os níveis de injúria causados pelo ultra-som medindo a densidade óptica da solução bacteriana em 400 nm, após os tratamentos dos tecidos cotiledonares com

ultra-som. Os tratamentos de longa duração (acima de 5 segundos) resultaram em densidades ópticas mais altas, sugerindo maior extravasamento dos conteúdos celulares.

O efeito da concentração de células de *Agrobacterium* na expressão transiente de *GUS* em tecidos de inflorescência de trigo foi determinado mostrando que o aumento na concentração bacteriana entre 1 e 1,5 proporcionou substancial acréscimo no número de explantes com expressão de *GUS* (Amoah *et al.*, 2001). No entanto, densidades de células acima de 1,5, resultaram em significativa redução do número de explantes bem como do número de setores por explante que mostraram expressão do gene.

2.4 CONCLUSÕES

Ao se utilizar a técnica de SAAT, os explantes cotiledonares apresentaram maior área de expressão transiente do gene *GUS*.

O tempo de exposição ao ultra-som que proporciona as maiores médias de expressão transiente do gene *GUS* é o tempo de 6 segundos. O processo é melhorado significativamente quando a imersão em suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* é realizada após 24 horas de exposição ao ultra-som.

A sonicação causa danos celulares em *Agrobacterium tumefaciens* ocasionando sua morte e essa taxa é aumentada com o acréscimo do tempo de exposição ao ultra-som.

O processo regenerativo é influenciado nas relações ramos/explantes viáveis, folíolos/explantes viáveis, massa fresca/explantes viáveis. O tempo de 3 segundos de exposição ao ultra-som possibilitou as maiores médias, indicando benefícios no procedimento. O aumento de exposição dos explantes ao ultra-som ocasionou a diminuição das médias das variáveis analisadas.

Relacionando todas as variáveis analisadas nos três testes realizados para avaliar a influência do ultra-som no processo de transformação, sugere-se o intervalo de tempo entre 3 e 6 segundos como o mais adequado para o processo de transformação.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amoah, B.K.; Wu, H.; Sparks, C.; Jones, H.D. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1135–1142, 2001.

Ananthkrishnan, G.; Xia, X.; Amutha, S.; Singer, S.; Muruganatham, M.; Yablonsky, S.; Fischer, E.; Gaba, V. Ultrasonic treatment stimulates multiple shoot regeneration and explant enlargement in recalcitrant squash cotyledon explants *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 26: 267–276, 2007.

Beranová, M.; Rakouský, S.; Vávrová, Z.; Skalický, T. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94: 253–259, 2008.

Chun JA, Jin UH, Lee JW, Yi YB, Hyung NI, Kang MH. (2003) Isolation and characterization of a *myo*-inositol 1-phosphate synthase cDNA from developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds: functional and differential expression, and salt-induced transcription during germination. *Planta*, 216: 874–880.

Cruz, C.D. *Programa Genes - Aplicativo computacional em genética e estatística*. 2006. Disponível em: www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm

Fechheimer, M.; Taylor, D.L. Introduction of exogenous molecules into the cytoplasm of *Dictyostelium discoideum amoebae* by controlled sonication. *Methods in Cell Biology*, 28:179-90, 1987.

Flores Solís, J.I.; Mlejnek, P.; Studená, K.; Procházka, S. Application of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation in *Chenopodium rubrum* L. *Plant Soil and Environment*, 49: 255–260, 2007.

Gaba, V.; Kathiravan, K.; Amutha, S.; Singer, S.; Xiaodi, X.; Ananthkrishnan, G. The use of ultrasound in plant tissue culture. In: Gupta, S.D.; Ybaraki, Y. (ed). *Plant tissue culture engineering*. Springer, Netherlands, p. 417–426, 2006.

Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A.; Bevan, M.W. GUS fusion:β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, 6:3001-3907, 1987.

Joersbo, M.; Brunstedt, J. Sonication – a new method for gene-transfer to plants. *Physiologia Plantarum*, 85: 230-234, 1992.

Liu, Z.; Park, B.-J.; Kanno, A.; Kameya, T. The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with *lea* gene. *Molecular Breeding*, 16: 189–197, 2005.

Lichtenthaler, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148:3349-3382, 1987.

- Miller, M. W.; Voorhees, S. M.; Carstens, E.L.; Eames, F. A. (1974) Histological study of effect of ultrasound on growth of *Vicia faba* roots. *Radiation Botany* 14: 201-208, 1974.
- McCormick, S.; Niedermeyer, J.; Fry, J.; Barnason, A.; Horsch, R.; Fraley, R. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 5:81-84, 1986.
- Nitsch, J.P. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology*, 19: 389-404, 1969.
- Oliveira, M.L.P.; Febres, V.J.; Costa, M.G.C.; Moore, G.A.; Otoni, W.C. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports*, 28: 387-395, 2009.
- Otoni, W.C.; Picoli, E.A.T.; Costa, M.G.C.; Nogueira, F.T.S.; Zerbini, F.M. (2003) Transgenic tomato. In: Singh, R.P.; Jaiwal, P. J. (Eds.) *Plant genetic engineering: Improvement of vegetables*, v.5. Houston:Sci Tech Publishing LLC, p.40-131.
- Pathak, M.R.; Hamzah, R.Y. An effective method of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpeas. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93: 65–71, 2008.
- Picoli, E.A.T. Morfogênese *in vitro* e transformação genética de berinjela (*Solanum melongena* L. cv. Embú) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 2000. 141p. Dissertação (Mestrado Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa.
- Santarém, E.R.; Trick, H.N.; Essing, J.S.; Finer, J.J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Reports*, 17: 752-759, 1998.
- Tang, W.; Sederoff, R.; Whetten, R. Regeneration of transgenic loblolly pine (*Pinus taeda* L.) from zygotic embryos transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *Planta*, 213: 981–989, 2001.
- Trick, H.N.; Finer, J.J. SAAT: Sonication-Assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Research*, 6:29-336, 1997.
- Zaragozá, C.; Muñoz-Bertomeu, J.; Arrilaga, I. Regeneration of herbicide-tolerant black locust transgenic plants by SAAT. *Plant Cell Reports*, 22: 832–838, 2004.

CAPÍTULO 3

Silenciamento gênico mediado por RNAi da sintase do *mio*-inositol-fosfato em tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill.) e berinjela (*Solanum melongena* L.) utilizando o gene *GmMIPS1*

3.1 INTRODUÇÃO

O silenciamento de RNA foi observado pela primeira vez em plantas transgênicas por dois grupos independentes de pesquisadores (Napoli *et al.*, 1990; Van Der Krol *et al.*, 1990). Estes pesquisadores tinham como objetivo criar petúnias transgênicas, cujas flores apresentassem uma coloração mais intensa. A estratégia escolhida consistia em superexpressar o gene que codifica a chalcone sintase (*Chs*), uma enzima chave na biossíntese de antocianinas. Para isso foi introduzida uma cópia extra do gene *Chs* sob controle do promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Entretanto, ao contrário do esperado, as diferentes linhagens transgênicas obtidas possuíam padrões distintos de variação floral, incluindo linhagens que apresentavam flores sem pigmentos. A análise molecular das linhagens transgênicas comprovou que a introdução da cópia extra havia efetivamente bloqueado a biossíntese de antocianinas, inibindo, simultaneamente, a expressão do gene endógeno pré-existente e da cópia introduzida. A inibição da pigmentação das flores foi diretamente correlacionada com uma redução específica no acúmulo de mRNA do gene *Chs*. O fenômeno foi denominado co-supressão, pois a introdução de um transgene levou ao silenciamento simultâneo do próprio transgene e do gene endógeno homólogo (Napoli *et al.*, 1990; Van Der Krol *et al.*, 1990). Fenômeno semelhante foi relatado no fungo *Neurospora crassa*, no qual foi denominado *quelling* (Cogoni *et al.*, 1996; Romano & Macino, 1992), e em animais (*Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*), nos quais foi denominado RNAi (RNA de interferência) (Fire *et al.*, 1998).

RNA de interferência é um mecanismo que controla a expressão de genes. Neste mecanismo, minúsculas moléculas de dupla fita de RNA chamadas “RNA de interferência pequenos (siRNA)” degradam mRNA celular que tem sucessão semelhante. Como resultado, embora um gene fosse expresso o mRNA não formaria proteínas. As moléculas de siRNA que iniciam o processo de RNAi realmente são minúsculas (21 nucleotídeos) e podem ativar a degradação de moléculas de mRNA que podem ser mais do que 100 vezes maior que eles. E se estas moléculas de mRNA codificam proteínas com importantes funções celulares, tal degradação pode resultar em consequências devastadoras para a célula (Utpal Nath & Saumitra Das, 2007)

Estudos genéticos demonstraram a existência de três vias de silenciamento de RNA (Xie *et al.*, 2004). Estudos com proteínas supressoras de silenciamento codificadas por vírus demonstraram que estas vias podem se sobrepor em alguns pontos (Dunoyer *et al.*, 2002). A primeira via é a de silenciamento citoplasmático via siRNAs,

que está envolvida na degradação de RNA viral interferindo, ou mesmo bloqueando, o ciclo de infecção. O dsRNA ('double-stranded RNA') pode originar-se da transcrição de um gene endógeno, de um transgene ou de um intermediário da replicação de vírus com genoma de RNA. Em vírus com genoma de DNA, dsRNA pode ser formado por meio do anelamento de transcritos sobrepostos complementares (Baulcombe, 2004).

A segunda via é a de silenciamento de mRNAs endógenos via miRNAs (micro RNAs). Os miRNAs regulam a expressão gênica negativamente por meio do pareamento de bases específicos a mRNAs alvo, resultando na clivagem do mRNA ou na repressão de sua tradução (Baulcombe, 2004). A terceira via é nuclear e está associada à metilação de DNA e à formação de heterocromatina. Uma importante função para esta via é provavelmente proteger o indivíduo de desorganizações genômicas causadas por transposons (Baulcombe, 2004). As três vias do silenciamento de RNA requerem grupos de proteínas relacionadas em plantas, fungos, animais e protozoários, sugerindo a existência de um mecanismo ancestral comum a estes organismos e às três vias, embora com diferenças significativas (Zamore, 2002).

Estudos genéticos e bioquímicos demonstraram que o silenciamento de RNA é um processo gradual com pelo menos quatro etapas: iniciação, amplificação, sinalização sistêmica e manutenção.

Na etapa de iniciação, o dsRNA é processado em siRNAs com aproximadamente 21-24 nt. Esta clivagem requer ATP e é mediada por Dicer que possui um domínio de RNA helicase na região amino-terminal, um domínio central PAZ (Piwi, Argonaute e Zwilli) de ligação a RNA, dois domínios catalíticos, um ou dois domínios de ligação a dsRNA e um domínio de função desconhecida (Carmell & Hannon, 2004; Cerutti *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2003). O modelo para a clivagem de dsRNA mediada por Dicer propõe que a enzima atua como um dímero antiparalelo, formando dois centros catalíticos que geram os siRNAs de 22 nt (Blaszczyk *et al.*, 2001).

O siRNA de fita dupla derivado do processamento de dsRNA por Dicer se associa à proteína R2D2, que contém domínios de ligação a dsRNA sua função é discriminar qual das duas fitas do siRNA será incorporada ao RISC (Tomari *et al.*, 2004). A fita incorporada será aquela cujo terminal 5' se anela com menor energia específica ao terminal 3' da fita complementar. O RISC direciona a clivagem seqüência específica de mRNAs complementares (Hutvagner & Zamore, 2002).

O complexo RISC possui atividade catalítica que cliva especificamente o mRNA alvo sem afetar o siRNA guia (Liu *et al.*, 2004).

Uma característica marcante do silenciamento de RNA é seu caráter sistêmico. As primeiras suspeitas sobre a existência de um “fator difusível” vieram da existência do sinal sistêmico que foi claramente demonstrada em experimentos de enxertia entre plantas transgênicas silenciadas e não silenciadas (Palauqui *et al.*, 1997). Nesses ensaios foram utilizados três transgenes distintos: os genes endógenos *Nia* & *Nii*, que codificam respectivamente as enzimas nitrato redutase e nitrito redutase, e o gene exógeno *uidA*, que codifica a enzima β -glucuronidase (GUS). O silenciamento foi sempre transmitido de porta-enxertos silenciados para enxertos não silenciados que expressavam o mesmo transgene, mas não para enxertos expressando transgenes distintos.

Os mesmos resultados foram obtidos nos três sistemas, indicando que o sinal sistêmico não é uma característica específica de um gene em particular. Em todos os casos o silenciamento do enxerto foi específico, ou seja, as seqüências silenciadas foram as mesmas que encontravam-se silenciadas no porta-enxerto. Esta especificidade de seqüência sugere que o sinal sistêmico possui um ácido nucléico em sua composição. A transmissão do silenciamento também ocorreu quando porta-enxertos silenciados foram fisicamente separados do enxerto por um segmento de caule de 30 cm de planta não-transformada, indicando a propagação a longa distância do sinal.

O mecanismo pelo qual o silenciamento é propagado a partir da célula inicialmente silenciada ainda não é totalmente compreendido. Estudos em *C. elegans* identificaram um gene requerido para o transporte do sinal sistêmico entre tecidos, porém totalmente dispensável para iniciar ou manter o silenciamento. Este gene, denominado *Sid1* (*systemic RNA interference deficient*), codifica uma proteína transmembrana que se localiza na periferia celular. Em plantas, acredita-se que o sinal sistêmico seja capaz de se mover célula-a-célula via plasmodesmas (Lucas *et al.*, 2001; Mlotshwa *et al.*, 2002; Himber *et al.*, 2003) e a longa distância via floema (Klahre *et al.*, 2002; Mallory *et al.*, 2003). Entretanto, não se sabe de que forma (ativa ou passiva) o transporte ocorre. Uma hipótese atrativa é a de que os siRNAs fazem parte do sinal sistêmico, pois eles possuem comprimento longo o suficiente para garantir a especificidade, estão consistentemente associados ao silenciamento e são pequenos o suficiente para movimentar-se célula-a-célula via plasmodesmas. Entretanto, existem duas evidências contrárias à hipótese de que os siRNAs estejam associados ao sinal sistêmico. Estudos com HC-Pro, uma proteína viral supressora de silenciamento, demonstraram que em plantas onde o silenciamento foi suprimido por HC-Pro não ocorre acúmulo de siRNAs, entretanto a capacidade de produzir ou enviar o sinal sistêmico não é afetada (Mallory *et al.*, 2001). Além disso, em *C. elegans*, indivíduos

mutantes no gene *Rde-4*, essencial para que o silenciamento ocorra, produzem siRNAs de forma deficiente, porém o silenciamento sistêmico não é afetado (Parrish *et al.*, 2000).

Um estudo detalhado do extrato de floema de plantas de abóbora (*Cucurbita maxima*) demonstrou a presença de uma população de pequenos RNAs provavelmente envolvidos no processo de sinalização sistêmica, pois uma análise comparativa de seqüência identificou possíveis alvos destes pequenos RNAs. Experimentos realizados com plantas transgênicas silenciadas e infectadas por vírus confirmaram a presença de siRNAs derivados do transgene ou do vírus no extrato do floema. Uma análise bioquímica desse extrato levou à identificação de uma proteína que se liga seletivamente a pequenos RNAs de fita simples, denominada CmPSRP1 ('*C. maxima* Phloem Small RNA Binding Protein 1'), sugerindo que esta proteína é parte da maquinaria envolvida no silenciamento sistêmico (Yoo *et al.*, 2004).

Nunes *et al.* (2006) produziram linhagens de soja usando RNA de interferência (RNA_i), construído para silenciar o gene *mio-inositol-1 fosfato sintase*. Observaram a ausência de desenvolvimento de sementes nas linhagens em que apresentaram forte expressão do gene inserido, i.e, ausência de detecção do mRNA do gene *GmMIPS1*. Além disso, redução drástica (de até 94,5%) no conteúdo de fitato foi alcançada em linhagens transgênicas. Contudo, os autores relatam que não está claro se a construção de RNA_i afeta os outros códigos da família MIPS expressos em tecidos vegetativos, pois as plantas transgênicas geradas se apresentaram normais, enquanto as sementes da progênie herdando o RNA_i apresentam previamente aborto de embrião. Os resultados demonstraram correlação positiva entre a expressão do gene *GmMIPS1* e desenvolvimento de semente. Reforçando a hipótese de que o gene *MIPS* esteja envolvido no desenvolvimento das sementes, Hegeman *et al.* (2001), também trabalhando com inositol, obtiveram níveis detectáveis de proteína de *MIPS*, principalmente durante o desenvolvimento da semente, indicando um nível de expressão alto somente em fases anteriores à cotiledonar embrionária. Isso indica que a conversão de glicose-6-fosfato para *mio*-inositol-1-fosfato pode acontecer anteriormente ao desenvolvimento de semente. Esses dados demonstram que a alta redução de AF em sementes pode ser prejudicial à planta. Dessa forma, o presente trabalho objetivou verificar se a alta homologia entre os códigos da família MIPS possibilitam a utilização do gene isolado de soja *GmMIPS1* para o silenciamento do gene endógeno de outras espécies, e se o silenciamento da expressão da sintase do *mio*-inositol-fostado estaria de fato relacionado com o desenvolvimento de sementes em berinjela (*Solanum*

melongema L.) e tomateiro (*Solanum lycopersicum* Mill.). Para isso, foi necessário estabelecer a curva de seleção para o agente seletivo higromicina para tomateiro, realizar transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* contendo vetor de transformação com sequência que pode induzir o mecanismo de silenciamento do gene da *mio*-inositol-fosfato-sintase e avaliar a expressão gênica dos transformantes, suas características morfológicas e a eficiência e estabilidade genética do processo de regeneração mediante a técnica de citometria de fluxo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

A linhagem GV3101 foi descongelada da criopreservação de -80°C sob refrigeração. Em câmara de fluxo vertical realizou-se o preparo do material para eletroporação, adicionando em cubetas de eletroporação 40 µL da cepa GV3101 do *Agrobacterium* e 1µL do plasmídio (Figura 1). A eletroporação ocorreu com os parâmetros de descarga elétrica de 2.500 V e 200 Ohms de capacitância, durante aproximadamente 3 segundos.

Após a eletroporação adicionou-se 1 mL de meio Rhizo (Tepfer & Casse-Delbart, 1987) na cubeta de eletroporação e homogeneizou-se a suspensão bacteriana juntamente com o meio de cultivo, vertendo este mix em Eppendorf, incubado sob agitação orbital de 150 rpm, durante 2 horas e 28 °C.

Após este processo, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 30 minutos, resuspenso em 100 µL de meio Rhizo e plaqueado em meio seletivo contendo o antibiótico gentamicina e canamicina. Após plaqueadas, incubou-se as placas em BOD a 28 °C durante período de 6 dias.

3.2.1.1 Crescimento do *Agrobacterium tumefaciens* putativamente transformado

Em posse das placas contendo as colônias que cresceram sob seleção após a transformação por eletroporação, escolheu-se uma única colônia e a ela adicionou-se 5 mL do meio líquido YEP com antibióticos de seleção canamicina (50 mg.L⁻¹) e gentamicina (50 mg.L⁻¹) em um tubo Falcon estéril de capacidade de 15 mL.

Incubou-se as culturas a 28 °C sob rotação de 180 rpm, durante 12 horas. Após o tempo de incubação, quantificou-se o crescimento por técnica de turbidimetria em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm e a confirmação molecular da transformação foi realizada por PCR ('Polymerase Chain Reaction' – Reação de polimerase em cadeia) de colônia.

3.2.1.2 Confirmação dos transformantes de *Agrobacterium tumefaciens* por PCR de colônia

Foi realizada uma PCR baseado nas recomendações por Sambrook *et al.* (1989) em um termociclador (PTC-100, MJ Researcher, USA) utilizando-se 0,8 μL de cada iniciador de seqüência homóloga ao do promotor CaMV 35S, 2 μL de tampão 10 x, 0,4 μL de dNTPs (deoxinucleotídeos) [4 mM], 0,12 μL de enzima Taq polimerase 5 u. μL^{-1} , (Invitrogen[®]) e 1 μL da colônia de bactérias (10^5 cfu. μL^{-1}); 2 mM MgCl e água ultrapura em quantidade suficiente para um volume de reação final de 20 μL . A PCR foi programada em 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 130 segundos.

Os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% em cuba de eletroforese media BioRad[®] (100 V durante 25 min) contendo um gel de 12,8 cm de largura e 15 cm de comprimento, composto de 150 mL de solução TBE 5X (Tris-Borato-EDTA; 0,445 M Tris, 0,445 M ácido bórico e 0,01 M EDTA) diluído para 0,5X e 1,5 g de agarose ultrapura Merck[®] e 0,01mg.L⁻¹ de brometo de etíio.

O padrão eletroforético foi visualizado e fotodocumentado num transiluminador de luz ultravioleta.

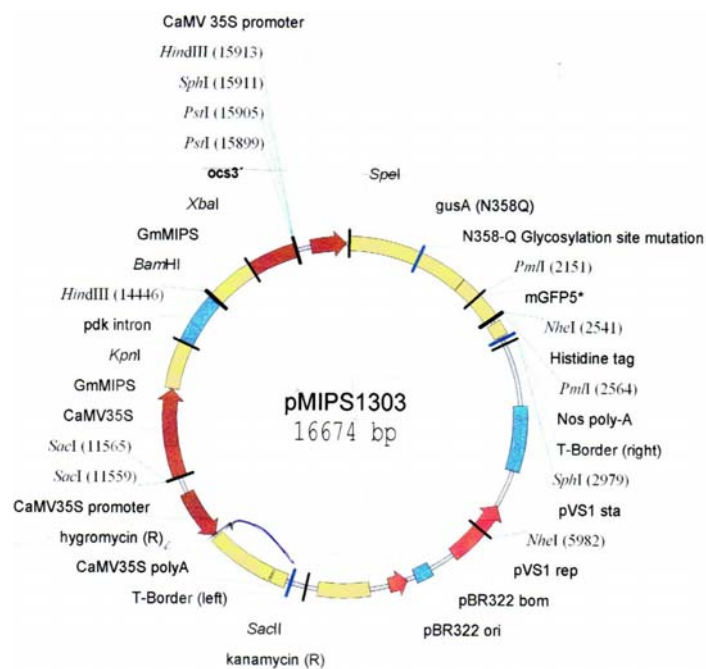


Figura 1 - Plasmídeo de transformação contendo o gene *GmMIPS1* em construção para silenciamento por siRNA.

3.2.1.3 Conservação da coleção de *Agrobacterium tumefaciens* transformada

3.2.1.3.1 Armazenamento a longo prazo a -80 °C

Realizou-se uma cultura líquida a partir de uma colônia individualizada crescida em meio sólido contendo os agentes de seleção para *A. tumefaciens* encontrados no plasmídeo Ti e no vetor binário pMIPS 1303, onde essa cultura foi crescida por incubação a 28°C e 180 rpm de agitação orbital, até atingir sua fase exponencial. Essa fase pode ser medida através da técnica de turbidimetria, quantificando-se a densidade óptica em comprimento de onda a 600 nm, sendo a fase exponencial encontrada entre os valores de 0,5 a 1,0.

Após o crescimento da suspensão bacteriana adicionou-se glicerol estéril a 40% em volume necessário a se obter uma concentração final de glicerol de 20%. Fracionou-se a suspensão contendo glicerol 20% em tubo de criopreservação, congelou-se em banho de nitrogênio líquido, transferindo-se imediatamente para ultrafreezer a -80 °C.

3.2.1.4 Reativação das linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* mantidas em estoque

Para preparar a suspensão celular de *A. tumefaciens*, inicialmente uma cultura em meio sólido seletivo foi estabelecida a partir dos estoques. Após o crescimento desta cultura, algumas colônias isoladas foram inoculadas em meio líquido seletivo e crescidas à temperatura de 28 °C, sob agitação orbital de 100 a 150 rpm. Utilizou-se na transformação genética suspensões que apresentam OD₆₀₀ entre 0,5 a 1,0.

3.2.2 Transformação genética de berinjela e tomateiro mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

3.2.2.1 Obtenção de explantes

Sementes de tomateiro ‘Moneymaker’ e berinjela ‘Long Purple’ foram desinfestadas conforme descrito no capítulo 1. Para as sementes de tomateiro seguiu-se

a metodologia proposta por Nogueira (2000), e para as de berinjela a metodologia proposta por Ribeiro (2006), sendo modificado o tempo de permanência em molho, utilizando 36 horas em detrimento das 72 horas do protocolo original.

Após a desinfestação as sementes foram germinadas *in vitro* em tubo de ensaio, vedados com tampa PP e fita Micropore para berinjela em meio semi-sólido de MS (Murashige & Skoog, 1962) força total e complexo vitamínico B5 (Gamborg *et al.*, 1968), contendo 3 sementes cada tubo. Para tomateiro foram utilizados frascos vedados com tampa PP contendo 2 membranas contendo meio semi-sólido MS meia força, 50 mg.L⁻¹ de *mio*-inositol e 2% (p/v) de sacarose, vitaminas de Nitsch e Nitsch (Nitsch & Nitsch, 1969); e solidificados pela adição de 0,8 g.L⁻¹ ágar Merck[®] contendo 15 sementes por frasco; ambos os meios foram ajustados seu pH para 5,8 e as culturas foram mantidas sob irradiância de 24 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas.

A germinação e desenvolvimento das plântulas ocorreram entre 10 a 15 dias em sala de crescimento e foram fontes de explantes segmentos de hipocótilos e cotilédones, os quais foram seccionados antes da expansão das primeiras folhas verdadeiras.

3.2.2.2 Curva de letalidade para seleção com o antibiótico higromicina para tomateiro

Para avaliar-se o efeito de higromicina (Sigma Chemical Company, EUA) na organogênese de explantes de tomateiro, utilizou-se inicialmente as concentrações 0,0; 15,0; 17,5; 20,0; e 22,5 mg L⁻¹ para explantes de hipocótilos e cotilédones das cultivares de tomateiro ‘Moneymaker’ e ‘NCEBR-2’. Após a avaliação dos resultados referentes à curva de letalidade mencionada acima, uma nova curva com concentrações de 0; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 foi realizada em explantes de hipocótilos e cotilédones e folhas da cultivar Santa Clara. A segunda curva de letalidade foi realizada com a cultivar Santa Clara devido a fácil disponibilidade dessas sementes no comércio local, o que não acontecia para ‘Moneymaker’ e ‘NCEBR-2’.

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado e cada tratamento constituiu-se de 4 unidades experimentais, sendo cada unidade constituída de uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro contendo 25 mL de meio de regeneração descrito por Frary *et al.* (1995), contendo 10 explantes cada.

O meio de regeneração foi composto por sais MS força total, vitaminas de Nitsch e Nitsch, 2,0 mg.L⁻¹ de zeatina, 0,1 mg.L⁻¹ de ácido indol acético, 20 g.L⁻¹

sacarose, pH $5,8 \pm 0,2$, 300 mg.L^{-1} do antibiótico Timentin e as concentrações referentes a cada tratamento com o antibiótico higromicina. Os antibióticos foram esterilizados por filtração, em filtro Millex-GS (Millipore, USA) com membranas de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro de poros, sendo adicionados ao meio de cultura após o processo de autoclavagem e durante o processo de resfriamento, com temperatura em torno de $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

As culturas foram mantidas sob irradiância de $24 \text{ }\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

A avaliação ocorreu após 80 dias do início do experimento, sendo durante este período os explantes recultivados em novo meio a cada 20 dias.

Uma vez que o tomateiro apresenta organogênese indireta, foram avaliadas a intensidade de calejamento em porcentagem; a frequência de regeneração de ramos em número de ramos regenerados; o teor de pigmentos (clorofilas *a*, *b* e carotenóides) em g.kg^{-1} de massa fresca (Lichtenthaler, 1987), além de quantificações das massas frescas.

3.2.2.3 Pré-cultivo, preparação dos explantes vegetais.

Em posse do material vegetal germinado os explantes de cotilédones e hipocótilos de tomateiro e berinjela foram seccionados em tamanhos entre 0,7 a 1 cm e dispostos em placa de Petri contendo meio de regeneração sem antibióticos.

Os explantes de tomateiro foram pré-cultivados em meio de regeneração composto de sais MS força total, vitaminas de Nitsch e Nitsch, $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de zeatina e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido indolil-3-acético (AIA), 2 g.L^{-1} sacarose, $100 \text{ }\mu\text{M}$ acetosiringona, pH $5,8 \pm 0,2$, durante 24 horas no escuro com a face adaxial dos cotilédones voltada para o meio de cultivo. Já, os de berinjela em meio MS força total, complexo vitamínico B5, 1968), $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, 20 g.L^{-1} sacarose, $100 \text{ }\mu\text{M}$ acetosiringona pH $5,8 \pm 0,2$ durante 24 horas no escuro com a face adaxial dos cotilédones voltada para o meio de cultivo.

3.2.2.4 Co-cultivo e inoculação de *Agrobacterium tumefaciens*

Essa etapa foi realizada mediante a imersão dos explantes, provenientes da fase de pré-cultivo, na suspensão bacteriana ($\text{OD}_{600} = 0,4$) durante um período de 5 minutos com agitações ocasionais. Após banho os explantes foram secos em papel filtro estéril e

transferidos novamente para o meio de pré-cultivo durante dois dias de co-cultivo onde foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, neste período, os explantes foram cultivados sobre papel filtro autoclavado e estéril disposto sobre o meio de pré-cultivo.

3.2.2.5 Regeneração e processo de seleção

Após a etapa de co-cultivo, os explantes foram transferidos para o meio de regeneração seletivo, com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

O meio seletivo de regeneração para explantes de tomateiro saís de MS força total, $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de *mio*-inositol, vitaminas de Nitsch e Nitsch, 20 g.L^{-1} de sacarose, $5,2 \text{ g.L}^{-1}$ de agargel, $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de zeatina, $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, suplementado com $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de higromicina e 300 mg.L^{-1} de Timentin, pH $5,8 \pm 0,2$

O meio seletivo de regeneração para explantes de berinjela conteve saís de MS força total, $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de *mio*-inositol, complexo vitamínico B5, $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, 20 g.L^{-1} sacarose, $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de higromicina (conforme Picoli, 2000) e 300 mg.L^{-1} de Timentin. Para cotilédones o meio seletivo de regeneração conteve saís de MS força total, $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de *mio*-inositol, complexo vitamínico B5, $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, 20 g.L^{-1} sacarose, 5 mg.L^{-1} de ácido α -naftaleno-acético (ANA), 10 mg.L^{-1} de higromicina e 300 mg.L^{-1} de Timentin.

3.2.2.6 Alongamento e enraizamento

Após a fase de indução de gemas, brotos diferenciados e alongados, com aproximadamente 1,5 cm de tamanho, foram individualizados e transferidos para frascos contendo 40 mL de meio seletivo de alongamento.

Para explantes de tomate o meio de alongamento constituiu de saís MS força total, $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de *mio*-inositol, vitaminas de Nitsch e Nitsch, 20 g.L^{-1} de sacarose, $6,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar Merck[®], $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de zeatina, $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, suplementado com $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de higromicina e 300 mg.L^{-1} de Timentin e pH $5,8 \pm 0,2$. Após o alongamento de ramos crescidos foram transferidos para meio de enraizamento contendo MS força total, $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de *mio*-inositol, vitaminas de de Nitsch e Nitsch, 20 g.L^{-1} de sacarose, $5,2 \text{ g.L}^{-1}$

de agargel, $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, 2 mg.L^{-1} de glicina, 300 mg.L^{-1} de Timentin, $\text{pH } 5,8 \pm 0,2$, sem o antibiótico seletivo.

Para os explantes de berinjela o meio de alongamento para ramos regenerados a partir de segmentos de hipocótilo consistiu de sais MS força total, $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de *mio*-inositol, complexo vitamínico B5, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, 20 g.L^{-1} de sacarose, $6,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar Merck[®], 300 mg.L^{-1} de Timentin, também na ausência do antibiótico seletivo

3.2.2.7 Aclimatização

Após o enraizamento e desenvolvimento da parte aérea, as plantas de berinjela e tomate tiveram suas raízes lavadas em água corrente, e foram transferidas para copos plásticos descartáveis contendo água deionizada e cobertos por sacos plásticos a fim de proporcionar umidade alta como encontrada no ambiente *in vitro*. Os copos plásticos contendo as plantas foram mantidos sob condições ambientes em sala de laboratório, enquanto orifícios foram feitos nos sacos plásticos a cada dois dias proporcionando trocas gasosas e diminuição da umidade relativa do ar. Ao final de duas semanas, foram retirados os sacos plásticos transferidas para vasos plásticos contendo substrato orgânico e mantidas em casa-de-vegetação sob telado sombrite 50% por mais uma semana, após este período foram dispostas em bancada de casa de vegetação a pleno sol.

3.2.3 Caracterização fenotípica das plantas putativamente transformadas pelo teste histoquímico de *GUS*

O teste histoquímico de *GUS* (Jeferson *et al.*, 1987) foi efetuado nas plantas regeneradas para a indicação de possíveis eventos de transformação genética. Secções transversais de folhas e pecíolos, frutos de tomateiro e ovário de berinjela foram cortadas em micrótomo de mesa e nestes adicionado a solução de ração X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo; Gold Biotechnology Inc., St. Louis, USA) e, posteriormente incubados à 37°C , em ausência de luz, de forma a permitir análise histológica da expressão do gene *gusA*.

3.2.4 Análise de PCR para verificação da integração do gene GmMIPS1

3.2.4.1. Extração de DNA para análise de PCR

Tecido foliar de três plantas resistentes à higromicina e *GUS* positivas e 2 plantas controle de tomateiro ‘Moneymaker’ e de berinjela ‘Long Purple’, foi utilizado para a extração de DNA de acordo com Edwards *et al.* (1991). Para tal, utilizou-se um disco foliar (circunferência do tubo de Eppendorf) o qual foi macerado com bastão de vidro com ponta esmerilhada no interior de um tubo de Eppendorf estéril e misturado com 750 µL de tampão de extração (CTAB a 55 mM, Tris a 100 mM, pH 8,0, EDTA a 10 mM, NaCl a 0,7 M) e 15 µL de mercaptoetanol. Após incubação a 65 °C por 30 min, foram acrescentados 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e a mistura foi centrifugada por 5 min a 14.000 rpm.

A fase aquosa superior foi transferida para outro microtubo, ao qual foram adicionados 500 µL de clorofórmio - álcool isoamílico (24:1), sendo a mistura centrifugada novamente. A fase líquida foi transferida para microtubo contendo 750 µL de isopropanol (-20 °C), incubada em gelo por 10 min e centrifugada. Em seguida, o precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% (-20 °C), seco e ressuspendido em 50 µL de tampão TE (Tris a 10 mM, pH 8,0, EDTA a 1 mM). O DNA total foi tratado com RNase e as amostras foram armazenadas a - 20 °C.

3.2.4.2 Reação de Polimerase em Cadeia

O DNA genômico foi submetido à amplificação pela técnica de PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos MIPSKpn (5'-CGGTACCAAATCTCAGCCTCATTTC-3') e MIPSEco (5'-GGAATTCACCACCGAACTTGTTTCAC-3) para amplificar dois fragmentos de 706 pb do gene GmMIPS1, GenBank AF293970. A reação foi realizada em termociclador (PTC-100, MJ Researcher, USA) em 25 µL de solução contendo 40 ng de DNA, 60 mM Tris-SO₄ (pH 8,9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 250 nM de cada dNTP; 200 nM de cada iniciador, 5 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen).

A amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação de 5 min a 95 °C seguido por 35 ciclos com 1 min de desnaturação a 95 °C, 1 min, para o anelamento dos

oligonucleotídeos a 50 °C e 1 min de polimerização a 72 °C com um ciclo alongamento final a 72 °C por 5 min e temperatura de manutenção de 4 °C, até retirada das amostras.

3.2.4.3 Revelação da amplificação por eletroforese

Os produtos da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% em cuba de eletroforese média (Bio Rad[®]) contendo um gel de 12,8 cm de largura e 15 cm de comprimento, composto de 150 mL de solução TBE 5X (Tris-Borate-EDTA; 0,445 M Tris, 0,445 M ácido bórico e 0,01 M EDTA) diluído para 0,5X e 1,5 g de agarose ultrapura Merck[®].

O tampão juntamente com a agarose foi aquecido até total cozimento em microondas e resfriado até aproximadamente 60 °C em água corrente e adicionado 5 µL de brometo de etídio.

O gel após polimerizado com pentes para marcação dos poços, foi submerso em tampão TBE 0,5X em cuba eletroforética e o marcador molecular, controles negativos, positivos e as amostras foram adicionadas nos poços. Juntamente com cada amostra e controles foram adicionados 2 µL de tampão de carregamento utilizado para visualmente acompanhar a distância máxima percorrida no gel pelas amostras, evitando a perda da amostra pela ultrapassagem do limite do gel.

3.2.5 Análise de expressão gênica

3.2.5.1 Isolamento e purificação do RNA

O RNA de foi extraído e purificado de sementes normais e abortadas de frutos imaturos dos eventos transgênicos e dos controles negativos de acordo com Sambrook et al. (1989), mediante o uso do kit Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen, Carlsbad, CA).

O RNA extraído foi tratado com DNase em reações contendo 2 µL do RNA extraído adicionados a 1 µL de tampão 10X; 1 µL de DNase e água ultrapura em quantidade suficiente para uma reação de 10 µL. Essas reações foram desenvolvidas em tubos de Eppendorf 0,5 mL RNase free em termociclador, onde permaneceram por 30

minutos em temperatura a 37 °C; 4 minutos a 4 °C onde nesse momento adicionou-se a cada reação 1 µL de ‘Stop Solution’, finalizando a reação com 10 minutos a 65 °C.

Após este tratamento os RNAs foram mantidos à temperatura de -70°C devido sua fácil desnaturação e degradação.

3.2.5.2 Reação de amplificação de DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total pela utilização da enzima transcriptase reversa de acordo com o protocolo do kit SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Para a obtenção do cDNA foi utilizado o volume total das amostras de RNA tratadas com DNase. Nestas amostras foram adicionados as reações descritas no Kit da Invitrogen da ‘Superscript III’, onde prescreve 2 reações aplicadas em tempos e temperaturas diferentes.

Estas reações foram adicionadas nas amostras por meio de mistura dos reagentes e estas foram mantidas em termociclador que desenvolveu às temperaturas requeridas para as reações. Na primeira reação 1 µL de oligo dT e 2,5 µL de dNTPs 4 mM foram adicionados à cada amostra e a reação ocorreu durante 5 minutos a 65 °C. Após este período uma pausa de 3 minutos a 4 °C foi realizada e aplicou-se a segunda reação composta de 4 µL do tampão 5X, 1 µL de DTT, 1 µL de RNase out e 1 µL de ‘Superscript III’ onde permaneceram em termociclador a 50 °C por 60 minutos; 70 °C a 15 minutos e mantidos a 4 °C até a retirada das amostras para a estocagem a -20°C

Após a reação de cDNA, este DNA sintetizado foi quantificado em aparelho Nano Drop ND-1000.3.3.1, usando a relação de absorvância 260/280 nm de aproximadamente 1,8 para determinar a concentração de material genético ($1A = 50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).

3.2.5.3 PCR Controle Interno Gene *EF1-α* e Gene *MIPS*

Reações de PCR foram conduzidas com amostras de RNA, RNA tratado com DNase e c-DNA. A reação de PCR foi constituída de 10 mM TRIS-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 30 mM de MgCl_2 , 4 mM de cada dNTP, 1,5 U de Taq polimerase (Invitrogen) e 0,2 µM do par de iniciadores do gene *EF1-α* GenBank acesso nº X56856; iniciadores

EF1F (5'-TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG-3') e EF1R (5'-AACAGTTTGACGCATGTCCCTAAC-3') a fim de verificar a pureza do cDNA e validar a PCR.

A validação da PCR para verificação da expressão gênica ocorre após encontrar o volume da alíquota do cDNA a ser utilizado nas reações com o controle interno fator de alongamento EF1- α ; até uma amplificação de mesma intensidade em todas as amostras.

A PCR do gene *MIPS* foi preparada contendo cDNA num volume estabelecido de acordo com o controle interno da reação. A reação de PCR foi constituída como descrita acima, exceto o par de iniciador específico para *MIPS* de tomateiro *LEMIPSF* (Seqüência 5'-CCAAGATGAAGTCAGTGCTGGT-3') *LEMIPSR* (Seqüência 5'-ATGTTGTTCTCTGGTGCCAGTC-3') baseados na seqüência do *MIPS* de *Lycopersicum esculentum* (agora *Solanum lycopersicum*), acesso do GenBank nº AI491091 fragmento de 580 pb.

As condições de tempo e temperatura da PCR foram de 95 °C (5 min), para desnaturar, e 20 ciclos de amplificação (95 °C por 1 min, 50 °C por 1 min, 72 °C por 1 min) com um ciclo final de 5 min a 72 °C.

3.2.6 Citometria de fluxo

Para a determinação do conteúdo de DNA (pg), foram selecionadas aleatoriamente 3 plantas controle de cada espécie, germinadas *in vitro* na ausência de reguladores de crescimento e aclimatizadas em casa de vegetação, e as plantas transgênicas de berinjela e tomateiro.

Aproximadamente 20-30 mg de folha fresca de cada planta e dos padrões internos de referência interna *Glycine max* Mill. (valor 2C = 2,5 pg de DNA; para o caso de tomateiro) e *Pisum sativum* L. (valor 2C = 9,09 pg de DNA; para o caso de berinjela) foram cortadas em pequenos pedaços com uma navalha de aço descartável na presença de 1 mL de tampão LB01 para liberação dos núcleos (Doležel & Bartos, 2005). O tecido previamente picado foi aspirado através de duas camadas de tela metálica com uma pipeta plástica, filtrado por uma membrana de nylon de 50 μ m e coletado em um tubo de poliestireno.

A suspensão de núcleos foi corada com 25 µL de solução de iodeto de propídio (1 mg.mL⁻¹), sendo adicionados 5 µL de RNase para cada amostra. As amostras foram armazenadas a 4°C no escuro e analisadas após 1-2 horas.

Para cada amostra, no mínimo 10.000 núcleos foram analisados usando um visor de escala logarítmica. As análises foram realizadas com utilização de um citômetro FacsCalibur (Becton Dickinson). Cada histograma citométrico foi salvo usando o software Cell Quest e analisado com o software WinMDI 2.8. O conteúdo de DNA nuclear (pg) das amostras foi estimado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Amostra (2C DNA)} = \frac{\text{Canal do pico G1 da amostra}}{\text{Canal do pico G1 do padrão}} \times \text{conteúdo de DNA do padrão}$$

A determinação foi repetida uma vez para validar os dados obtidos quando da primeira determinação da quantidade de DNA.

3.2.7 Avaliações morfológicas descritivas da parte aérea de plantas transformadas

Durante a fase de desenvolvimento em casa de vegetação, algumas características morfológicas foram acompanhadas entre os eventos transformados e seus respectivos controles.

3.2.8 Avaliações morfológicas descritivas dos frutos e sementes de plantas transformadas de tomateiro

Cinco frutos de cada evento transformado de *Solanum lycopersicum* e cinco frutos controle foram avaliados quanto à massa fresca dos frutos, o número de sementes normais e o número de sementes abortadas e a relação sementes normais/massa fresca e sementes abortadas/massa fresca. Os dados foram avaliados por análise de variância ANOVA a 5% probabilidade e separação de médias pelo teste Tukey a 5% de significância. O teste de separação de médias foi realizado pelo programa estatístico GENES (Cruz, 2006).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.2 Dosagem de seleção ao antibiótico higromicina em *Solanum lycopersicum*

Transformação genética na cultivar de tomateiro Moneymaker foi realizada com a dose do agente seletivo higromicina 20 mg.L⁻¹ e todos os explantes submetidos ao agente seletivo apresentaram senescência e necrose, evidenciando então dosagem excessiva do agente seletivo. Como medida de ajuste, realizou-se a curva de letalidade com dosagens de 0, 15, 17,5 20 e 22,5 mg.L⁻¹ de higromicina; o efeito de senescência e necrose também foi visualizado em todos os tratamentos contendo o agente de seleção durante o período de 40 dias (Figuras 6 e 7). Nova curva de letalidade utilizando as dosagem de 0, 5, 7,5 10 e 12,5 mg.L⁻¹ de higromicina em explantes de cotilédones, hipocótilos e folhas da cultivar Santa Clara, onde dentro desta faixa de concentração pode-se evidenciar nos diferentes tratamentos as respostas de regeneração, ausência de regeneração, senescencia e necrose (Figura 7).

No meio de regeneração sem a presença do agente seletivo higromicina houve calejamento em 100% dos explantes; quanto ao número de brotações houve média de 13 brotos nos explantes de cotilédones e 24 brotos nos explantes de hipocótilo e 5 em explantes de folhas. Na dosagem de 5 mg.L⁻¹ de higromicina quantificou-se a média de calejamento de 25% nos explantes de hipocótilos e cotilédones, não sendo evidenciado nos explantes de folhas; observou-se a presença de 3 unidades de brotos nos explantes de cotilédones e 5 unidades de brotos nos explantes de hipocótilos e não foram observados brotos nos explantes de folhas sob seleção de 5 mg.L⁻¹ de higromicina.

As diminuições dos conteúdos de clorofilas a e b em explantes de cotilédones e hipocótilos em relação as diferentes concentrações do agente seletivo (Figuras 2 e 3). Houve marcante decréscimo das massas frescas (Figura 4) e as médias de calejamento e formação de brotos nos diferentes explantes (Figura 5), em relação às dosagens do agente seletivo.

A higromicina é usada universalmente para a seleção e manutenção de células tanto eucariotas como procariontas que portam um gene de resistência, chamado *hph*. Desde o descobrimento deste gene, a higromicina tem sido utilizada como um antibiótico de seleção em experimentos de transformação genética (Elzen *et al.*, 1985).

O gene de *hpt* (ou *aph IV*) codifica para a enzima fosfotransferase da higromicina (HPT; EC 2.7.1.119), também conhecido como aminoglicosídeo 4' –

fosfotransferase (APH [4]). Esse gene foi isolado de *E. coli* e expressa para uma quinona que inativa o antibiótico catalisando-o através da fosforilação do grupamento hidroxila (Elzen *et al.*, 1985).

A dosagem ideal para a seleção de explantes de cotilédones e hipocótilos de tomateiro referente às dosagens testadas foi a de 7,5 mg.L⁻¹ de higromicina B, onde podemos visualizar uma manutenção da vitalidade do explante, mas porém, sem apresentar brotos regenerados. Em 5,0 mg.L⁻¹ de higromicina B houve diferenciação de brotos regenerantes tanto nos explantes de hipocótilos quanto nos de cotilédones, resultando, portanto, em dosagem ineficiente para ser utilizada em processos de transformação, pois permitiria a formação de escapes. Dosagens acima de 7,5 mg.L⁻¹ de higromicina B mostraram-se muito tóxicas, levando os explantes a apresentarem áreas necróticas, em especial na superfície do explante em contato com o meio contendo o agente seletivo. O que contraria a literatura existente (Xia, 2003; Cheng 2004; Shrish & Gupta, 2005; Gupta, 2006) sobre doses utilizadas de higromicina para trabalhos de transformação genética de tomateiro. Nesses, os autores relatam a obtenção de transformantes utilizando 20 mg.L⁻¹ de higromicina como agente seletivo.

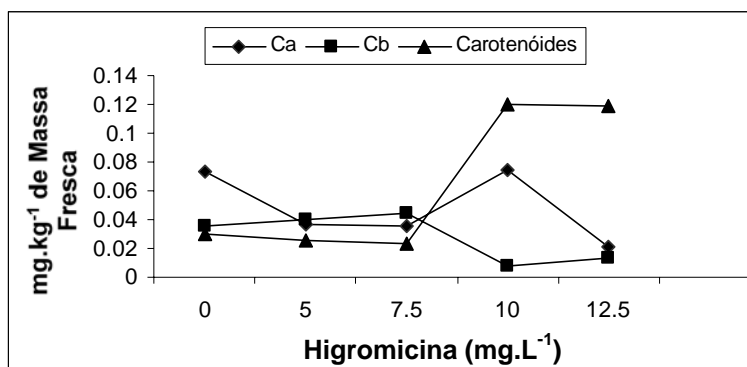


Figura 2 - Curva de letalidade de explantes de segmentos cotilédones de tomateiro relacionando os conteúdos de Ca (clorofila a) Cb (clorofila b) e carotenóides em mg.Kg⁻¹ de massa fresca em relação as dosagens de Higromicina B.

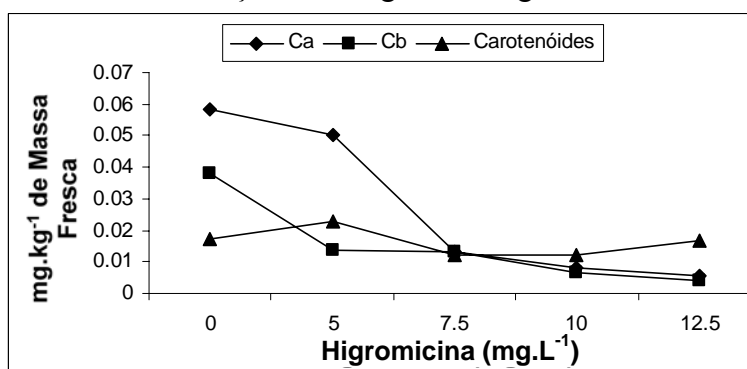


Figura 3 - Curva de letalidade de explantes de segmentos de hipocótilos de tomateiros, relacionando os conteúdos em mg.Kg⁻¹ de massa fresca de Ca (clorofila a) Cb (clorofila b) e carotenóides em relação as dosagens de Higromicina B.

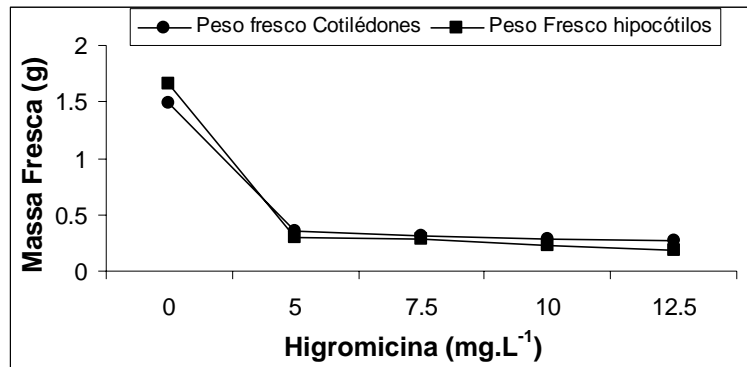


Figura 4 - Curva de letalidade de explantes de segmentos de hipocótilos e cotilédones de tomateiro, relacionando as médias de massa fresca pelas dosagens de Higromicina B.

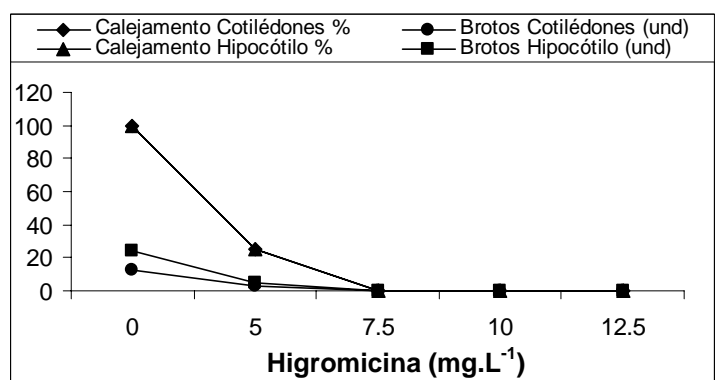


Figura 5 - Curva de letalidade de explantes de segmentos de hipocótilos e cotilédones de tomateiro relacionando as médias de calejamento em porcentagem e médias de brotos por unidade pelas dosagens de Higromicina B.

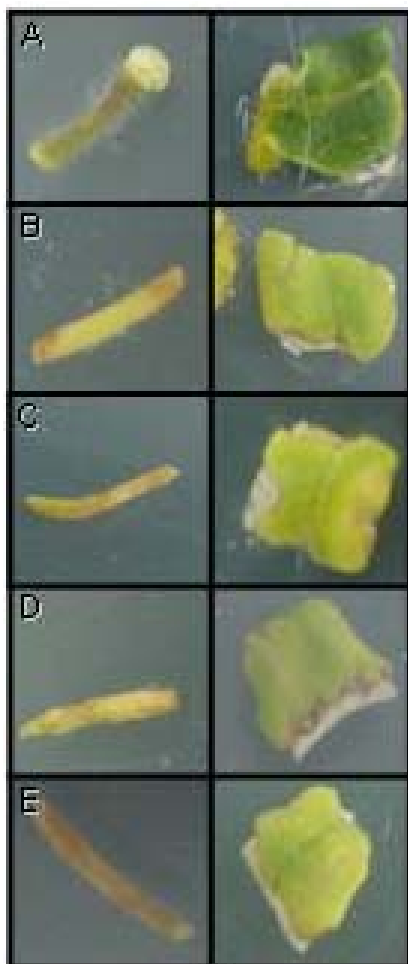


Figura 6 - Curva de letalidade, explantes de hipocótilos e cotilédones da cultivar MoneyMaker nas dosagens de (A) 0; (B) 15; (C) 17,5; (D) 20 e (E) 22,5 mg.L⁻¹ de higromicina.

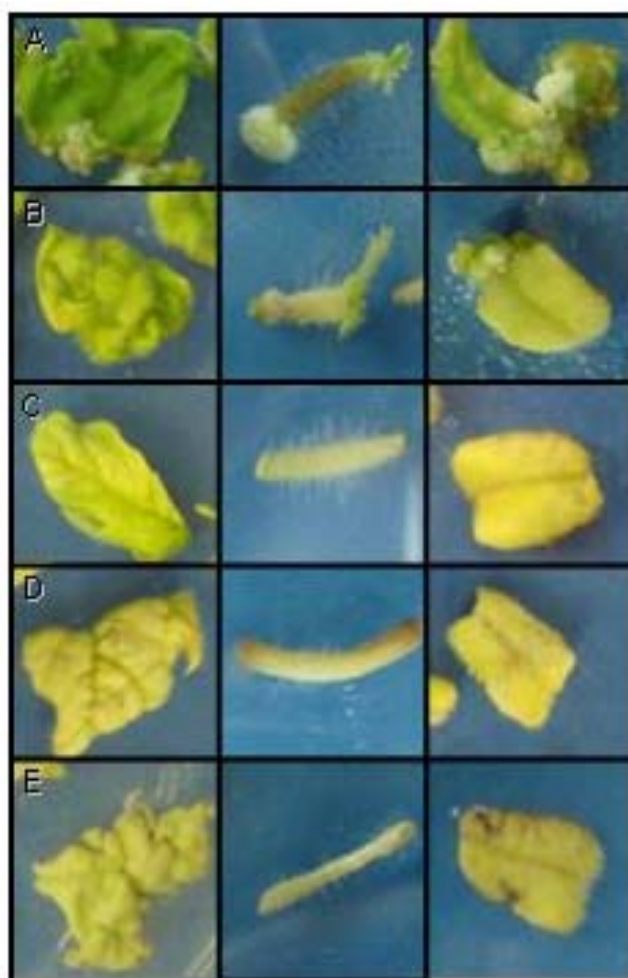


Figura 7 - Curva de letalidade, explantes de folhas hipocótilo e cotilédones da cultivar Santa Clara nas dosagens de (A) 0; (B) 5; (C) 7,5; (D) 10 e (E) 12,5 mg.L⁻¹ de higromicina.

3.3.4- Teste histoquímico *in situ* para detecção da expressão de *GUS*

Tecidos vegetais (folhas, pecíolos, frutos e ovários) de plantas transgênicas e plantas-controle forma utilizadas para a detecção histoquímica *in situ* do gene *GUS* (Figuras 8, 9 e 10).

A natureza transgênica das plantas aclimatizadas foi inicialmente confirmada por meio de análises histológicas da expressão do gene *CAMV35S/uidA* em seções transversais de frutos jovens de tomateiros (Figura 8 B e C) e ovários de berinjela (Figura 9B e C). Nos tecidos desses mesmos órgãos provenientes de plantas-controle não houve detecção histoquímica de expressão do gene (Figuras 8A e 9A).

Nas seções transversais de pecíolo, da nervura central e lâmina foliar a coloração foi mais marcante junto à região de feixes vasculares (Figura 10 B, D e F). Não houve expressão nas análises histoquímicas *in situ* para o gene GUS em tecidos provenientes das plantas-controle (Figura 10A, C e F).

Esses resultados estão em concordância com os obtidos por vários autores incluindo Jefferson (1987), Jefferson *et al.* (1987), Nogueira (2000), Otoni *et al.* (2003) e Oliveira *et al.* (2009).

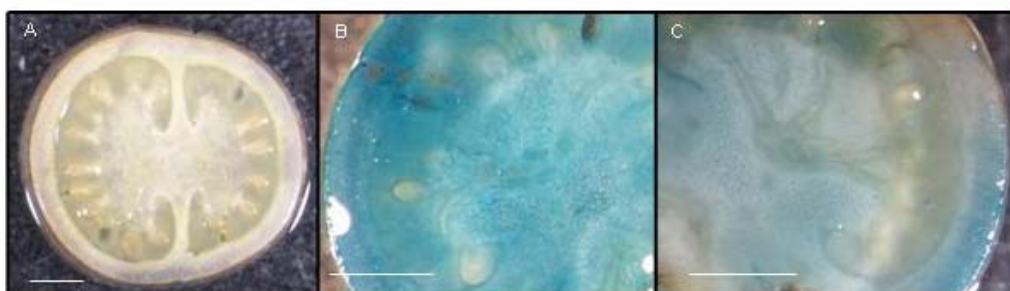


Figura 8 - Teste histoquímico de *GUS* em fruto imaturo de plantas controle e plantas possivelmente transformadas de tomateiro ‘Moneymaker’. **A** - Corte transversal de fruto imaturo proveniente de uma planta controle; **B** e **C** - Corte transversais de frutos imaturos *GUS* positivos de plantas possivelmente transformadas.



Figura 9 - Teste histoquímico do gene *GUS* em ovários de plantas controle e plantas possivelmente transformadas de berinjela ‘Long Purple’. **A** - Corte transversal de ovário jovem proveniente de uma planta controle. Notar a ausência de coloração azul típica da expressão de *GUS*; **B** e **C** - Cortes transversais de ovários jovens de plantas possivelmente transformadas, evidenciando a expressão típica de *GUS*.

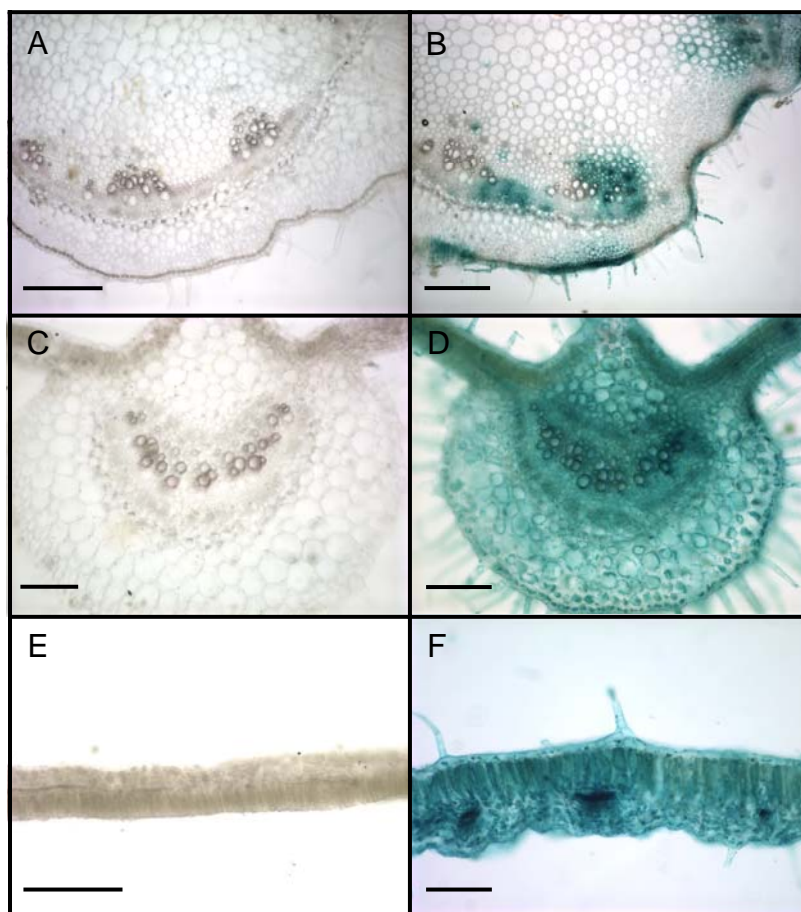


Figura 10 - Teste histoquímico para o gene *GUS* em tecido vegetal de plantas controle e plantas potencialmente transformadas de tomateiro ‘Moneymaker’. **A, C e E**: cortes transversais de pecíolo, nervura central e lâmina foliar, respectivamente, em plantas controle; **B, D e F**: cortes transversais de pecíolo, nervura central e lâmina foliar, respectivamente, em plantas transformadas apresentando a expressão típica do gene *GUS*. Barra = 200 μm .

3.3.5 Análise de PCR para verificação da integração do gene *GmMIPS1*

A revelação da eletroforese de gel de agarose foi realizada mediante sua exposição a uma fonte de radiação UV. A identificação do fragmento de DNA foi realizada quando comparado a marcador molecular de tamanho conhecido e controles positivos, resolvidos juntamente com as amostras durante a eletroforese.

As amostras putativamente transformadas foram confirmadas molecularmente por amplificação de PCR (Figura 11).

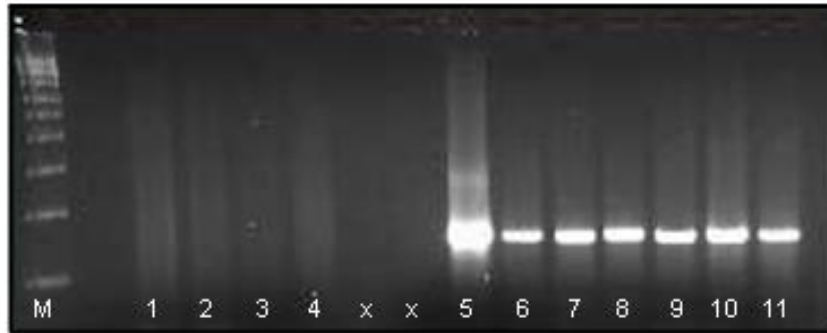


Figura 11 - Revelação de separação eletroforética dos produtos da reação de PCR com iniciadores para o gene GmMIPS1. M= marcador molecular, 1 e 2 controles negativos de tomate, 3 e 4 controles negativos de berinjela, x = ausência de amostras, 5 = controle positivo (vetor de transformação), 6 a 8 plantas de tomateiro transformadas, 9 a 11 plantas de berinjela transformadas.

3.3.6 Análise da expressão gênica

Após separação eletroforética em gel de agarose a 1% das reações de PCR com o iniciador EF-1 α , realizadas com as amostras de RNA e RNA tratado com DNase, verificou-se a pureza desse RNA, fonte para síntese de cDNA. Mediante a não revelação de bandas, confirmou-se a ausência de fragmentos contaminantes de DNA que pudessem fornecer falsos positivos na análise de expressão.

Com o cDNA sintetizado a partir das amostras de RNA tratadas com DNase, reações de PCR foram conduzidas a fim de verificar a expressão do gene EF1 α do fator de alongamento, representando o controle interno da reação.

Após verificada a amplificação e padronização do cDNA para o fator de alongamento pode-se realizar a análise de expressão para o gene *MIPS*. Para tal, iniciadores específicos para o gene *MIPS* de tomateiro foram utilizados para verificação da expressão gênica, onde comprovou-se o silenciamento gênico em amostras de sementes abortadas dos eventos transformados (Figura 12).

A expressão do gene *MIPS* em sementes de outras espécies foi relatada por Abreu *et al.* (2006) em sementes de *Passiflora edulis* em todos os estágios de desenvolvimento analisados. Observaram um nível máximo de expressão, com presença de um pico marcante, ao nono dia após a polinização. Chun *et al.* (2003) detectaram transcritos em sementes de soja em diferentes estágios de desenvolvimento. Hegeman *et al.* (2001) afirmam que nas sementes de soja a expressão do gene *MIPS* ocorre nos primeiros estágios de desenvolvimento, com sementes de até 10 mm de comprimento.

Desta forma, para o caso de tomateiro, pode-se afirmar que o silenciamento do gene *mio*-inositol-fostato-sintase está ligado ao aborto de sementes, uma vez que sementes abortadas do controle expressam o gene *MIPS*, sendo seu aborto ocasionado por outro fator. Sementes normais transformadas apresentam expressão do gene *MIPS*, comprovando que mesmo com o transgene de silenciamento, se este não ocorre, sementes normais são formadas, dando maior sustentabilidade à hipótese de aborto de sementes causado por silenciamento do gene *MIPS*.



Figura 12 - RT-PCR do gene *MIPS* em plantas transformadas e controles de tomateiro. Linhas 1, 2 e 3: sementes normais dos indivíduos controle; plantas transgênicas 1.1 e 1.3, respectivamente. Linhas 4, 5, 6 e 7: sementes abortadas dos indivíduos controle, plantas transgênicas 1.1, 1.2 e 1.3, respectivamente.

3.3.7 Citometria de fluxo.

As análises de citometria de fluxo apresentaram CV inferiores a 3%. As 3 plantas controle de tomateiros analisadas apresentaram 2,1, 2,11 e 2,1 pg de DNA (Tabela 1). Para berinjela as 3 plantas controle analisadas apresentaram 2,82, 2,82 e 2,78 (Tabela 2). Vale destacar que a planta TPT1 apresentou células com variação de ploidia, apresentando os picos respectivos aos valores 2C, 4C e 8C, caracterizando-se, portanto, como um mixoplóide (Figura 13 B). Já a planta TPT2 apresentou-se com quantidade de DNA (2,1 pg) compatível à apresentada pelos controles (Tabela 1, Figura 13 C). A planta TPT3 apresentou-se como tetraplóide, com quantidade de DNA equivalente a 4,05 pg (Tabela 1).

Por outro lado, para berinjela todos os 3 eventos transgênicos (BPT1, BPT2 e BPT3) analisados apresentaram quantidade de DNA compatível com aquelas apresentadas pelos controles (Tabela 2, Fig. 13 F, G, H).

Os dados de citometria obtidos para tomateiro (Tabela 1) reforçam a necessidade de reavaliação dos protocolos de regeneração e de transformação genética, uma vez que ao contrário do observado em berinjela (Tabela 2), houve regeneração de plantas

tetraplóides e mixoplóides. Cabe também ressaltar que a via morfogênica direta observada em berinjela e a indireta em tomateiro contribuem para a maior ou menor estabilidade genética de regenerantes primários, conforme observado no presente trabalho.

A instabilidade genética, comumente observada em plantas cultivadas e mantidas *in vitro* durante períodos prolongados, pode representar limitação do emprego das técnicas de cultivo *in vitro*, sobretudo na propagação massal de plantas e na transformação genética (Evans *et al.*, 1984; Larkin & Scowcroft, 1981; Karp, 1991).

Os resultados obtidos no presente trabalho concordam, portanto, com o descrito por Ellul *et al.* (2003), em que os autores relatam que o nível de ploidia de plantas transgênicas de 5 variedades de tomateiro, acessado também por citometria de fluxo, é genótipo- e protocolo-dependente. Diante dessa realidade, ressaltaram a importância e a necessidade de avaliação do nível de ploidia dos transformantes primários, previamente à qualquer intenção de incorporá-los em programas de melhoramento.

É crescente o uso de análises de citometria de fluxo na detecção de variações de níveis de ploidias em cultura de tecidos, células e órgãos vegetais. A variação genética mais comum observada na cultura de tecidos é o aumento no nível de ploidia e a citometria de fluxo mostra-se eficaz na identificação deste tipo de mudança, uma vez que revela apenas grandes diferenças no tamanho do genoma (acima de 2%), aliando ainda as vantagens de rapidez e eficiência para estudos do nível de ploidia em larga escala (Ellul *et al.* 2003; Loureiro *et al.*, 2005; Clarindo *et al.*, 2008; Orbovié *et al.*, 2008).

Orbovié *et al.* (2008) analisando a variabilidade genética de cinco populações de plantas de limão, obtidas de óvulos através de diferentes procedimentos de cultura *in vitro*, também identificaram apenas uma planta contendo células diplóides e tetraplóides.

Tabela 1 – Valores de DNA 2C em picogramas (pg) determinada por análise de citometria de plantas obtidas via seminífera (controles TPC1, TPC2 e TPC3) e plantas transgênicas (TPT1, TPT2 e TPT3) de tomateiro (*Solanum lycopersicon* ‘Moneymaker’).

	DNA (pg) Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
TPC1	2,1	0,023	2,34
TPC2	2,11	0,01	1,89
TPC3	2,1	0,015	2,12
TPT1	2,07	0,029	2,89
TPT2	2,14	0,02	2,76
TPT3	4,05	0,062	2,54

TPC: Tomate Planta Controle
TPT: Tomate Planta Transgênica

Tabela 2. Valores de DNA 2C em picogramas (pg) determinada por análise de citometria de plantas obtidas via seminífera (controles BPC1, BPC 2 e BPC 3) e plantas transgênicas (BPT1, BPT2 e BPT3) de berinjela (*Solanum melongena* ‘Long Purple’)

	DNA (pg) Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
BPC1	2,82	0,03	2,11
BPC2	2,82	0,055	2,23
BPC3	2,78	0,045	2,67
BPT1	2,85	0,021	1,79
BPT2	2,82	0,047	2,67
BPT3	2,74	0,03	2,36

BPC: Berinjela Planta Controle
BPT: Berinjela Planta Transgênica

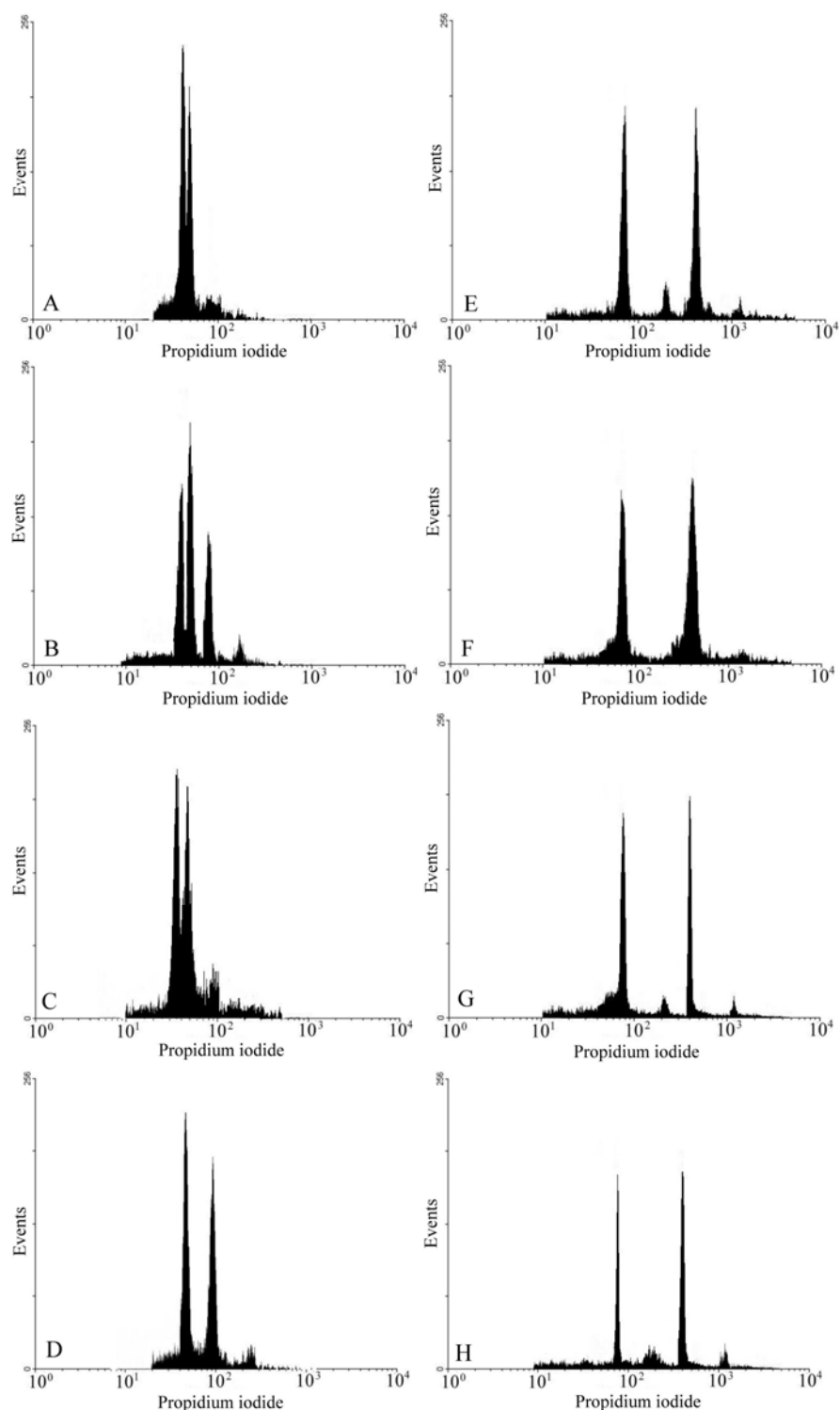


Figura 13 - Histogramas de citometria de fluxo referentes a tomateiro (A-D) e berinjela (E-H). O primeiro pico nos citogramas A-D corresponde ao padrão interno *Glycine max* (2,5 pg) e e de E-H à *Pisum sativum* (9,09 pg). **A, E** – Citogramas obtidos de plantas provenientes da germinação de sementes *in vitro*; **B**. Linhagem transgênica 1 (TPT1) de tomateiro Moneymaker, evidenciando picos com valores 2C, 4C e 8C, caracterizando a ocorrência de mixoploidia. **C**. Linhagem transgênica 2 (TPT2) de tomateiro Moneymaker, com conteúdo de DNA compatível com a planta controle; **D**. Linhagem transgênica 3 (TPT3) de tomateiro Moneymaker, com valor duplicado de DNA; **F-H** – Linhagens transgênicas de berinjela ‘Long Purple’, BPT1, BPT2 e BPT3, respectivamente, com conteúdo de DNA compatível com aquele apresentado pela planta controle (E).

3.3.8 Avaliações morfológicas descritivas da parte aérea de plantas transformadas

Durante a fase de desenvolvimento em casa de vegetação, algumas características morfológicas foram visualizadas como diferentes entre os eventos transformados e seus respectivos controles.

No que se refere à morfologia da parte aérea das plantas as plantas transformadas apresentam susceptibilidade a estresses bióticos e abióticos visivelmente superior aos seus controles, tendo desenvolvimento afetado principalmente em *S. melongena* (Figura 14).



Figura 14 - Plantas transformadas e controle de *Solanum melongena* 'Long Purple' em casa de vegetação. **A**, **B** e **C** - plantas transformadas BPT1, BPT2 e BPT3, respectivamente; **D** - planta controle - BPC1.

Nunes *et al.* (2005), trabalhando com silenciamento de *MIPS* em soja, não relataram diferenças morfológicas na parte aérea entre os eventos transformados e os controles, porém sugeriram a avaliação destas características em estudos complementares.

As plantas de berinjela foram subcultivadas e aclimatizadas em casa de vegetação contendo o mesmo padrão morfológico, porém o desenvolvimento das mesmas foi diferenciado, sendo severamente afetado nas plantas transformadas. Sabe-se que além de reservas de fosfato os *mio*-inositol fosfatos estão envolvidos em muitos processos e rotas celulares como transdução e regulação de sinais, regulação da síntese de ATP, transporte e estocagem de auxina, biossíntese de parede celular, endocitose e tráfico de vesículas, produção de moléculas relacionadas ao estresse, da remodelagem da cromatina, reparo e recombinação de DNA e expressão de genes e exportação de mRNAs (Safrany *et al.*, 1999; York *et al.*, 1999; Saiardi *et al.*, 2002). Dessa forma, o silenciamento gênico pode ter alterado rotas de sinalização específicas relacionadas à morfogênese compatível com os declínios de vigor apresentados pelas plantas transformadas. Porém estas afirmativas são meramente especulativas, sendo necessários estudos mais aprofundados, dentre esses, os ultraestruturais, a quantificação de conteúdos de *mio*-inositol em órgãos vegetativos e reprodutivos, a mensuração de conteúdos endógenos de auxinas, dentre outros, para confirmação dessa hipótese.

3.3.9 Avaliações morfológicas descritiva dos frutos e sementes de plantas transformadas

No que tange às características morfológicas dos frutos e sementes a hipótese principal desta pesquisa foi confirmada, o silenciamento gênico de *mio*-inositol-fosfatossintase interfere na formação de sementes, sendo o número de sementes normais encontrado nos eventos transgênicos fortemente reduzido ou eliminado, permanecendo grande a quantidade de sementes abortadas.

Para comprovar estatisticamente esta diferença morfológica, procedeu-se à análise de variância a 5% de probabilidade sob os valores quantificados avaliados de cinco frutos de cada evento transformado de *Solanum lycopersicum* e cinco frutos controle.

Foram avaliados a massa fresca de frutos, o número de sementes normais e o número de sementes abortadas e a relação sementes normais/massa fresca e sementes

abortadas/massa fresca. Para estas variáveis encontrou-se variação significativa em número de sementes normais relação sementes normais/massa fresca e sementes abortadas/massa fresca. Comprovando que não houve interação ou maiores modificações quanto ao desenvolvimento do fruto pelo aborto das sementes, uma vez que a variável massa fresca não se mostrou significativa. O número de sementes abortadas também não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, porém a relação sementes abortadas/peso fresco apresentou diferenças.

O número de sementes normais (Figuras 15 e 20) foi significativamente diferente entre as médias das sementes dos controles e aquelas dos eventos transformados. Porém o número de sementes abortadas (Figuras 16 e 20) não diferiu estatisticamente entre os controles se os eventos transformados, pois os controles possuem naturalmente sementes abortadas, não sendo resposta do silenciamento de genes e sim associado à outra natureza durante a sua formação.

A relação sementes normais/massa fresca diferiu estatisticamente entre os controles e os eventos transformados, comprovando que a diminuição de sementes deve-se a fator outro que não o de desenvolvimento do fruto (Figuras 17 e 18). Todavia, a relação sementes abortadas/massa fresca, apresentou diferença entre as médias para o evento transgênico 1.3 por conter muitas sementes abortadas, sendo essa relação significativamente diferente das demais médias (Figura 19).

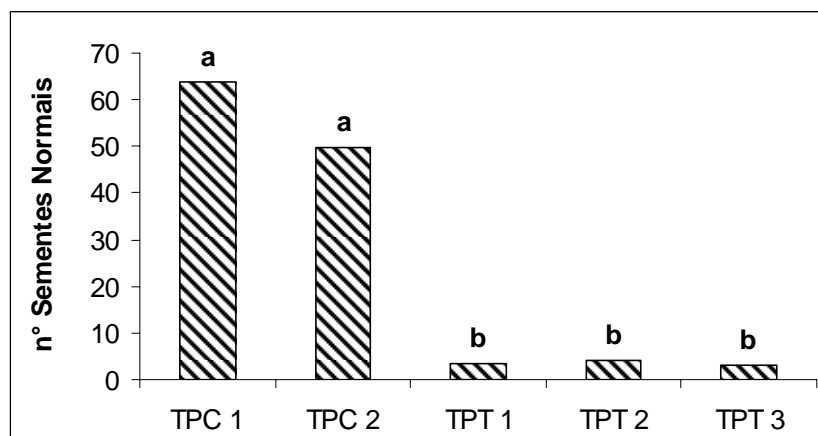


Figura 15 - Médias dos números de sementes normais em plantas controle (controle 1 e controle 2) e nas plantas transformadas (mm 1.1, mm 1.2 e mm 1.3) de tomateiro. Colunas com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

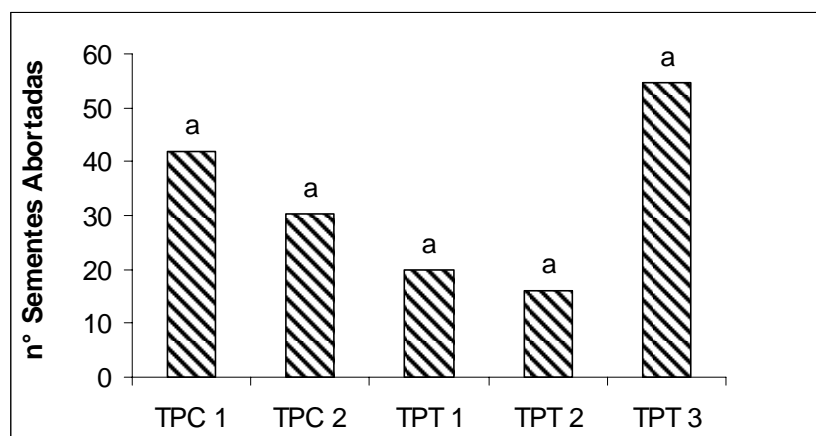


Figura 16 - Médias do número de sementes abortadas em plantas controle (controle 1 e controle 2) e nas plantas transformadas (mm 1.1, mm 1.2 e mm 1.3) de tomateiro. Colunas com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

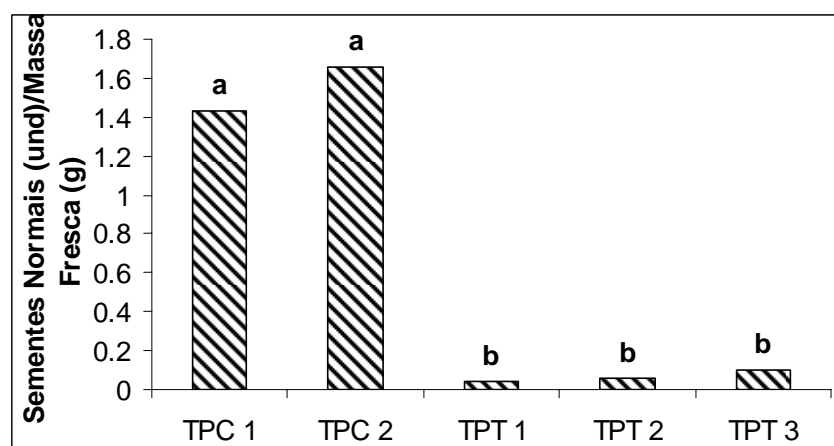


Figura 17 - Médias da relação sementes normais/massa fresca dos frutos de plantas controle (controle 1 e controle 2) e plantas transformadas (mm 1.1, mm 1.2 e mm 1.3) de tomateiro. Colunas com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.



Figura 18 - Frutos de tomateiro do evento transformado e do evento controle. À esquerda, fruto de evento transformado seccionado longitudinalmente, com ausência de sementes normais; à direita, fruto controle seccionado longitudinalmente mostrando sementes normais.

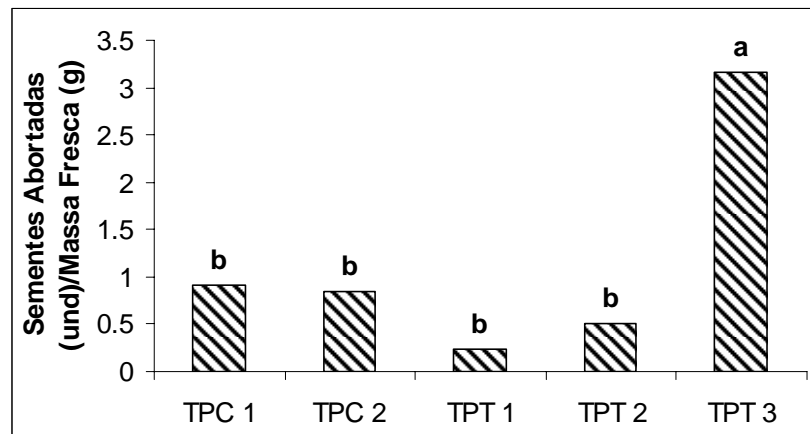


Figura 19: Média da relação sementes abortadas/massa fresca dos frutos de plantas controle (controle 1 e controle 2) e plantas transformadas (mm 1.1, mm 1.2 e mm 1.3) de tomateiro. Colunas com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

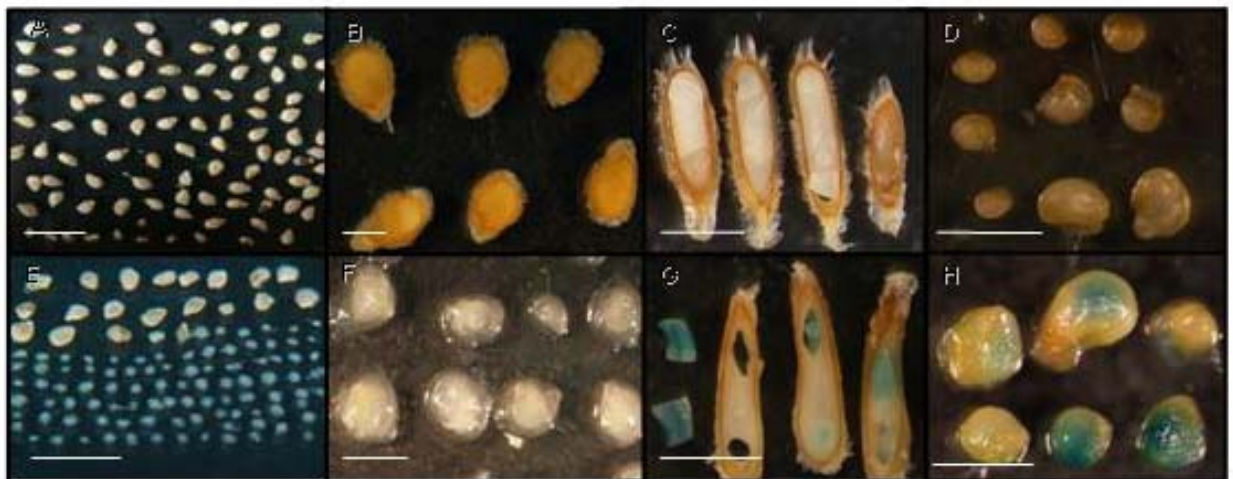


Figura 20 - Sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* 'MoneyMaker'). **A** - sementes de um fruto proveniente de uma planta não transformada; **B**- característica das sementes predominantes no fruto de uma planta não transformada; **C** - teste histoquímico de *GUS* em sementes de plantas não transformadas seccionadas longitudinalmente; **D**-teste histoquímico de *GUS* em sementes abortadas de plantas não transformadas; **E** - sementes de fruto de planta transformada; **F** - característica das sementes predominantes no fruto de uma planta transformada; **G** - teste histoquímico de *GUS* em cortes longitudinais de sementes de plantas transformadas; **H** - teste histoquímico de *GUS* em sementes abortadas de plantas transformadas. Barra = 0,2 cm.

3.4 CONCLUSÕES

A dosagem adequada para a seleção de explantes de cotilédones e hipocótilos de tomateiro foi a de $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de higromicina B. Dosagens acima dessa mostraram-se muito tóxicas, levando à clorose e necrose dos explantes.

À exceção aos carotenóides, todas as variáveis analisadas apresentaram decréscimos nas suas quantificações com o aumento das doses de higromicina B.

O teste histoquímico de *GUS* forneceu uma confirmação inicial da natureza transgênica dos regenerantes primários e a análise de PCR confirmou a integração do transgene nas plantas transformadas.

O processo de regeneração *in vitro* adotado no protocolo de transformação para tomateiro, ao contrário de berinjela, induziu a ocorrência de poliploidia em alguns regenerantes.

A análise de expressão gênica confirmou o mecanismo de silenciamento causado pela integração do transgene, e a análise morfológica dos frutos confirma a hipótese do relacionamento da *mio*-inositol-fosfato-sintase com o desenvolvimento de sementes.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baulcombe, D. RNA silencing in plants. *Nature*, 431:356-63, 2004.

Blaszczyk, J.; Tropea, J. E.; Bubunencko, M.; Routzahn, K. M.; Waugh, D. S.; Court, D. L.; Ji, X. Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure*, 9:1225-36, 2001.

Carmell, M. A.; Hannon, G. J. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11:214-218, 2004.

Cerutti, L.; Mian, N.; Bateman, A. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: The novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends in Biochemical Sciences*, 25:481-482, 2000.

Clarindo, W.R.; Carvalho, C.R.; Araújo, F.S.; Abreu, I.S.; Otoni, W.C. Recovering polyploid papaya in vitro regenerants as screened by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92:207-214, 2008.

Cogoni, C.; Irelan, J.; Schumacher, M.; Schmidhauser, T.; Selker, E.; Macino, G. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO Journal*, 15:3153-63, 1996.

Das, S.; Nath, U. Silence of the Genes. 2006 Nobel Prize in Physiology or Medicine. General article. *Resonance*, April., 2007.

Doležel, J.; Bartos, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95: 99-110, 2005.

Dunoyer, P.; Pfeffer, S.; Fritsch, C.; Hemmer, O.; Vonnet, O.; Richards, K.E. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by *Peanut clump virus*. *Plant Journal*, 29 : 555-67, 2002.

Edwards, K.; Johnstone, C.; Thompson, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19:1349, 1991.

Ellu, P.; Garcia-Sogo, B.; Pineda, B.; Ríos, G.; Roig, L.A.; Moreno, V. The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theoretical and Applied Genetics*, 10:231-238, 2003.

Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Medina-Filho, H.P. Somaclonal and gametoclonal variation. *American Journal of Botany*, 77:759-774, 1984.

Fári, M.; Nagy, I.; Csányi, M.; Mitykó, J.; Andrásfalvy, A. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and plant regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis from cotyledon leaves in eggplant (*Solanum melongena* L. cv. 'Kecskeméti'). *Plant Cell Reports*, 15: 82-86, 1995.

Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391 : 806-11; 1998.

Gamborg, O.L.; Phillips, G.C. *Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods*. Germany: Springer. 359p, 1995.

Gamborg, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50:151-158, 1968.

Hegeman, C.E.; Good, LL.; Grabau, E.A. Expression of D-myo-inositol-3-phosphate syntase in soybean. Implications for phytic acid biosynthesis. *Plant Physiology*, 125:1941-1948, 2001.

Hutvagner, G.; Zamore, P. D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 297: 2056-2060, 2002.

Jefferson, R.A. Assaying chimeric genes in plant: the *GUS* gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reports*, 5:387-405, 1987.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. *GUS* fusion:β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, 6:3001-3907, 1987.

Karp, A. On the current understanding of somaclonal variation. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* , 7: 1–58, 1991.

Klahre, U.; Crete, P.; Leuenberger, S.A.; Iglesias, V.A.; Meins, F. High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic postranscriptional gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99: 11981-11986, 2002.

Larkin, P.J.; Scowcroft, W. R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60:443-455, 1981.

Liu, J.; Carmell, M.A.; Rivas, F.V.; Marsden, C.G.; Thomson, J.M.; Song, J.J.; Hammond, S.M.; Jouhua-Tour, L.; Hannon, G. J. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305:1437-41, 2004.

Lichtenthaler, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148:3349-3382, 1987.

Loureiro, J.; Pinto, G.; Lopes, T.; Doležel, J.; Santos, C. Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. *Planta*, 221:815–822, 2005.

McCormick; Niedermeyer, J.; Fry, J.; Barnason, A.; Horsch, R.; Fraley, R. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 5:81-84, 1986.

Mallory, A.C.; Ely, L.; Smith, T.H.; Marathe, R.; Anandalakshmi, R.; Fagard, M.; Vaucheret, H.; Pruss, G.; Bowman, L.; Vance, V.B. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell*, 13 : 571-83, 2001.

Napoli, C.; Lemieux, C.; Jorgensen, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petúnia results in reversible co-suppression of homologous genes in *trans*. *Plant Cell*, 2:279-89, 1990.

Nogueira, F.T.S. Transformação genética e regeneração *in vitro* de tomateiros (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ‘Santa Clara’ e mutante ‘Firme’; inserção do cDNA ACCs na orientação anti-senso. Dissertação. Mestrado em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Viçosa, 121 p. 2000.

Nunes, A.; Vianna, G.; Cuneo, F.; Amaya-Farfán, J.; de Capdeville, G.; Rech, E.; Aragão, F. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPSI*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta*, 224: 125-132, 2006.

Oliveira, M.L.P.; Febres, V.J.; Costa, M.G.C.; Moore, G.A.; Otoni, W.C. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports*, 28: 387-395, 2009.

Otoni, W.C.; Picoli, E.A.T.; Costa, M.G.C.; Nogueira, F.T.S.; Zerbini, F.M. (2003) Transgenic tomato. In: Singh, R.P.; Jaiwal, P. J. (Eds.) *Plant genetic engineering: Improvement of vegetables*, v.5. Houston:Sci Tech Publishing LLC, .p.40-131.

Orbovié, V.; Calovié, M.; Viloría, Z.; Nielsen, B.; Gmitter Jr., F.G.; Castle, W.S.; Grosser, J. W. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica*, 161:329–335, 2008.

Palauqui, J. C.; Elmayan, J. M.; Vaucheret, H. Systemic acquired silencing: Transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO Journal*, 16:4738-45, 1997.

Parrish, S.; Fleenor, J.; Xu, S.; Mello, C.; Fire, A. Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Molecular Cell*, 6:1077-87, 2000.

Romano, N.; Macino, G. Quelling: Transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, 6:3343-53, 1992

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2 ed., 1989.
- Tepfer, M. and CassE-Delbart, F. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. *Microbiological Science*, 4:24-28, 1987.
- Tomari, Y.; Matranga, C.; Haley, B.; Martinez, N.; Zamore, P. D. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, 306: 2004.
- Van Der Krol, A.R.; Mur, L.A.; Beld, M.; Mol, J. N. M.; Stuitje, A. R. Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of genes copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2:291-299, 1990.
- Xie, Z.; Johansen, L. K.; Gustafson, A. M.; Kasschau, K. D.; Lellis, A. D.; Zilberman, D.; Jacobsen, S. E.; Carrington, J. C. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PloS Biology* 2: E 104, 2004.
- Yan K. S.; Yan, S.; Farooq, A.; Han, A.; Zeng, L.; Zhou. M. M. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*, 426:468-474, 2003.
- Yoo, B. C.; Kragler, F.; Varkonyi-Gasic, E.; Haywood, V.; Archer-Evans, S.; Lee, Y. M.; Lough, T. J.; Lucas, W.J. A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell*, 16:1979-2000, 2004.
- York, J.D.; Odom, A.R.; Murphy, R.; Ives, E.B.; Went, S.R. A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science*, 285:96-100, 1999.
- Zamore, P. D. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*, 296:1265-1269, 2002.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Nos estudos realizados no presente trabalho pode-se concluir que:

- Houve maior eficácia nos processos de desinfestação de sementes de berinjela, quando a sanitização foi realizada, utilizando imersão em água deionizada em conjunto com as desinfestações com hipoclorito de sódio a 1,25% (v/v) a cada doze horas durante um período de 36 horas. Em sementes de tomateiro, a desinfestação descrita por Nogueira (2000) foi a mais adequada quando comparada com a proposta por Di *et al.* (1996).

- As trocas gasosas durante a germinação foram avaliadas e estas favoreceram o desenvolvimento das plântulas e geraram explantes em maior número e de melhor qualidade para utilização na transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*.

- Visando ao aumento da eficiência de transformação, a técnica de SAAT foi avaliada em explantes de hypocótilos e cotilédones de tomate, resultando em maior área de expressão transiente do gene *GUS* quando os explantes foram expostos durante 6 segundos, e a imersão com *Agrobacterium tumefaciens* foi empregada após 24 horas de exposição ao ultra-som. Comprovou-se, também, que a sonicação causa danos celulares em *A. tumefaciens* ocasionando sua morte e essa taxa é aumentada com o acréscimo do tempo de exposição ao ultra-som.

- As respostas de regeneração dos explantes foram testadas em relação à utilização da técnica de SAAT, onde o processo regenerativo foi influenciado positivamente na formação de ramos, folíolos e ganho de massa fresca quando o SAAT foi empregado durante três segundos.

- No propósito de obter-se transformantes estáveis foi necessário a avaliação da curva de morte para o agente seletivo higromicina, e nossas observações levaram a conclusão que a dosagem de 7,5 mg.L⁻¹ de higromicina B é a ideal para a seleção de explantes de cotilédones, hypocótilos e folhas de tomateiro. As plantas regeneradas após processo de transformação e seleção com 7,5 mg.L⁻¹ de higromicina B apresentaram integração estável do transgene, que foi confirmado inicialmente através de teste histoquímico de *GUS* e comprovado por PCR.

- As plantas transgênicas estáveis foram avaliadas perante a análise de expressão gênica, verificando o mecanismo de silenciamento causado pela integração do transgene. Estes resultados confirmam nossa hipótese de que a alta homologia entre a sequência gênica encontrada na família *MIPS* possibilita a utilização do gene isolado de soja *GmMIPS1* para o silenciamento do gene *MIPS* endógeno de outras espécies, em

nosso trabalho confirmado para tomate. O silenciamento confirma, também, nossa hipótese sobre o relacionamento da *mio*-inositol-fosfato-sintase com o desenvolvimento de sementes, causando diminuição em número e qualidade das sementes.