MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA-PPGBA

REGENERAÇÃO E INFECÇÃO POR *Agrobacterium tumefaciens* EM EXPLANTES DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.) cv. SR1

CAMILA MEDEIROS COUTINHO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Pedro Canísio Binsfeld, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre em Ciências (M.S.).

PELOTAS
Rio Grande do Sul-Brasil
Junho de 2005

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA-PPGBA

REGENERAÇÃO E INFECÇÃO POR *Agrobacterium tumefaciens* EM EXPLANTES DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.) cv. SR1

CAMILA MEDEIROS COUTINHO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Pedro Canísio Binsfeld, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre em Ciências (M.S.).

PELOTAS
Rio Grande do Sul-Brasil
Junho de 2005

Dados de catalogação na fonte:

Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB-10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C871r Coutinho, Camila Medeiros

Regeneração e infecção por *Agrobacterium tumefaciens* em explantes de Tabaco(*Nicotiana tabacum* L.) cv. SR1 / Camila Medeiros Coutinho; orientador Pedro Canisio Binsfeld. – Pelotas, 2005. – 66f. : il. color – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2005.

1.Biotecnologia. 2.Tabaco. 3.Nicotiana tabacum. 4.Proteínas recombinantes. I.Binsfeld, Pedro Canisio. II.Título.

CDD: 633.71

CAMILA MEDEIROS COUTINHO

REGENERAÇÃO E INFECÇÃO POR *Agrobacterium tumefaciens* EM EXPLANTES DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.) cv. SR1

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Pedro Canísio Binsfeld, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre em Ciências (M.S.).

APROVADA: 27 de junho de 2005.

BANCA EXAMINADORA:

Prof., Dr. José Antonio Peters

Profa., Dr^{a}. Luciana Bicca Dode

Profa., Dr^{a}. Vera Lúcia Bobrowski

Profa., Dr^{a}. Eugenia Jacira Bolacel Braga – Co-orientadora

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola do Centro de Biotecnologia, pela oportunidade de realizar o curso.

Aos meus pais Jussara e Diego, minha irmã Bianca e minha fonte de alegria Anakim, pelo apoio nos momentos de dificuldade e por estarem comigo também nos momentos de alegria.

Ao meu orientador, Pedro Canísio Binsfeld, pela oportunidade de novamente trabalhar na área vegetal e de me ajudar na conclusão desse trabalho.

A minha co-orientadora, Eugenia Jacira Bolacel Braga, por me ensinar e ajudar no início do meu trabalho.

A minha amiga Fabiana Seixas, por me incentivar a fazer o curso e me ajudar durante a realização de meus experimentos.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular, Sibele, Suselaine, Fabrício, Gustavo, Tessália, Valeska, André, Francine e Daiane, pela amizade e auxílio durante esse período de trabalho.

As amigas do laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas, Janaína, Andréa, Anna Lia, Marina, Natália e Caroline, pelo convívio, auxílio e amizade.

A minha amiga Rutilene Roll, pela agradável convivência e ajuda.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Agradeço.

ÍNDICE

SUMÁRIO ..... **viii**
SUMMARY ..... **ix**
1. INTRODUÇÃO **1**
2. REVISÃO DE LITERATURA **3**
2.1 - Cultura de tecidos 3
2.2 - Regeneração *in vitro* 4
2.3 - Transformação genética de plantas 6
2.3.1 - Transferência via *Agrobacterium tumefaciens* 6
2.4 - Seleção de tecidos transformados 8
2.5 - Caracterização de plantas transformadas 9
2.5.1 – Ensaio histoquímico 9
2.6 - Produção de proteínas heterólogas em plantas 10
3. MATERIAL E MÉTODOS **13**
3.1 - Material vegetal 13
3.2 – Meio de cultura 14
3.3 - Protocolo de regeneração *in vitro* para explantes de tabaco 14
3.4 – Teste *in vitro* de tolerância ao agente de seleção - canamicina 15
3.5 – Infecção de tabaco via *Agrobacterium tumefaciens* 15
3.5.1 - Cepa da bactéria e vetor binário 15
3.5.2 - Crescimento da bactéria 17
3.6 - Fatores que influenciam a eficiência de infecção de tabaco cv. SR1 17
3.6.1 - Tipo de explante 17
3.6.2 - Pré-condicionamento do explante 17
3.6.3 - Meio de co-cultivo líquido para infecção por *Agrobacterium tumefaciens* 18
3.6.4 - Tempo de imersão dos entrenós em meio de co-cultivo líquido 19
3.6.5 - Tempo de co-cultivo em meio semi-sólido 19
3.6.6 - Lavagem dos explantes 19
3.6.7 - Meio de regeneração com e sem agente de seleção 20
3.7- Avaliação da expressão do gene *uidA* (GUS) através de ensaio histoquímico 20
3.7.1 – Expressão transiente 20
3.7.2 – Expressão avaliada 14 dias após a infecção por *Agrobacterium tumefaciens* 21
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO **22**
4.1 – Regeneração *in vitro* 22
4.2 – Teste *in vitro* de tolerância ao agente de seleção - canamicina 27
4.3 - Fatores que influenciam a eficiência de infecção de tabaco cv. SR1 29
4.3.1 - Tipo de explante 29
4.3.2 - Pré-condicionamento do explante 31
4.3.3 - Meio de co-cultivo líquido para infecção por *Agrobacterium tumefaciens* 33
4.3.4 - Tempo de imersão em *Agrobacterium tumefaciens* 35
4.3.5 - Tempo de co-cultivo semi-sólido 37

4.3.6 - Lavagem dos explantes 39
4.3.7 - Presença da canamicina no meio de regeneração 41
4.4- Regeneração de plantas de tabaco após infecção com *Agrobacterium tumefaciens* 42
4.5 - Resumo do protocolo otimizado 44
5. CONCLUSÕES 45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 46

SUMÁRIO

COUTINHO, CAMILA M., Universidade Federal de Pelotas, junho de 2005. **Regeneração e infecção por *Agrobacterium tumefaciens* em explantes de tabaco *(Nicotiana tabacum* L.) cv. SR1**. Professor Orientador: Pedro Canísio Binsfeld. Co-orientadora: Eugenia Jacira Bolacel Braga.

A moderna biotecnologia molecular permite a produção de várias proteínas recombinantes em diferentes sistemas de expressão. A produção de vacinas em plantas pode representar uma alternativa atrativa, segura e barata ao sistema convencional. Antígenos, como HBsAg de organismos infecciosos como o vírus da hepatite-B podem ser produzidos em plantas transformadas. Um sistema de expressão que usa plantas como biorreator requer elevadas taxas de regeneração e transformação. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um eficiente protocolo de regeneração e transformação visando estabelecer um sistema de expressão para a produção do antígeno de HBsAg. Para isso, foram realizados experimentos para avaliar os fatores que influenciam o processo de regeneração, seleção, assim como, determinar parâmetros de transformação, via *Agrobacterium*, usando segmentos de folhas e entrenós de *Nicotiana tabacum* L. cv. SR1. Para regeneração a concentração de cinetina ideal foi de 1,0 $mg.L^{-1}$ e 2,0 $mg.L^{-1}$ para entrenós e segmentos de folha, respectivamente. O teste de tolerância a canamicina mostrou ser altamente eficiente, obtendo-se a supressão da regeneração com 50 $mg.L^{-1}$ e 100 $mg.L^{-1}$ para segmentos de folhas e entrenós, respectivamente. Apesar do bom desempenho de regeneração dos explantes de folhas nos testes de regeneração, para a transformação via *Agrobacterium*, entrenós foram significativamente mais eficientes. Além disso, para tabaco cv. SR1 os parâmetros ideais foram o pré-condicionamento por 4 dias em meio de regeneração, os explantes foram colocacados por 10 min em *Agrobacterium* em meio MS, um co-cultivo de 24 h em meio semi-sólido, a lavagem dos explantes com os antibióticos cefotaxima (100 $mg.L^{-1}$) e tetraciclina (400 $mg.L^{-1}$), sendo essa a combinação de antibióticas menos tóxica. A regeneração, após a transformação deve ser feita sem a presença de canamicina, já que esta inibe a regeneração de gemas. A otimização dos parâmetros de transformação resultou em percentagens de transformação significativamente maiores. Os explantes, calos e primórdios meristemáticos eram quimeras para a atividade da β-glucoronidase, onde se observou explantes sem atividade e outros com forte atividade. Porém, não foi possível confirmar que as plantas transformadas possuíam o T-DNA integrado ao genoma de forma estável, e recomendam-se análises moleculares adicionais para verificar a presença do gene *hbsag* nas plantas bem como verificar a viabilidade da cepa C58C1 da *Agrobacterium* para a transformação efetiva de plantas. O sucesso demonstrado para a regeneração e transformação representam um importante avanço estratégico para o uso de plantas como biorreator visando a expressão recombinante do antígeno de HBsAg.

SUMMARY

COUTINHO, CAMILA M., Universidade Federal de Pelotas, junho de 2005. **Regeneration and infection mediated by *Agrobacterium tumefaciens* using explants of tobacco *(Nicotiana tabacum* L.) cv. SR1**. Adviser: Pedro Canísio Binsfeld. Comitte: Eugenia Jacira Bolacel Braga.

The modern molecular biotechnology allows the production of several recombinant proteins using different expression systems. Plant-based vaccines may provide an attractive, safe and inexpensive alternative to conventional vaccine production. Antigens, like HBsAg from common infectious organisms like hepatitis-B virus can be produced in DNA-transformed plants. An expression system that uses plants as bioreactors needs an efficient *in vitro* regeneration and transformation process. The main aim of the present work was to develop an efficient regeneration and transformation protocol in order to establish an expression system for the production of the HBsAg antigen. Factors influencing regeneration, selection and transformation frequencies using the *Agrobacterium*-mediated protocol developed for *Nicotiana tabacum* L. cv. SR1 leaf and internodal stem segments were optimized, with particular emphasis on important transformation parameters. For regeneration the ideal kinetine concentration was 1.0 $mg.L^{-1}$ and 2.0 $mg.L^{-1}$ for internodal stem segments and leaf segments respectively. The canamicina tolerance test was highly efficient and the regeneration suppression was achieved at 50 $mg.L^{-1}$ and at 100 mg.L-1 for leaf segments and internodal stem segments respectively. Although the good performance of leaf segments in regeneration tests, in *Agrobacterium* mediated transformation experiments, internodal stem segments were significantly more efficient. Even so, the ideal parameters for tobacco cv.SR1 transformation include explants pre-conditioning for 4 days in regeneration medium, explants immersion for 10 min with *Agrobacterium* in MS medium and subsequent co-cultivation of 24 h at semi-solid medium. The explants should be washed with the antibiotic cefotaxime (100 $mg.L^{-1}$) and tetracycline (400 $mg.L^{-1}$) since this was the less harmful antibiotic combination. The regeneration after transformation should be done in the absence of kanamycin that negatively affects shoots regeneration. The use of the optimized protocol resulted in significantly higher transformation frequencies. Many of the explants, callus and shoot primordia were chimeric for β-glucoronidase activity and ranged from non-staining to solidly staining explants. But solidly transformed plants with integrated T-DNA were not confirmed, such plants should be analyzed by other molecular techniques to verify the presence of the *hbsag* gene and the viability of the strain C58C1 of *Agrobacterium* for effective plant transformation. The demonstrated success of the regeneration and transformation process provides an important advance in the strategy to achieve a stable transformation using plants as bioreactor for recombinant expression of the HBsAg antigen.

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia do DNA recombinante possibilita a clonagem de genes e sua posterior introdução em células, produzindo organismos geneticamente modificados também denominados transgênicos. A biotecnologia molecular possibilita a produção de várias proteínas recombinantes em diferentes sistemas de expressão. Os sistemas de expressão mais conhecidos são os baseados em fermentação microbiana, células animais e animais transgênicos. Como todo sistema, cada um deles apresenta vantagens e limitações que obrigam a desenvolver novos sistemas de expressão que ofereçam maiores vantagens, tanto de custo, de quantidade e qualidade da proteína que se quer produzir. O uso de plantas como um sistema de expressão de proteína recombinante oferece uma combinação única de vantagens para a produção heteróloga de proteínas.

Plantas como sistema de expressão, permitem a produção em larga escala, o acúmulo e direcionamento de proteínas alvo para compartimentos intracelulares, deixa-as mais estáveis e mais seguras comparando aos outros sistemas de expressão, por não conter vírus ou patógenos humanos e animais.

Para utilizar esse sistema de expressão, um protocolo eficiente e eficaz de regeneração *in vitro* deve ser previamente estabelecido, tornando favorável o uso de plantas para a produção de proteínas recombinantes, além de ser também extremamente necessário para a transformação genética.

A transformação genética de plantas depende também do estabelecimento de um processo eficiente para a transferência de genes, que é essencial para o sucesso da técnica. A escolha da espécie vegetal influência a eficiência de

transformação e regeneração *in vitro*, pois existem espécies e cultivares mais suscetíveis à transformação e regeneração do que outras.

Plantas transgênicas expressando antígenos recombinantes têm sido desenvolvidas, principalmente devido aos custos de produção mais baixos quando comparados aos outros sistemas de produção de proteínas heterólogas.

Experimentos anteriores demonstraram a viabilidade da expressão do antígeno HBsAg em tabaco, batata, tremoço e alface utilizando o processo de transformação indireta por meio da *Agrobacterium tumefaciens*.

Diante do exposto acima, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo de regeneração e infecção por *Agrobacterium tumefaciens* em explantes de tabaco cv. SR1 para ser utilizado posteriormente em experimentos de transformação genética visando a expressão heteróloga do antígeno HBsAg para a produção de vacina contra o vírus da hepatite B.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Cultura de tecidos

O melhoramento vegetal visando criar variedades de plantas capazes de se adaptar a condições adversas do meio ambiente, tais como pragas, doenças e etc, tem sido, há muito tempo, praticado pelo homem (Mansur & Pinheiro, 1995). Durante décadas as culturas agronômicas foram melhoradas através de métodos convencionais utilizando a variação natural dentro de diferentes recursos genéticos (Filho *et al*., 1999).

O surgimento da biologia molecular e da engenharia genética tornou possível aprofundar-se em aspectos fundamentais do desenvolvimento da planta, como o conhecimento de mecanismos de regulação gênica e diferenciação celular.

Um dos fatores que favoreceu o desenvolvimento de novas técnicas para o melhoramento de plantas foi o aperfeiçoamento da tecnologia de cultura de tecidos, que é uma das áreas de maior êxito da biotecnologia (Giacometti, 1990). Os avanços nessa área têm ampliado as perspectivas de aplicações em diversos campos da biotecnologia de plantas (Davies, 1995).

A cultura de tecidos é uma técnica onde pequenos segmentos de tecidos da planta, chamados explantes, são cultivados em um meio artificial, contendo os nutrientes necessários ao crescimento vegetal em condições assépticas (McCowm & Sellmer, 1987).

A técnica de cultura de tecidos está baseada no fenômeno da totipotência das células vegetais, que é a capacidade que cada célula tem de desenvolver uma

nova planta quando colocada em condições especiais para que ocorra o processo de diferenciação (Kerbauy, 1999).

Entre as contribuições que esta técnica proporciona pode-se destacar a micropropagação, cultura de embriões, seleção *in vitro*, produção de plantas duplo haplóides, hibridização somática, variação somaclonal e transformação genética (Karp, 1995). A cultura de tecidos é uma etapa fundamental para a transformação genética, pois o sucesso da técnica depende da capacidade de regeneração da espécie em estudo (Ferreira *et al.*, 1998).

2.2 - Regeneração *in vitro*

A regeneração de plantas tem sido alcançada em cultura *in vitro* por meio de um balanço hormonal e de condições adequadas de incubação, sendo que a obtenção de altas ou baixas taxas pode depender do tipo de herança qualitativa ou quantitativa (Cid, 1998).

O processo morfogenético de regeneração *in vitro* pode ser obtido através de organogênese (Bhaskaram & Smith, 1990). A organogênese nos tecidos em cultura pode ser controlada através do uso exógeno de reguladores de crescimento e nutrientes que induzem a desdiferenciação de células diferenciadas de tal modo que a célula se torne totipotente, ou seja, esta célula pode-se diferenciar dando origem a uma nova planta (Handro & Floh, 1990).

A organogênese pode ocorrer de forma direta ou indireta (George & Sherrinton, 1984). Na organogênese direta a regeneração ocorre a partir do explante inicial, sem formação de calos, apenas uma proliferação celular restrita às regiões seccionadas do explante, e na organogênese indireta a regeneração do explante vai ocorrer a partir de células de calo (na região do corte antes da formação do órgão) ou de suspensões celulares (Handro & Floh, 1990). Entretanto plantas regeneradas através de calos ou células em suspensão podem dar origem a plantas com variações genéticas, conhecidas como variação somaclonal (Karp, 1994), que é indesejável para processos de transformação genética. Em virtude disso, a regeneração direta, ou organogênese direta, é a mais desejada e amplamente utilizada, principalmente nos trabalhos de transformação de plantas,

pois com este tipo de regeneração as plantas obtidas são geneticamente mais estáveis (Kamenická & Rypák, 1989).

A resposta organogênica pode variar de acordo com a espécie, idade, posição do explante, época do ano, composição do meio de cultura e condições de incubação (Pérez-Molphe-Balch & Ocho-Alejo, 1997). A interação entre os reguladores de crescimento, o explante e as condições de cultivo determinam a morfogênese do tecido, conduzindo a uma organogênese que pode ser tanto direta como indireta (Guerra *et al*.,1999).

Um dos principais fatores que controlam os processos morfogenéticos de regeneração *in vitro* são os fitorreguladores, principalmente o balanço auxina/citocinina. A adição de fitorreguladores tem como principal objetivo suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz (Grattapaglia & Machado, 1998).

As auxinas são responsáveis pelo alongamento e aumento no tamanho dos tecidos, divisão celular, formação de raízes adventícias e inibição da formação de brotos adventícios e axilares. As citocininas têm a função principal de promover a divisão celular, mesmo quando em baixas concentrações e diferenciação dos tecidos (Davies, 1990). O efeito mais significativo das citocininas é a sua interação com as auxinas no controle da morfogênese e a formação de órgãos em tecidos cultivados (Metivier, 1986), assim como, Dufour (1990) relata que a organogênese indireta não ocorre na ausência de citocinina. A diferenciação de parte aérea, raiz ou ambos em calo de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) é regulada pelo balanço auxinina/citocinina (Torres *et al*., 1998). Em tecido medular de tabaco cultivado *in vitro*, a presença exógena e/ou endógena de uma auxina e uma citocinina é extremamente necessária para a retomada das divisões celulares (Patau & Das, 1961).

Outro fator que influencia a regeneração é o tipo de explante utilizado, pois eles apresentam diferentes tipos de células e graus de diferenciação, logo, em alguns tecidos ela é mais facilmente induzida (Kerbauy, 1999). As diferenças encontradas podem estar relacionadas com as variações nos níveis endógenos

dos hormônios nas plantas e, também, a existência de um gradiente hormonal nos tecidos (Bhaskaram & Smith, 1990). Segundo Peres (2002), a organogênese será maior quando forem utilizados tecidos jovens, os quais possuem maior competência organogenética. A regeneração via organogênese em *Citrus* tem sido descrita para vários tecidos incluindo raízes, discos de folhas, segmento internodal, segmento de cotilédone, segmento de hipocótilo (Goh *et al.,* 1995; Chaturvedi & Mitra, 1974; Moore, 1986; Sim *et al.*, 1989). Guis *et al.* (2000) analisaram protocolos de regeneração utilizando folhas e cotilédones de meloeiro como explantes, obtendo uma alta freqüência de regeneração.

O estabelecimento de protocolos eficientes e eficazes de regeneração *in vitro* é extremamente necessário para a aplicação das técnicas de biologia molecular e de transformação genética, mas as condições estabelecidas para um genótipo dificilmente são aplicáveis a outro (Oridate *et al*., 1992; Gray *et al.*, 1993). Para De Bondt *et al*. (1994) a transformação de plantas depende de dois fatores essenciais: a habilidade para introduzir um gene desejável e a habilidade para regenerar uma planta fértil de células transformadas. De acordo com Siril & Dhar (1996), um protocolo de regeneração simples e eficiente é um requisito básico quando se deseja transformação genética de plantas.

2.3 - Transformação genética de plantas

A transformação genética é definida como sendo a introdução controlada de ácidos nucléicos (gene funcional) em um genoma receptor por um processo assexual, eliminando-se a introdução por fecundação (Tacchini & Walbot, 1986; Brasileiro & Dusi, 1999). O estabelecimento de uma estratégia eficiente para a transferência de genes é fundamental para o sucesso da técnica (Machado *et al.*, 1997).

2.3.1 - Transferência via *Agrobacterium tumefaciens*

Denomina-se de transferência indireta de genes aquela que necessita de um vetor para intermediar o processo de transformação. Esse processo representa uma forma natural de engenharia genética (Chilton, 1983), pois foi

desenvolvido com base na *Agrobacterium tumefaciens*, que infecta naturalmente as células de plantas, transferindo e integrando um fragmento de DNA no genoma das células de plantas infectadas (Lee *et al.*, 1995). Ela altera o metabolismo e desenvolvimento de células da planta, ocasionando a doença conhecida como galha de coroa ("*crow gall*") (Lutova *et al.*, 1998).

A *Agrobacterium tumefaciens* infecta a planta quando esta apresenta uma lesão, causada por tratos culturais, geadas, insetos e outras injúrias. A célula lesada libera compostos ou moléculas sinal que atraem a bactéria. Durante a interação da *Agrobacterium* com o tecido danificado, ela transfere uma região definida do plasmídeo Ti (indutor de tumor), chamada T-DNA ('*Transferred DNA'*) para as células da planta, sendo os limites desse fragmento definidos por 25 pb diretamente repetidos em cada extremidade, definindo a porção do plasmídeo a ser transferida, sendo a presença da borda direita essencial para a ocorrência da transferência (Van Sluys, 1999; Wang *et al.*, 1984). A transferência desse T-DNA só é possível devido a uma região presente no plasmídeo Ti, chamada de região *vir*, que é ativada por compostos fenólicos liberados pelo tecido vegetal lesado (Van Sluys, 1999).

A região de virulência contendo os genes *vir* do plasmídeo forma um conjunto de operons co-regulados pelas mesmas proteínas onde as unidades transcricionais denominadas *vir A, vir B, vir C, vir D, vir E* e *vir G* estão localizadas adjacente à borda esquerda do T-DNA (Hooykaas & Beijersbergen, 1994).

O uso desse sistema de transformação foi demonstrado pela primeira vez introduzindo-se o gene que confere resistência ao antibiótico canamicina em tabaco (Herrera-Estrella *et al.*, 1983), possibilitando o uso do plasmídeo de *Agrobacterium* para a transferência de uma informação genética desejada ao interior de uma célula hospedeira (Van Sluys, 1999).

O uso da *Agrobacterium tumefaciens* como vetor de transformação exige que a linhagem esteja "desarmada", isto é, sem a presença dos oncogenes em seu plasmideo. No lugar dos genes retirados, serão colocados genes de interesse e/ou marcadores de seleção, que vão ser transferidos e integrados ao genoma vegetal, sem afetar a regeneração (Brasileiro & Dusi, 1999; Klee *et al.*, 1987). A

transferência de genes utilizando *Agrobacterium tumefaciens* tem a vantagem de ter alta probabilidade de integração de uma única cópia do transgene (Zambryski, 1992).

Alguns cultivares de pereira da espécie *Pyrus communis* L. foram transformadas geneticamente utilizando o método de transferência indireta com a *Agrobacterium tumefaciens*. Merkulov *et al.* (1998) utilizaram a cultivar Vyszhmitsa e Bell *et al.* (1999) utilizaram a cultivar Beurre Bosc, e após técnicas moleculares de análise, confirmaram a transformação de seus cultivares.

Mourgues *et al.* (1996), utilizaram a variedade de pereira Conference e obtiveram plantas transgênicas, e o processo de transformação foi tão bem sucedido que ele foi utilizado em outras duas variedades de pereira, a Doyenne du Comice e Passe-Crassane.

Na transformação genética de meloeiro, foi utilizado a *Agrobacterium tumefaciens* como vetor e cotilédones como explante (Fang & Grumet, 1990; Ayub *et al*., 1996). Para a transformação genética de meloeiro as linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* disponíveis mais utilizadas tem sido a LBA 4404 e a C58, com resultados significativos para a linhagem C58 (Guis *et al.,* 1997).

2.4 - Seleção de tecidos transformados

Quando um material vegetal (cotilédone, folha, entrenó, etc) é transformado, é necessário um mecanismo que detecte e evidencie essa transformação. Para isso é necessário um sistema de seleção, onde apenas as células transformadas consigam sobreviver e crescer (Shepherd, 1990). Com essa finalidade, alguns sistemas incorporam ao vetor de transformação de plantas um gene marcador de seleção, geralmente uma resistência a um antibiótico (Lin *et al.,*1996).

As principais características a serem consideradas na escolha de um determinado gene marcador são: 1) a expressão do mesmo não deve interferir no metabolismo normal das células transformadas, 2) seu produto deve proteger de modo efetivo as células transformadas das propriedades inibitórias de crescimento do agente seletivo, além de ter uma boa difusão nos tecidos, permitindo a

diferenciar as células transformadas das não transformadas, 3) a exposição do explante transformado ao agente seletivo não deve afetar seu posterior crescimento e regeneração em plantas inteiras e férteis (Potrycus & Spangenber, 1995).

Existe um número razoável de genes de marcadores de seleção, e os mais utilizados são: 1) os que produzem uma enzima funcional que não é reconhecida pelo agente seletivo, como o gene *bar*, que codifica para a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT), e que inativa o herbicida L-fosfinotricina (PPT), vem sendo utilizado na obtenção de plantas transgênicas de espécies diferentes (Wilmink & Dons, 1993). 2) os que produzem um produto que permite a desintoxicação e eliminação do agente seletivo (De Block *et al.*, 1987). No caso do gene *nptII* (neomicina-fosfotransferase), ele promove a fosforilização de antibióticos aminoglicosilados, como por exemplo a canamicina, inativando o agente seletivo por transferências de grupos fosfatos (Wilmink & Dons, 1993). O uso do gene *nptII* (marcador de seleção) tem sido utilizado em ameixeira (Mante *et al.*, 1991), macieira (De Bondt *et al.,*1994), meloeiro (Gonsalves *et al.*, 1994; Ayub *et al.*, 1996), citros (Peña *et al.*, 1995), pereira (Mourgues *et al.*, 1996).

2.5 - Caracterização de plantas transformadas

2.5.1 – Ensaio histoquímico

O uso de genes que permitam avaliar a transferência e expressão de um gene, e também estudar a regulação de determinadas seqüências promotoras, proporcionou avaliar e determinar algumas variáveis no método de transformação genética para posteriores ajustes. O gene repórter mais utilizado tem sido o gene *uidA* (GUS), isolado de *Escherichia coli,* e que codifica a enzima β-glucuronidase (GUS) (Jefferson *et al.*, 1986). A grande aceitação desse gene é por sua simplicidade, rapidez e versatilidade do método em detectar a atividade enzimática e do fato das plantas não apresentarem atividade endógena significante (Tör *et al.*, 1992). O produto da enzima β-glucuronidase pode ser detectado através de ensaios histoquímicos e fluorimétrico (Lacorte, 1998). O ensaio histoquímico é um

método qualitativo, onde os explantes transformados são imersos no substrato chamado ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-glucoronídeo (X-Gluc), onde na presença da enzima β-glucuronidase é convertido e forma um precipitado azul, localizando a atividade do gene nas células transformadas de tecidos de plantas (Jefferson, 1987; Jefferson, 1989).

Uma das limitações que o método apresenta é o fato desses ensaios histoquímicos e fluorimétricos serem destrutivos, e por isso não podem ser utilizados para a recuperação do material *in vivo* (Naleway, 1992).

Em explantes inoculados com *Agrobacterium* a eficiência de transformação pode ser quantificada por meio da porcentagem de área de tecidos que expressam GUS ou pelo número de pontos azuis (Jia *et al*., 1989; Novoa & Coles, 1994; Russel *et al*., 1992).

2.6 - Produção de proteínas heterólogas em plantas

As plantas são consideradas um dos possíveis sistemas de expressão para a produção de proteínas, incluindo também os sistemas convencionais de expressão, como o bacteriano, levedura e cultura de células de animais (Giddings, 2001). O sistema de expressão para ser considerado ideal tem que produzir de maneira segura a proteína, deixando-a biologicamente ativa, e a um baixo custo de produção (Daniell *et al.,* 2001). Os sistemas convencionais de expressão (bacteriano, levedura e cultura de células de animais), têm sido utilizados com sucesso a mais de duas décadas, mas apresentam problemas individuais e limitações (Lundblad & Kingdon, 1999).

Com o surgimento e aperfeiçoamento de protocolos de transformação e regeneração de plantas, tornou conveniente o seu uso para a produção de várias proteínas recombinantes (Gleba *et al.*, 1999). A probabilidade de explorar plantas para a produção de proteínas recombinantes de mamíferos foi demonstrada pela primeira vez em 1989, quando foi expresso com sucesso um anticorpo funcional completo em tabaco transgênico (Hiatt *et al.*, 1989).

Plantas podem oferecer uma combinação única de vantagens para a produção heteróloga de proteínas de interesse terapêutico (Fisher *et al.*, 2000; Giddings, 2001; Daniell *et al.*, 2001). Esse sistema de expressão é mais econômico que o industrial, que exige o uso de sistemas de fermentação e biorreatores. A tecnologia encontra-se disponível para um desenvolvimento e produção em larga escala (a nível industrial) dessas plantas, direcionam proteínas alvos para dentro de compartimentos intracelulares, deixando-as mais estáveis (Daniell *et al.*, 2001). Além disso, células de plantas são capazes de promover modificações pós-traducionais, acetilação, fosforilização, glicosilação necessários para garantir a atividade biológica da proteína (Gleba *et al.*, 1999; Schillberg *et al.*, 2002). As chances de contaminação das proteínas com patógenos (humanos e animais), toxinas e seqüências oncogênicas é mínimo, proporcionando segurança na produção (Fisher *et al.*, 2003; Daniell *et al.*, 2001; Fisher & Emans, 2000). Entretanto, a extração e purificação dessas proteínas a partir dos tecidos da planta têm representado o maior obstáculo para a produção em larga escala devido ao seu alto custo (Stoger *et al.*, 2002; Gleba *et al.*, 1999). Alternativas que vem sendo utilizadas é a expressão em sementes de arroz e soja, pois esses não necessitam uma purificação muito dispendiosa, ou ainda a própria eliminação da etapa de purificação, quando o tecido da planta contendo a proteína for utilizado como alimento (vacinas comestíveis) (Daniell *et al.*, 2001).

Ainda não há um consenso sobre qual espécie ou tecido de planta é o mais adequado para a expressão heteróloga de proteína (Kusnadi *et al.* 1997; Stoger *et al.*, 2000). A espécie mais utilizada e citada em vários trabalhos é o tabaco (*Nicotiana* sp), por apresentar grandes vantagens como a manipulação genética relativamente fácil e capaz de possibilitar várias safras ao ano, com potencial anual de 100 toneladas por hectare (Daniell *et al.*, 2001). A organogênese de brotos a partir de explantes foliares de tabaco tem sido o mais efetivo sistema de regeneração utilizado em estudos básicos e aplicados de transformação, mas em algumas espécies a organogênese a partir de folha permanece ainda limitado (Li *et al.*, 2003).

Plantas transgênicas expressando antígenos recombinantes têm sido desenvolvidas com sucesso (Gao *et al.*, 2003). Dentre os antígenos produzidos em plantas, um de grande destaque é o antígeno o HBsAg do vírus da Hepatite B.

A hepatite viral é a mais letal doença infecciosa, sendo o vírus da hepatite B um dos maiores causadores desta persistente viremia em humanos (Kumar *et al.*, 2003). A vacinação é a melhor maneira de prevenir a transmissão do vírus (Huang & Mason, 2004). O antígeno HBsAg é uma proteína de superfície expressa em grande quantidade pelo vírus, formada por um dímero de dois polipeptídeos idênticos codificados pelo mesmo gene (Kawashima *et al.*, 2001) e é considerada uma proteína estável devido ao seu alto conteúdo de cisteina (Dogan *et al.*, 2000). O conceito da produção do antígeno HBsAg em plantas foi primeiramente relatado em 1992, onde buscaram um sistema mais econômico de expressão deste antígeno, até então produzido somente em leveduras (Mason *et al.*, 1992). O antígeno HBsAg tem sido expressado em tabaco, alface, tremoço e batata (Kapusta *et al.*, 1999; Richter *et al.*, 2000). Estudos demonstraram que o antígeno HBsAg obtido de plantas de tabaco transgênico produz uma resposta imune favorável, qualitativamente similar a obtida através da imunização com vacina comercial (Thanavala *et al.*, 1995).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em uma colaboração entre os Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas do Centro de Biotecnologia e o Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica/Instituto de Biologia, ambos na Universidade Federal de Pelotas - UFPel.

3.1 - Material vegetal

O material vegetal utilizado foi obtido de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivar SR1 (Figura 1), mantido em cultivo *in vitro*, para se ter uma maior uniformidade dos explantes sob condições assépticas.

FIGURA 1 - Planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. SR1 *in vitro.*

3.2 – Meio de cultura

Em todos os experimentos utilizou-se como meio de cultura básico, o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) (Tabela 1A), acrescido de 25 g. L^{-1} de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1 N, antes da adição do ágar (7 $g.L^{-1}$) e da autoclavagem por 20 minutos a 120°C e a 1,5 atm de pressão. Todas as etapas de manipulação do material vegetal foram realizadas sob condições assépticas em capela de fluxo laminar. O material foi cultivado e mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, com fluxo de fótons de 25 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ e temperatura de 25 $\pm$ 2°C. Em uma seqüência de etapas foram determinadas as condições para: 1) regeneração *in vitro* a partir de entrenós e folhas; 2) teste *in vitro* de tolerância ao agente de seleção canamicina e 3) infecção por *Agrobacterium tumefaciens* dos explantes visando a transformação genética.

3.3 - Protocolo de regeneração *in vitro* para explantes de tabaco

Para a regeneração *in vitro*, foram utilizados dois tipos de explantes, entrenó e segmentos de folha, obtidos de plantas de tabaco cultivadas *in vitro*, em fase de multiplicação, 30 dias após a repicagem. Os entrenós constituíram-se de segmentos do caule, medindo de 0,4 a 0,5 cm de comprimento. Já os segmentos de folhas, foram obtidos cortando-se perpendicular e horizontalmente a nervura central e, sendo colocados com a superfície adaxial em contato com o meio.

Os meios de regeneração testados constituíram-se do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) (Tabela 1A), suplementado com 1,0 $mg.L^{-1}$ de AIA (concentração fixa) e 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2 $mg.L^{-1}$ de cinetina.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x5, sendo os explantes e as doses de cinetina os fatores considerados. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada uma representada por um frasco contendo quatro explantes. A avaliação foi realizada

trinta dias após o início do experimento, onde foi analisada a percentagem de sobrevivência, formação de calos, formação de gemas e raízes.

3.4 – Teste *in vitro* de tolerância ao agente de seleção - canamicina

Para o teste de tolerância (seleção *in vitro*) foram utilizados entrenós e folhas de plantas de tabaco mantidas *in vitro* por 30 dias. Para a determinação da resistência dos tecidos ao antibiótico, os explantes foram submetidos às concentrações de 0, 25, 50, 100, 150 e 200 $mg.L^{-1}$ de canamicina no meio de regeneração composto do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) (Tabela 1A) e 1,0 $mg.L^{-1}$ de AIA e 1,0 $mg.L^{-1}$ de cinetina.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x6, sendo dois tipos de explantes e seis doses de canamicina os fatores considerados. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada uma representada por uma placa dividida contendo quatro entrenós em uma metade e quatro folhas em outra. Os parâmetros analisados semanalmente foram: percentagem de sobrevivência, formação de calos, formação de gemas, formação de brotações e raízes.

3.5 – Infecção de tabaco via *Agrobacterium tumefaciens*

3.5.1 - Cepa da bactéria e vetor binário

No ensaio de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* foi utilizado a cepa desarmada C58C1 (Figura 2) com resistência ao antibiótico rifampicina com pG35SHBsAg.

Essa cepa foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Ekkehard Ernst Theodor Hansen, do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

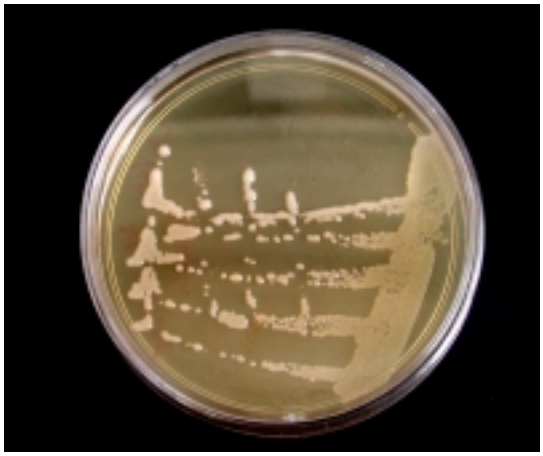


FIGURA 2. Colônias de *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58C1 utilizadas para a transformação de explantes de *Nicotiana tabacum* L.

A cepa desarmada contém o plasmídeo pG35SHBsAg de 15 kb, que apresenta a seguinte construção: RB - borda direita do T-DNA; T - seqüência de terminação da transcrição; *uidA*(GUS)- seqüência que codifica para a β-glucoronidase; P35S- promotor 35S do vírus mosaico da couve-flor; Ω- seqüência líder do vírus do mosaico do tabaco; *hbsag*- sequência que codifica a proteína HBsAg; P*nos*- promotor do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens*; *nptII*- sequência que codifica para a neomicina fosfotransferase; LB- borda esquerda do T-DNA (Figura 3).

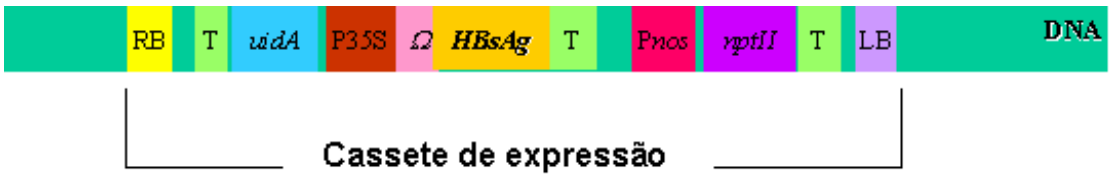


FIGURA 3. Representação esquemática do cassete de expressão contendo os genes *hbsag*, *uidA* (GUS) e *nptII*, utilizado para a transformação genética de tabaco, utilizando como vetor o plasmídeo pG35SHBsAg.

3.5.2 - Crescimento da bactéria

A cepa da *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Rif^R) com pG35SHBsAg (Kan^R) foi cultivada a 28 °C por 48 horas, em meio YEB semi sólido (Tabela 2A). O meio foi autoclavado e quando atingiu temperatura inferior a 40 ºC foram adicionados os antibióticos de seleção rifampicina (50 mg. L^{-1}) e canamicina (50 mg. L^{-1}) filtro-esterelizados (Millipore Milex 0,22 µm).

As placas com as bactérias foram mantidas no escuro a 28 ºC por 48 horas e desse pré-cultivo, uma colônia isolada foi extraída e transferida para um erlenmeyer de 50 mL, contendo 20 mL do mesmo meio seletivo não geleificado, com a adição de 10 µM de acetoseringona e 10 µM de glicose . A suspensão foi cultivada em estufa a 28 ºC, sob agitação de 250 rpm, até atingir uma DO_{600} entre 0,5 e 0,8.

3.6 - Fatores que influenciam a eficiência de infecção de tabaco cv. SR1

Para avaliar o processo de infecção da cepa *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Rif^R) com pG35SHBsAg (Kan^R) foram realizados diferentes experimentos que influenciam a taxa de infecção: 1) tipo de explante; 2) pré-condicionamento do explante; 3) meio de co-cultivo para transformação; 4) tempo imersão; 5) tempo de co-cultivo semi-sólido; 6) lavagem dos explantes; 7) meio de regeneração com e sem agente de seleção (antibiótico canamicina). Para os parâmetros acima, quando aplicado, foi avaliado a regeneração, expressão transiente do gene *uidA* (GUS) e expressão do gene *uidA* (GUS) 14 dias após a infecção.

3.6.1 - Tipo de explante

Foi avaliada a eficiência de regeneração após infecção por *Agrobacterium tumefaciens* de entrenós e folhas de tabaco cv. SR1.

3.6.2 - Pré-condicionamento do explante

O pré-cultivo ou prévio tratamento de explantes antes de submetê-los a infecção por *Agrobacterium tumefaciens* visa melhorar as taxas de regeneração.

Nesse sentido, avaliaram-se quatro diferentes tipos de pré-condicionamento para entrenós: 4, 7 e 14 dias em meio de regeneração (MR), e 7 dias após Agroinjeção (com o auxílio de uma seringa de insulina de 1 mL, AG 13x3,8). Como controle foram utilizados entrenós sem pré-condicionamento. A eficiência de cada pré-condicionamento foi avaliada pela eficiência de regeneração dos explantes após a infecção por *Agrobacterium tumefaciens* e o percentual de explantes que apresentaram expressão transiente do gene *uid*A (GUS).

3.6.3 - Meio de co-cultivo líquido para infecção por *Agrobacterium tumefaciens*

Foram testados diferentes meios de co-cultivo líquido para a infecção por *Agrobacterium tumefaciens* de entrenós conforme mostra a tabela abaixo:

Tratamentos	Co-cultivo
A	5 mL de MS +2 mL de YEB sem bactérias
B	5 mL de MS +2 mL de YEB com bactérias
C	5 mL MS sem bactéria
D	5 mL MS com bactéria
E	5 mL de YEB sem bactérias
F	5 mL de YEB com bactérias

Os tratamentos A e E eram compostos por meio YEB (Tabela 2A). Ao tratamento A foi acrescentado também o meio MS (Tabela 1A). Os tratamentos B e F foram preparados a partir do crescimento bacteriano de uma colônia isolada. Para o tratamento B foi utilizado 2 mL desta suspensão bacteriana e a ela foi misturado 5 mL de meio MS. O tratamento C é composto apenas de meio MS sem bactéria. O tratamento D constitui-se de suspensão bacteriana centrifugada a 8.000 rpm por 10 minutos, onde foi descartado o sobrenadante e o pellet suspenso em meio MS. Os tratamentos A, C e E foram utilizados como controle, e o B, D e F utilizados com *Agrobacterium* para a infecção dos entrenós de tabaco.

A eficiência de cada tratamento foi verificada de acordo com o percentual de regeneração dos explantes após a infecção e com percentual de calos que apresentaram a expressão do gene *uid*A (GUS) após um período de 14 dias.

3.6.4 - Tempo de imersão dos entrenós em meio de co-cultivo líquido

Foram testados três diferentes tempos de imersão para a infecção dos entrenós: 10, 15 e 20 min. Os entrenós foram excisados e imersos no co-cultivo por 10, 15 e 20 min. Após cada período, os entrenós foram enxugados com papel filtro e transferidos para o meio de co-cultivo semi-sólido. Utilizando apenas o período de 10 min, foi feita a imersão total dos entrenós no co-cultivo e o contato apenas das extremidades excisadas do explante (sem imersão total) no meio de co-cultivo. Após o processo, os entrenós de ambos os tratamentos foram enxugados com papel filtro e transferidos para o meio de co-cultivo semi-sólido. A eficiência de cada período foi verificada de acordo com o percentual de regeneração dos explantes após a infecção e a expressão do gene *uid*A (GUS) após um período de 14 dias.

3.6.5 - Tempo de co-cultivo em meio semi-sólido

O co-cultivo dos entrenós foi realizado por 24 e 48 horas no escuro a uma temperatura de 22°C para todos os tratamentos. O meio de co-cultivo foi constituído do meio MS, com adição de 0,01µM de glicose e 0,3 µM de acetoseringona estéril. A eficiência de cada período foi verificada de acordo com o percentual de regeneração dos explantes após a infecção e a expressão do gene *uid*A (GUS) após um período de 14 dias.

3.6.6 - Lavagem dos explantes

Foram testados diferentes antibióticos para eliminar e inibir o crescimento da *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 residual e verificar a influência desses

antibióticos sobre a regeneração dos entrenós. Os antibióticos utilizados para esse teste foram a vancomicina (20 mg. L^{-1}), carbenicilina (250 mg. L^{-1}) + cefotaxima (100 mg. L^{-1}) e tetraciclina (400 mg. L^{-1}) + cefotaxima (100 mg. L^{-1}), em dois tempos de lavagem 10 e 20 min, sob agitação de 200 rpm. Após esses dois períodos, os entrenós foram enxugados com papel filtro e transferidos para o meio de regeneração (1,0 mg. L^{-1} de AIA e 1,0 mg. L^{-1} de cinetina). A eficiência de cada tratamento foi verificada de acordo com o percentual de regeneração dos explantes.

3.6.7 - Meio de regeneração com e sem agente de seleção

Para esta etapa foram utilizados dois tipos de meio de regeneração: 1) MS com 2,5% de sacarose, 1,0 mg.L^{-1} de AIA e 1,0 mg.L^{-1} de cinetina sem antibiótico de seleção e 2) MS com 2,5% de sacarose, 1,0 mg.L^{-1} de AIA e 1,0 mg.L^{-1} de cinetina com antibiótico de seleção (100 mg. L^{-1} de canamicina) e antibiótico inibidor de crescimento bacteriano (100 mg. L^{-1} de cefotaxima).

Foi avaliada a eficiência de regeneração dos entrenós após infecção por *Agrobacterium tumefaciens* em meio de regeneração com a presença e ausência de canamicina no meio de regeneração.

3.7- Avaliação da expressão do gene *uidA* (GUS) através de ensaio histoquímico

3.7.1 – Expressão transiente

Para a avaliação dos experimentos foi utilizado o ensaio histoquímico, baseado na clivagem do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-glucoronídeo (X-Gluc) pela β-glucoronidase. O teste foi realizado 24 h após a transformação, onde os explantes foram colocados imersos no substrato e incubados no escuro a 37° C, por 24 horas. Quando foi verificada a expressão transiente no explante, ela foi

considerada positiva, e quando não foi verificada a expressão transiente no explante, ela foi considerada negativa.

3.7.2 – Expressão avaliada 14 dias após a infecção por *Agrobacterium tumefaciens*

Foi realizado após 14 dias de infecção por *Agrobacterium tumefaciens* outro ensaio histoquímico em entrenós que já se encontravam em meio de regeneração depois da infecção, apresentando alta diferenciação celular e pontos meristemáticos, para verificar a expressão estável do gene *uidA* (GUS) nos tecidos do explante (calos e pontos meristemáticos). Os explantes foram colocados imersos no substrato e incubados no escuro a 37° C, por 24 horas. Após esse período, foi retirado o substrato e adicionado etanol 70% para interromper a reação, e alguns explantes permaneceram por um período maior para retirar a clorofila, permitindo uma melhor visualização da coloração azul.

Um explante foi considerado potencialmente transformado, quando apresentou pelo menos uma região de coloração azul.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Regeneração *in vitro*

Quanto à fonte de explante normalmente há maior sucesso se for utilizado tecidos jovens, os quais possuem maior competência organogenética. Explantes que contém tecidos meristemáticos, primário ou secundário são preferidos. Para a regeneração de elevado número de gemas por explante, o tipo de explante e concentração de cinetina foram determinantes.

Em entrenós, a melhor resposta foi observada em 1,0 $mg.L^{-1}$ de cinetina que induziu a formação de gemas em 93,7% dos explantes (Figuras 4 e 5). Com o aumento da concentração de cinetina foi constatado um decréscimo na percentagem de entrenós que apresentaram regeneração, sendo que para as concentrações de 1,5 $mg.L^{-1}$ e 2 $mg.L^{-1}$ somente 56,2% dos explantes apresentaram formação de gemas (Figura 4). Já na ausência da cinetina, 43,7% dos entrenós apresentaram regeneração, mostrando que o explante possui hormônios endógenos que promoveram formação de gemas mesmo na ausência de citocinina exógena no meio. Segundo Peters (1980) é possível obter-se células ou grupos de células que apresentam a capacidade de desenvolver-se em meio sem citocinina.

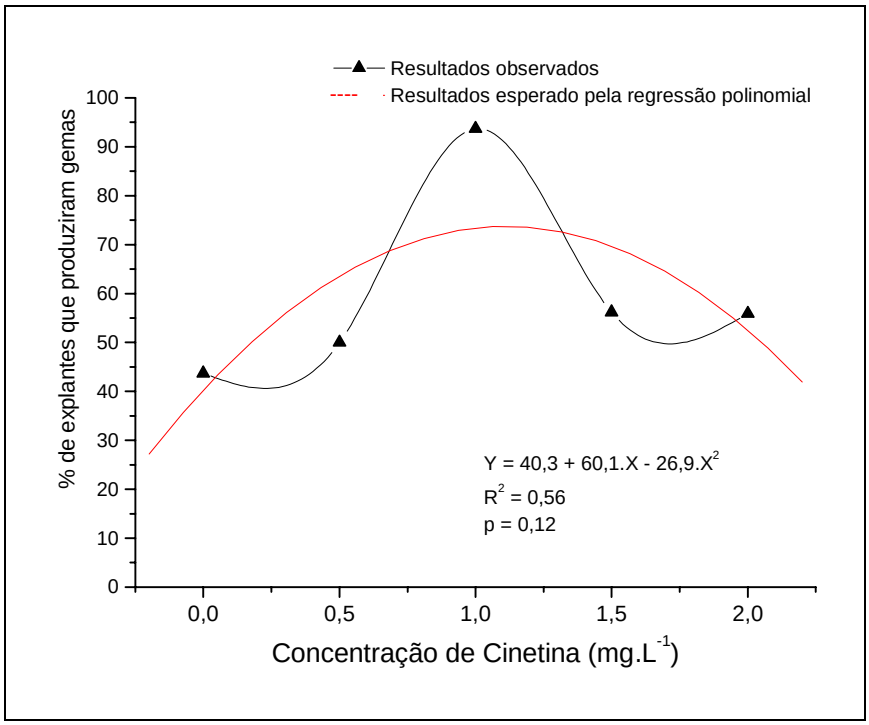


FIGURA 4. Influência das diferentes concentrações de cinetina sobre o percentual de regeneração de gemas em entrenós de *Nicotiana tabacum* L.

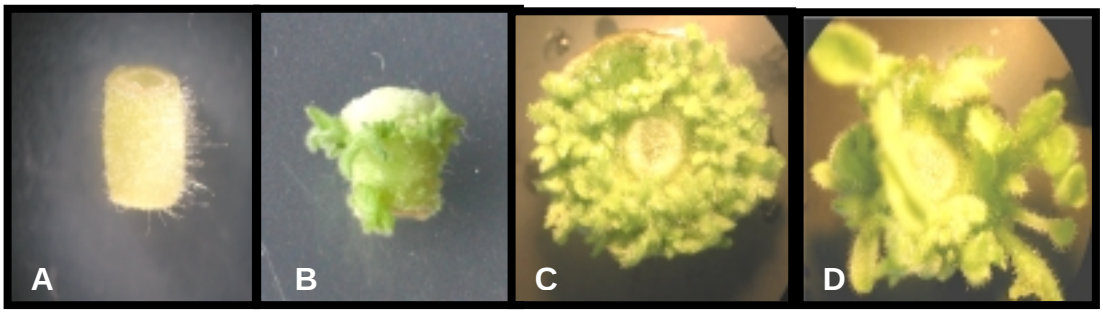


FIGURA 5. Etapas da regeneração de entrenó de tabaco cv. SR1 em meio de regeneração com 1,0 mg.L^{-1} de AIA e 1,0 mg.L^{-1} de cinetina. **A -** explante inicial; **B -** entrenó após 1 semana em cultura; **C -** entrenó após 2 semanas em cultura; **D -** entrenó após 30 dias em cultura.

A ausência de reguladores de crescimento no meio, em entrenós, promoveu um maior percentual de explantes com formação de calos (75%) (Figura 6). Já na concentração de 0,5 mg.L^{-1} observou-se a formação de raízes em 18,7% dos entrenós, mostrando que uma total inibição depende de uma concentração maior de cinetina (Figura 6), isso provavelmente pela concentração de auxina endógena ser maior que esta concentração. Em entrenós a taxa de sobrevivência dos explantes foi influenciada pela concentração do hormônio onde concentrações mais baixas de 0,5 e 1,0 mg.L^{-1} promoveram um percentual maior de sobrevivência (93,75%), e conforme aumentou-se essa concentração houve uma redução desse percentual, mostrando que doses maiores de citocininas em entrenós podem ter efeitos fisiológicos adversos para as células vegetais (Figura 6). A divisão e diferenciação de protoplastos de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cv. Ko Hsin N°1 depende do tipo de citocinina utilizada (Tsai *et al*., 1977).

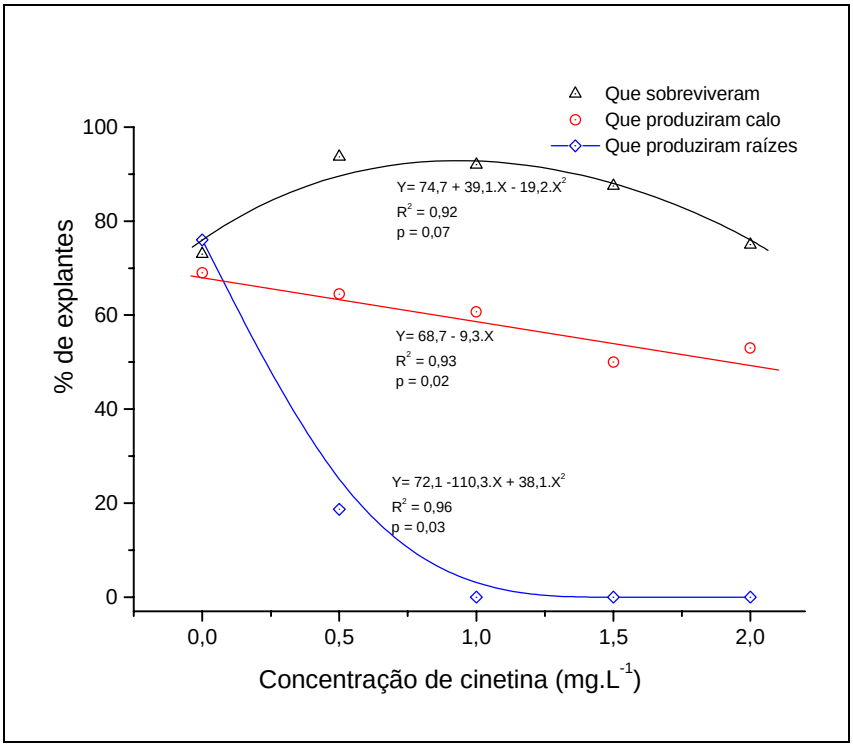


FIGURA 6. Influência das diferentes concentrações de cinetina no percentual de sobrevivência, formação de calos e raízes em entrenós de *Nicotiana tabacum* L.

Em explantes foliares foi observado que esses são mais dependentes de cinetina exógena para promover a regeneração, o que permitiu estabelecer uma curva de regressão linear altamente significativa ($p<0,006$) com coeficiente de determinação de 0,96, sugerindo que apenas 4% dos dados não são explicados pelo modelo utilizado. O percentual de explantes que formaram gemas aumentou quando foi aumentada a concentração de cinetina (Figura 7), sendo maior na máxima concentração testada (2,0 $mg.L^{-1}$) com um percentual 87,5% de explantes com gemas (Figuras 7 e 8). A ausência total de cinetina não proporcionou a indução e regeneração de gemas em explantes de folhas, mostrando que ao contrário dos entrenós, folhas não apresentam citocinina endógena suficiente que favoreça a regeneração. Já outras espécies como *Cajanus cajan,* por exemplo, requer uma combinação de duas citocininas para promover a regeneração de brotos a partir de explantes foliares (Dayal *et al.*, 2003). A regeneração de gemas a partir de discos foliares de morango (*Fragaria vesca*) foi obtida usando BAP na concentração de 3 $mg.L^{-1}$ (Alsheikh *et al.*, 2002).

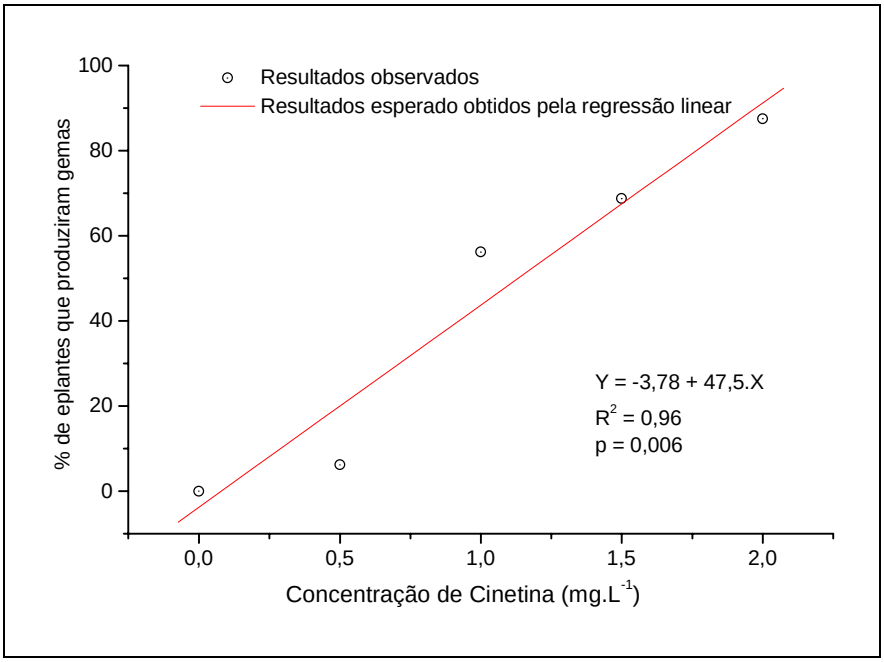


FIGURA 7. Influência das diferentes concentrações de cinetina no percentual de regeneração de gemas em folhas de *Nicotiana tabacum* L.

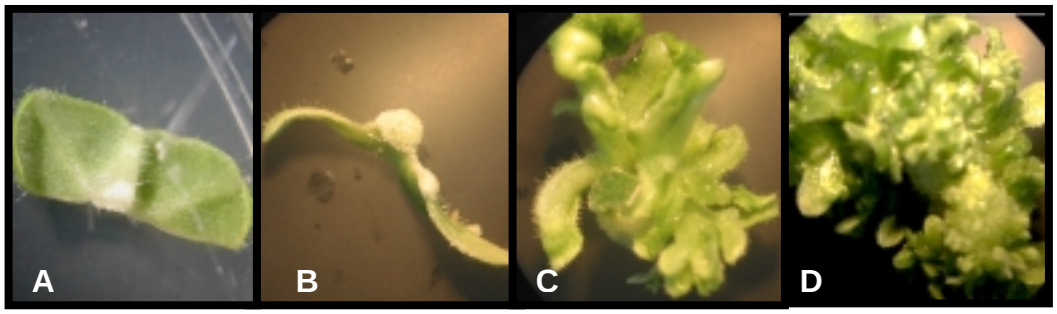


FIGURA 8. Etapas da regeneração de folha de tabaco cv. SR1 em meio de regeneração com 1,0 mg.L^{-1} de AIA e 2,0 mg.L^{-1} de cinetina. **A-** explante inicial; **B-** folha após 1 semana em cultura; **C-** folha após 2 semanas em cultura; **D-** folhas após 30 dias em cultura.

Em folhas a indução de calos foi significativamente menor, onde somente 25% dos explantes formaram calos (Figura 9). A formação de raízes nos explantes foliares foi suprimida pela presença da cinetina no meio (Figura 9) em concentrações superiores a 0,5 mg.L^{-1}. Um aumento progressivo da concentração do hormônio promoveu maior percentagem de sobrevivência dos explantes (Figura 9).

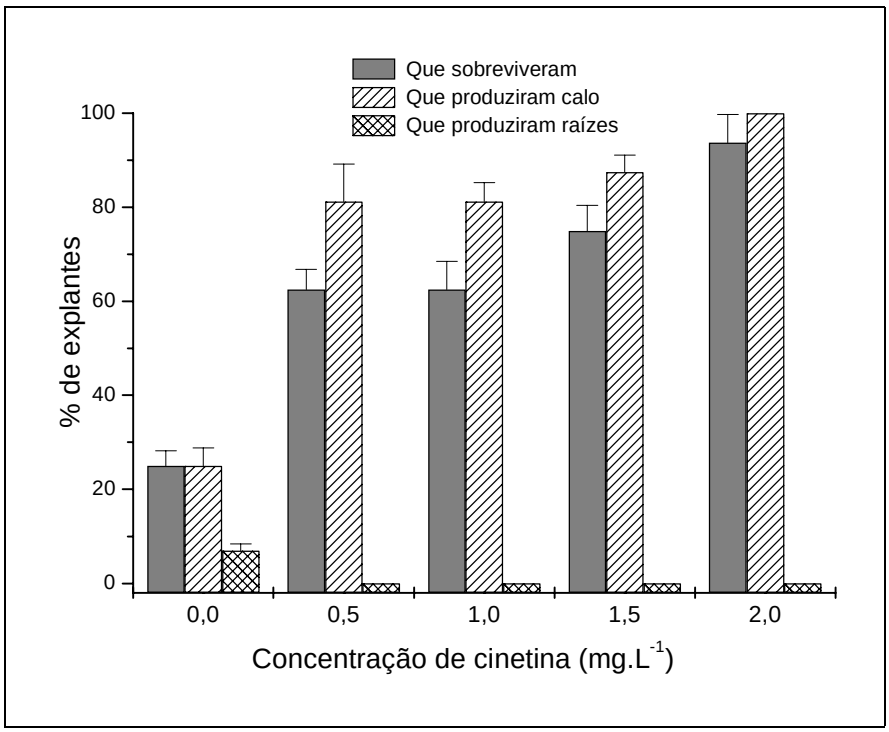


FIGURA 9. Influência das diferentes concentrações de cinetina no percentual de sobrevivência, formação de calos e raízes em folhas de *Nicotiana tabacum* L.

4.2 – Teste *in vitro* de tolerância ao agente de seleção - canamicina

Um sistema de seleção *in vitro* de explantes transformados é de grande valia como ferramenta para auxiliar no processo de seleção de plantas transformadas. Para otimizar o sistema de seleção *in vitro* em tabaco cv.SR1, foram estudados os efeitos sobre a regeneração de entrenós e folhas em diferentes concentrações de canamicina, pois a sensibilidade dos tecidos de plantas é dependente da espécie, do genótipo, do tipo de explante e do tipo de antibiótico (Alsheikh *et al.*, 2002).

Nos explantes foliares, a taxa de sobrevivência diminui conforme o aumento da concentração do antibiótico, sendo que a partir de 50 $mg.L^{-1}$ não houve a formação de gemas ou resposta celular dos explante cultivados. Somente os explantes controles e os que estavam na concentração de 25 $mg.L^{-1}$ produziram calos, e nesses últimos a taxa foi de 25% (Figura 10). Em estudos similares, concentrações acima de 25 $mg.L^{-1}$ promoveram necrose dos tecidos em *Fragaria vesca* e *Fragaria semperflorens* (Alsheikh *et al.*, 2002). Já em explantes de *Hevea brasiliensis* (seringueira) concentrações inferiores a 200 $mg.L^{-1}$ foram ineficazes para seleção de calos (Jayashree *et al.*, 2003). Para a seleção de protoplastos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. Petit Havana uma concentração de 25 $mg.L^{-1}$ não foi eficiente para inibir o seu desenvolvimento, mas concentrações a partir de 50 $mg.L^{-1}$ resultaram em diminuição do desenvolvimento dos protoplastos (Huang *et al.*, 2002). A canamicina em todas as concentrações testadas inibiu totalmente a produção de gemas e brotos em explantes foliares. Na concentração de 20 $mg.L^{-1}$ reduziu significativamente a regeneração de brotos, quando comparada ao controle, em explantes foliares de *Vaccinium corymbosum* (mirtilo) (Song & Sing, 2004). Horsh *et al.* (1985), utilizaram a concentração de 100 $mg.L^{-1}$ de canamicina para a seleção em explantes foliares de tabaco, mostrando que os explantes foliares da cv. SR1 são mais sensíveis ao antibiótico. A formação de raízes nos explantes foliares foi totalmente inibida pela presença do antibiótico em todas as concentrações testadas (Figura 10).

Para entrenós, a taxa de sobrevivência diminuiu conforme aumentou a concentração de canamicina. A partir de 100 $mg.L^{-1}$ não houve nenhuma resposta

dos explantes, enquanto que concentrações de 50 $mg.L^{-1}$ ou inferiores não foram suficientes para suprimir a formação de calos e gemas, mostrando que para a seleção de entrenós de tabaco cv. SR1 é necessária uma concentração de 100 $mg.L^{-1}$ para obter uma seleção eficiente (Figura 10). Respostas similares às encontradas no presente experimento foram verificadas para as cultivares de tomate ‘IPA-5’ e ‘IPA-6’, onde, na concentração de 50 $mg.L^{-1}$ de canamicina houve uma drástica redução na freqüência de regeneração, embora, tal concentração, não tenha sido eficiente para inibir completamente a formação de gemas (Costa *et al.*, 2000). Em cana-de-açúcar, requer-se uma concentração de 150 $mg.L^{-1}$ de canamicina para inibir completamente a formação de brotos primários nas cultivares, Co92061 e Co671 (Manickavassagam *et al.*, 2004).

Em *Vaccinium corymbosum* (mirtilo) as concentrações de 30 $mg.L^{-1}$ e 50 $mg.L^{-1}$ de canamicina promovem a inibição de brotos e oxidação do explante (Song & Sing, 2004). A canamicina a 75 $mg.L^{-1}$ foi um agente de seleção mais efetivo do que qualquer outra concentração de higromicina utilizada na seleção de *Citrus paradisi* (Costa *et al*., 2002).

A canamicina em todas as concentrações testadas também inibiu a formação de raízes em entrenós (Figura 10).

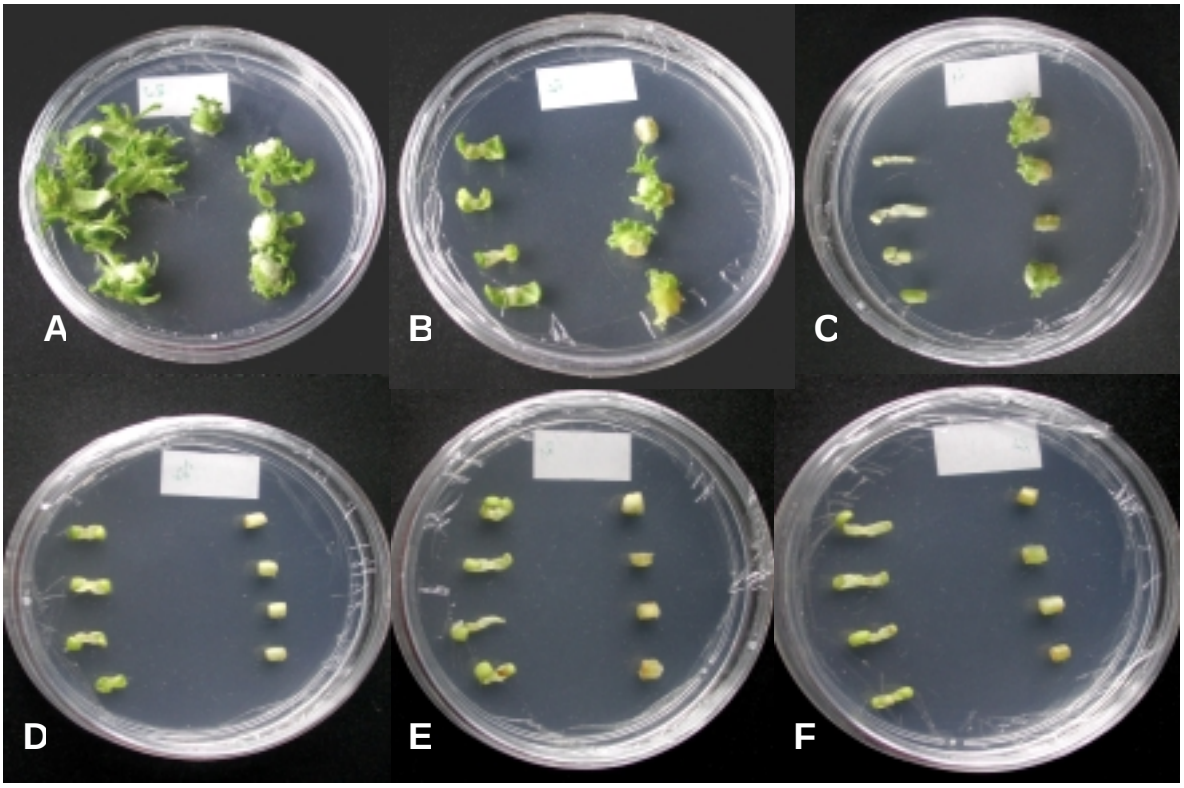


FIGURA 10. Influência da canamicina na regeneração de explantes de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) nas concentrações de: **A** - controle, meio de regeneração sem a presença de canamicina; **B** - com 25 $mg.L^{-1}$ de canamicina; **C** - com 50 $mg.L^{-1}$ de canamicina; **D** - com 100 $mg.L^{-1}$ de canamicina; **E** - com 150 $mg.L^{-1}$ de canamicina e **F** - com 200 $mg.L^{-1}$ de canamicina.

4.3 - Fatores que influenciam a eficiência de infecção de tabaco cv. SR1

4.3.1 - Tipo de explante

A maioria da literatura menciona o uso de discos foliares para o processo de transformação de tabaco (Thanavala *et al.*, 1995; Mason *et al.*, 1992; Hiatt *et al.*, 1989). No entanto, no intuito de otimizar o sistema de transformação, avaliou-se a eficiência de regeneração, após infecção de explantes de entrenós e folhas. Os resultados mostraram que os dois tipos de explantes diferem significativamente entre si ($p<0,05$), e a percentagem de regeneração foi de 93,3% e 57,8% para entrenós e folhas, respectivamente (Figura 11). Em relação ao controle, entrenós

e folhas quando co-cultivados em solução com *Agrobacterium* apresentaram uma significativa redução no percentual de regeneração. Em entrenós, após a infecção a taxa de regeneração foi de 46,7% enquanto que em folhas não houve regeneração (0%). O efeito negativo do processo de infecção pode ser verificado pela drástica redução da regeneração tanto verificado nos entrenós como a supressão total da regeneração em explantes foliares (Figura 11).

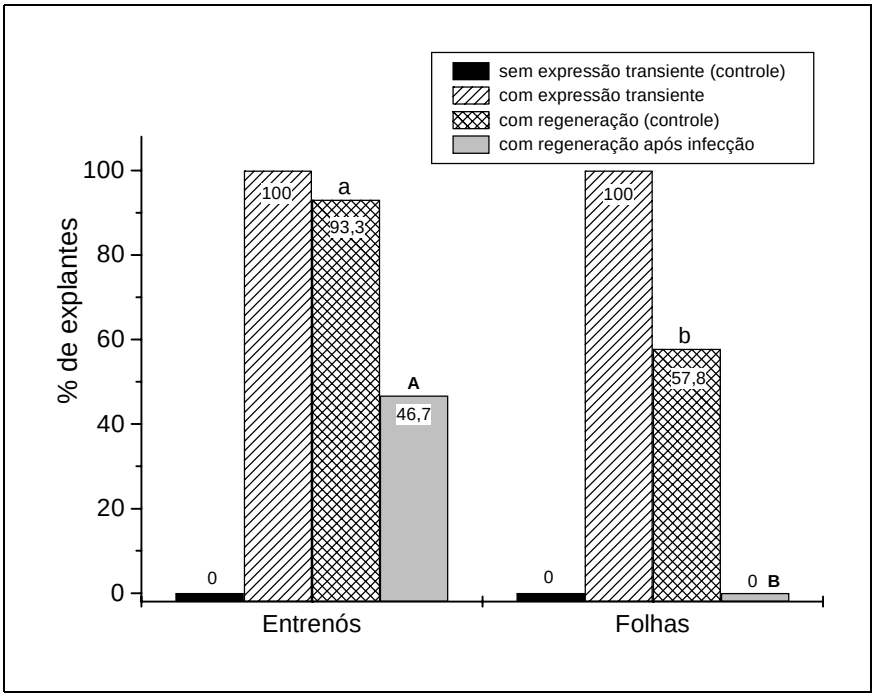


FIGURA 11. Eficiência de regeneração e expressão transiente observada nos explantes de entrenós e folhas de *Nicotiana tabacum* L. após infecção com *Agrobacterium tumefaciens*. Como teste de comparação de médias foi utilizado o teste t com médias seguidas de letras distintas variando ao nível de probabilidade ($p<0,05$).

A expressão transiente do gene *uid*A (GUS) após 24 horas em entrenós e folhas não transformadas (controle) foi negativo (0% de expressão transiente), esse resultado é esperado pois a expressão do gene só é detectada em explantes submetidos ao processo de transformação. Nos explantes submetidos à transformação, após 24 horas, foi observada a expressão do gene *uid*A (GUS) em 100% dos explantes, mostrando que entrenós e folhas não diferem significativamente ($p<0,05$) em relação a esse parâmetro (Figura 11). Mason *et al.*

(1992), utilizaram em seus experimentos discos foliares de *Nicotiana tabacum* cv. Sansun para transformação mediada por *Agrobacterium*. Já em cana-de-açúcar a eficiência de transformação obtida com botões axilares foi maior que as relatadas em gemas meristemáticas (Enriquez-Obregon *et al*., 1998) e explantes de calos através da transformação com *Agrobacterium* (Elliot *et al*., 1998).

4.3.2 - Pré-condicionamento do explante

Comparando ao controle, os explantes em pré-condicionamento de 4, 7 e 14 dias em meio de regeneração (MR), apresentaram um crescente aumento de regeneração (71,1%, 73,3% e 80%, respectivamente), mostrando que quanto maior o tempo de pré-condicionamento, maior é o percentual de regeneração. O tratamento via agroinjeção da planta doadora de explantes, foi o menos eficaz entre os tratamentos de pré-condicionamento, com taxa de regeneração de 17,7% (Figura 12).

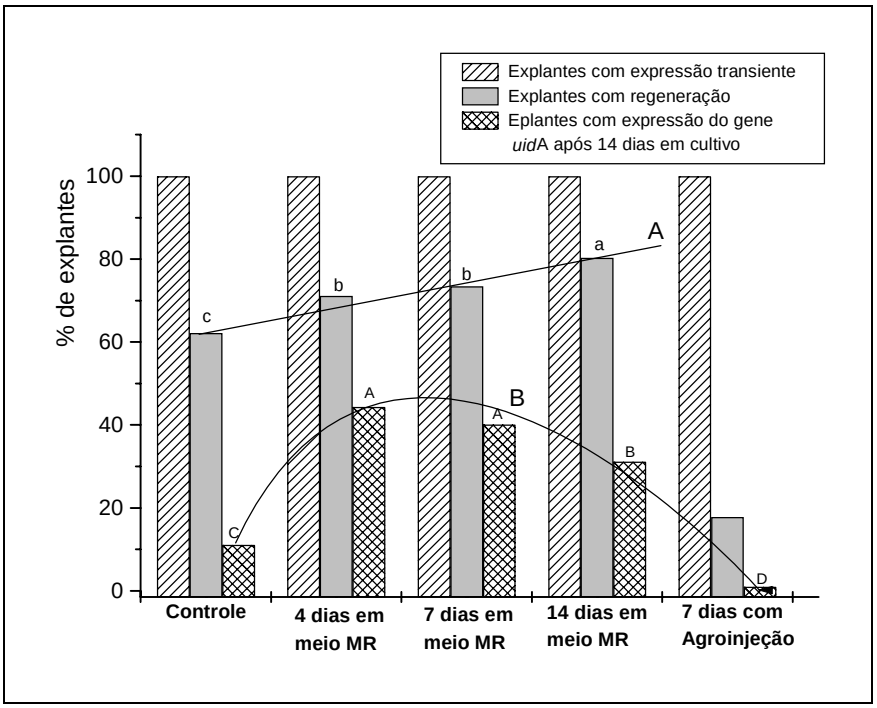


FIGURA 12. Comparação entre os diferentes sistemas de pré-condicionamento antes de submeter entrenós de *Nicotiana tabacum* L. à infecção com *Agrobacterium tumefaciens*. A – curva de regeneração e B – curva de infecção. Como teste de comparação de médias foi utilizado o teste t com médias seguidas de letras distintas variando ao nível de probabilidade ($p<0,05$).

A expressão transiente do gene *uid*A (GUS) após 24 horas de infecção foi observada para todos os métodos de pré-condicionamentos (Figura 12). A curva **A** da Figura 12 mostra que quanto mais longo o período de pré-condicionamento tanto maior a regeneração dos explantes. No entanto, observando-se a curva **B** observa-se que quanto maior o período de pré-condicionamento, tanto menor é a taxa de infecção.

Tanto sob o ponto de vista da regeneração quanto da infecção o pré-condicionamento mostrou-se eficaz. Combinando-se as taxas de regeneração e infecção, conclui-se que o melhor tratamento de pré-condicionamento foi o tratamento com quatro dias em meio de regeneração antes de proceder à infecção dos explantes. Um pré-condicionamento longo (12 dias) apesar de favorecer a regeneração reduz significativamente a taxa de infecção, isso decorre provavelmente em função da maior diferenciação celular já ocorrida nestes explantes (Figura 12). Um pré-condicionamento em meio com acetoseringona é indicado para a transformação de discos foliares de tabaco (Sunilkumar *et al.*, 1999). Em *Citrus paradisi* a percentagem de segmentos com brotos expressando o gene *uidA* (GUS) é considerada uma das mais informativas medidas da eficiência de transformação genética, e foi maior em explantes que não passaram por um pré-condicionamento, comparado a explantes com pré-condicionamento de 1 a 2 dias (Costa *et al.*, 2002). Em *Perilla frutenses*, o efeito de um pré-condicionamento mostrou uma redução na eficiência de transformação, onde apenas 27% dos explantes apresentaram atividade positiva da expressão do gene *uidA* (GUS) comparada aos explantes sem pré-condicionamento, com 40% dos explantes apresentando atividade positiva do gene *uidA* (GUS) (Kim *et al.*, 2004).

O processo da agroinjeção foi ineficaz como procedimento de pré-condicionamento, pois não apresentou expressão do gene *uidA* (GUS) em explantes tratados por esse procedimento (Figura 12). Este processo deverá ser aperfeiçoado ou combinado com outro procedimento para obter resultados satisfatórios.

4.3.3 - Meio de co-cultivo líquido para infecção por *Agrobacterium tumefaciens*

O percentual de regeneração de explantes submetidos aos meios MS+YEB, MS e YEB sem a presença de *Agrobacterium tumefaciens*, não diferiram significativamente (p<0,05), demonstrando que os meios de cultivo não influenciam na taxa de regeneração. Quando comparado ao controle, o percentual de regeneração de explantes submetidos aos diferentes meios com a *Agrobacterium*, os tratamentos constituídos de MS+YEB e YEB, apresentaram uma taxa de regeneração significativamente menor (60% e 55,5% respectivamente), e entre eles não houve diferença significativa (Figura 13). Já o tratamento composto de MS, onde a bactéria foi suspensa após centrifugação, não ocorreu diferença significativa na taxa de regeneração dos explantes, quando comparados aos tratamentos controles (Figura 13).

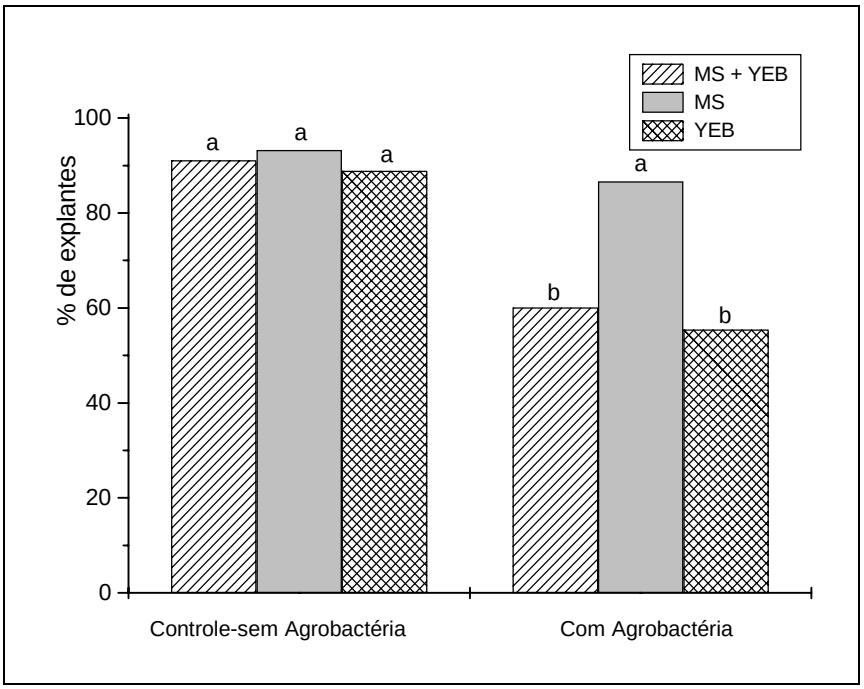


FIGURA 13. Meios de co-cultivo líquido sobre a eficiência de regeneração de entrenós de *Nicotiana tabacum* L. com *Agrobacterium tumefaciens*. Como teste de comparação de médias foi utilizado o teste t com médias seguidas de letras distintas variando ao nível de probabilidade (p<0,05).

Com relação à expressão do gene *uid*A (GUS) em calos de tabaco, o percentual em explantes controles foi de 0%, esse resultado é esperado por não ter havido infecção dos explantes. Já entre explantes submetidos à infecção entre os diferentes meios de co-cultivo houve diferença significativa (Figura 14). O melhor resultado entre os meios de co-cultivo foi observado para o tratamento com apenas MS+*Agrobacterium*, onde 37,7% dos explantes apresentaram expressão do gene *uidA* (GUS). Já entre os tratamentos MS+YEB e YEB isoladamente, não houve diferença significativa para expressão do gene *uidA* (GUS), tendo os mesmos apresentado 13,3% e 8,8% respectivamente (Figura 14).

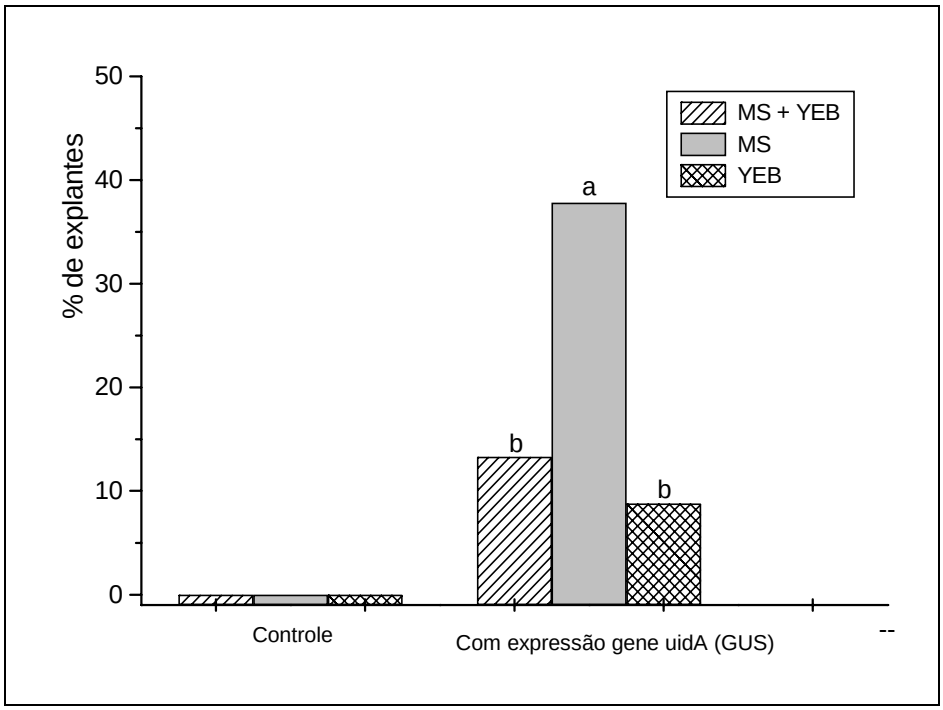


FIGURA 14. Meios de co-cultivo líquido sobre a eficiência da expressão do gene *uidA* (GUS) em entrenós de *Nicotiana tabacum* L. após 14 dias da infecção com *Agrobacterium tumefaciens*. Como teste de comparação de médias foi utilizado o teste t com médias seguidas de letras distintas variando ao nível de probabilidade ($p<0,05$).

4.3.4 - Tempo de imersão em *Agrobacterium tumefaciens*

Os entrenós foram incubados em solução de *Agrobacterium* por 10, 15 ou 20 min. Comparando-se a taxa de explantes apresentando expressão transiente após 24 horas de transformação, foi observado que a expressão é independente do tempo de imersão, pois todos os explantes apresentaram 100% de expressão depois de 10 minutos, não modificando no decorrer dos demais tempos avaliados (Figura 15).

Em relação ao percentual de regeneração, quanto maior o tempo de imersão, menor é taxa de regeneração, mostrando que ela é afetada negativamente quando os explantes permanecem por um período maior imerso no meio com *Agrobacterium* (Figura 15). Explantes de citrus incubados por 5, 10 ou 20 min em solução de Agrobacterium produziram mais brotos do que explantes incubados por 1 min, entretanto muitos desses brotos não apresentaram a expressão do gene *uid*A (GUS) (Costa *et al*., 2002).

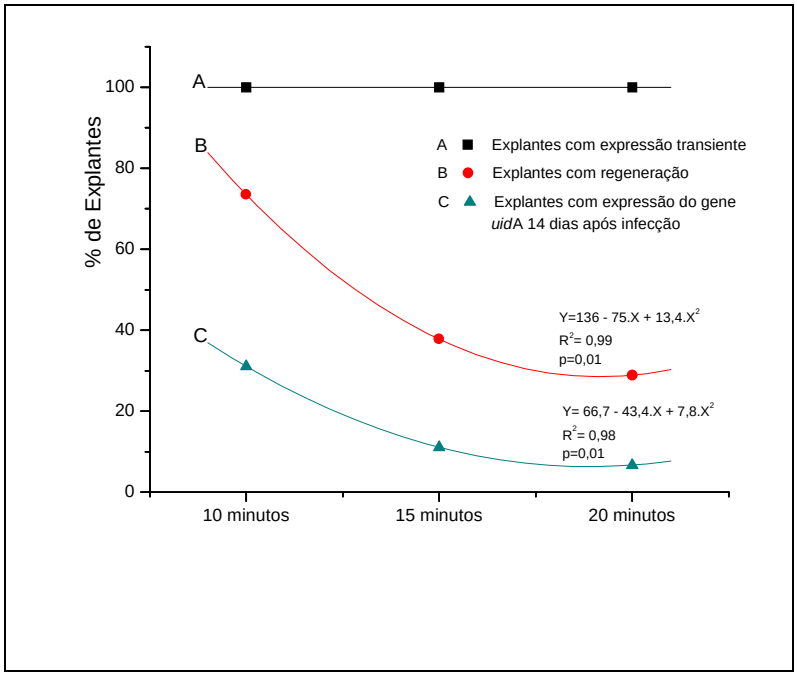


FIGURA 15. Exposição dos entrenós de *Nicotiana tabacum* L. a *Agrobacterium tumefaciens* por imersão no meio de co-cultivo líquido e efeitos sobre a infecção e expressão transiente do gene *uidA* (GUS) e expressão após 14 dias da infecção.

A expressão do gene *uid*A nos explantes após 14 dias de transformação foi negativamente influenciada pelo tempo de imersão, conforme observa-se na curva **C** da figura 15, onde verifica-se uma correlação negativa entre tempo de exposição e expressão do gene *uidA*. Em laranja umbigo Washington observou-se um fenômeno similar, onde qualquer tempo de imersão superior a 10 min, diminuiu a eficiência de transformação dos explantes (Bond & Roose, 1998).

Para entrenós de tabaco cv. SR1 o período de 10 min de imersão em solução bacteriana mostrou ser mais eficiente tanto para a regeneração como também para a transformação dos explantes, sendo as taxas de 86,6% e 35,5% respectivamente (Figura 15). Em morango (*Fragaria vesca*) o tempo ideal de imersão para transformação foi de 20 min, mas a maior freqüência da expressão do gene *uid*A em brotos regenerados foi com a imersão de 30 min (Alsheikh *et al.*, 2002).

Em virtude desses resultados foi testada também a diferença entre explantes totalmente imersos na solução e explantes onde apenas as extremidades entraram em contato com a solução. Foi escolhido o melhor tempo da etapa anterior que foi de 10 min, para testar esses dois parâmetros.

Quanto a expressão transiente do gene *uid*A (GUS), foi observado não houve influência do tipo de exposição do explante ao meio de imersão (totalmente imerso e não imerso). Quanto ao percentual de explantes regenerados, em relação ao controle, ambos os parâmetros mostraram diferença significativa ($p<0,05$), mas entre eles não foi encontrada diferença significativa para a taxa de regeneração dos explantes (Figura 16). O mesmo resultado pode ser observado quando avaliada a expressão do gene *uid*A (GUS) após 14 dias de infecção, mostrando que não há diferença em relação aos explantes totalmente imersos em solução bacteriana e explantes onde somente as extremidades foram imersas na solução, 31,2% e 35,4% dos explantes, respectivamente. No entanto, apesar de não haver diferença estatística, pelo aspecto visual do explante, pode-se considerar como tratamento melhor à exposição por contato e não por imersão.

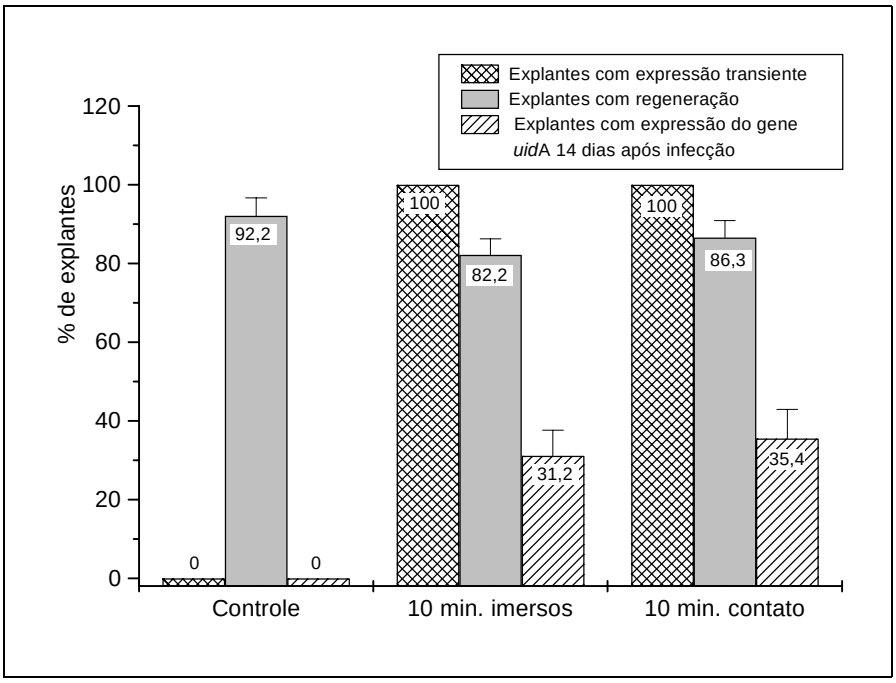


FIGURA 16. Exposição dos entrenós de *Nicotiana tabacum* L. a *Agrobacterium tumefaciens* por imersão no meio de co-cultivo líquido ou por contato das extremidades durante 10 min e sua resposta sobre a regeneração, expressão transiente do gene *uidA* (GUS) e expressão após 14 dias de infecção. Como teste de comparação de médias foi utilizado o teste t ($p<0,05$).

4.3.5 - Tempo de co-cultivo semi-sólido

Foram testados dois tempos de co-cultivo em meio semi-sólido, 24 e 48 horas. Avaliou-se a expressão transiente do gene *uid*A (GUS), onde foi constatado que o período de co-cultivo não influenciou a taxa de expressão, pois 100% dos explantes em ambos os períodos apresentaram a expressão transiente (Figura 17). Já em relação a percentagem de regeneração houve diferença significativa ($p<0,05\%$) entre os tratamentos, sendo que quanto maior o período de co-cultivo, menor foi a taxa de regeneração do explante. Períodos prolongados de co-cultivo induzem a um excessivo crescimento da *Agrobacterium* o que se manifesta negativamente sobre o explante quando colocado para a regeneração, além de exigir uma lavagem mais severa com antibiótico o que também contribui para a redução na regeneração. Esses resultados foram corroborados em trabalhos com

Pinus pinea onde se observou que períodos prolongados de co-cultivo resultam em necrose dos explantes (Humara *et al.*, 1999). Um período de cinco dias de co-cultivo resulta em um supercrescimento da *Agrobacterium* causando uma menor eficiência de regeneração de brotos transformados e alguns casos resulta na morte do explante (Cervera *et al*.,1998).

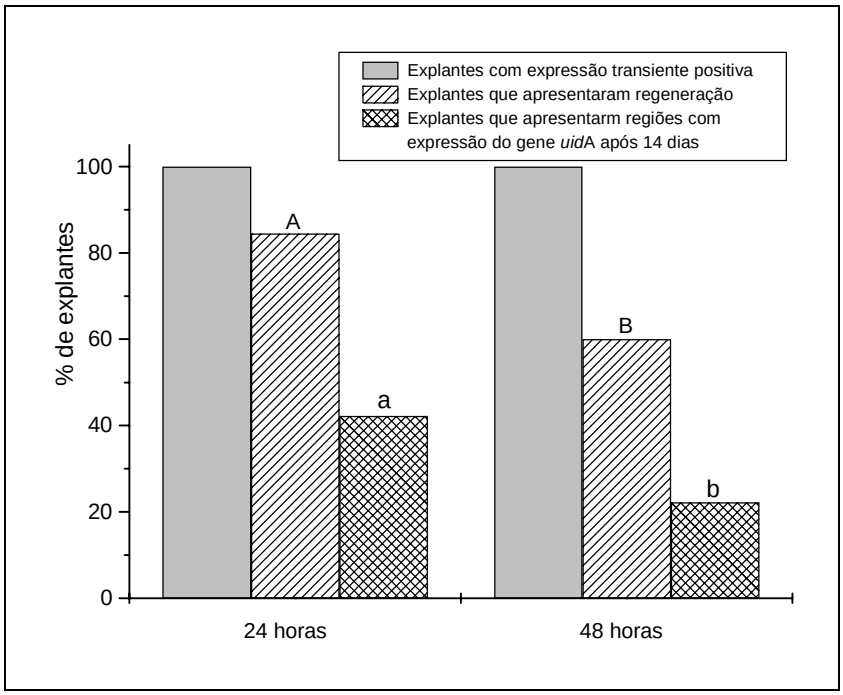


FIGURA 17. Influência do tempo de co-cultivo (24 e 48 h) de entrenós de *Nicotiana tabacum* L. em meio semi-sólido sobre a regeneração, expressão transiente do gene *uidA* (GUS) e expressão após 14 dias de infecção. Como teste de comparação de médias foi utilizado o teste t com médias seguidas de letras distintas variando ao nível de probabilidade (p<0,05).

Quando foi avaliada a expressão do gene *uid*A (GUS) em explante após 14 dias de infecção, verificou-se que quanto maior o período de co-cultivo, menor é o número de regiões com expressão *uid*A (GUS) (Figura 17). A duração do período de co-cultivo é um dos fatores que afetam a eficiência de transformação, no entanto é muito variável entre diferentes espécies (Kondo *et al*., 2000). Cao *et al*. (1998), sugerem que a baixa eficiência de transformação em maçã foi devido a um período insuficiente de co-cultivo, já um período entre dois a quatro dias aumentou

a expressão do gene *uid*A (GUS) (De Bondt *et al.* 1994). Em alho, um período de três dias de co-cultivo mostrou uma maior expressão do gene *uid*A (GUS) comparado com um e dois dias (Kondo *et al.*, 2000). Em explantes foliares de mirtilo, o número de regiões expressando o gene *uid*A (GUS) aumentou quando aumentado o tempo de co-cultivo (Cao *et al*., 1998). Para cana-de-açúcar, um período maior que três dias reduziu a freqüência de transformação devido ao supercrescimento bacteriano, e cinco dias inibiu a regeneração de brotos (Manickavasagam *et al.*, 2004).

Para o explante de tabaco cv. SR1 um período de co-cultivo de 24h mostrou maior eficiência de regeneração e infecção, quando comparado ao de 48h, tornando esse período mais indicado para a infecção dessa cultivar.

4.3.6 - Lavagem dos explantes

Na figura 18, observa-se que a lavagem com antibióticos afeta significativamente ($p<0,05$) o potencial de regeneração dos explantes, independentemente de qual tipo de antibiótico e o tempo de lavagem. Isso demonstra que embora se considere células eucarióticas pouco suscetíveis a antibióticos, esses afetam negativamente a viabilidade celular para uma normal regeneração. Assim, a lavagem dos explantes torna-se uma variável importante durante o processo de transformação genética de plantas. O efeito negativo do antibiótico se acentua, à medida que o tempo de lavagem for maior. Assim, o efeito da lavagem por 20 minutos foi significativamente mais severa que a lavagem por 10 min para todos os antibióticos.

Quando os explantes foram submetidos a um período de lavagem de 10 min, a eficiência de regeneração dos explantes lavados com vancomicina e carbenicilina+cefotaxima, diferiu significativamente do controle, com 46,6% e 51,1%, respectivamente, dos explantes apresentando regeneração, mas quando lavados com tetraciclina + cefotaxima, não houve diferenças na taxa de regeneração em relação ao controle, mostrando que tetraciclina+cefotaxima, tem menos efeito negativo sobre a regeneração do explante (Figura 18). Para *Fragaria*

vesca a regeneração a partir de discos foliares foi pouco inibida pelo antibiótico carbenicilina, mas secções do pecíolo mostraram-se mais sensíveis para todos os antibióticos testados (Alsheikh *et al.*, 2002).

A cefotaxima em uma concentração de 250 mg. L^{-1} causou decréscimo no número de brotos por explante, em *Vaccinium corymbosum* L. nas cv. Aurora e Bluecrop, mas não para as cv. Brigitta e Legacy (Song & Sing, 2004). Em *Pyrus communis* foram utilizados 500 mg.L^{-1} do antibiótico cefotaxima para eliminar a *Agrobacterium* (Matsuda *et al.*, 2005). A cepa de *Agrobacterium* C58 é menos sensível a ação de antibióticos, e altas concentrações de carbenicilina podem não ser eficientes para o controle do seu crescimento (Alsheikh *et al.,* 2002). Em explantes de *Perilla frutenses,* a cepa EHA 105 de *Agrobacterium* residual foi controlada através da lavagem dos explantes com 500 mg.L^{-1} de cefotaxima, onde após lavagem não foi observada nenhuma bactéria residual sobre o explante (Kim *et al.*, 2004).

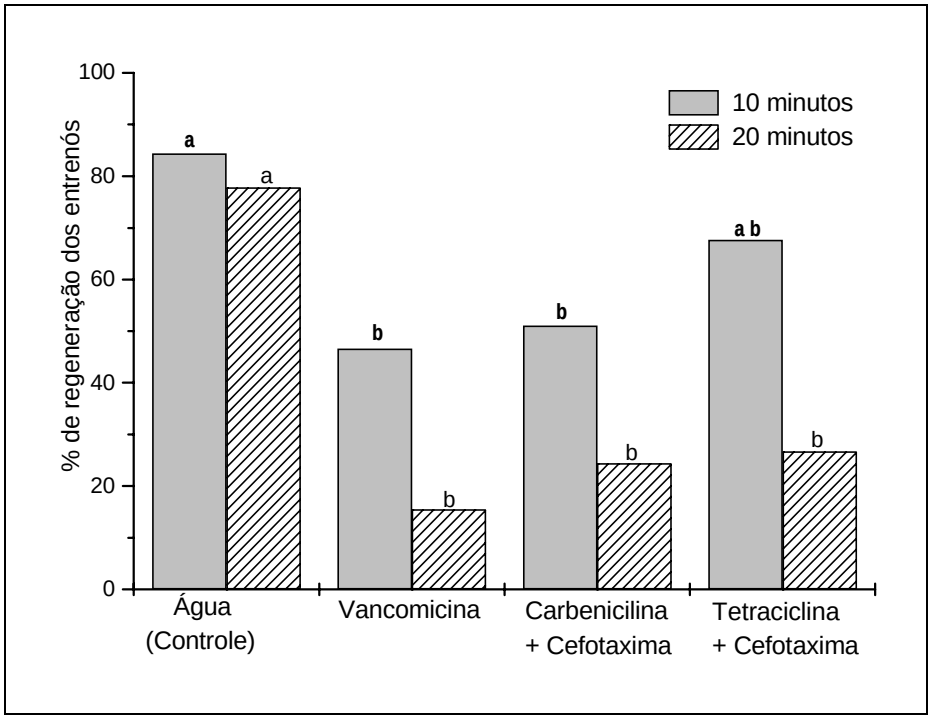


FIGURA 18. Eficiência de regeneração de entrenós de *Nicotiana tabacum* L. após lavagem com diferentes antibióticos e dois distintos tempos de lavagem (10 e 20 min). Como teste de comparação de médias foi utilizado o teste t com médias seguidas de letras distintas variando ao nível de probabilidade ($p<0,05$).

4.3.7 - Presença da canamicina no meio de regeneração

Conforme apresentado na figura 19, quando os entrenós foram cultivados em meio de cultura sem agente de seleção (canamicina), não houve diferença significativa ($p<0,05$) na taxa de regeneração dos explantes controles (77,7%) e os submetidos à transformação (68,8%). Resultado similar, porém em taxa bem inferiores foi encontrado em explantes que permaneceram em meio de regeneração com agente de seleção, onde somente 6,6% dos explantes submetidos à infecção apresentaram alguma regeneração, enquanto que os explantes controle também apresentaram drástica redução na sua capacidade de regeneração, demonstrando que o principal fator de redução da capacidade de regeneração de gemas em explantes não é o processo de infecção, mas sim a presença do agente de seleção no meio de cultura.

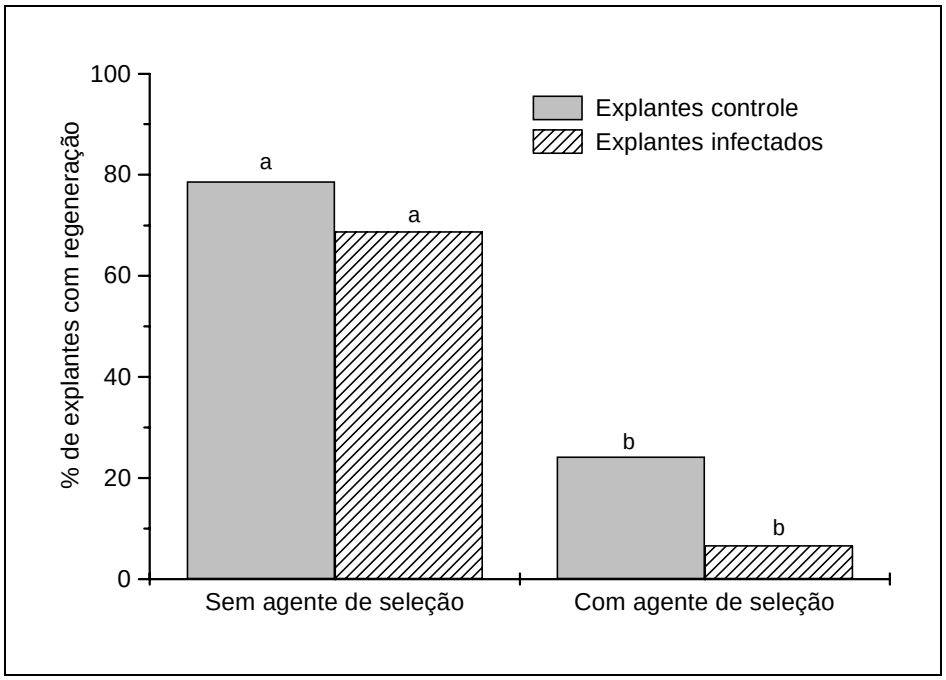


FIGURA 19. Eficiência de regeneração de entrenós de *Nicotiana tabacum* L. quando cultivados em meio de regeneração (MS + 1,0 mg. L^{-1} de AIA + 1,0 mg. L^{-1} de cinetina) contendo como agente de seleção o antibiótico canamicina (100 mg. L^{-1}) e antibiótico inibidor do crescimento bacteriano (cefotaxima 100 mg. L^{-1}). Como teste de comparação de médias foi utilizado o teste t com médias seguidas de letras distintas variando ao nível de probabilidade ($p<0,05$).

Durante o processo de transformação genética dos explantes, apenas um pequeno número de células tratadas são transformadas enquanto que a maioria das células permanece não transformada (Joersbo & Okkels, 1996). Normalmente, apesar das células transformadas terem a capacidade de sobreviver, por possuir um gene de resistência, quando as outras células se tornarem apoptóticas, as células transformadas dentro do tecido não transformado, reduzem sensivelmente sua viabilidade ou mesmo a capacidade de regenerarem plantas transformadas. Por essa razão, e pelas baixas taxas de regeneração dos entrenós em meio de regeneração contendo canamicina, recomenda-se o não uso do agente de seleção e desenvolver outra estratégia de "*screening*" e seleção das plantas regeneradas.

4.4- Regeneração de plantas de tabaco após infecção com *Agrobacterium tumefaciens*

Uma das metas do trabalho de transformação genética do tabaco era a obtenção de plantas geneticamente modificadas que fossem capazes de expressar a proteína HBsAg, que dependendo dos níveis de expressão no tecido vegetal, seria utilizada para a produção da vacina contra a hepatite B, a um custo menor do que a produzida através de levedura. Obteve-se mais de 100 plantas regeneradas a partir de explantes infectados (Figura 20). No entanto, pela análise com ensaio histoquímico, não foi possível comprovar a expressão do gene *uidA* (GUS) de forma estável, nas folhas das plantas regeneradas após um período de aproximadamente de dois a três meses após a infecção, o que nos leva a crer que não houve uma eficiente infecção de plantas de tabaco que expressem o antígeno desejado, já que o gene repórter (*uidA*) (GUS), de seleção (*nptII*) e o gene de interesse (*hbsag*) encontram-se no mesmo cassete de expressão. A ausência da expressão dos genes nas plantas regeneradas pode ter ocorrido devido a uma ineficiência da *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 em transferir e inserir o gene de forma estável ao genoma da planta, em conseqüência de uma provável inativação (mutação) de genes da região *vir* responsáveis por esse processo.

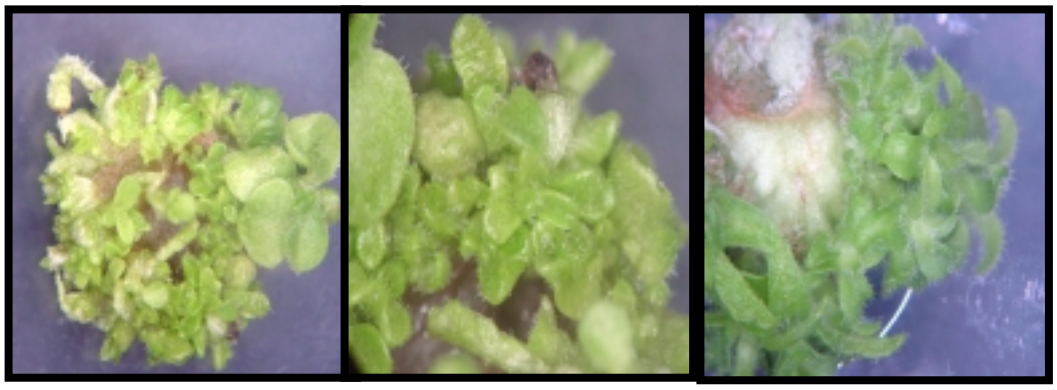


FIGURA 20. Eficiência de regeneração de entrenós de tabaco cv.SR1, após infecção com *Agrobacterium tumefaciens*, quando os explantes foram pré-condicionados em meio de regeneração antes da infecção e cultivadas em meio de regeneração MS + 1,0 $mg.L^{-1}$ de AIA e 1,0 $mg.L^{-1}$ de cinetina.

A expressão do antígeno HBsAg não foi medida, apenas uma avaliação indireta utilizando o ensaio histoquímico foi utilizado para detectar a atividade do gene *uidA* (GUS) nos tecidos submetidos a infecção (Figura 21), já que a presença do gene repórter justamente é utilizado como referencial indicador da transformação.

Essas plantas poderão ser analisadas por outras técnicas para confirmar se o gene de interesse se encontra efetivamente presente no genoma das plantas infectadas e também em virtude desses resultados, outros testes deverão ser realizados para confirmar o potencial de infecção da cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1.

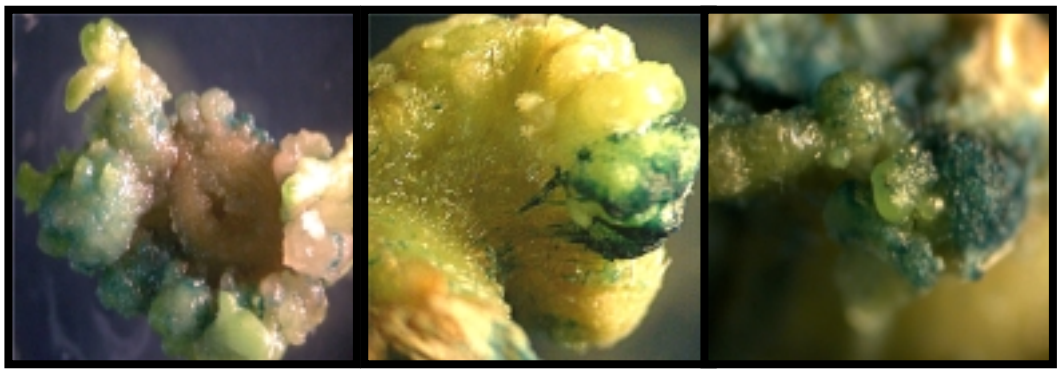
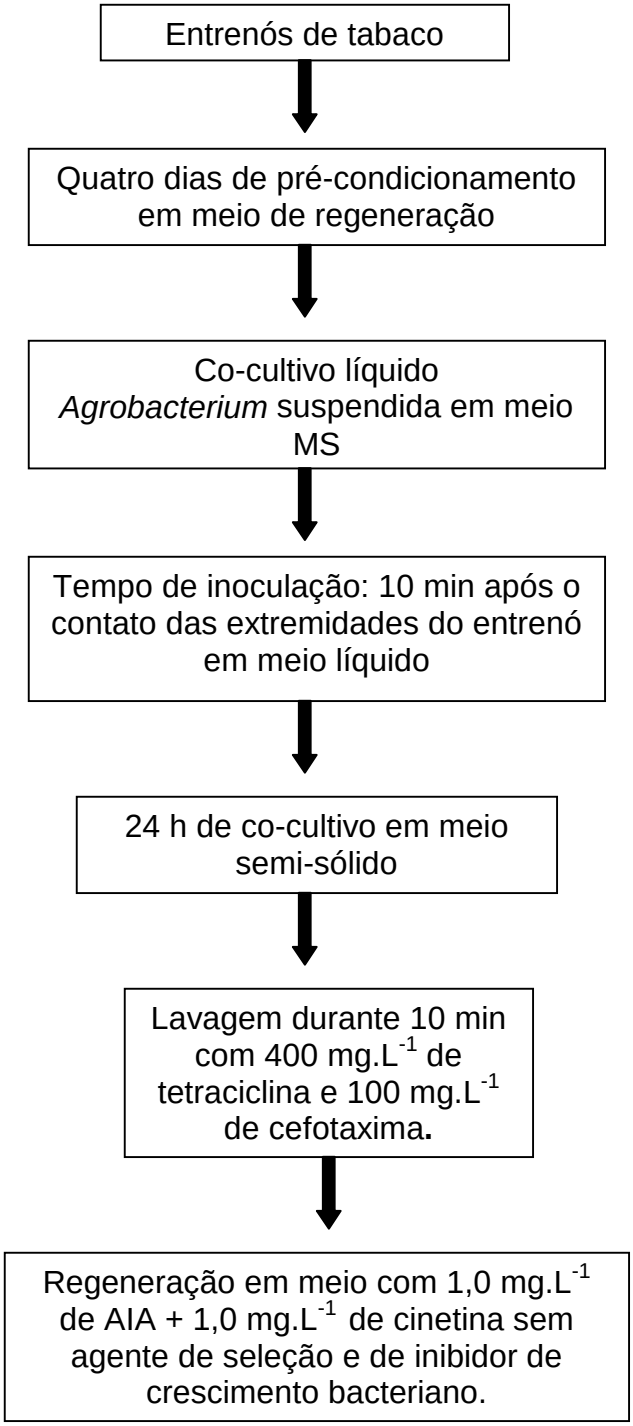


FIGURA 21. Calos e regiões meristemáticas de tabaco cv. SR1 transformados apresentando a expressão de gene *uidA* (GUS) após 14 dias de infecção com *Agrobacterium tumefaciens*.

4.5 - Resumo do protocolo otimizado

Os resultados obtidos na regeneração, seleção e infecção por *Agrobacterium tumefaciens* C58C1, permitiram em conjunto a adequação de um protocolo para a transformação genética de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cv. SR1 para fins de expressão heteróloga do antígeno HBsAg.



5. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que:

- entrenó e folha, podem ser utilizados no processo de regeneração, porém entrenós demonstraram ser mais tolerantes ao processo de infecção mantendo elevado sua capacidade de regeneração.

- para seleção *in vitro*, a canamicina na concentração de 50 $mg.L^{-1}$ e 100 $mg.L^{-1}$ foi eficiente para inibir a regeneração de folha e entrenó, respectivamente;
- a otimização dos fatores de infecção por *Agrobacterium tumefaciens*, permitirá maior eficácia no processo que utiliza tabaco cv. SR1.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alsheikh, M.K., Suso, H.P., Robson, M., Battey, N.H. & Wetten, A. (2002). Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic-sensitive *Fragaria vesca* and *F. v. semperflorens.* **Plant Cell Reports** 20, 1173-1180.

Ayub, R.A, Guis, M., Bem, M.A., Lanche, A., Bouzayen, M. & Pech, J.C. (1996). Expression of ACCoxidase antisense gene inhibits of cantaloupe melon fruits. **Nature Biotechnology** 14, 862-866.

Bell, R.L., Scorza, R., Srinivasan, C. & Webb, K. (1999) Transformation of 'Beurre Bosc' pear with the *rolC* gene. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 124, 570-574.

Bhaskaran, S. & Smith, R.H. (1990). Regeneration in cereal tissue culture: a review. **Crop science** 3, 1328-1336.

Bond, J.E. & Roose, M.L. (1998). *Agrobacterium* mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. **Plant Cell Reports** 18, 229-234.

Brasileiro, A.C.M. & Dusi, D.M.A. (1999). In: Torres, A.C., Caldas, L.S. & Buso, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas** 2, 679-735.

Cao, X., Liu, Q., Rowland, L.J. & Hammerschlag, F.A. (1998). GUS expression in blueberry (*Vaccinium* spp.): factors influencing *Agrobacterium*-mediated gene transfer efficiency. **Plant Cell Reports** 18, 266-270.

Cervera, M., Pina, J.A, Juarez, J., Navarro, L. & Peña, L. (1998). *Agrobacterium* mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports** 18, 271-278.

Chaturvedi, H.C. & Mitra, G.C. (1974). Clonal propagation of citrus from somatic callus culture. **HortScience** 9, 118-120.

Chilton, M.D. (1983). A vector for introducing new genes into plants. **Sci. Amer.** 248, 36-45.

Cid, L.P.B. (1998). Suspensão celular. In: Torres, A.C., Caldas, L.S, & Buso, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas** 1,331-353.

Costa, M.G.C., Nogueira, F.T.S., Otoni, W.C. & Brommonschenkel, S.H. (2000).Transformação genética de cultivares de tomateiro industrial mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 12, 107-118.

Costa, M.G.C., Otoni, W.C. & Moore, G.A. (2002). An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. **Plant Cell Reports** 21, 365-373.

Daniell, H., Streatfield, S.J. & Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccine in plants. **Trends in Plant Science** 5, 219-226.

Dayal, S., Lavanya, M., Devi, P. & Sharma, K.K. (2003). An efficient protocol for shoot regeneration and genetic transformation of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] using leaf explants. **Plant Cell Reports** 21, 1072-1079.

Davies, P.J. (1990). Plant hormones and their role in plant growth. **Netherlands: Kluwer Academic Publishers**, 681.

Davies, P.J. (1995). The plant hormones: their nature, occoruences and functions. In: Davies, P.J. (Ed). **Plant hormones, phisiology, biochemistry and molecular biology** 1, 1-13.

De Bondt, A., Eggermont, K., Druart, P., Devil, M., Goderis, I., Vanderleyden, J. & Broekaert, W.F. (1994). Agrobacterium-mediated transformation of apple (*Mallus domestica*, Borkh): and assenment of factors affecting gene transformation steps. **Plant Cell Reports** 13, 587-593.

De Block, M., Botterman, J., Vandewilie, M., Dekx, J., Thoen, C., Gosselé, V., Movva, N.R., Thopson, C., Van Montagu, M. & Leemans, J. (1987). Ingeenering herbicide in plants by expression of detoxifying enzyme. **EMBO Journal** 9, 2513-2518.

Dogan, B., Mason, H.S., Richter, L., Hunter, J.B. & Shuler, M.L. (2000). Process options in hepatitis B surface antigen extraction from transgenic potato. **Biotechnology Progress** 16, 435-441.

Dufour, M. (1990). Improving yield of adventitious shoots in apple. **ACTA Horticulturae**, 51-60.

Elliot, A.R., Campbell, J.A., Brettell, R.I.S. & Christopher, P.L. (1998). *Agrobacterium* mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. **Journal Plant Physiology** 25, 739-743.

Enriquez-Obregon, G.A, Vazquez-Padron, R.I., Pieto-Samsonov, D.L., Dela Riva, G.A. & Selman-Housein, G. (1998). Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium* mediated transformation. **Planta** 206, 20-27.

Fang, G. & Grumet, R. (1990). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. **Plant Cell Reports** 9, 160-164.

Ferreira, M.E., Caldas, L.S., & Pereira, E.A. (1998). Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: Torres, A.C., Caldas, L.S. & Buso, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas** 1,21-43.

Filho, N.D., Cascardo, J.C.M., & Fontes, E.P.B. (1999). Clonagem molecular e isolamento de genes. In: Torres, A.C., Caldas, L.S. & Buso, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas** 2, 653-677.

Fisher, R. & Emans, N. (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. **Transgenic Research** 9, 279-299.

Fisher, R., Hoffmann, K., Schillberg, S. & Emans, N. (2000). Antibody production by molecular farming in plants. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents** 14, 83-92.

Fischer, R., Twyman, R.M. & Schillberg, S. (2003). Production of antibodies in plants and their use for global health. **Vaccine** 21, 820-825

Gao, Y., Ma Y., Li, M., Cheng, I., Li, S.W., Zhang, J. & Xia, N.S. (2003). Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg. **World Journal of Gastroenterology** 9, 996-1002.

George,E.F. & Sherrington, P.D. (1984). Plant propagation by tissue culture. **Eversley: Exegetics**, 709.

Giacometti, D.C. (1990). Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In Torres, A.C. & Caldas, L.S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**, 19-28.

Giddings, G. (2001). Transgenic plants as protein factories. **Current Opinion in Biotechnology** 12, 450-454.

Gleba, D., Borisjuk, N., Borisjuk, L.G., Kneer, R., Poulev, A., Skarzhinskaya, M., Dushenkov, S., Logendra, S., Gleba, Y.Y. & Raskin, I. (1999). Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 96, 5973-5977.

Goh, C.J., Sim, G.E., Morales, C.L. & Loh, C.S. (1995). Plantlet regeneration through different morphogenic pathways in pommelo tissue culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 43, 301-303.

Gonsalves, C., Xue, B., Yepes, M., Fuchs, M., Ling, K. & Namba, S., Chee, P. & Slightom, J.L. & Gonsalves, D. (1994). Transferring Cucumber Mosaic Virus- White leaf strai coat protein gene into *Cucumis melon* l. and evaluating transgenic plants for protection against infections. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 119, 345-355.

Grattapaglia, D. & Machado, M.A. (1998). Micropropagação. In: Torres, A.C., Caldas, L.S, & Buso, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas** 1,183-260.

Gray, D.J., Mc Colley, D.W. & Comptom, M.E. (1993). High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 118, 425-432.

Guerra, M.P., Torres, A.C. & Teixeira, J.B. (1999). Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres, A.C., Caldas, L.S, & Buso, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas** 2, 533-568.

Guis, M., Bem, M.A., Latche, A., Pech, J.C. & Roustan, J.P. (2000). A reliable system for the transformation of cantaloupe charentais melon (*Cucumis melo* L. var. *Cantalupensis*) leading to a marjority of diploid regenerants. **Scientia Horticulturae** 84, 91-92.

Guis, M., Latché, A., Pech, J.P. & Roustan, J.P. (1997). An efficient method for the production of diploids Cantaloup Charentais Melon (*Cucumis melo* L var. *Cantalupensis*) by somatic embryogenesis. **Sciencia Horticulturae** 4, 323-327.

Handro, W. & Floh, E.I.S. (1990). Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: Torres, A.C., & Caldas, L.S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**, 203-212.

Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van-Montagu, M. & Schell, J. (1983). Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a ti-plasmid derived vector. **Nature** 303, 209-213.

Hiatt, A., Cafferkey, R. & Bowdish, K. (1989). Production of antibodies in transgenic plants. **Nature** 342, 76-78.

Hooykaas, P.J.J. & Beijersbergen, A.G.M. (1994). The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Annual Review of Phytopathology** 32, 157-179.

Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. & Fraley, R.T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. **Science** 227, 1229-1231.

Huang, F.C., Klaus, S.M.J., Herz, S., Zou, Z., Koop, H.U. & Golds, T.J. (2002). Efficient plastid transformation in tobacco using the *aphA*-6 gene and kanamycin selection. **Molecular Genetic Genomics** 268, 19-27.

Huang, Z. & Mason, H.S. (2004). Conformational analysis of hepatitis B surface antigen fusions in *Agrobacterium*-mediated transient expression system. **Plant Biotechnology Journal** 2, 241-249.

Humara, J.M., López, M. & Ordás R.J. (1999). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assesment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer. **Plant Cell Reports** 19, 51-58.

Jayashree, R., Rekha, K., Venkatachalam, P., Uratsu, S.L., Dandekar, A.M., Jayasree, P.K., Kala, R.G., Priya, P., Kumari, S.S., Sobha, S., Ashokan, M.P., Sethuraj, M.R. & Thulaseedharan, A. (2003). Genetic transformation and regeneration of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) transgenic plants with a constitutive version of an anti-oxidative stress superoxide dismutase gene. **Plant Cell Reports** 22, 201-209.

Jefferson, R.A. (1989). The Gus reporter gene system. **Nature** 342, 837-838.

Jefferson, R.A., Burguess, S.M. & David, H. (1986). β-glucoronidase from *Escherichia coli* as a gene fusion marker. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 83, 8447-8451.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. & Bevan, M.W. (1987). Gus fusions: β-glucoronidase as a sensitive versatile gene fusion marker in highes plants. **EMBO Journal** 6, 3901-3907.

Jia, R.S, Yang, M.Z., Ott, R. & Chua, N.H. (1989). High frequency of transformation of *Kalanchoe laciniata*. **Plant Cell Reports** 8, 336-340.

Joersbo, M. & Okkels, F.T. (1996). A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. **Plant Cell Reports** 16, 219-221.

Kamenickà, A. & Rypak, M. (1989). The regeneration of *Actinidia chinensis* Pl. cultured *in vitro*. **Polnohospodarvo** 9, 811-818.

Kapusta, J., Modelska, A., Figlerowicz, M., Pniewski, T., Letellier, M., Lisowa, O., Yusibov, V., Koprowski, H., Pluciennczak, A. & Legocki, A.B. (1999). A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. **A Plant-Derived Vaccine** 13, 1796-1799.

Karp, A. (1994). Can genetic instability be controlled in plant tissue culture ? **ABCTP Notícias** 22, 2-8.

Karp, A. (1995). Somaclonal variation as tool for crop improvement. **Euphytica** 85, 295-302.

Kawashima, C.G., Babá, E.H. & Hansen, E. (2001). Expression of recombinant hepatitis B virus antigen HBsAg in transgenic plant callus. **Protein and Peptide Letters** 2, 97-100.

Kerbauy, G.B. (1999). Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: Torres, A.C., Caldas, L.S. & Buso, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas** 2, 519-531.

Kim, K.H., Lee, Y.H., Kim, D., Park, Y.H., Lee, J.Y., Hwang, Y.S. & Kim, Y.H. (2004) *Agrobacterium* - mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. **Plant Cell Reports** 6, 386-390.

Klee, H.J., Horsch, R.B. & Roggers, S.G. (1987). *Agrobacterium* mediated plant transformation and its further applications to plant biology. **Annual Review of Plant Physiology** 38, 467-486.

Kondo, T., Hasegawa, H. & Suzuki, M. (2000). Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. **Plant Cell Reports** 19, 989-993.

Kumar, G.B.S., Ganapathi, T.R., Revathi, C.J., Prasad, K.S.N. & Bapat, V.A. (2003). Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures. **Protein Expression and Purification** 32, 10-17.

Kusnadi, A., Nikolov, Z.L. & Howard, J.A. (1997). Production of recombinant proteins in transgenic plants: pratical considerations. **Biotechnology and Bioengineering** 56, 473-484.

Lacorte, C. β-glucoronidase. (1998). In: Brasileiro, A.C.M. & Carneiro, V.T.C. **Manual de Transformação Genética de Plantas** 8, 127-141.

Lee, Y.W., Jin, S. Sim, W.S & Nester, E.W. (1995). Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the Vir A protein of *Agrobacterium tumefaciens*. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America** 92, 12245-12249.

Lee, H.S., Lee, J.I., Ryu, S.N. & Hur, H.S. (1994). Effect of low temperature growth regulators on callus induction and plant regeneration in anther culture of perilla. **Journal of genetics and Breeding** 26, 345-352.

Li, B., Huang, W. & Bass, T. (2003). Shoot production per responsive leaf explant increases exponentially with explant organogenic potential in *Nicotiana* species. **Plant Cell Reports** 22, 231-238.

Lin, J.J., Ma, J., Garcia-Assad, N. & Kuo, J. (1996). Higromycin B as na efficient antibiotic for the selection of transgenic plants. **Technical Focus** 18, 47-49.

Lundblad, R.L. & Kingdon, H.S. (1999). Molecular pharming. **Biotechnology and Applied Biochemistry** 30, 99-100.

Lutova, L.A., Pavlova, B.Z. & Ivanova, M.M. (1998). *Agrobacterium* mediated transformation as a way to change hormonal metabolism in high plants. **Russian Journal of Genetic** 2, 109-123.

Machado, L.O., Andrade, G.M., Cid, L.P.B., Penchel, R.M. & Brasileiro, A.C.M. (1997). Agrobacterium strain specificity and shooty tumour formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla*). **Plant Cell Reports** 16, 299-303.

Manickavasagam, M., Ganapathi, A., Anbazhagan, V.R., Sudhakar, B., Selvaraj, N., Vasudevan, A. & Kasthurirengan. (2004). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Reports** 23, 134-143.

Mansur, E. & Pinheiro, M.M. (1995). Plantas geneticamente modificadas: um caminho para o melhoramento vegetal. **ABCTP Notícias** 23, 2-6.

Mante, S., Morgens, P.H., Scroza, R., Cordts, J.M. & Callahan, A.M. (1991). *Agrobacterium*-mediated transformation of plum (*Prunnus domestica* L.) hipocotyl slices and regeneration of transgenic plants. **Biology and Technology** 9.

Mason, H.S., Lam, D.M.K. & Arntzen, C.J. (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 89, 11745-11749.

Matsuda, N., Gao M., Isuzugawa, K., Takashina, T. & Nishimura, K. (2005). Development of an *Agrobacterium*-mediated transformation method for pear (*Pyrus communis* L.) with leaf-section and axillary shoot-meristem explants. **Plant Cell Reports** 24, 45-51.

McCown, D.D. & Sellmer, J.C. (1987). In: Bonga, J.M.; & Durzan, D.J. (Ed.) **Cell and tissue culture in forestry** 1, 4-14.

Merkulov, S.M., Bartish, I.V., Dolgov, S.V., Pasternak, T.P. & McHugen, A. (1998). Genetic transformation of pear (*Pyrus communis* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Genetika** 34, 373-378.

Metivier, J.R. (1986). Citocininas. In: Ferri, M.G. **Fisiologia vegetal** 2, 93-127.

Moore, G.A. (1986). *In vitro* propagation of *Citrus* rootstocks. **HortScience** 21, 300-301.

Mourgues, F., Chevreau, E., Lambert, C. & De Bondt, A. (1996). Efficient *Agrobacterium* mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). **Plant Cell Reports** 16, 245-249.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum** 15, 473-497.

Naleway, J.J. (1992). In: Gallagher, S.R. (ed.). GUS Protocols: Using the GUS gene as a Reporter Expression. **Academic Press**, 61-76.

Novoa, C.O. & Coles, G. (1994). Computer image analysis to quantify and análise stable transformation identified using histochemical GUS assay. **Plant Molecular Biology Reports** 12, 146-151.

Oridate, T., Atsumi, H., Ito, S. & Araki, H. (1992). Genetic difference in somatic embryogenesis from seeds in melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 29, 27-30.

Patau, K. & Das, N.K. (1961). The relation of DNA synthesis and mitosis in tobacco pith tissuel culture *in vitro*. In: Kerbauy, G.B. (1999). Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: Torres, A.C., Caldas, L.S. & Buso, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas** 2, 519-531.

Peña, L., Cervera, M., Juárez, J., Navarro, A., Pina, J.A., Durá-Vila, N. & Navarro, L. (1995). *Agrobacterium* mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenics plants. **Plant Cell Reports** 14, 616-619.

Peres, L.E.P. (2002). Regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 25, 44-48.

Pérez-Molphe-Balch, E. & Ochoa-Alejo, N. (1997). In vitro plant regeneration of Mexican lime and mandarin by direct organogenesis. **HortScience** 32, 931-934.

Peters, J.A. (1980). Autotrofia para citocininas em cultura de tecidos de plantas haplóides de *Nicotiana tabacum* L. cv. W-38. **Tese de Doutorado**, 119.

Potrycus, I. & Spangenber, G.G. (1995). Gene transfer to plant. **Springer: Laboratory Manual,** 328.

Richter, L.J., Thanavala, Y., Arntzen, C.J. & Mason, H.S. (2000). Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. **Nature Biotechnology** 18, 1167-1171.

Russell, J.A, Roy, M.K. & Sanford, J.C. (1992). Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. **Plant Physiology** 3, 1050-1056.

Schillberg, S., Emans, N. & Fischer, R. (2002). Antibody molecular farming in plants and plants cells. **Phytochemistry Reviews** 1, 45 - 54.

Shepherd, S.L.K. (1990). Seleção *in vitro*. In: Torres, A.C., & Caldas, L.S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**, 433.

Sim, G.E., Goh, C.J. & Loh, C.S. (1989). Micropropagation of *Citrus mitis* Blano-multiple buds formation from shoot and root explants in the presence of 6-beinzilaminopurine. **Plant Science** 59, 203-210.

Siril, Z.A. & Dhar, V. (1996). A highly efficient “in vitro” regeneration methodology for mature chinese tallow tree (*Sapium sebiferum*). **Plant Cell Reports** 16, 83-87.

Song, G.Q. & Sing, K.C. (2004). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) **Plant Cell Reports** 7, 475-484.

Stoger, E., Sack, M., Fischer, R. & Christou, P. (2002). Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. **Current Opinion in Biotechnology** 13, 161-166.

Stoger, E., Vaquero, C., Torres, E., Sack, M., Nicholson, L., Drossard, J., Williams, S., Kenn, D., Perrin, D., Christou, P. & Fischer, R. (2000). Cereal cropos as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv andibodies. **Plant Molecular Biology** 42, 583-590.

Sunilkumar, G., Vijayachandra, K. & Veluthambi, K. (1999). Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium* mediated transformation by increasing *vir* gene induction. **Plant Science** 141, 51-58.

Tachini, P. & Walbot, T.V. (1986). Transformation of plants. **Nestlé Research News**, 19-29.

Tao, R., Dandekar, A.M., Uratsu, S.L., Vail, P.V. & Tebbets, J.S. (1997). Engineering genetic resistance against insects in Japanese Persimmon using the cryl A© gene of *Bacillus thuringienses*. **Journal of the American Society for Horticutural Science** 6, 764-771.

Thanavala, Y., Yang, Y.-F., Lyons, P., Mason, H.S. & Arntzen, C. (1995). Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 92, 3358-3361.

Tör, M., Mantell, S.H. & Ainsworth, C. (1992). Endophytic bacteria expressing β-glucoronidase cause false positive in *Discorea* species. **Plant Cell Reports** 11, 452-456.

Torres, A.C., Caldas, L.S., Ferreira, A.T. (1998). Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: Torres, A.C., Caldas, L.S, & Buso, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas** 1, 11-20.

Tsai, C.K., Ch'ien, Y.C., Chou, Y.L. & Wu, S.H. (1977). Regeneration of plants from tobacco protoplasts and some factors affecting the plant differatiation. **Scientia Sinica** 20, 458-468.

Van Sluys, M.A. (1999). *Agrobacterium* um vetor natural para transformação em plantas. In: Torres, A.C., Caldas, L.S, & Buso, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas** 2, 737-759.

Wang, K., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M. & Zambrysk, P. (1984). Rigth 25bp terminus of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. **Cell** 38, 455-462.

Wilmink, A. & Dons, J.J.M. (1993). Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. **Plant Molecular Biology Reporter** 12, 165-185.

Zambryski, P.C. (1992). Chronicles form the *Agrobacterium* plant cell DNA transfer story. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 43, 465-490 .

ANEXOS

TABELA 1A - Soluções estoque para o preparo do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), utilizado como cultura para as plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) mantidas *in vitro* e meio básico para a regeneração de explantes visando à transformação genética de tabaco.

Solução Estoque	Nutrientes	Concentração Final ($mg.L^{-1}$)
A	NH_4NO_3	1650
B	KNO_3	1900
C	$MgSO_47H_2O$	370
	$MnSO_4H_2O$	16,9
	$ZnSO_47H_2O$	8,6
	$CuSO_45H_2O$	0,025
D	$CaCl_22H_2O$	333
E	H_3BO_3	6,2
	KH_2PO_4	170
	KI	0,83
	$Na_2MoO_42H_2O$	0,25
	$CoCl_26H_2O$	0,025
F	Na_2EDTA	37,25
	$FeSO_47H_2O$	27,85
G	TIAMINA	0,5
	PIROXIDINA	0,5
	ÁC. NICOTÍNICO	0,5
	GLICINA	2
	MIO-INOSITOL	100
Outros Componentes	AGAR	7000

Murashige & Skoog, 1962.

TABELA 2A- Componentes utilizados para o preparo do meio de cultura YEB utilizado para o crescimento da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*.

Componentes	Concentração Final ($g.L^{-1}$)
Extrato de carne	5
Extrato de levedura	1
Peptona	5
Sacarose	5
Sulfato de magnésio ($MgSO_4$)	0,24
Agar	7