

Cintia Tiemi Shigihara

Subsídios à transformação genética de
plantas de *Catasetum pileatum*
(Orchidaceae) por meio de tecidos
meristemáticos radiculares e caulinares

São Paulo

2008

Cintia Tiemi Shigihara

Subsídios à transformação genética de
plantas de *Catasetum pileatum*
(Orchidaceae) por meio de tecidos
meristemáticos radiculares e caulinares

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para
a obtenção de Título de Mestre
em Ciências, na Área de
Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto
Barbante Kerbauy

Co-orientadora: Profa. Dra.
Marie-Anne Van Sluys

São Paulo

2008

Shigihara, Cíntia Tiemi

Subsídios à transformação genética de *Catasetum pileatum* (Orchidaceae) por meio de tecidos meristemáticos radiculares e caulinares.

121p

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. *Catasetum pileatum*
 2. Transformação genética
 3. Meristemas
- I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy
Orientador

“O conselho da sabedoria é:

Procure obter sabedoria,

use tudo o que você possui para obter entendimento.

Dedique alta estima à sabedoria , e ela o exaltará;

abraça-a e ela o honrará.

Ela porá um belo diadema sobre sua cabeça

e lhe dará de presente uma coroa de esplendor.”

Provérbios 4:7-9
(Bíblia sagrada, NVI)

Ao meu amado Milton,
Que sempre esteve ao meu lado
com extraordinária dedicação e paciência
dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy, pela orientação, exemplo, dedicação e amizade.

À Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys, pela orientação, confiança, incentivo constante e disponibilização do laboratório GaTE, que tornaram possível a realização deste trabalho.

À Dra. Myna Nakabashi, pelo ensino das técnicas moleculares, orientação, amizade e dedicação permanente.

À FAPESP pelo auxílio financeiro que tornou possível a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Gregório Ceccantini e à Bianca Brasil, pela orientação e confecção das lâminas histológicas, respectivamente.

À doutoranda e amiga Maria Aurineide Rodrigues, pelo incentivo e apoio incondicional, exemplo pessoal, discussões, conselhos, auxílio nas tarefas cotidianas e companhia para o café.

Aos professores Helenice Mercier e Marcos Buckeridge do Laboratório de Fisiologia Vegetal e à professora Magdalena Rossi do Laboratório GaTE, pelo apoio e conselhos no andamento do trabalho.

Aos amigos e companheiros de laboratório: Cássia, Luciano, Thaís, Camila, Lia, Alessandra, Aline B., Juliane e Rogério, pelos muitos momentos agradáveis, discussões, apoio e ajuda prática no dia-a-dia.

Aos companheiros do Laboratório de Fisiologia Vegetal: Aline C., Pinho, Adriana G. e Adriana Y., Giovanna, Mari, Luis, Flávia, Katherine, Marcelo, Kátia, Leila, Ilton, Andréia e a todos os companheiros que estão ou já foram do laboratório, pela colaboração e bons momentos.

Aos companheiros do Laboratório GaTE: Dani K., Douglas, Marcelo, Hana, Bruno, Regininha, Ana Paula, Maria Elisa, Alessandro, Guilherme, Luisa e todos

os outros que estão ou já passaram pelo laboratório durante minha estadia, pela colaboração e prontidão em ajudar.

Às técnicas Ana Maria, Ingrid, Silvia e Leonor pela amizade e apoio na manutenção dos laboratórios.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Botânica que contribuíram para o andamento do trabalho.

Um agradecimento especial ao meu marido pelo tamanho amor, amizade e auxílio prático, além de paciência, apoio incansável e incondicional, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Jairo e Laura e ao meu irmão Marcos, pelo apoio desde sempre, amor e compreensão.

E finalmente, a Deus, o criador de tudo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O gênero <i>Catsetum</i> como modelo de estudos de desenvolvimento....	1
1.1.1. Conversão <i>in vitro</i> do meristema apical radicular (MAR) em meristema caulinar.....	1
1.1.2. Retomada e manutenção do meristema apical caulinar (MAC), no escuro.....	3
1.2. Plantas transgênicas na pesquisa básica e no melhoramento vegetal..	4
1.3. Transformação genética em plantas.....	6
1.3.1. Promotores.....	7
1.3.2. Genes repórteres.....	10
1.3.3. Introdução de DNA em plantas.....	12
1.3.3.1. Introdução de genes via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
1.3.3.2. Introdução de genes por Biobalística.....	14
1.3.4. Cultura de tecidos e regeneração de plantas.....	15
1.3.5 Seleção de tecidos transformados.....	15
1.4. Transformação genética de orquídeas.....	17
2. OBJETIVOS DO TRABALHO.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Obtenção do material vegetal.....	29
3.2. Análise de promotores.....	31
3.2.1. Extração de DNA plasmídeo (“Midiprep”).....	32
3.2.2. Bombardeamento de micropartículas.....	33
3.2.3. Análise histoquímica da expressão de <i>uidA</i>	34
3.2.4. Análise da expressão de <i>uidA</i> regulado por diferentes promotores....	34
3.3. Obtenção de estruturas adequadas à transformação genética	37
3.3.1. Análise do potencial regenerativo de segmentos de ARs: efeito de auxina e citonina.....	37
3.3.2. Caracterização histológica de SRs na presença e ausência de AIB e BA.....	39
3.3.3. Desenvolvimento de plantas a partir de intumescências de SRs.....	39

3.4. Determinação da concentração de higromicina para seleção de tecidos.....	40
3.5. Seleção e regeneração de tecidos transformados.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1. Avaliação de promotores.....	45
4.2. Cultura de tecidos de segmentos radiculares.....	50
4.2.1. Comportamento dos três segmentos de ARs: efeito de auxina e citocinina.....	50
4.2.2. Fenótipos de culturas de SR, na presença de ANA, AIB, BA e ANA+BA.....	54
4.2.3. Caracterização histológica de SRs na presença e ausência de AIB e BA.....	60
4.3. Determinação da concentração de higromicina para a seleção de tecidos.....	72
4.4. Seleção e regeneração de tecidos transformados.....	83
5. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS.....	103
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

35S de CaMV	promotor 35S do vírus mosaico de couve-flor;
AIA	ácido indolilacético;
AIB	ácido indolilbutírico;
ANA	ácido naftalenoacético;
AR	ápice radicular;
AS	acetossiringona
BA	6-benzilaminopurina;
CAT	cloranfenicol;
CE	segmento nodal de caules estiolados contendo gemas;
<i>gfp</i>	gene “green fluorescent protein” de <i>Aequorea victoria</i> , emite luminescência verde (507nm) na presença de luz UV ou azul;
GUS	β -glucuronidase, enzima codificada pelo gene <i>uidA</i> ;
<i>hpt</i>	gene que codifica para higromicina fosfotransferase;
<i>luc</i>	gene que codifica para a enzima luciferase de vaga-lume (<i>Photinus pyralis</i>), que na presença do substrato luciferina, emite luminescência em 260nm;
<i>PAtXPB1</i>	promotor do gene <i>AtXPB1</i> , ligado ao reparo do DNA em <i>Arabidopsis</i> ;
<i>PAtXPB2</i>	promotor do gene <i>AtXPB2</i> ligado ao reparo do DNA em <i>Arabidopsis</i> ;
PEG	polietilenoglicol;
PCM	protocormo;
PLB	“protocormo like body”;
pRi	plasmídeo “ <u>R</u> oot <u>I</u> nducer” (indutor de raiz) de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ;

PTE010	promotor do retrotransposon TE027, de cana-de-açúcar, “Hopscotch-like”;
PTE027	promotor do retrotransposon TE010, de cana-de-açúcar, “Maggy-like”;
<i>Pthi1</i>	promotor do gene <i>thi1</i> , ligado à síntese de tiamina em <i>Arabidopsis</i> ;
pTi	plasmídeo “Tumor inducer” (indutor de tumor) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ;
SR	primeiro segmento transversal subapical da região do ápice radicular (AR);
T-DNA	região T do DNA plasmidial de <i>Agrobacterium</i> que é transferido às células vegetais;
TTC	cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio;
<i>uidA</i>	gene que codifica para a enzima β -glucuronidase (GUS);
X-gluc	5-bromo 4-cloro 3-indol β -D-glucuronídeo ciclohexilamina.

RESUMO

Os estudos sobre a conversão *in vitro* de meristemas apicais radiculares em gemas caulinares de plantas do gênero *Catasetum* vêm contribuindo para uma melhor compreensão dos processos de competência, indução e determinação celular no processo de desenvolvimento, necessitando, no momento, de aprofundamento em estudos moleculares. Para tanto, a utilização de plantas transgênicas representa uma ferramenta de trabalho importante. Além disso, os métodos de transformação genética acenam como uma alternativa eficaz para o melhoramento de plantas de interesse econômico com ciclos reprodutivos longos, como as orquídeas. Desta forma, o objetivo deste projeto foi estabelecer um protocolo para transformação genética de *Catasetum pileatum*, utilizando tecidos meristemáticos como explantes alvos.

Para tanto, avaliou-se o potencial de alguns promotores na expressão de *uidA* em tecidos de *C. pileatum*, dentre os quais destacaram-se o 35S de CaMV, o promotor do gene *Pthi1* e o de PTE027, sendo que os dois primeiros foram utilizados para os experimentos de transformação genética permanente.

Como explantes alvos para a transformação, foram testadas tanto gemas laterais de caules estiolados (CEs) quanto ápices radiculares (ARs), além de segmentos radiculares subapicais (SRs). Para obtenção de estruturas com maior quantidade de células em divisão celular, foi estabelecido um protocolo de cultura de tecidos a partir de segmentos radiculares subapicais (SRs). Na região proximal destes segmentos, estabeleceu-se uma estrutura globular e intumescida na presença de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de BA. Cortes histológicos destas intumescências revelaram a presença de grande quantidade de células em intensa divisão celular, levando, em estágios mais avançados, à formação de gemas caulinares superficiais. Estas originavam plantas após um mês em meio propício para este fim.

Estes explantes foram submetidos a várias concentrações de higromicina, sendo que as concentrações escolhidas para seleção de tecidos transformados foram de 25mg.L^{-1} para CEs e ARs e 10mg.L^{-1} para SRs.

CEs e ARs foram bombardeados com micropartículas de tungstênio contendo DNA plasmidial adsorvido (*P35S:uidA* ou *Pthi1:uidA*) e transferidos para meio seletivo após uma, duas ou três semanas. No entanto, estes não foram capazes de sobreviver em meio seletivo após dois meses de seleção.

SRs foram bombardeados com *P35S:uidA* ou *Pthi1:uidA*. Estes foram capazes de expressar *uidA* entre 48h até quatro semanas, sendo que após três meses de seleção, foi observada uma gema azul transformada com *Pthi1*. As melhores condições para a transformação foram as seguintes: bombardeamento dos SRs recém-isolados, manutenção por duas semanas em meio não seletivo e, por fim, transferência para meio com higromicina até o término de três meses.

Não obstante a necessidade de refinamentos dos procedimentos utilizados e de análises moleculares adicionais, estes resultados constituem os primeiros a indicarem a possibilidade de obtenção de plantas transgênicas de *Catasetum pileatum*.

ABSTRACT

Research on *in vitro* conversion of root apical meristems into buds in *Catasetum* has contributed to a better understanding of competence, induction and cellular determination processes during plant development. Nowadays It demands advances in molecular studies. To achieve this, the use of transgenic plants is an important working tool. Furthermore, genetic transformation methods seem to be an efficient alternative for improvement of commercial plants with long-life cycles, such as orchids. Therefore, the aim of these studies was to establish a protocol for genetic transformation of *Catasetum pileatum*, using meristematic tissues as target explants.

The potential of some gene promoters to induce the expression of *uidA* was evaluated in *C. pileatum* tissues. CaMV 35S, *Pthi* and the PTE027 showed the best results among all tested. The CaMV 35S and the *Pthi1* were used in the permanent genetic transformation experiments.

Lateral buds of shoot explants (CEs), root apices (ARs) and root segments (SRs) were tested as target explants for transformation. In order to obtain material containing higher quantity of proliferating cells, a tissue culture protocol was established using root segments (SRs). The formation of a globular structure on the proximal region of the explants was observed in the presence of $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of BA. Histological sections of these structures showed the presence of a huge quantity of cells in intense cellular division. In advanced stages, it was observed superficial bud formation on the structures. These buds have the capacity to produce whole plants within one month, in appropriated culture medium.

Explants were exposed to a range of hygromycin concentrations and thereupon concentrations of $25\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ were chosen for selecting CEs and ARs, and for selection of SRs, respectively.

CEs and ARs were bombarded with tungsten microparticules containing adsorbed plasmidial DNA (*P35S:uidA* or *Pthi1:uidA*) and it was transferred to selective medium after one, two or three weeks. Nevertheless, these explants were not capable to survive in selective medium after two months.

SRs were also bombarded with *P35S:uidA* or *Pthi1:uidA*. These explants expressed *uidA* between 48 hours and four weeks. After three months of selection, it was possible to see a blue stained bud transformed with *Pthi1*. The best conditions for genetic transformation of *C. pileatum* were followed: bombardment of newly isolated SRs, maintenance for two weeks in non-selective medium followed of transference to hygromycin medium up to three months.

Although additional experiments will still be necessary to refine transformation methods and conduct molecular analysis, the results from the present study are the first reference about genetic transformation of *Catasetum pileatum* plants.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Catasetum* como modelo de estudos de desenvolvimento

1.1.1. Conversão *in vitro* do meristema apical radicular (MAR) em meristema caulinar

Kerbauy (1984a), testando diversas condições de cultivo *in vitro*, observou a formação direta de gemas vegetativas em *Catasetum* (Orchidaceae) a partir de ápices radiculares estudados com 1,5 cm de comprimento. Outros poucos estudos com espécies orquídeas lograram também êxito na regeneração a partir de ápices radiculares (Kerbauy, 1984b, 1991, Colli & Kerbauy, 1993; Kerbauy & Estelita, 1996; Sánchez, 1988; Stewart & Button, 1978; Tanaka *et al.*, 1976). Em alguns destes trabalhos, a regeneração de plantas foi precedida por uma fase de calo. No entanto, a conversão de ápices meristemáticos de *Catasetum* em gemas vegetativas ocorre diretamente, sem a necessidade de qualquer tratamento hormonal (Kerbauy, 1984a). Considerando-se que os meristemas das angiospermas no seu todo são altamente recalcitrantes à regeneração de gemas por apresentar elevada identidade estrutural/fisiológica, este evento organogenético pode ser considerado incomum em plantas superiores (Peres *et al.*, 1999).

Análises histológicas do processo de conversão de ápices radiculares de *Catasetum pileatum* em gemas caulinares vieram demonstrar que o evento iniciava-se em um período de tempo relativamente curto, entre 24 e 48 horas após o isolamento do ápice. Neste processo, as células meristemáticas mantinham-se em contínua divisão, originando inicialmente uma estrutura de aspecto globular, semelhante aos protocormos (PCMs), na qual era possível observar a mudança gradativa do padrão histológico radicular para caulinar, e o estabelecimento de uma gema caulinar apical a partir da qual uma nova planta era formada (Kraus & Monteiro, 1989).

A alteração do balanço endógeno auxina/citocinina, favorável às citocininas, parecia ser a causa indutora do processo. Esta alteração ocorria naturalmente durante a conversão, sem qualquer suplementação hormonal externa, devido ao acúmulo de citocininas endógenas desencadeado, provavelmente, pela separação física dos segmentos radiculares da planta mãe (Colli & Kerbauy, 1993; Peres & Kerbauy, 1999, Peres *et al.*, 1999). Não obstante, a razão auxina/citocinina poderia ser alterada pela adição de etileno ou citocininas ao meio de cultura (Colli & Kerbauy, 1993; Kerbauy & Colli, 1997; Peres *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2006a). Dentre as citocininas, a zeatina foi a que mais estimulou a conversão, alcançando a conversão de 100% dos ápices radiculares competentes, ao mesmo tempo que induziu a conversão de 83% de ápices não competentes (Rodrigues *et al.*, 2006a). Por fim, Campos (2006) observou uma indução da conversão de 100% dos explantes mantidos em condições de escuro constante, em contraste à uma conversão de no máximo 53,33% em explantes mantidos sob condições de luz contínua.

Estudos referentes às mudanças de aspectos do metabolismo primário foram realizados por Vaz *et al.* (1998) e Campos (2006), os quais concluíram que as alterações metabólicas e hormonais ocorriam muito rapidamente após o isolamento dos ápices radiculares e que estas mudanças levaram ao estabelecimento de um dreno forte na região do ápice, cujos recursos seriam alocados para a formação da gema e desenvolvimento da nova planta. Campos (2006) postula que as alterações metabólicas e hormonais ocorridas durante as primeiras 12 horas após o isolamento deviam ser resultantes do estresse desencadeado pelo processo, sendo que durante este período, ocorreria o disparo de sinais envolvidos na mudança do padrão de desenvolvimento radicular para caulinar. Corroborando com a hipótese de que o estresse estaria envolvido no processo de conversão, Chaer *et al.* (2006) observou que 100% dos explantes jovens convertiam-se em gemas caulinares após serem submetidos a 5% de PEG, um indutor de estresse hídrico.

Dentre os fatores potencialmente relacionados à necessária aquisição de competência para a conversão, estudos recentes e em andamento têm demonstrado a participação conspícua da idade da raiz, refletida pela parada do

crescimento longitudinal e alterações metabólicas e morfológicas. Dentre destas últimas, destacam-se a mudança do meristema apical radicular do tipo fechado para o aberto, redução nos teores endógenos de citocininas e o aumento na produção de etileno em plantas com 260 dias (Rodrigues *et al.*, 2006b). A alteração na distribuição de AIA no ápice radicular causada pela adição de NPA, um inibidor do transporte polar de auxina, em raízes jovens (30 dias), resultou no estabelecimento da competência das células meristemáticas, seguida pela mudança do padrão de desenvolvimento (Rodrigues *et al.*, 2007a). Por último, observações de diferenças nas concentrações de óxido nítrico entre raízes jovens, estas antes não-competentes, e raízes maduras competentes, sugerem uma possível participação destes radicais livres no evento de aquisição de competência para a formação de gemas (Rodrigues *et al.*, 2007b).

1.1.2. Retomada e manutenção da atividade do meristema apical caulinar (MAC), no escuro

Paralelamente aos estudos de ápices radiculares, foi verificado que as gemas caulinares de *Catsetum* incubadas *in vitro*, quando transferidas para o escuro, apresentavam um comportamento peculiar. Conforme o esperado, sob condições de crescimento no claro, as gemas formam plantas normalmente verdes, com crescimento caulinar limitado e formação de pseudobulbos e folhas. Entretanto, quando estas gemas ou plantas são transferidas para o escuro, verificou-se a retomada da atividade do meristemas caulinares apical e laterais até então inibidas, originando caules estiolados, com crescimento apical indefinido e produção contínua de nós e entrenós, cada um dos quais contendo uma gema lateral (Suzuki & Kerbauy, 1999). Este crescimento indeterminado pode estar relacionado com o acúmulo de ácido giberélico nos estolões em crescimento no escuro (Suzuki *et al.*, 2004). Por fim, gemas de segmentos nodais destes caules estiolados podem ser utilizadas na propagação *in vitro* (Kerbauy *et al.*, 1995).

1.2. Plantas transgênicas na pesquisa básica e no melhoramento vegetal

Na pesquisa básica e aplicada atual, plantas transgênicas têm-se constituído uma ferramenta de trabalho com amplo alcance nas áreas como fisiologia, genética, biologia molecular e biologia celular (Brasileiro & Dusi, 1999). A capacidade de introduzir, expressar ou silenciar genes específicos em plantas provê um poderoso instrumento experimental, permitindo abordar algumas hipóteses importantes na área de fisiologia, as quais têm sido difíceis de serem estudadas por meio de outras técnicas convencionalmente empregadas até o momento (Birch, 1997). É bem sabido que os eventos do desenvolvimento são controlados pela atividade de genes que se encontram dispersos no genoma da planta (Brasileiro & Dusi, 1999).

Muitos estudos na área de fisiologia vegetal têm sido conduzidos com plantas transgênicas em substituição a mutantes (Eklöf *et al.*, 1997; Werner *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2006). Desta forma, a possibilidade de obtenção de plantas transgênicas de *Catsetum* produzidas a partir de um protocolo previamente estabelecido, auxiliaria os estudos sobre o desenvolvimento vegetal e sobre a conversão de meristemas radiculares para caulinares, em andamento no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica/ IB – USP desde 1984. Transgênicos de *Catsetum* que possuam, por exemplo, aumento da expressão de genes de inativação e degradação de citocininas tais como a oxidase/desidrogenase de citocinina (como feito em *Arabidopsis* por Werner *et al.*, 2003), ou silenciamento dos genes de receptores de citocininas homólogos às cinases de histidinas (como em mutantes de *Arabidopsis* descritos por Nishimura *et al.*, 2004), poderiam contribuir vantajosamente para a compreensão do papel desse hormônio no controle do processo de conversão de ápices radiculares. Por fim, outra possibilidade que provavelmente alteraria o processo de conversão seria a alteração do transporte polar de auxina nas raízes, como demonstrado em mutantes de *Arabidopsis*, que apresentaram diferenciação prematura do meristema radicular (Geldner *et al.*, 2004).

Alternativamente, a obtenção de plantas transgênicas contendo seqüências de genes repórteres fusionados ao de genes de identidade de órgãos, como por

exemplo, o gene *wuschel* de *Arabidopsis* (Gallois *et al.*, 2004), poderia auxiliar na definição do momento da conversão de células radiculares em meristemáticas caulinares, ajudando, também, na identificação dos fatores moleculares envolvidos no processo.

Em adição, a transformação genética para fins de melhoramento pode apresentar atrativos comerciais. A família Orchidaceae abrange cerca de 25.000 espécies, contidas em mais de 800 gêneros (Yang *et al.*, 1999), incluindo espécies ornamentais importantes comercialmente, as quais têm ocupado cada vez mais espaço no mercado global (Men *et al.*, 2003a). No Brasil, as exportações de mudas e plantas ornamentais vêm crescendo, apresentando um aumento de 12 milhões de dólares em 2000 para 24 milhões, em 2005 (Salomé, 2007). Nesse sentido, o melhoramento de orquídeas para características como resistência a doenças e ataque de pestes, tolerância a estresses, coloração, forma e durabilidade das flores, além do melhoramento de aspectos do desenvolvimento são importantes para o aumento do valor comercial (Yang *et al.*, 1999).

Uma vez que o melhoramento genético por métodos tradicionais é limitado devido ao longo ciclo reprodutivo (de muitos anos) e lenta maturação das sementes deste grupo de plantas, a utilização de técnicas de engenharia genética para este fim tem se apresentado uma alternativa interessante (Belarmino & Mii, 2000; Kuehnle & Sugii, 1992; Men *et al.*, 2003a; Yang *et al.*, 1999). No caso específico de *Catasetum pileatum*, bem como de outras espécies e gêneros afins do grupo Catasetinae, a introdução de alterações visando aumentar a durabilidade das flores poderia ser bastante interessante. Esta espécie apresenta inflorescências e flores grandes, coloração que varia de branca (Fig. 1) a vinho, característica que poderia contribuir para seu valor comercial, caso a longevidade das flores não fosse tão curta. Este aspecto poderia ser alterado, por exemplo, pela expressão dos genes que codificam para um alelo mutante de um receptor de etileno, como o *etr1-1* (Sriskandarajah *et al.*, 2007).



Figura 1: Inflorescência de *Catasetum pileatum*.

1.3. Transformação genética em plantas

A transformação genética de plantas caracteriza-se pela introdução controlada e artificial de um fragmento de DNA em um genoma receptor (Potrikus, 1990). O protocolo de transformação eficiente de um determinado genoma compreende várias etapas, como:

1. idealização e montagem do vetor contendo os genes de interesse e aqueles necessários à visualização e seleção do material transformado;
2. escolha do material vegetal alvo adequado à transformação genética e à seleção e regeneração de plantas;
3. escolha da estratégia mais adequada à introdução de DNA nas células destes tecidos vegetais;
4. disponibilidade de métodos confiáveis de seleção das células transformadas e regeneração de plantas a partir das mesmas (Birch, 1997; Sharma *et al.*, 2005).

Durante o estabelecimento de um protocolo, todas estas etapas necessitam ser estudadas e adaptadas para cada espécie que se deseja

transformar, considerando-se o modelo vegetal em enfoque, os objetivos finais e os estudos pré-existentes (Birch, 1997).

1.3.1. Promotores

O sucesso da transgenia é dependente em parte dos promotores que determinam a expressão dos genes de interesse no local, momento e quantidade necessária. Cada promotor apresenta um padrão específico de expressão, podendo ser constitutivo, quando promove a expressão do gene em todo o organismo de forma atemporal; ou então específico para um determinado tipo celular, tecido ou grupo de tecidos. Alguns se expressam somente em uma determinada fase do ciclo de vida do organismo, outros podem ser regulados por sinais fisiológicos e ambientais (Potenza *et al.*, 2004). Promotores podem também ser construídos artificialmente, contendo regiões regulatórias apropriadas e seqüências ativadoras (Bhullar *et al.*, 2003, Potenza *et al.*, 2004).

Promotor 35S do vírus mosaico de couve-flor (CaMV). Inicialmente descrito por Odell *et al.*, em 1985, este promotor vem sendo utilizado intensamente em pesquisas de transformação genética, devido a este proporcionar expressão intensa e constitutiva em praticamente todos os tecidos e órgãos de muitas espécies, tanto dicotiledôneas quanto monocotiledôneas (Bhullar *et al.*, 2003). Além deste fato, este promotor é amplamente disponível comercialmente, podendo ser encontrado em diversas construções vetoriais para transformação genética (Potenza *et al.*, 2004).

A despeito das vantagens já citadas, encontra-se na literatura a menção de certos problemas causados pela utilização deste promotor, como é o caso do silenciamento de transgenes por ele regulados em muitos casos de transformações genéticas estáveis (Elmayan & Vaucheret, 1996; Angell & Baulcombe, 1997; Mishiba *et al.*, 2005a; Bhullar *et al.*, 2003). Mishiba *et al.* (2005a) demonstraram que o silenciamento de transgenes contendo o promotor

35S em um híbrido de genciana (*Gentiana triflora* x *Gentiana scabra*), ocorreu devido ao elevado grau de metilação de resíduos de citosina nele presente. Este silenciamento foi provavelmente induzido pelo sistema de defesa do genoma da planta contra seqüências de DNA invasivas, tais como DNAs virais ou bacterianos, ou elementos de transposição (Matzke, Mette & Matzke, 2000). O silenciamento dos genes durante a seleção pode ser a causa de baixas freqüências de transformação verificadas em muitas espécies (Mishiba *et al.*, 2005a).

Outra desvantagem deste promotor foi relatada por Yoo *et al.* (2005), os quais revelaram que as seqüências ativadoras presentes em 35S foram capazes de ativar genes adjacentes ao gene regulado dentro do T-DNA transferido. Weigel *et al.* (2000) citam a super-regulação de um gene adjacente à borda esquerda, a uma distância de 8,9kb a partir da região de integração do T-DNA, enquanto que Ren *et al.* (2003) observaram esta interferência em distâncias maiores, como no caso de um gene localizado a 78kb de distância.

Por fim, dependendo dos genes que se deseja inserir, o padrão de expressão forte ou constitutivo pode não se enquadrar no desejado, necessitando de promotores com níveis de expressão mais baixos, ou que sejam tecido-específicos, ou até indutíveis por algum fator externo. Assim, a busca e utilização de outros promotores para transformação se fazem necessários, e alguns candidatos são descritos a seguir.

P*thi1*: promotor do gene *thi1* de *Arabidopsis thaliana*, cuja proteína codificada é uma enzima envolvida na síntese de tiazol (THI1), responsável pela produção de um dos precursores da tiamina pirofosfato (TPP), a forma ativa da vitamina B-1. Este composto é um cofator chave de enzimas envolvidas no metabolismo do carbono (Ribeiro *et al.*, 2005). Ao mesmo tempo, a proteína THI1 está envolvida em mecanismos de tolerância a danos no DNA organelar (Machado *et al.*, 1997). O gene foi originalmente isolado de uma biblioteca de cDNA de *Arabidopsis thaliana* (Machado *et al.*, 1996), e contém seqüências para direcionamento tanto para cloroplastos quanto para mitocôndrias (Chabregas *et al.*, 2003). Análises funcionais do promotor demonstraram que o seu padrão de

expressão é forte e praticamente constitutivo nesta espécie, sendo expresso em diversos tecidos da parte aérea e nos tecidos vasculares de raízes. Os mesmos estudos também demonstraram que o gene é reprimido em ausência de luz, e apresenta aumento de expressão em condições de estresse, tais como hipóxia, concentrações elevadas de sais e ausência de sacarose (Ribeiro *et al.*, 2005).

PA_tXPB1 e PA_tXPB2: promotores dos genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos ao gene *XPB* humano, que codifica para uma proteína envolvida na transcrição e no reparo de DNA. Esta proteína é componente do fator de transcrição IIH (TFIIH), envolvida no mecanismo de remoção de danos ao DNA conhecido como “Reparo por Excisão de Nucleotídeos” (NER). Dentro do complexo, a proteína é responsável pela atividade helicase durante a excisão de nucleotídeos (Costa *et al.*, 2001; Morgante *et al.*, 2005). Os genes de *Arabidopsis* apresentam expressão durante todo o desenvolvimento, sendo baixa no 3º dia e aumentando no 10º, 20º e 28º dia, podendo também ser regulado positivamente pela luz (Morgante *et al.*, 2005). Plantas transgênicas contendo os promotores fusionados à seqüência de um gene repórter indicam que há sobreposições, porém também diferenças no padrão de expressão de *AtXPB1* e *AtXPB2* (Nakabashi, 2005).

PTE010 e PTE027 (TEs): são promotores derivados de elementos de transposição da classe I (retrotransposons). Dentro do grupo de retrotransposons, muitos dos exemplares já estudados são transcritos intensamente em condições estressantes, como injúrias físicas, ataque de patógenos, estresses abióticos e cultura de tecidos (Grandbastien, 1998; Takeda *et al.*, 1999; Courtial *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2001; Araújo & Rossi *et al.*, 2005). Desta forma, a utilização de recursos provenientes destes elementos em biotecnologia parece ser bastante promissora, como o aproveitamento da especificidade tecidual ou indução por estresses dos promotores destes genes para a transformação genética.

Araújo & Rossi *et al.* (2005) realizaram um levantamento e estudo da expressão de TEs de cana-de-açúcar. Dentro deste trabalho, com o intuito de estudar a atividade e regulação dos promotores, foi gerado uma série de

construções plasmideais contendo as possíveis regiões promotoras de alguns retrotransposons ligados à seqüência de um gene repórter. Estas construções foram testadas em catáfilos de cebola e folhas de fumo, sendo que a expressão transiente do gene repórter demonstrou que algumas construções apresentavam o promotor funcional, entre eles, os promotores de TE010 e TE027 (Araújo & Rossi et al., 2005). Os clones TE010 e TE027 são seqüências com similaridade aos retrotransposons com LTRs *Hopscotch* (grupo Ty1/copia) e *Maggy* (grupo Ty3/gypsy), respectivamente. O primeiro clone (TE010) foi originalmente isolado de flores de cana-de-açúcar (*SCSBFL1102B03* é o nome original no banco de dados do SUCEST), sendo que análises de macroarranjos demonstraram que o elemento expressou-se em calos, folhas e flores desta planta. O clone TE027 (*SCBFLR1083G04*) foi isolado de folhas jovens e se expressou em calos, meristema apical do caule e flores (Araújo & Rossi et al., 2005).

1.3.2. Genes repórteres

A atividade de um promotor pode ser avaliada pela fusão de sua seqüência à de um gene repórter e a introdução subsequente destes nos tecidos vegetais. A partir da observação da expressão transiente ou permanente da construção, este sistema possibilita a escolha de promotores e construções plasmidiais mais adequados às espécies, tecidos e propósitos das transformações genéticas (Ellis et al., 1991; Tee et al., 2003). O uso de genes repórteres permite também o monitoramento da expressão do transgene nas células ou organismos transformados, bem como a localização e direcionamento da proteína em estudo, quando a parte codificante do gene da mesma é fusionada à seqüência codificante do gene repórter. Alguns dos genes repórteres mais utilizados estão descritos abaixo.

uidA: isolado de *Escherichia coli*, este gene codifica para a enzima β -glucuronidase (GUS), uma hidrolase ácida que catalisa a clivagem de uma ampla variedade de β -glucuronídeos disponíveis comercialmente (Jefferson *et al.*, 1986). A atividade de GUS pode ser observada histoquimicamente pela adição de um substrato cromogênico, como o X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indol glucuronídeo), o qual dimeriza-se e forma um composto azul quando hidrolisado na presença da enzima (Brasileiro & Dusi, 1999). Apesar do método ser sensível para detecção de células e tecidos transformados, uma grande desvantagem da utilização deste gene é a não possibilidade de visualiza-los em tecidos vivos. No entanto, estes podem ser mantidos em álcool 70% por longos períodos.

luc: primeiramente utilizado como gene repórter por Own *et al.* (1986), codifica para a enzima luciferase de vaga-lume (*Photinus pyralis*). A reação catalizada por esta enzima na presença de luciferina, um substrato atóxico para as células vegetais, emite luminescência com pico de emissão em 260nm. A vantagem da utilização deste gene repórter é que a sua expressão pode ser quantificada.

gfp: codifica para a “green fluorescent protein” de *Aequorea victoria* (água-viva), com a propriedade única de absorver luz UV ou azul e emitir luz verde (507nm). Utilizada inicialmente por Chalfie *et al.*(1994) em *Escherichia coli* e *Caenorhabditis elegans*, a proteína pode ser atualmente expressa em praticamente todos os tipos de seres vivos. Uma vez que esta não necessita de cofatores para ser observada, ela constitui um método não invasivo, permitindo o monitoramento do transgene *in vivo* e em tempo real. Modificações para aumentar sua expressão, estabilidade, bem como adição de marcações para alteração da localização subcelular da proteína e produção de proteínas híbridas tornou o GFP uma das ferramentas mais versáteis para monitoramento de expressão gênica e localização subcelular de proteínas, além de estudos de transdução de sinal, interação proteína-proteína, linhagens celulares, entre outros (Shenn *et al.*, 1995; Pang *et al.*, 1996; Arnim *et al.*, 1998; Ellenberg *et al.*, 1999; Stewart Jr, 2005).

Atualmente, outros genes que codificam para proteínas bioluminescentes, como o *DsRed* de *Discosoma sp.*, cuja proteína RFP emite luminescência de amarelo (537nm) até vermelho longo (649nm), bem como variações de GFP aumentaram as possibilidades de utilização de marcadores moleculares pela variedade de cores de luminescência disponíveis (Arnim *et al.*, 1998; Ellenberg *et al.*, 1999; Jach *et al.*, 2001; Stewart Jr, 2005).

1.3.3. Introdução de DNA em plantas

As técnicas existentes para introdução de DNA em plantas podem ser agrupadas em duas categorias: transferência direta e indireta de genes. Na transferência indireta, utiliza-se um vetor, geralmente a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* ou a *A. rhizogenes* para intermediar a transformação (Brasileiro & Dusi, 1999; Sharma *et al.*, 2005). Pode-se também utilizar vetores virais, porém neste caso existe a desvantagem de não ocorrer integração do gene no genoma da planta (Potrikus, 1990; Robertson, 2004).

As técnicas de transferência direta de genes foram desenvolvidas devido às limitações das técnicas indiretas, que apresentam especificidade ou preferência a determinado grupo de plantas ou genótipo (de Block, 1993; Brasileiro & Dusi, 1999; Van Sluys, 1999). A transformação por biobalística, eletroporação de protoplastos ou introdução por PEG (polietilenoglicol), lipossomas, microinjeção e macroinjeção de genes são exemplos de técnicas diretas (Potrikus, 1990; Chia *et al.*, 1994; Brasileiro & Dusi, 1999). Atualmente, somente com as técnicas de transformação por *Agrobacterium* ou por bombardeamento de micropartículas (biobalística), tem sido possível introduzir e expressar genes em virtualmente qualquer tipo celular regenerável (Birch, 1997, Sharma *et al.*, 2005).

1.3.3.1. Introdução de genes via *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação indireta por meio de *Agrobacterium* foi desenvolvida a partir da descoberta de que as doenças vegetais “crown gall” (galha de coroa) e “hairy root” (raiz em cabeleira) ocorriam devido à passagem de informação genética da célula bacteriana para a célula vegetal (Van Sluys, 1999). A informação genética transferida constituía-se de um segmento particular de DNA (T-DNA), delimitada por duas seqüências repetidas de 23pb (denominadas de borda direita e esquerda), presente no plasmídeo indutor de tumor (pTi) ou de raízes (pRi) de *Agrobacterium tumefaciens* ou *A. rhizogenes*, respectivamente. Estes plasmídeos pTi e pRi contém genes responsáveis pela interação bactéria-planta e a introdução do fragmento nas células vegetais, dentro das quais o fragmento é direcionado ao interior do núcleo, integrando-se ao genoma por meio da maquinaria de reparo de DNA da própria célula (Zambryski, 1988; Tzfira & Citovsky, 2006; McCullen & Binns, 2006). O sistema foi adaptado para transformação genética através da retirada dos genes de virulência e introdução de genes de interesse na região T-DNA dos plasmídeos pTi e pRi, seguindo-se de posterior infecção do tecido alvo com as bactérias modificadas. Algumas vantagens desta metodologia é que ela é simples, eficiente e relativamente barata; as plantas transformadas apresentam menores quantidades de cópias do transgene inseridas no genoma, diminuindo assim a possibilidade de silenciamento gênico, além do que a inserção do gene geralmente ocorre de uma forma mais precisa (de Block, 1993).

Apesar do consenso inicial de que algumas dicotiledôneas, gimnospermas e a maioria das monocotiledôneas apresentam pouca ou nenhuma suscetibilidade a *Agrobacterium* (Potrykus, 1990; Van Sluys, 1999; Lacorte *et al.*, 1999), atualmente é comum encontrar diversos projetos com reconhecido sucesso na transformação de espécies destes grupos. Em sua maioria, estes protocolos são resultados de adição de etapas e adequações nos protocolos já existentes para dicotiledôneas, tornando-os relativamente mais trabalhosos. Alguns dos aspectos que devem ser relevados visando possibilitar ou aumentar a eficiência destas transformações são os tipos de explantes e genótipos dos organismos receptores,

as linhagens de bactérias e plasmídeos a serem utilizados e as condições de co-cultura, como o tipo de meio de cultura, adição de agentes indutores de virulência, temperatura e etapas da co-cultura. Alternativas como tratamentos anti-necróticos e osmóticos, dessecação dos explantes, adição de reguladores de crescimento vegetal, culturas celulares auxiliares, antibióticos ou surfactantes já possibilitaram resultados favoráveis para alguns casos (Cheng *et al.*, 2004, Matsubayashi *et al.*, 2004). Alterações genéticas nas bactérias tem levado até mesmo à transformação por *Agrobacterium* de células eucarióticas não pertencentes ao reino vegetal, como células de leveduras, alguns tipos de fungos e até mesmo células humanas, em condições de cultura em laboratório (Lacroix *et al.*, 2006).

1.3.3.2. Introdução de genes por Biobalística

O processo de transformação por biobalística pode ser definido como a introdução de DNA em células e tecidos vivos e intactos através da utilização de microprojéteis em alta-velocidade (Sanford, 1990). A técnica de aceleração de partículas direcionada à introdução de genes foi primeiramente utilizada por Klein *et al.* (1987), como um mecanismo capaz de atravessar paredes celulares e membranas plasmáticas, as principais barreiras para a entrada de DNA na célula. Neste processo, micropartículas de tungstênio ou ouro são recobertas com o DNA que se deseja introduzir e acelerado a altas velocidades por meio de um aparelho com propulsão a ar, pólvora, gás hélio ou eletricidade (Brasileiro & Dusi, 1999). Por meio desta técnica, foi realizada a introdução de genes com sucesso, não somente nos diversos grupos de plantas superiores (Luthra, 1997), como também tem sido efetiva e corriqueira para organismos de outros reinos, como bactérias, protozoários, fungos, algas e animais (Lacorte *et al.*, 1999). Por meio desta estratégia, é possível também testar o padrão de expressão de uma construção de DNA em diferentes tecidos de forma rápida, através da expressão transiente (Tee *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2005).

O sucesso dos bombardeamentos pode ser afetado pela variação de parâmetros como a pressão do gás propulsor, construções plasmídeos, tamanho e tipo das micropartículas, tipo de tecidos, genótipo e estado fisiológico dos explantes (Nan & Kuehnle, 1995; Brasileiro & Dusi, 1999). A expressão dos transgenes obtidos com esta metodologia varia muito entre linhagens transgênicas independentes, devido ao número e a localização cromossomal dos genes introduzidos serem menos controlados. Esta variação no nível de expressão requer a produção de uma quantidade maior de plantas transgênicas para estudo dos genes introduzidos (Chia *et al.*, 1994).

1.3.4. Cultura de tecidos e regeneração de plantas

Os principais métodos disponíveis para obtenção de plantas transgênicas envolvem, em maior ou menor grau, um sistema de cultura de tecidos e regeneração de plantas *in vitro* (de Block, 1993; Birch, 1997; Lacorte & Aragão, 1999). A inexistência de um protocolo eficiente de regeneração, a partir das células transformadas, é um fator limitante para a manipulação genética de plantas (Alves, 1999; Sharma *et al.*, 2005). Cada espécie ou genótipo apresenta diferentes exigências nutricionais e hormonais, e os processos de regeneração e seleção das células transformadas *in vitro* são também dependentes dos tipos de explantes e genótipos utilizados (Brasileiro & Dusi, 1999).

1.3.5. Seleção dos tecidos transformados

A seleção de tecidos transformados é usualmente feita pela introdução de um gene que confere vantagem seletiva às células que o recebem, sobre as que não o possuem. A vantagem seletiva pode ser a sobrevivência dos primeiros ou a proliferação e desenvolvimento destes em contraste à inibição do crescimento das

células não transformadas (Takahashi, 2002). Este tipo de vantagem, denominada de seleção positiva condicional por Miki & McHugh (2004), é conferida ao tecido pela introdução de genes que levam à resistência a antibióticos, herbicidas ou patógenos naturais, e requer adição destes no meio de cultura. Neste caso, a combinação do agente seletivo e sua concentração devem ser ajustadas de tal maneira a permitir somente o crescimento de células/tecidos transformados, e evitar o escape dos não transformados, os chamados falsos positivos. Por outro lado, a dosagem não pode ser excessiva a ponto de evitar também o crescimento dos explantes transformados (Takahashi, 2002).

Outra forma de seleção, a seleção positiva não condicional, pode ser realizada pela inserção/inativação de um gene capaz de alterar o desenvolvimento, permitindo que o crescimento diferenciado dos tecidos/explantes transformados possa distingui-los dos não transformados. Um exemplo tradicional é a utilização do gene *ipt*, presente na região do T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*. Este gene codifica para a enzima isopentenil transferase, que catalisa um dos passos da síntese de citocininas em plantas. O sistema é interessante por evitar utilização de agentes seletivos tóxicos, entretanto causam alterações profundas na morfologia das plantas, como por exemplo, perda da dominância apical e ausência de raízes, indesejável em muitos casos (Miki & McHugh, 2004). Outra alternativa é a visualização e isolamento das células e tecidos transformados pela expressão de um gene repórter não invasivo, como por exemplo, o gene *luc* ou *gfp* (Chia *et al.*, 1994).

No presente trabalho, foi utilizado o gene *hpt*, que confere resistência ao antibiótico higromicina. Este gene é amplamente utilizado como gene de seleção em monocotiledôneas (Yu *et al.*, 1999). Isolado do genoma de *Escherichia coli* por Gritz & Davies (1983), este gene codifica para a enzima higromicina fosfotransferase (HPT ou APH(4')) que inativa o antibiótico por fosforilação de um grupo hidroxil (Takahashi, 2002). A higromicina afeta as células alvos inibindo a síntese de proteínas, impedindo o alongamento da cadeia peptídica por ocupar o sítio de ligação ribossomal do fator de alongação EF-2 em células procariontes. Como os ribossomos de mitocôndrias e cloroplastos de plantas superiores são

similares aos de bactérias, estes são susceptíveis ao antibiótico (Takahashi, 2002).

1.4. Transformação genética de Orquídeas

Os estudos relacionados à transformação genética de orquídeas são razoavelmente recentes em relação a outros grupos vegetais, abrangendo poucos gêneros da grande família Orchidaceae. Até o momento foram relatadas plantas transgênicas de *Dendrobium* (Kuehnle & Sugii, 1992; Chia *et al.*, 1994; Nan & Kuehnle, 1995; Yu *et al.*, 1999, Yu *et al.*, 2000 e 2001; Yang *et al.*, 2003a; Men *et al.*, 2003b; Chang *et al.*, 2005; Chai *et al.*, 2007; Suwanaketchanatit *et al.*, 2007), *Cymbidium* (Yang *et al.*, 1999; Chin *et al.*, 2007), *Phalaenopsis* (Belarmino & Mii, 2000; Chai *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 2004; Mishiba *et al.*, 2005b; Chan *et al.*, 2005), *Oncidium* (You *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2003a e 2003b; Li *et al.*, 2005), *Brassia*, *Cattleya* e *Doritaenopsis* (Knapp *et al.*, 2000) e *Calanthe* (Griesbach, 1994). As publicações e seus principais atributos estão listados na tabela 1.

A maioria dos trabalhos com orquídeas, principalmente os primeiros, refletem a grande dificuldade de se utilizar plantas de crescimento lento e ciclos de vida longos, características que os diferem dos principais modelos e sistemas de transformação de plantas. Exemplificando este fato, não há relatos de protocolos de transformação deste grupo que duram menos de 3 meses, podendo alcançar até 21 meses entre introdução de genes e seleção (Kuehnle & Sugii, 1992). Outro exemplo é o de Griesbach (1994), que não conseguiu realizar análises de PCR em mais do que duas plantas pois estas não atingiam tamanho suficiente após um ano da transformação.

Tabela 1. Resumo dos artigos publicados sobre a transformação genética de orquídeas.

Referência	Gênero	Método	Genes	Material vegetal	Agente seletivo	Período pré-seleção	Período de seleção
Kuehnle & Sugii, 1992	<i>Dendrobium</i>	bombardeamento	35S:Prv (‘papaya ringspot virus coat protein’) nos:nptII	PCM (3 meses)	Canamicina (50-100mg.L ⁻¹)	3 meses	21 meses
Chia et al., 1994	<i>Dendrobium</i>	bombardeamento	35S:luc 35S:cp (CyMV - cymbidium mosaic virus coat protein’)	PLBs e calos	Isolamento manual	21 dias	9 semanas
Griesbach, 1994	<i>Calanthe</i>	eletroforese	35S:uidA nos:nptII	PCMs	-	-	-
Nan & Kuehnle, 1995	<i>Dendrobium</i>	bombardeamento	35S:uidA-nptII	PCMs PLBs e/ou calos Caules estilados	Canamicina (100-200mg.L ⁻¹)	3-4 dias	3-9,5 meses
Yu et al, 1999	<i>Dendrobium</i>	bombardeamento	35S:uidA 35S:hpt	PCMs cortados	Higromicina (50mg.L ⁻¹)	2-3 meses	4-6 meses
Yang et al., 1999	<i>Cymbidium</i>	bombardeamento	35S:uidA-int nos:nptII	PLBs	Canamicina (100-200mg.L ⁻¹)	10-45 dias	Até crescimento de plantas
Belarmino & Mii, 2000	<i>Phalaenopsis</i>	<i>Agrobacterium</i> (LBA4404 e EHA101)	35S:uidA-int nos:hpt	Calos friáveis (em suspensão)	Higromicina (50 mg.L ⁻¹)	-	6 semanas
Knapp et al., 2000	<i>Brassia</i> <i>Cattleya</i> <i>Doritaenopsis</i>	bombardeamento	35S:bar	PCMs e PLBs cortados	Bialaphos (PPT)	48h	2-6 meses
Chai et al., 2002	<i>Phalaenopsis</i>	<i>Agrobacterium</i> (LBA4404)	35S:uidA-int 35S:hpt nos:nptII	PLBs feridos ou bissecionados	Higromicina (1,5-2mg.L ⁻¹)	6 semanas	2 meses
You et al., 2003	<i>Oncidium</i>	bombardeamento <i>Agrobacterium</i> (EHA 105)	35S:pflp 35S:hpt 35S:gfp-uidA	PLBs cortados	<i>Erwinia carotovora</i> e higromicina	1 mês	3 meses
Liau et al., 2003a	<i>Oncidium</i>	<i>Agrobacterium</i> (EHA105 e LBA4404)	35S:hpt 35S:uidA-int	PLBs cortados	Higromicina (5mg.L ⁻¹)	1 mês	3 meses
Liau et al., 2003b	<i>Oncidium</i>	<i>Agrobacterium</i> (EHA105)	35S:pflp 35S:hpt 35S:gfp-uidA	PLBs cortados	Higromicina (5mg.L ⁻¹)	1 mês	3 meses
Men et al., 2003a	<i>Dendrobium</i>	bombardeamento	35S:hpt 35S:uidA-int	Calos e PLBs cortados	Higromicina (30mg.L ⁻¹)	2-10 dias	Mínimo de 3 meses

Continuação

Men et al., 2003b	<i>Dendrobium</i>	<i>Agrobacterium</i> (EHA105 e AGL1)	35S:hpt 35S:uidA-int	PLBS cortados	Higromicina (30mg.L ⁻¹)	-	3 meses
Yu et al., 2000	<i>Dendrobium</i>	bombardeamento	35S:DOH1-sense 35S:DOH1-antis. (desenvolvimento de caules) Nos: nptII	Seções finas de PLBs (1mm)	Canamicina (200-250mg.L ⁻¹)	4 dias	3 períodos de seleção de Calos
Yu et al., 2001	<i>Dendrobium</i>	<i>Agrobacterium</i> (LBA4404)	35S:DOH1-antis. nos: nptII	Seções finas de PLBs (1mm)	Canamicina (200mg.L ⁻¹)	3-4 semanas	6-8 meses
Yu et al., 2002	<i>Dendrobium</i>	bombardeamento	Vários pDOMADS1:uidA (Gene relacionado a órgãos florais)	Seções finas de PLBs (1mm)	Canamicina (200mg.L ⁻¹)	-	6-8 meses
Yang et al., 2003a	<i>Dendrobium</i>	<i>Agrobacterium</i> (LBA4404)	35S:DSCX1-sense 35S:DSCX1-antis. (gene da citocinina oxidase de orquídeas)	Seções finas de PLBs (1mm)	Canamicina (200mg.L ⁻¹)	-	6-8 meses
Liao et al., 2004	<i>Phalaenopsis</i>	bombardeamento	ubi:cp 35S:hpt 35S:gfp-uidA	PLBs	Higromicina (25ppm)	Escuro 7 dias. Claro até formação de novos PLBs	Até formação de plantas
Chang et al., 2005	<i>Dendrobium</i>	bombardeamento	35S:cp 35S:hpt	PCMs jovens (15 dias)	Higromicina (20mg.L ⁻¹)	1 semana	6 meses
Chan et al., 2005	<i>Phalaenopsis</i>	bombardeamento e <i>Agrobacterium</i> (LBA4404)	ubi:cp 35S:pflp	PLBs e PLBs cortados	Higromicina (25ppm)	2 semanas Liao et al., (2004) Yu et al., (2003)	2 semanas Liao et al., (2004) Yu et al., (2003)
Li et al., 2005	<i>Oncidium</i>	bombardeamento	35S:pflp 35S:hpt 35S:uidA	PLBs	Higromicina (5mg.L ⁻¹)	40 dias	3 meses
Mishiba et al., 2005b	<i>Phalaenopsis</i>	<i>Agrobacterium</i> (EHA101)	hpt uidA nptII	PLBs	Higromicina (20mg.L ⁻¹)	1 semana	2 meses, alternados à fase de crescimento
Chai et al., 2007	<i>Dendrobium</i>	bombardeamento	nos:bar 35S:DcOSEP1	Calos friáveis	I-Methionine sulfoximine 5-10uM (D. Madame Tong in) 0,5-2uM (D. Chao Praya Smile)	4 dias	3 meses
Chin et al., 2007	<i>Cymbidium</i>	<i>Agrobacterium</i> (EHA101)	hpt uidA nptII	PLBs (1 mês)	Higromicina (20mg.L ⁻¹)	-	Mais de 3 meses
Suwanaketchanatit et al., 2007	<i>Dendrobium</i>	bombardeamento	hpt ubi:gfp	PLBs ativos	Higromicina (5-30mg.L ⁻¹)	3 dias	4 meses

Um dos primeiros trabalhos foi realizado por Kuehnle & Sugii (1992), os quais utilizaram as técnicas de bombardeamento de micropartículas em protocormos e o antibiótico canamicina como agente seletivo, para obtenção de plantas contendo o gene *35S:prv*, que codifica para a “papaya ringspot virus coat protein”, conferindo resistência a potívirus. Entretanto, como todo sistema pioneiro, os autores encontraram muitas dificuldades, principalmente na seleção e distinção dos tecidos transformados e na integração do gene de interesse, levando à obtenção de plantas com um mosaico de tecidos transformados e não transformados. Apenas uma planta contendo *prv* foi observada.

Promotores e genes utilizados

O promotor 35S do vírus de mosaico da couve-flor (CaMV) vem sendo utilizado intensamente até o momento em estudos de transformação genética de orquídeas, por meio da regulação do gene de seleção, do gene repórter e/ou do gene de interesse (Kuehnle & Sugii, 1992; Chia *et al.*, 1994; Nan & Kuehnle, 1995; Yang *et al.*, 1999; Knapp *et al.*, 2000; Belarmino & Mii, 2000; Yu *et al.*, 2001; Chai *et al.*, 2002; You *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2003; Men *et al.*, 2003). Recentemente, Suwanaketchanatit *et al.* (2007) empregou outro promotor de grande expressão, o *ubi1*, utilizado principalmente em monocotiledôneas, dentro do vetor de expressão pMNK1005.

Estudos de Yu *et al.* (2000, 2001 e 2002), bem como outros artigos deste grupo de pesquisa (Yang *et al.*, 2003a e Chai *et al.*, 2007) vêm se destacando por estudar genes de desenvolvimento de orquídeas. Yu *et al.*, (2000 e 2001) descreveram o isolamento e caracterização do gene *DOH1* (*Dendrobium Orchid Homeobox 1*), o primeiro gene homeótico isolado de orquídeas. Os autores também realizam um estudo funcional a partir de transformação genética de *Arabidopsis* e *Dendrobium*, tanto por biobalística quanto por *Agrobacterium*. Nestes estudos, eles verificaram a formação anormal de múltiplos caules pela introdução do gene antisense de *DOH1*. Conjuntamente com a descrição de

DOH1, Yu *et al.* (2001 e 2002) descreveram um grupo de genes da família MADbox, os genes *DOMADS*, cujas seqüências dos promotores, quando fusionadas à *uidA* e introduzidas em orquídeas, apresentaram expressão na fase de transição do meristema apical caulinar para meristema floral.

Da mesma forma, Yang *et al.* (2003a) isolaram e estudaram funcionalmente o gene da citocinina oxidase em *Dendrobium* (*DSCCKX1* – *Dendrobium Sonia cytokinin oxidase 1*), utilizando plantas transgênicas deste gênero com os genes na posição senso e antisense.

Material vegetal alvo e cultura de tecidos

NA maioria dos estudos sobre a transformação genética de plantas de orquídeas, têm sido utilizados protocormos – PCM, ou seja, embriões em estágios iniciais de desenvolvimento, bem como estruturas semelhantes à protocormos (“protocorm like bodies” – PLB), estes últimos obtidos a partir de cultura de tecidos meristemáticos, como material para a transformação. Ambas as estruturas contendo células potencialmente meristemáticas nas camadas superficiais, apresentam a vantagem de ser facilmente obtidas através da germinação assimbiótica de sementes (os protocormos propriamente ditos) ou da cultura de tecidos geneticamente estáveis, como os meristemas. Outra vantagem é a possibilidade de re-indução de formação de PLBs, os quais se originam de poucas ou até mesmo de uma única célula de PCMs ou PLBs. Muitos dos autores utilizaram-se também da estratégia de seccionar as estruturas em diversas partes, a fim de aumentar a área de contato com *Agrobacterium* e potencializar a regeneração de novos PLBs, durante a seleção (Chai *et al.*, 2002; You *et al.*, 2003; Liau *et al.*, 2003a e b; Yang *et al.*, 2003a; Chan *et al.*, 2005). Yu *et al.* (2000, 2001 e 2002) utilizaram seções finas de PLBs (1mm) tanto para transformação por bombardeamento quanto por *Agrobacterium*. Com o objetivo de descartar a possibilidade de obtenção de plantas quiméricas, tem-se

procurado induzir, repetidamente, a formação de PLBs durante a fase de seleção dos tecidos, tornando o processo de seleção mais longo.

Nan & Kuehnle (1995) testaram com relativo sucesso, também, a utilização de caules estiolados para a transformação, ou seja, tecidos não meristemáticos e geneticamente homogêneos. Apesar dos resultados terem sido favoráveis, a eficiência de transformação foi menor do que através da utilização de PLBs.

A utilização de calos permite a possibilidade de regenerar plantas a partir de células isoladas, ou seja, recuperar eventos isolados de transformação e diminuir a chance de formação de quimeras. Esta estratégia foi utilizada com sucesso por Belamino & Mii (2000) e Chai *et al.* (2007), sendo que o primeiro obteve cerca de 10-24 plantas transgênicas por grama de células bombardeadas. Entretanto, além destas estruturas serem de difícil obtenção, principalmente em orquídeas, a grande necessidade de utilização de fitohormônios e a manipulação de cultura de tecidos requerida aumentam as chances de problemas de alteração somaclonal (Phillips *et al.*, 1994; Mishiba *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005).

Em relação à *Catasetum pileatum*, dois protocolos eficientes de propagação *in vitro* através de ápices radiculares (Kerbaux, 1984a) e gemas de caules estiolados (Kerbaux *et al.*, 1995) vêm sendo utilizados rotineiramente neste laboratório. Além destes protocolos já se encontrarem estabelecidos há um bom tempo, os explantes utilizados para regeneração *in vitro* nos referidos métodos acenam como potencialmente favoráveis ao processo de transformação genética. A técnica de regeneração direta de plantas a partir de tecidos meristemáticos pode substituir, vantajosamente, a utilização da fase de calo, eliminando a necessidade de tratamento com reguladores de crescimento e assim, as oportunidades de variação somaclonal (Yang *et al.*, 1999). Além disso, a eficiência da transformação via *Agrobacterium* e biobalística parece aumentar pela utilização de tecidos alvos com alta taxa de células em divisão mitótica (Iida *et al.*, 1991; Sangwan, 1992; Villemont *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1999; Guidolim, 2003).

A regeneração de gemas caulinares a partir da cultura de raízes isoladas é uma estratégia desejável para evitar o uso de meristemas caulinares apicais para a micropropagação, especialmente em orquídeas, uma vez que os explantes

apresentam elevado grau de oxidação, além de que a excisão destes tecidos prejudica intensamente o crescimento e desenvolvimento da planta de origem, podendo levar até à perda desta (Philip & Nainar 1986; Stewart & Button, 1978).

A formação de gemas a partir de raízes geminíferas foi observada, primeiramente, em espécies lenhosas que normalmente apresentam esta capacidade sob condições naturais (Torrey, 1958; Kerbauy, 1999). Neste caso, as gemas formam-se nas superfícies estéreis das raízes. No ambiente natural, a capacidade de gerar gemas a partir de raízes está associada a espécies sujeitas periodicamente a algum tipo de distúrbio ambiental, tais como queimadas (Hayashi *et al.*, 2001). Em espécies que não possuem raízes geminíferas, a formação de gemas *in vitro* tem sido obtida mediante envelhecimento da cultura ou adição de substâncias reguladoras de crescimento (Lazzeri & Dunwell, 1984), sendo que a formação das gemas pode ocorrer diretamente dos tecidos da raiz ou ser precedida pela formação de calo.

Em geral, seções distantes do ápice têm se mostrado mais favoráveis tanto à proliferação celular quanto à conseqüente formação de calos. O câmbio, o felogênio e os tecidos corticais são os tecidos mais constantemente envolvidos no estabelecimento da cultura (Kerbauy, 1999). Segundo Lazzeri & Dunwell (1984), a maior capacidade regenerativa das regiões mais maduras dos segmentos radiculares seriam resultantes da atividade do periciclo.

Métodos de transformação

Em relação aos métodos de transformação, a biobalística foi o processo empregado nas primeiras tentativas de transformação de orquídeas, como uma alternativa à baixa susceptibilidade destas plantas a infecções por *Agrobacterium tumefaciens* (Kuehnle & Sugii, 1992; Chia *et al.*, 1994). Mesmo após o aprimoramento da utilização de *Agrobacterium* para orquídeas, as técnicas de biobalística vêm sendo empregadas de forma constante para a otimização de outros sistemas repórteres, de seleção, estudo de promotores, genes e

construções plasmideais (Yu *et al.*, 2000, 2001 e 2002; Yang *et al.*, 2003a; Su & Hsu, 2003; Tee *et al.*, 2003; Tee & Maziah, 2005; Suwanaketchanatit *et al.*, 2007).

Nan & Kuehnle (1995), estudaram alguns fatores que interferem na expressão transiente de genes em tecidos de *Dendrobium* por bombardeamento. Neste trabalho, os autores verificaram que o tipo de estrutura (PLBs), o plasmídeo (promotor) e o tamanho das partículas utilizadas afetavam significativamente a expressão transiente de *uidA*. Diferentemente, Suwanaketchanatit *et al.* (2007) não observaram diferenças significativas na expressão de *uidA* frente aos diferentes tipos de partículas, tamanho dos explantes alvos e distância dos tiros, porém verificaram que estes fatores afetavam a sobrevivência dos explantes e, assim, a eficiência da transformação. Já a variação de pressão dos bombardeamentos não levou a diferenças na atividade de *uidA* e nem na transformação em ambos os estudos.

A partir do ano 2000, têm sido obtidos alguns sucessos na infecção de espécies orquidáceas por *Agrobacterium tumefaciens*. Já foram estabelecidos protocolos para *Phalaenopsis*, *Oncidium* e *Dendrobium* (Belarmino & Mii, 2000; Yu *et al.*, 2001; You *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2003a; Mishiba *et al.*, 2005b), e mais recentemente para *Cymbidium* (Chin *et al.*, 2007). Tais conquistas foram inicialmente possíveis a partir do relato da existência de indutores de genes de virulência de *Agrobacterium* em algumas orquídeas (Nan *et al.*, 1997). A utilização de compostos fenólicos tais como a acetossiringona (AS), que mimetizam o processo dos indutores de genes de virulência, também tem se mostrado eficiente e geralmente necessário para a reprodutibilidade dos protocolos, sendo adicionada nas etapas de co-cultivo e até mesmo antes, durante o crescimento da bactéria e/ou pré-indução do material vegetal (You *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2003a; Mishiba *et al.*, 2005b). Outro fator determinante foi o desenvolvimento de protocolos com duas ou mais etapas de co-cultivos, sendo o primeiro por um tempo curto, geralmente em meio líquido, conhecido como fase de inoculação, e o segundo em meio sólido, por um período mínimo de três dias. Entretanto, Yu *et al.* (2001) e Liao *et al.* (2003a) informam ter utilizado uma terceira etapa de co-cultivo de quatro semanas, com a adição de baixas concentrações de timentina ou cefotaxime em meio sólido, no intuito de reduzir o crescimento de *Agrobacterium*,

ao mesmo tempo em que se prolongava o período de transformação. Yu *et al.* (2002) e Yang *et al.* (2003a) repetiram o processo com sucesso.

Por último, um trabalho realizado por Griesbach (1994) testou a utilização de eletroforese para a introdução de genes diretamente nos tecidos de PCMs de *Calanthe*, sem passagem por cultura de tecidos. Os PCMs de três semanas foram posicionados entre duas ponteiras de 1mL, uma das quais contendo plasmídeos pBI121 dentro de 150 uL de agarose-tampão. O restante do volume das ponteiras foi preenchido com tampão TAE. Após aplicação de 5-10 minutos de 0,5mA de corrente, foi observada a sobrevivência de 45% dos protocormos, dos quais 55% apresentavam expressão constante de GUS nas folhas após um ano de crescimento. Dentro das plantas sobreviventes, foi possível realizar PCR de apenas duas plantas (apenas uma expressando GUS), sendo que as duas apresentaram bandas para o inserto *uidA*. Apesar de o método parecer eficiente para transformação, a porcentagem de sobrevivência dos tecidos foi baixa, além do método ser extremamente trabalhoso, uma vez que os autores puderam testar apenas 25 protocormos por dia.

Seleção de tecidos transformados

A seleção de tecidos transgênicos é uma das principais limitações e desafios em transformações genéticas de orquídeas, por diversos fatores. Em primeiro lugar, as células deste grupo apresentam taxas de proliferação muito baixas. Segundo, as orquídeas são, até o momento, recalcitrantes à muitas formas de manipulação de cultura de tecidos, fato exemplificado pela incapacidade de regeneração de plantas a partir de células diferenciadas. Terceiro, as culturas de células de orquídeas exsudam uma grande quantidade de substâncias fenólico-oxidadas que são tóxicas às próprias células (Yu *et al.*, 1999). Em consequência, esta etapa da transformação tem recebido grande atenção em estudos voltados às transformações genéticas com representantes desta família.

Uma estratégia desenvolvida para minimizar estas limitações tem sido a utilização de períodos longos de seleção, com vários subcultivos e repetidas induções de novos órgãos ou PLBs. Em orquídeas, via de regra, as fases de seleção mais curtas raramente são inferiores a três meses.

O tempo entre a introdução dos genes e a transferência para meio de seleção também vem sendo bastante considerado. Uma vez que os tecidos de orquídeas apresentam crescimento muito lento, a introdução de agentes seletivos, logo em seguida à introdução dos genes, leva à inibição do crescimento e a perda inclusive das células transformadas. Desta forma, dependendo do tecido em questão, o período de pré-seleção pode alcançar até três meses (Kuehnle & Sugii, 1992; Yu *et al.*, 1999; Liau *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005).

Kuehnle e Sugii (1992) foram um dos primeiros grupos a estudar a seleção em orquídeas. Para a transformação utilizaram como gene de seleção o gene *neo*, cuja enzima, neomicina fosfotransferase II (NPTII), fosforila o grupo 3'hidroxil da porção aminohexose de antibióticos aminoglicosilados (Brasileiro e Dusi, 1999). Como agente seletivo, foi utilizado o antibiótico canamicina, após 3 meses do bombardeamento. Apesar dos testes preliminares indicarem a inibição completa do crescimento a partir de 150mg.L⁻¹, os autores optaram por utilizar 50mg.L⁻¹ como seleção inicial por três meses, procurando assim, evitar o efeito inibitório do antibiótico, seguido de subcultivos em meio com 100mg.L⁻¹ durante 21 meses. Conforme os próprios autores reconheceram, houve uma considerável dificuldade em diferenciar os tecidos transformados dos não transformados, e formação de plantas com alto grau de quimerismo. Apesar de diversos trabalhos indicarem uma necessidade de concentrações elevadas de canamicina para a seleção de orquídeas, como é o caso por exemplo de 500mg.L⁻¹ (Chia *et al.*, 1994), estudos posteriores buscaram o refinamento da seleção de orquídeas por este antibiótico (Nan & Kuehnle, 1995; Yang *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000 e 2001).

Em 1994, Chia *et al.* reportaram um método diferenciado de seleção. Após inserção do gene *luc* por meio de bombardeamento de micropartículas em *Dendrobium*, os autores isolaram manualmente as células transformadas que emitiam luminescência da luciferina por meio de um microscópio adaptado. Este método apresentou-se muito eficiente, não permitindo a formação de quimeras,

entretanto foi criticada por outros autores por ser pouco reprodutível e dispendioso, dada a necessidade de equipamentos muito específicos e demandando grande destreza e trabalho manual (Yang *et al.*, 1999). Suwanaketchanatit *et al.* (2007), utilizaram vantajosamente a potencialidade do *gfp* como um gene repórter não destrutivo, porém acoplado à seleção das células dos PLBs por higromicina, podendo com esta avançar o conhecimento sobre a seleção e regeneração dos PLBs transgênicos.

Uma vez que os primeiros estudos com transformação de orquídeas indicaram a dificuldade de seleção por antibióticos aminoglicosilados como a canamicina (Chia *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1999), a seleção por higromicina mostrou-se mais eficiente e decisiva para a devida discriminação de tecidos transformados, sendo desta forma, utilizado na maioria dos trabalhos a partir de 1999 (Yu *et al.*, 1999; Belarmino & Mii, 2000; Chai *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 2003; Men *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Mishiba *et al.*, 2005; Chin *et al.*, 2007 e Suwanaketchanatit *et al.* (2007).

Knapp *et al.*, em 2000, utilizou o gene *bar* que codifica para a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT) que inativa o herbicida fosfinotricina (PPT) por meio de acetilação do grupo amino. Após o processo de seleção de três gêneros de orquídeas com 1 e 3mg.L⁻¹ de herbicida, as plantas transgênicas obtidas mostraram-se resistentes à aplicação do produto diretamente nas folhas. Entretanto, Chai *et al.* (2007), argumentando sobre a existência de inibidores nas misturas comerciais de PPT e o preço elevado do produto, substituíram este agente seletivo pelo análogo MSO (L-metionina sulfoximina), com efeitos incrementados na seleção dos tecidos transformados.

Outra forma de seleção tem sido a utilização de genes que conferem resistência a um patógeno. You *et al.* (2003) transformaram PLBs de um híbrido de *Oncidium* com o gene *pflp*, que codifica para uma proteína semelhante à ferredoxina, de atividade antimicrobiana, proveniente de *Capsicum annuum* L.. Assim, para a seleção, os explantes foram infectados diretamente com o patógeno *Erwinia carotovora*, e os tecidos transformados foram capazes de sobreviver por suprimir o crescimento bacteriano.

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

Objetivos gerais do trabalho

- Ø Desenvolver um protocolo para a transformação genética por biobalística de tecidos meristemáticos radiculares e caulinares de *Catasetum pileatum* (Orchidaceae).

Objetivos específicos do trabalho

- Ø Identificar promotores que sejam funcionais em tecidos de *C. pileatum* para as abordagens da transformação genética.
- Ø Estabelecer um protocolo de cultura de tecidos, para produção de estruturas adequadas à transformação genética.
- Ø Definir a concentração de higromicina para a seleção dos tecidos transformados.
- Ø Padronizar a etapa de pós-bombardeamento e a de seleção de tecidos transformados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Foram utilizados como materiais alvos para a transformação genética tanto ápices radiculares (ARs) quanto gemas laterais de caules estiolados (CEs) de plantas de *Catsetum pileatum* Reichb. F. (Orchidaceae), ambos obtidos de um germoplasma clonado e mantido *in vitro*. Estes explantes foram respectivamente denominados “ARs” e “CEs”. Ambos os tipos de materiais (explantes) foram seccionados com aproximadamente 0,6 cm de comprimento. Nos experimentos de biobalística, foram também utilizadas pétalas de *C. pileatum* e para controle dos experimentos, catáfilos de *Allium cepa*.

Obtenção do material vegetal

Foi utilizado o clone de *Catsetum pileatum* mantido no estoque de germoplasmas do laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade de São Paulo, propagado através da técnica estabelecida por Kerbauy *et al.* (1995). Para tanto, plantas crescidas no claro, já com pseudobulbos, são transferidas para condições de escuro, na qual os meristemas caulinares apicais e laterais retomam o crescimento, originando estolões esbranquiçados, com crescimento indeterminado, folhas reduzidas a simples escamas, entrenós alongados, e nós com uma gema lateral cada. Após um período mínimo de três meses, os estolões foram seccionados em segmentos nodais contendo gemas, os quais foram transferidos para meio de cultura e incubados sob luz para a obtenção de plantas verdes e completas. Estas plantas, por sua vez, podem ser utilizadas para fins experimentais, ou então transferidas para o escuro com a produção de estolões, fechando o ciclo. Este método permite a obtenção de plantas experimentais em grande quantidade, em tempo reduzido e sem alterações genéticas. Até o

momento não foi observada qualquer alteração fenotípica nas referidas plantas que pudesse indicar a ocorrência de algum tipo de variação somaclonal.

3.1.1. Crescimento de plantas no escuro e obtenção de CEs

O meio de cultura para crescimento no escuro consistiu na adição dos macronutrientes de Vacin & Went (1949), modificado pela substituição de citrato de ferro por 27 mg.L⁻¹ de Fe-EDTA e pela adição de micronutrientes de Murashige & Skoog (1962), 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 1,0 g.L⁻¹ de peptona de soja e 0,1 mg.L⁻¹ de tiamina. O pH foi ajustado para 5,8 com KOH, seguido da geleificação com 7 g.L⁻¹ de ágar. Foram distribuídos 100mL de meio por frasco de soro (750mL de capacidade), os quais foram fechados com rolha de borracha perfurada, cujo furo foi preenchido com algodão. A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C por 15 minutos. Após a inoculação de 15 plantas por frasco em ambiente estéril, adicionou-se ao tufo de algodão das rolhas uma gota de solução de sulfato de cobre. As plantas foram mantidas no escuro por um período entre três a seis meses, para estiolamento.

Após o período de estiolamento, os estolões foram seccionados em segmentos nodais contendo 1 gema cada, transferidos para meio de cultura e incubados no claro, ou seccionados em explantes de 0,6cm de comprimento, também contendo gemas individuais, para utilização nos experimentos.

3.1.2. Crescimento de plantas no claro e obtenção de ARs

Para o crescimento das plantas no claro, os CEs foram inoculados em meio de cultura contendo os macronutrientes de Vacin & Went (1949), modificado pela substituição de citrato de ferro por 27 mg.L⁻¹ de Fe-EDTA, adição dos micronutrientes de Murashige & Skoog (1962), 60g.L⁻¹ de polpa de banana nanica

madura, 15% de água de coco, 1 g.L⁻¹ de carvão ativado e 20 g.L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 com KOH e o meio foi geleificado com 7 g.L⁻¹ de ágar, seguido da esterilização em autoclave a 120°C por 15 minutos. Após inoculação das plantas e adição do sulfato de cobre às rolhas, as plantas foram crescidas sob 16 horas a 40 μmol.m⁻².s⁻¹ de luz provida por lâmpadas fluorescentes (tipo luz diurna), a uma temperatura de 26 ± 1°C.

Para os experimentos, os ARs com cerca de 0,6 cm de comprimento foram isolados de plantas com dois a três meses de idade. A figura 2 resume as principais etapas necessárias à obtenção dos materiais vegetais.

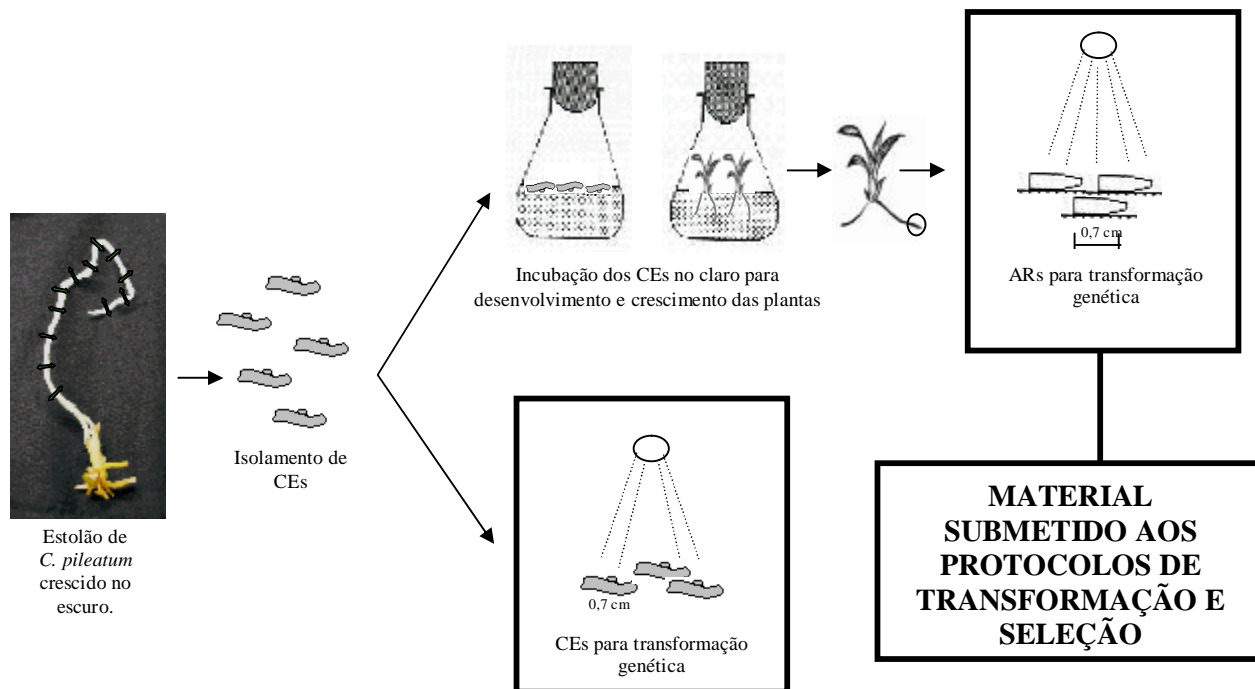


Figura 2. Obtenção de segmentos nodais de caules estiolados (CEs) e de ápices radiculares (ARs) utilizados nos procedimentos de transformação genética.

3.2. Análise de promotores

Diferentes promotores foram analisados quanto à intensidade de expressão nos tecidos de *C. pileatum*, visando seleção daqueles mais adequados aos testes de transformação genética. Amostras dos vetores contendo diferentes promotores regulando a expressão do gene *uidA* a serem testados foram gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Marie-Anne Van Sluys, do Laboratório GaTE/IB/USP.

3.2.1. Extração de DNA plasmidial (“midiprep”)

As linhagens de *E.coli* contendo os vetores de interesse encontravam-se armazenadas à -70°C, em glicerol 25%, no mencionado laboratório. Amostras foram transferidas para 2mL de meio de cultura LB líquido contendo o antibiótico adequado (Anexo 1) e mantidos no escuro, a 37°C sob agitação (200rpm), por 24 horas. Cada cultura foi então inoculada em meio seletivo LB sólido e mantida por mais 24 horas à 37°C para crescimento de colônias. Amostra de uma colônia de cada placa foi transferida para 2mL de LB líquido contendo o antibiótico adequado, e mantido sob agitação nas mesmas condições. Após 12 horas, adicionou-se mais 100mL de meio em frascos Erlenmeyer 500mL e a cultura foi mantida sob agitação nas mesmas condições de um dia para o outro.

A extração e purificação do DNA foram realizadas segundo procedimentos padrões do Laboratório GaTE (Botânica/IB/USP), descritas a seguir:

A cultura de *E. coli* foi centrifugada durante 15 minutos (Superspeed RC5-B Sorvall – rotor GSA), a 600rpm, em temperatura ambiente. O precipitado obtido foi ressuspenso em 4mL de tampão GTE e transferido para tubos gelados. Após 10 min, adicionou-se 8mL de NaOH 0,2N/SDS1% (feito na hora), e a mistura foi mantida por mais 10 minutos no gelo. Em seguida, foi adicionado 6mL de KOAc 3M. Após 10 minutos no gelo, realizou-se a centrifugação (Superspeed RC5-B Sorvall – rotor GSA) por 40 minutos, a 1100rpm, à 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo ao qual foi adicionado 0,6 volume de isopropanol, e

incubado por 60 minutos à temperatura ambiente, para precipitação do DNA. Após este período, procedeu-se a centrifugação por 20 minutos, a 7000 rpm, sob temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspenso em 500µL de tampão TE.

Purificação por polietilenoglicol: o material foi transferido para tubos Eppendorf de 2mL ao qual foi adicionado 500µL de LiCl 5M gelado, e centrifugado a 14000rpm (centrífuga Universal 30RF, Hettich Zentrifugem), 4°C, por 10 minutos. Ao sobrenadante adicionou-se 500µL de isopropanol. Após 10 minutos em temperatura ambiente, procedeu-se a centrifugação a 14000rpm, por 10 minutos, à mesma temperatura. Em seguida, o precipitado foi suspenso em 200µL de TE, ao qual foi adicionado 4µL de RNase (estoque 10mg/mL) e incubado por 15 minutos a 37°C. Após a degradação do RNA, foi adicionado 400µL de 1,6M NaCl/13% PEG 800 gelada. A mistura, bem homogeneizada, foi incubada por 45 minutos no gelo. Após este tempo, procedeu-se a centrifugação por 15 minutos, a 10000rpm. O sobrenadante foi suspenso em 200µL de TE, ao qual foi adicionado 150µL de NH₄Oac 7,5M, misturado e acrescido de 1100µL de etanol 100%, à temperatura ambiente. A mistura foi precipitada ao longo da noite à -20°C. Após a precipitação, centrifugou-se a 14000 rpm, por 20 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1mL de etanol 70%, seguido da centrifugação a 14000rpm, à 4°C, por 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, o material foi seco em temperatura ambiente, e ressuspenso em tampão TE.

Os resultados das midi-preparações foram observados em gel de agarose 0,7% em tampão TBE 0,5X, com marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen).

3.2.2. Bombardeamento com micropartículas

Foram utilizadas partículas de tungstênio M17 de 1,1µm de diâmetro (Bio-Rad). Para tal fim, 24 mg de partículas foram lavadas em 1mL de etanol absoluto e centrifugadas a 13000 rpm, à 20°C, por 5 minutos. Após repetição do processo por três vezes, as partículas foram suspensas em 250µL de glicerol 50%. Sob agitação, o DNA (2µg de pCAMBIA 1281Z+35S, ou a quantidade equivalente de

moléculas de outros plasmídeos), diluído para 22,5µL de H₂O, foi adicionado à 22,5µL de solução de partículas, seguido da adição de 37,5µL de CaCl₂ (2,5M) e de 15µL de espermidina (0,1M). Após 5 minutos de agitação, o material foi centrifugado à 14000rpm, à 21°C, por 5 minutos. A mistura precipitada foi lavada em etanol 70%, centrifugada e suspensa em 25µL de etanol absoluto. Foram dispensados 6µL da solução no centro de cada membrana carreadora. Após a secagem, os bombardeamentos foram conduzidos em acelerador de partículas da CENARGEM, sob vácuo de 27 polegadas de mercúrio, com pulsos de gás hélio de 1100 psi na câmara de vácuo. A distância entre a tela de retenção e o material vegetal alvo foi de 11 cm.

3.2.3. Análise histoquímica da expressão do gene *uidA*

A expressão do gene *uidA* foi verificada por procedimentos de coloração histoquímica descritos por Brasileiro & Carneiro (1998). Após a coloração e antes das observações, os materiais clorofilados foram tratados com etanol 70% para remoção dos pigmentos.

3.2.4. Análise da expressão de *uidA* regulada por diferentes promotores

Nesta triagem, além do clássico promotor 35S de CaMV, foram analisados também os promotores de genes ligados ao reparo de DNA (*PAtXPB1* e *PAtXPB2*), *Pthi1* e promotores de genes de retrotransposons (PTE010 e PTE027). Os promotores e suas especificações estão resumidos na tabela 2.

Tabela 2. Promotores utilizados na primeira triagem e suas origens, referências, vetores aos quais estão inseridos e gene repórter ao qual estão fusionados.

Promotor	Origem (gene, referência)	vetor	Gene repórter	Gene de seleção
35S	Promotor 35S do vírus do mosaico de couve-flor (CaMV) (Franck et al., 1980)	pCAMBIA 1281Z	<i>uidA</i>	<i>hpt</i> (resistência à higromicina)
P_{thi1}	Promotor do gene ligado à síntese de tiamina em <i>Arabidopsis</i> (Ribeiro et al., 2005)	pCAMBIA 1281Z	<i>uidA</i>	<i>hpt</i> (resistência à higromicina)
P_{AtXPB1}	Promotor do gene <i>AtXPB1</i> ligado ao reparo do DNA em <i>Arabidopsis</i> (Costa et al., 2001; Morgante et al., 2005)	pCAMBIA 1291Z	<i>uidA</i>	<i>hpt</i> (resistência à higromicina)
P_{AtXPB2}	Promotor do gene <i>AtXPB2</i> ligado ao reparo do DNA em <i>Arabidopsis</i> (Morgante et al., 2005)	pCAMBIA 1291Z	<i>uidA</i>	<i>hpt</i> (resistência à higromicina)
PTE010	Promotor do retrotransposon de <i>Saccharum sp.</i> , “Hopscotch-like” (Araujo & Rossi et al., 2005)	pBI221	<i>uidA</i>	<i>amp</i> (resistência à ampicilina)
PTE027	Promotor do retrotransposon de <i>Saccharum sp.</i> , “Maggy-like” (Araujo & Rossi et al., 2005).	PBI221	<i>uidA</i>	<i>amp</i> (resistência à ampicilina)

Foram bombardeados ARs, CEs e pétalas de *C. pileatum*. O monitoramento da viabilidade do DNA foi realizado bombardeando-se epidermes de catáfilos de *Allium cepa*. Como controle negativo, bombardeou-se pCAMBIA1281Z contendo o gene repórter sem promotor em todos os tecidos testados. Foram expostos 30 ARs, 30 CEs, uma pétala ou um catáfilo dispostos no centro de placas de Petri médias contendo o seguinte meio: meio Vacin & Went modificado, o qual foi chamado de “VW básico”. Este meio consiste nos macronutrientes de Vacin & Went (1949) modificado pela substituição do citrato de ferro por 27 mg.L⁻¹ de Fe-EDTA, adição dos micronutrientes de Murashige & Skoog (1962) e 20g.L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 com KOH e o meio foi geleificado com 7g.L⁻¹ de ágar.

Todos os materiais recobriam uma área maior que 400mm² do centro das placas. Cada placa foi bombardeada duas vezes. Os bombardeamentos foram feitos em duplicata, ou seja, 2 placas por tecido/promotor. Após os

bombardeamentos, o material vegetal foi mantido no escuro sob temperatura ambiente por 24 horas, antes da análise histoquímica com X-gluc.

Análise da expressão de *uidA* regulado pelos promotores de 35S, TE027 e *thi1*.

A partir do primeiro teste, foram selecionados os promotores que melhor apresentaram expressão em *Catasetum pileatum*. Foram bombardeados ARs e CEs de *C. pileatum* e utilizados os mesmos controles positivos e negativos descritos no item 3.2.4. Antes dos bombardeamentos, a região de incidência dos disparos foi definida através de tiros contendo somente partículas de tungstênio incidindo sobre um papel de filtro. Em seguida, foi padronizada uma área circular de 415mm² da placa de Petri contendo uma camada do meio de VW básico (item 3.2.4.), no qual o material vegetal foi posicionado. Esta área circular excluía a região de maior incidência dos tiros de acordo com a figura 3, evitando desta forma, que os tecidos vegetais sofressem injúrias intensas, acarretando a morte de partes dos mesmos. Os bombardeamentos foram realizados em triplicata.

O material bombardeado foi mantido no escuro, sob temperatura ambiente, por 24 horas, antes da análise histoquímica.

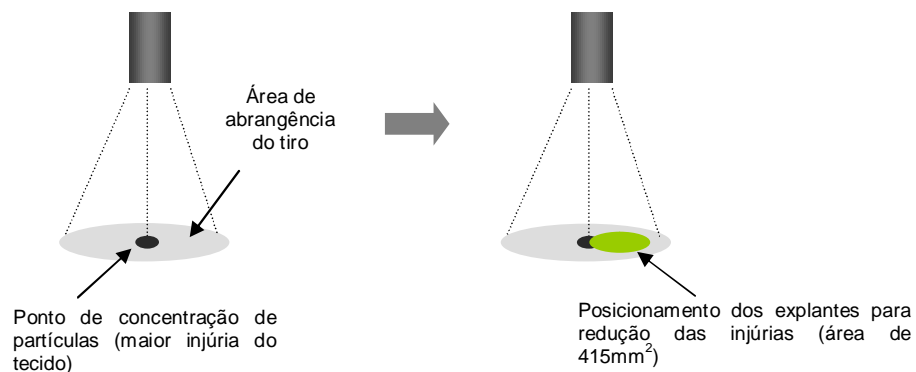


Figura 3. Esquema dos bombardeamentos com padronização do tamanho da área de cobertura do material vegetal, onde é mostrada a exclusão da região de maior incidência de partículas.

3.3. Obtenção de estruturas adequadas à transformação genética

3.3.1. Análise do potencial regenerativo de segmentos de ápices radiculares (ARs): efeito de auxina e citocinina

Foram analisados os efeitos dos seguintes reguladores de crescimento, nas seguintes concentrações: 0,25 e 0,5mg.L⁻¹ de ANA e 0,2 e 0,5mg.L⁻¹ de BA, em 3 diferentes segmentos do ápice radicular. Como controle, foi utilizado meio destituído de reguladores. O primeiro segmento com espessura entre 0,5 a 0,8mm, corresponde ao ápice radicular contendo a região meristemática; o segundo, à região imediatamente seguinte, em torno de 1mm (denominado de primeiro segmento subapical) e o terceiro e último, com 1 mm de espessura, à região na qual os tecidos começam a se diferenciar (denominado de segundo segmento subapical - Fig. 4).

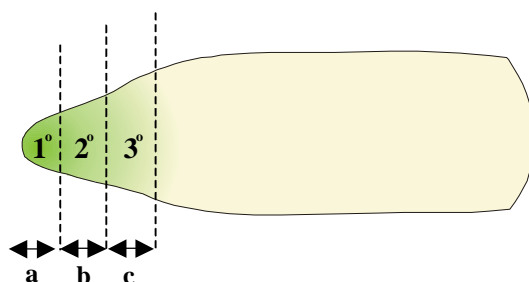


Figura 4. Esquema ilustrativo da segmentação do AR. **a:** primeiro segmento, denominado “segmento meristemático”, de espessura entre 0,5 a 0,8mm. **b:** segundo segmento, denominado “primeiro segmento subapical”(ou “SR”), em torno de 1 mm. **c:** terceiro segmento, denominado “segundo segmento subapical”, em torno de 1mm.

Os hormônios foram adicionados durante a preparação do meio WV básico (Item 3.2.4.), porém com a substituição do ágar por 2g.L⁻¹ de Phytigel®. 15mL de meio foram distribuídos em frascos Erlenmeyers de 50mL de capacidade e em seguida autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Sob estereoscópio em condições de cabine de fluxo de ar laminar horizontal, ápices radiculares vigorosos de plantas com 2 meses de idade foram

isolados e segmentados transversalmente (Fig. 4), sendo cada um dos tipos de segmentos inoculados em frascos separados. Em cada um dos frascos foram inoculados em torno de 15 segmentos. Foram utilizados três frascos por tratamento. Estes foram incubados em sala de cultura, a $26^{\circ}\text{C} \pm 1$, sob 16 horas de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de luz (lâmpadas fluorescentes) durante 36 dias, com acompanhamento semanal. Finalizado o período, os materiais foram observados sob estereoscópio e separados em categorias morfológicas.

Estudo dos primeiros segmentos subapicais de ápices radiculares (SRs): efeito de auxinas, citocinina e uma combinação

Foram utilizados somente o 1º segmento subapical de ARs, denominados "SRs". Estes foram inoculados em Meio de VW básico (Item 3.3.1.), contendo as concentrações dos seguintes hormônios:

- Controle, sem hormônios;
- $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB;
- $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB;
- $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA;
- $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ BA;
- $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BA;
- $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA + $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ BA.

Foram inoculados 14 segmentos em cada frasco, num total de seis frascos por tratamento. O experimento foi acompanhado durante 30 dias, com observação a cada 10 dias. Ao longo do período, os explantes foram classificados em categorias morfológicas, e estas foram expressas em porcentagem. Foi tomada a massa fresca por frasco de tratamento. Os dados foram comparados por meio de análise de variância (one-way ANOVA) e caso fossem detectadas

diferenças significativas ($\alpha = 0,05$), as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

3.3.2. Caracterização histológica dos SRs na presença e ausência de AIB e BA

Os SRs foram mantidos na presença de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de AIB (testes não mostrados) ou BA, bem como na ausência de hormônios, em meio VW básico (Item 3.3.1.). Coletas foram realizadas em 0, 5, 15 e 30 dias de manutenção nessas condições. Imediatamente após as coletas, o material foi fixado em solução de Karnovsky (1965), desidratado em série etanólica e infiltradas em historesina. Foram realizados cortes transversais e longitudinais com 6 e $7\mu\text{m}$ de espessura, os quais foram corados com azul de toluidina (Sakai, 1973). Cada combinação de tratamento hormonal, dia de coleta e direção dos cortes foi feito em duplicata.

3.3.3. Desenvolvimento de plantas a partir de intumescências originadas de SRs

As intumescências originadas dos SRs mantidos na presença de BA foram transferidas para o meio Phv8, constituído pelos micronutrientes e pela metade da concentração dos macronutrientes de Murashige & Skoog (1962), Fe-EDTA, 10g.L^{-1} de sacarose, $0,5\text{ mg.L}^{-1}$ de BA e $0,2\text{ mg.L}^{-1}$ de ANA, 15% de água de côco, 100mg.L^{-1} de mio-inositol, 1mg.L^{-1} de tiamina, 60g.L^{-1} de banana madura, 1g.L^{-1} de carvão ativado. O pH foi ajustado para 5,8 com KOH, adicionado 2g.L^{-1} de Phytigel[®] e autoclavado por 15 minutos a 121°C . Após resfriamento do meio para temperatura em torno de 40°C , adicionou-se 400mg.L^{-1} de glutamina, cuja solução estoque foi previamente filtrada em filtros Millipore[®] de $0,2\mu\text{m}$, estéreis. 50mL do

meio foi distribuído em frascos Erlenmeyers de 125mL. As plantas foram mantidas em sala de cultura, a 26°C ±1, sob 16 horas de 40 μmol.m⁻².s⁻¹ de luz (lâmpadas fluorescentes).

3.4. Determinação da concentração de higromicina para seleção de tecidos

3.4.1. Determinação da concentração de higromicina para seleção de CEs e ARs

Verificou-se o efeito das concentrações de 0 (controle), 5, 15, 25, 35 e 50 mg.L⁻¹ de higromicina em CEs e ARs. Para tanto, a solução de antibiótico previamente filtrada (filtros Milipore[®] 0,20μm) foi adicionada ao meio de VW básico (Item 3.3.1.), geleificado com 2,0 g.L⁻¹ de Phytigel[®] após autoclavagem a 120°C por 15 minutos, e resfriamento até temperatura em torno de 40°C. Foram distribuídos 15mL do meio em frascos Erlenmeyers de 50 mL de capacidade. Em cada frasco, foram inoculados 10 explantes CEs ou ARs, totalizando seis frascos por tratamento (N=60). O material foi mantido à 26°C ±1 sob 16 horas a 40μmol.m⁻².s⁻¹ de luz (lâmpadas fluorescentes).

Após 10 dias em meio contendo higromicina, todos os tratamentos foram transferidos para meio VW básico, nas mesmas condições, porém sem antibiótico por mais 30 dias. Finalizado o período, mediram-se as massas frescas dos CEs ou o comprimento dos ARs. Para apurar a permanência de tecidos sobreviventes, a análise do material fresco observado em estereoscópio foi comparada com as observações dos tecidos após submetê-los ao teste de tetrazólio nas seguintes condições adaptadas de Steponkus & Lamphear (1967): os explantes foram seccionados longitudinalmente e transferidos para microtubos contendo 0,075% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio em tampão fosfato (pH 7,4), seguido de infiltração à vácuo de 1 minuto de duração, por 3 vezes. O material foi mantido no escuro a 29°C, por 20 horas. Após este período, foi analisada sob estereoscópio a presença de coloração vermelha, indicando presença de tecidos vivos.

A massas frescas de CEs ou os comprimentos de ARs foram analisados por meio de análise de variância (one-way ANOVA); os dados significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) foram submetidos à análise das médias por meio do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). A sobrevivência dos explantes foi expressa em porcentagem.

Efeito de 25mg.L^{-1} de higromicina nos CEs e ARs, após 20, 40 e 60 dias de incubação

CEs e ARs foram isolados e inoculados em frascos Erlenmeyers (125mL de capacidade) contendo 20mL de meio VW básico (Ítem 3.3.1) e higromicina (na concentração escolhida no item 3.4.1.). Para cada tratamento foram utilizados 7 frascos contendo 10 explantes cada. Os tratamentos consistiram na manutenção dos explantes em higromicina pelos seguintes períodos de tempo: 0, 20, 40 e 60 dias, sob 16 horas de luz ($40\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) de lâmpadas fluorescentes, à $26^{\circ}\text{C} \pm 1$. Foram realizados subcultivos a cada 20 dias.

Após o término dos períodos e tratamento com o antibiótico, os explantes foram transferidos para meio de cultura destituído de higromicina, até a finalização do experimento (60 dias). A observação do crescimento e sobrevivência do material e a análise estatística dos dados foram realizadas conforme descrito no ítem 3.4.1.

3. 4.2 Determinação da concentração de higromicina para seleção de SRs

Foram analisadas as seguintes concentrações de higromicina em SRs, ao longo de 60 dias: 0 (controle); 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 e 10,0 mg.L^{-1} do antibiótico filtrado em membranas de $0,20\ \mu\text{m}$ (Millipore[®]) e adicionado ao meio de VW básico (Ítem 3.3.1), após autoclavagem e resfriamento do meio à temperatura próxima a 40°C , sob ambiente estéril. Foram inoculados 10 explantes por frasco,

sendo 4 frascos por tratamento, totalizando 40 explantes por tratamento. O material foi mantido à 26°C ±1 sob 16 horas a 40 μmol.m⁻².s⁻¹ de luz de lâmpadas fluorescentes, por um período de 60 dias, com subcultivos em 20 e 40 dias. Nestas datas e ao fim de 60 dias, foi registrada a porcentagem de sobrevivência e a de formação de raízes em SRs.

3.5. Seleção e regeneração de tecidos transformados

3.5.1. Seleção de CEs e ARs após 1 semana dos bombardeamentos

Foram bombardeados ARs e CEs com os plasmídeos pCAMBIA 1281Z+35S e pCAMBIA 1281Z+*thi1* (de acordo com item 3.2.2.), para observação da seleção e regeneração de tecidos transformados. Como controles, placas de CEs e ARs foram bombardeados somente com partículas ou com pCAMBIA 1291Z contendo o gene repórter sem promotor. Foram dispostos 140 ARs ou 80 CEs por placa de Petri. Estes últimos tiveram as escamas que recobrem as gemas laterais retiradas previamente aos bombardeamentos, e posicionados na placa com as gemas voltadas para cima. Foram utilizadas 2 placas por cada combinação de plasmídeo e tecido testado, sendo que cada placa recebeu 2 tiros. Os explantes que ocasionalmente escaparam da placa durante o bombardeamento foram descartados. Após os bombardeamentos, os explantes foram mantidos por 24 horas no escuro e depois transferidos para fotoperíodo de 16 horas de 40 μmol.m⁻².s⁻¹ de luz. Após sete dias, estes foram transferidos para meio de seleção contendo 25mg.L⁻¹ de higromicina, para seleção de tecidos, como previamente definido nos testes de sobrevivência ao antibiótico. Amostras com aproximadamente 10 explantes de cada placa foram retiradas para análise histoquímica entre as transferências do escuro para o claro, e deste último para o meio seletivo. Os explantes foram mantidos em meio seletivo por dois meses, com subcultivo mensal, seguido da transferência para meio não seletivo para observação do crescimento de eventuais tecidos sobreviventes.

3.5.2. Seleção de CEs, ARs e SRs após duas e três semanas do bombardeamento

A preparação das placas de Petri com CEs e ARs, o controle positivo e os bombardeamentos foram realizados como descrito no item 3.5.1. Em relação aos SRs, foram inoculados 100 explantes recém-isolados no mesmo meio VW básico (item 3.2.4.), porém adicionado de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de BA. Os explantes foram depositados com a região seccionada proximal voltada para cima, para que os tiros atingissem a região de células em divisão celular. Foram bombardeadas 3 placas de SRs com cada construção plasmidial, totalizando 300 explantes por tratamento.

CEs, ARs e SRs bombardeados com pCAMBIA 1281Z+35S, pCAMBIA 1281Z+*thi1* e os controles foram mantidos por 48 horas no escuro, seguido da transferência para meio VW básico (item 3.3.1.) ainda sem adição de antibióticos, porém com BA (para os SRs), sob fotoperíodo de 16 horas de $40\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de luz. Após duas semanas, o material foi separado em 3 lotes: o primeiro lote foi transferido para meio seletivo com 25mg.L^{-1} de higromicina (CEs e ARs) ou 10mg.L^{-1} (SRs), e denominado “Higro1”. O segundo lote permaneceu três semanas sem seleção, seguido da transferência para meio seletivo (“Higro2”). O terceiro lote foi mantido sem higromicina para acompanhamento do crescimento dos explantes e da expressão de *uidA* ao longo do tempo. De cada tratamento foram retirados 10 explantes para análise histoquímica semanalmente, por quatro semanas, para acompanhamento da expressão de *uidA* ao longo do tempo de seleção e crescimento dos explantes. Após dois meses (para CEs e ARs) e três meses (para SRs) de seleção, os explantes foram transferidos para meio não seletivo, para observação do crescimento de eventuais tecidos sobreviventes, ou submetidos à análise histoquímica com X-gluc. A figura 5 esquematiza o experimento 3.5.2, para SRs.

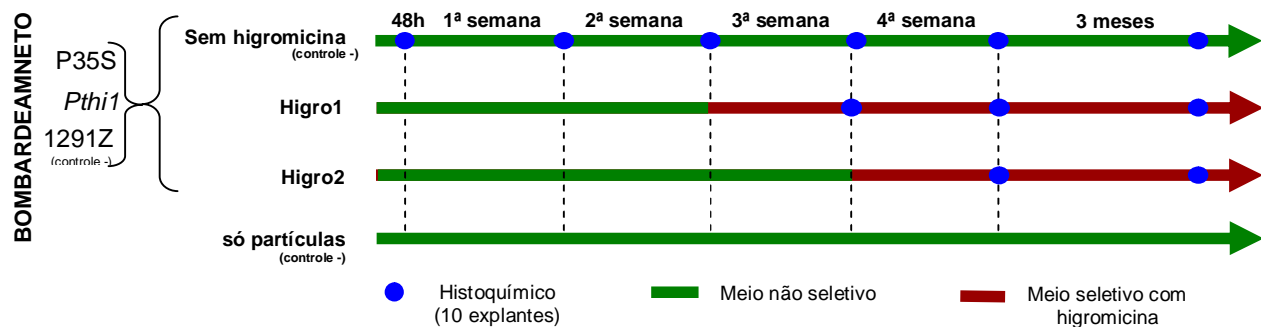


Figura 5. Esquema representativo do processo de seleção de SRs na ausência e presença de higromicina. **Higro1:** tratamento no qual os materiais vegetais foram mantidos por duas semanas na ausência de higromicina e então transferidos para meio seletivo com higromicina. **Higro2:** tratamento no qual os materiais vegetais foram mantidos por três semanas na ausência de higromicina, antes da transferência para meio seletivo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação de promotores

4.1.1. Análise da expressão de *uidA* regulado por diferentes promotores

Para realizar a triagem de promotores potencialmente ativos em *Catasetum pileatum*, foram analisados por expressão transiente os promotores 35S de CaMV, *Pthi1*, *PAtXPB1*, *PAtXPB2*, PTE010 e PTE027, em CEs, ARs e pétalas de plantas desta espécie. Foram utilizados Catáfilos de *Allium cepa* como tecidos controle para este experimento pois todos os promotores aqui testados eram capazes de promover a transcrição de *uidA* nestes tecidos.

O promotor 35S apresentou expressão intensa em todos os tecidos de *C. pileatum* (Fig. 6a-d), corroborando resultados da literatura que afirmam que este trata-se de um promotor forte e constitutivo na maioria dos vegetais (Bhullar *et al.*, 2003). Por este fato, este promotor foi utilizado nos testes de padronização da transformação genética para esta planta.

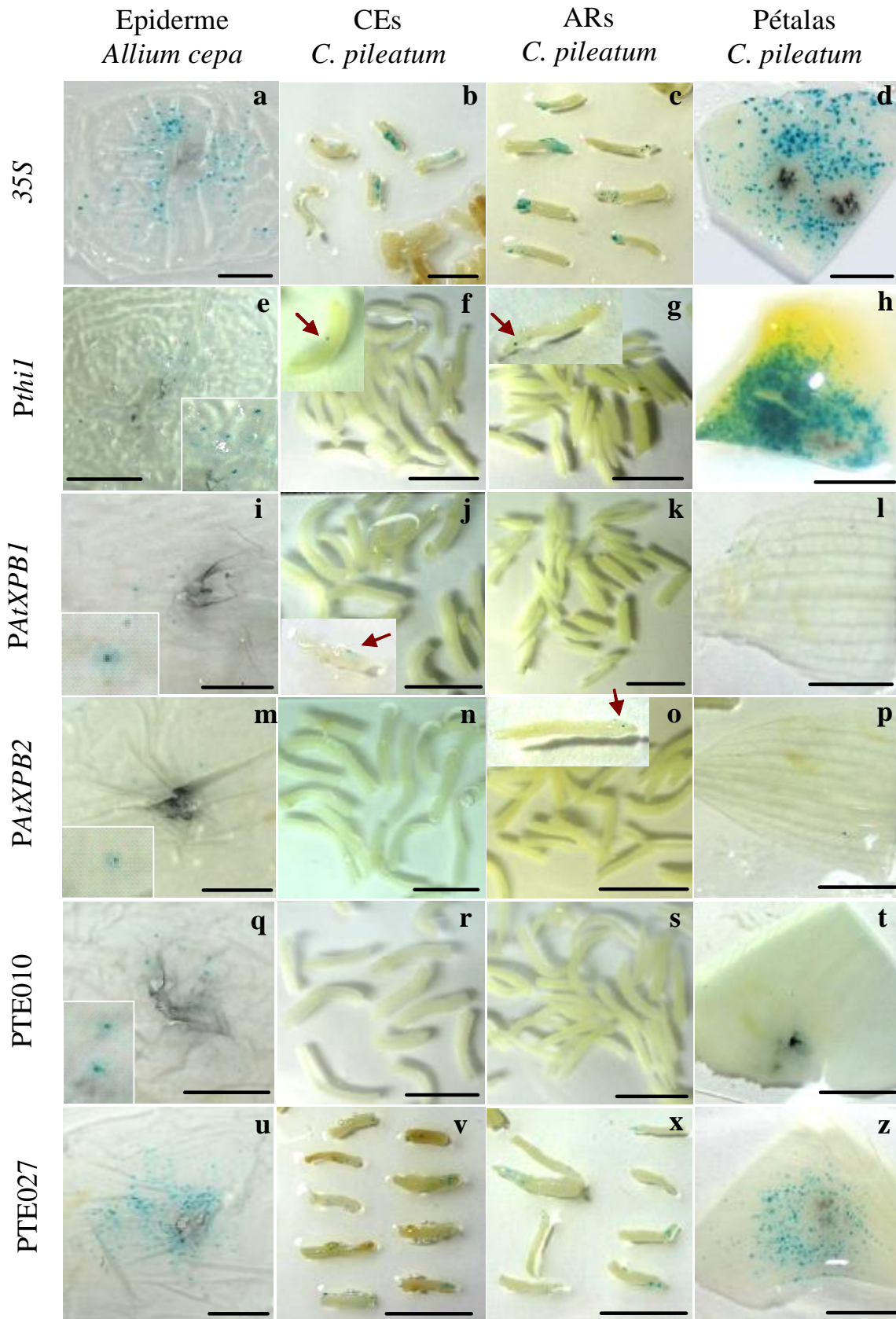
O promotor *Pthi1* induziu a expressão de *uidA* em todos os tecidos, com destaque para as pétalas (Fig. 6h). Estes resultados corroboram os de Ribeiro *et al.* (2005), que observou sua expressão na maioria dos tecidos de plantas de *Arabidopsis* transgênicas, caracterizando um promotor de natureza quase constitutiva. Entretanto, houve expressão intensa somente em uma das pétalas, enquanto não foi observada expressão na segunda replicata. Este fato provavelmente é devido às diferenças genéticas ou a diferenças no estado fisiológico entre as flores utilizadas como, por exemplo, a presença de algum tipo de estresse em uma delas, ou estágios de desenvolvimento diferentes, uma vez que as flores foram coletadas de plantas diferentes da mesma espécie, crescidas em casa de vegetação, e as pétalas retiradas aleatoriamente para os bombardeamentos.

A presença de *PAtXPB1* resultou em um nível de expressão muito baixo de *uidA* nos ARs e *PAtXPB2* nos CEs, tal como em epidermes de *Allium cepa* (Fig. 6i-p). Em testes anteriores (dados não apresentados), estes promotores sempre apresentaram expressão baixa ou nula nos tecidos de *C. pileatum*. Todavia, a ausência da coloração azul não permite afirmar que a expressão não poderia ocorrer em outras condições, uma vez que não foram testados outros estágios de desenvolvimento ou outras condições de bombardeamento e pós-bombardeamento. De qualquer forma, a expressão diferencial de *PAtXPB1* e *PAtXPB2* em vários tecidos de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* já foi relatada por Nakabashi (2005).

Embora PTE010 não tenha se manifestado nos tecidos de *C. pileatum* (Fig. 8q-t), PTE027 apresentou expressão em todos os tecidos (Fig. 6u-z). Nos resultados de macroarranjos de Araújo & Rossi *et al.* (2005), foi observado acúmulo de RNAs de TE010 em folhas, flores e calos de cana-de-açúcar. Nesta planta, a região radicular não foi estudada. Entretanto, a ausência de expressão até mesmo nas pétalas de *C. pileatum* (este promotor foi originalmente isolado de flores de cana-de-açúcar) evidencia resultados contrastantes, mas também podem ser devido às diferenças genéticas entre as espécies ou à expressão diferencial em partes diferentes da flor.

A constatação da expressão de PTE027, em todos os tecidos analisados de *C. pileatum*, representa um dado interessante para os objetivos deste trabalho. Resultados semelhantes foram obtidos por Araújo & Rossi, *et al.* (2005), que observaram acúmulo de mRNAs deste retrotransposon em flores, tecidos meristemáticos e calos de cana. No geral, dentre todos os clones de TEs utilizados por esses autores, os clones “Maggy-like” foram os que apresentaram maior amplitude de expressão em tecidos diferentes.

Figura 6. Expressão de *uidA* regulado por diferentes promotores em epiderme de *Allium cepa* (controle positivo) e tecidos de *C. pileatum*. **a-d:** 35S. **e-h:** *PPthi1*. **i-l:** *PAtXPB1*. **m-p:** *PAtXPB2*. **q-t:** PTE010. **n-z:** PTE027. **1ª coluna:** epiderme de *Allium cepa*. **2ª a 4ª colunas:** tecidos de *C. pileatum*. **2ª coluna:** CEs. **3ª coluna:** ARs. **4ª coluna:** pétalas. Setas vermelhas: pontos azuis. Barras: 1cm.



4.1.2. Análise da expressão de *uidA* regulado pelos promotores 35S, PTE027 e *Pthi1*.

Com base nos resultados acima expostos, foram concentrados esforços na expressão transiente de *uidA* por meio dos promotores 35S, PTE027 e *Pthi1*. As construções foram testadas em CEs, ARs e labelos de *C. pileatum*, bem como em catáfilos de *Allium cepa* (controle positivo), com padronização da quantidade de moléculas de DNA e da área dos tecidos submetidos aos bombardeamentos. Os labelos foram retirados de flores de uma mesma inflorescência.

Os resultados confirmam que PTE027 e *Pthi1* expressaram-se em todos os tecidos de *C. pileatum* utilizados (Fig. 7). O promotor PTE027 manifestou-se relativamente bem em todos os tecidos (Fig. 7e-h), sendo que no labelo observou-se, em ambas as replicatas, um menor nível de expressão (Fig.7h), porém ainda melhor visível do que a expressão promovida por *Pthi1*. Este último, por sua vez, apresentou uma expressão comparativamente menor em todos os tecidos (Fig. 7i-l). Esta baixa expressão ocorreu provavelmente devido às condições do bombardeamento não serem as mais adequadas a este promotor. Sabe-se que *Pthi1* apresenta aumento de expressão induzido pela luz (Ribeiro *et al.*, 2005), mas para padronização das condições experimentais, optou-se em manter todo o material vegetal no escuro após o bombardeamento, visando uma melhor resposta com 35S.

Ainda em relação à *Pthi1*, foi possível observar uma expressão muito baixa em apenas um dos labelos, de uma das flores dentre as replicatas (Fig. 7l). Os pontos azuis só foram melhor visualizados em estereoscópio (Fig. 7l, detalhe). Este fato pode revelar diferenças resultantes de estados fisiológicos diferentes entre as flores utilizadas como, por exemplo, a presença de algum tipo de estresse em uma delas, ou estágios de desenvolvimento diferentes, embora as mesmas tenham sido colhidas de uma mesma inflorescência, muito próximas umas das outras, e apenas o labelo das flores foi utilizado.

Para fim de estabelecimento das etapas de transformação genética, foram escolhidas, então, as construções P35S:*uidA*, por ser expressa

intensamente, e *Pthi1:uidA*, por se expressar em menor nível, mas em todos os tecidos de *C. pileatum*. O promotor PTE027 não foi utilizado nesta pesquisa por ainda não se encontrar em um vetor de transformação vegetal que possua gene de seleção de plantas.

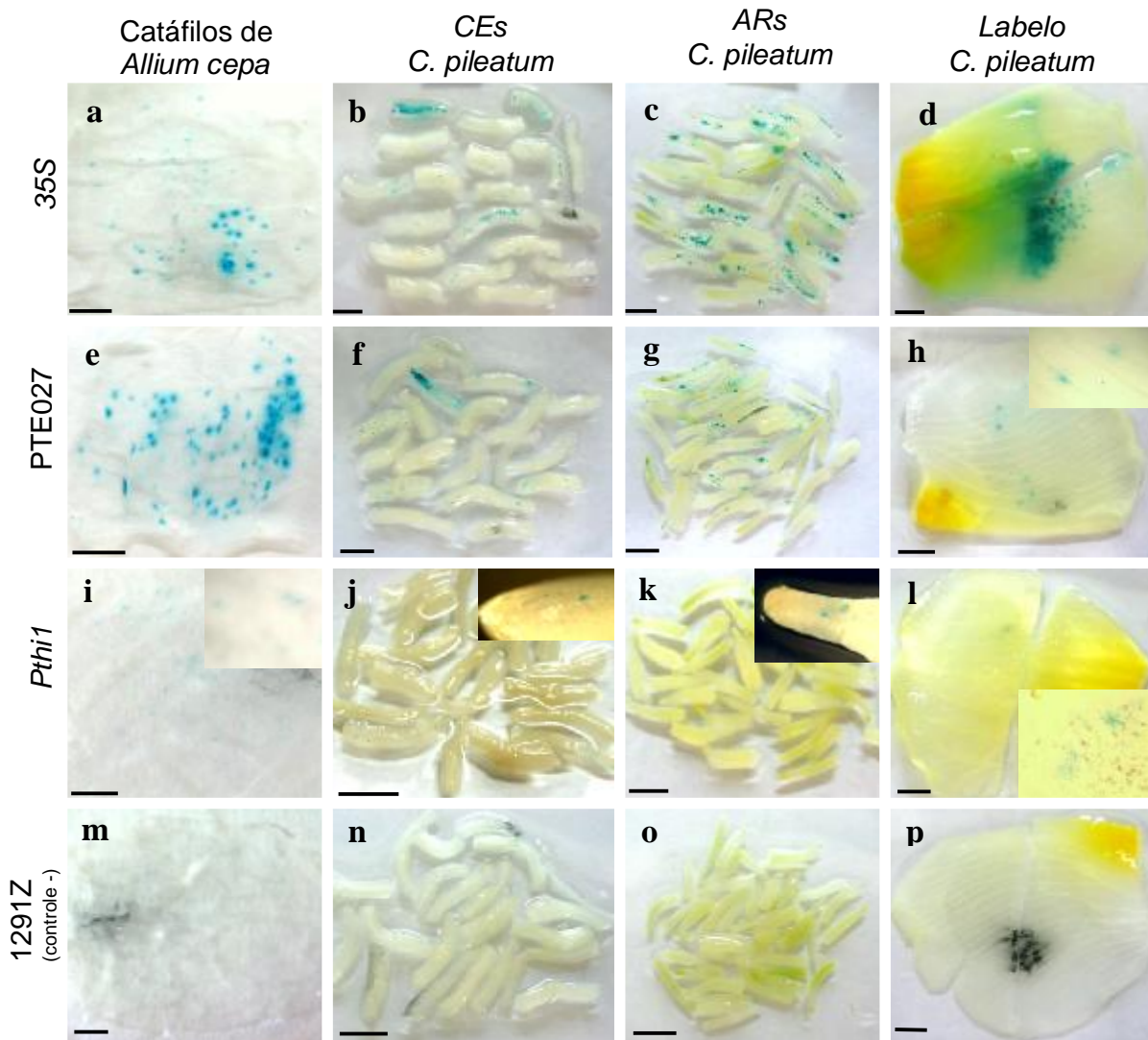


Figura 7. Expressão transiente de *uidA* em catáfilos de *Allium cepa* e tecidos de *C. pileatum*. **a-d:** 35S:*uidA*. **e-h:** PTE027:*uidA*. **i-l:** *Pthi1:uidA*. **m-p:** pCAMBIA 1291Z sem 35S, controle (-). **a, e, i, m:** catáfilos de *Allium cepa* (controle +). **b, f, j, n:** CEs. **c, g, k, o:** ARs. **d, h, l, p:** labelos de *C. pileatum*. Barras: 5mm.

4.2. Cultura de tecidos de segmentos radiculares

Tanto os segmentos nodais oriundos de caules estiolados (CEs) quanto os ápices radiculares (ARs) foram inicialmente escolhidos como alvos para os estudos de transformação, por serem portadores de tecidos meristemáticos. Entretanto, apesar destes métodos serem eficientes para regeneração de plantas, a transformação bem sucedida a partir destes materiais vegetais seria restrita à região meristemática, porções pequenas em relação ao explante como um todo. Além disto, cada meristema destes órgãos é capaz originar apenas uma planta, o que aumenta o risco de que os pequenos pontos de tecidos transformados sejam eliminados durante o processo de seleção. Em plantas de orquídeas ainda não se conseguiu a retomada da proliferação celular e diferenciação a partir de tecidos maduros. Desta forma, no presente projeto, procurou-se também uma alternativa de cultura de tecidos, que permitisse aumentar a quantidade de plantas produzidas a partir de um único explante, aumentando-se assim a possibilidade de recuperação de eventos de transformação isolados, facilitar a seleção e diminuir a formação de quimeras. A alternativa escolhida foi testar a expressão regenerativa de segmentos subapicais radiculares de *Catasetum pileatum* (SRs), compreendendo, portanto, a região de divisão e alongamento celular das raízes para a produção de gemas. Os resultados foram apresentados a seguir.

4.2.1. Comportamento dos três segmentos de ARs: efeito de auxina e citocinina

No meio de cultura destituído de hormônios, observou-se um comportamento diferente nos três tipos de segmentos (Fig. 8). O segmento apical, contendo a região meristemática, de tamanho relativamente menor do que os segmentos subapicais, apresentou uma nítida tendência de manter o padrão radicular, originando uma nova raiz. Este fato corrobora o elevado grau de estabilidade estrutural e funcional intrínseca dos meristemas apicais das raízes,

os quais parecem possuir intensas propriedades homeostáticas, mantendo a identidade funcional mesmo isolados e incubados durante longos períodos de cultura *in vitro* (Kerbaux, 1999). Uma pequena quantidade destes meristemas apicais (20%) não cresceu, apenas manteve-se vivo, sendo que não foi observada a morte de nenhum explante. Dentre os dois segmentos subapicais, o primeiro, mais próximo ao ápice (SRs), apresentou cerca de 60% de sobrevivência, sendo que em alguns casos observou-se um leve intumescimento do explante, mas sem desenvolvimento de órgãos ou estruturas. No caso do segundo segmento subapical, 100% deles não foram capazes de sobreviver. De acordo com Kerbaux (1999), a existência de zonas de crescimento bem estabelecidas ao longo da extensão das raízes implicaria na ocorrência de padrões estruturais e fisiológicos distintos, sendo que o comportamento *in vitro* dos explantes dependerá da abrangência de maior ou menor porção dessas zonas.

Os tratamentos com ANA estimularam a regeneração de raízes, influenciando também a sobrevivência dos explantes, dado que na maior concentração utilizada ($0,5\text{mg.L}^{-1}$) houve sobrevivência de 50% dos segundos segmentos subapicais (Fig. 8A).

Os tratamentos com BA não apresentaram efeito evidente na sobrevivência dos segundos segmentos subapicais, mas induziu a formação de intumescências, provavelmente contendo gemas caulinares, nos segmentos meristemáticos e no primeiro subapical (Fig. 8B). De forma semelhante, Colli & Kerbaux (1993) e Peres *et al.* (1999) já haviam observado que em *C. fimbriatum*, a adição de BA ao meio de cultura estimulava intensamente a formação de gemas caulinares, com eficiência maior na presença de luz.

Nos 1^os segmentos, BA acelerou a conversão do meristema apical radicular em uma única gema caulinar, originando, a partir deste, uma única planta. Este evento de conversão, já descrito e estudado intensamente neste laboratório (Kraus & Monteiro, 1989; Kraus, 1986 para *C. pileatum* e Peres *et al.*, 1999 para *C. fimbriatum*), ocorre naturalmente em ápices radiculares isolados de plantas de *Catsetum* com idades mais avançadas (Rodrigues *et al.*, 2006b), sem

a necessidade de suplementação hormonal, provavelmente devido ao estabelecimento de uma razão citocinina/auxina adequada para o processo.

No primeiro segmento subapical (SR), ocorreu a formação de uma estrutura intumescida contendo múltiplas gemas caulinares, da qual se formaram primórdios foliares e raízes. Estas estruturas, mesmo se fragmentadas, eram capazes de crescer novamente (dados não apresentados). Baseando-se no interesse de estabelecer um protocolo de cultura *in vitro* que possibilite a obtenção de diversas plantas a partir de um único explante, o emprego deste primeiro segmento subapical (SR) mantidos em meio contendo BA apresentou-se como o mais adequado. Neste sentido, foi realizado um segundo teste apenas com esta categoria de segmentos, testando-se também novas possibilidades hormonais.

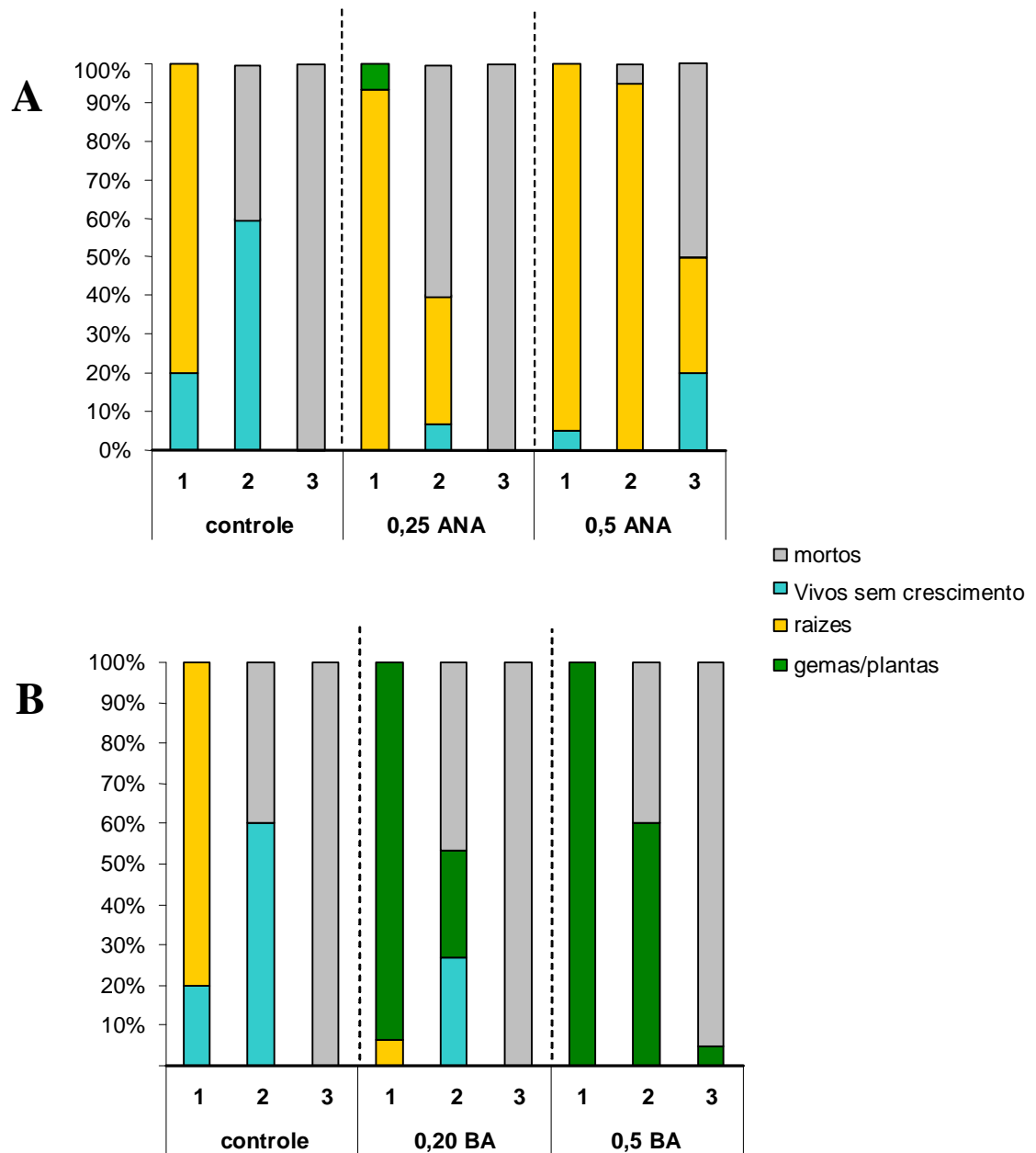


Figura 8. Efeito de concentrações (mg.L^{-1}) de ANA **(A)** e BA **(B)** em segmentos de ARs após 36 dias de tratamento. **1:** segmento meristemático. **2:** primeiro segmento subapical (SR). **3:** segundo segmento subapical.

4.2.2. fenótipos de culturas do primeiro segmento subapical (SR), na presença de ANA, AIB, BA e ANA+BA

Neste segundo teste, foram empregados apenas os primeiros segmentos subapicais (SRs) submetidos aos efeitos de duas auxinas (ANA e AIB), BA e uma combinação de $0,25\text{mg.L}^{-1}$ de ANA + $0,25\text{mg.L}^{-1}$ de BA. Ao final de 30 dias de incubação, os resultados apresentados por todos os tratamentos foram inicialmente reunidos, e as diferenças existentes entre os indivíduos do experimento total foram separadas em 7 categorias morfológicas, numeradas de 1 a 7, (Tab. 3).

Os resultados dos tratamentos estão apresentados nas figuras 9 e 10. Tanto o ANA quanto o AIB foram capazes de promover o crescimento de raízes (categorias 3 e 5, Tab.3), nas concentrações testadas, inibindo a formação de gemas caulinares (categorias 6 e 7, Tab.3). ANA promoveu apenas o crescimento de raízes diretamente do segmento radicular (categoria 3, Fig. 9 e 10d), enquanto o AIB apresentou, em ambas as concentrações, formação de calos friáveis e amarelados em toda a superfície do explante (categoria 4, Tab.3) e posterior crescimento de raiz (categoria 5, Tab.3) a partir da extremidade próxima ao ápice (extremidade proximal) (Fig. 9; 10b-c). Considerando-se que ambas as concentrações utilizadas desta auxina podem ser consideradas relativamente elevadas, com efeito potencialmente deletério à estabilidade genética dos materiais, será necessário testar concentrações mais baixas. As concentrações de 1 e 2mg.L^{-1} haviam sido previamente selecionadas para o teste devido aos efeitos promotores de proliferação celular de igual aspecto em ápices radiculares de *C. fimbriatum* (Rodrigues, 2006, comunicação pessoal), sendo que as concentrações mais baixas não apresentaram tal efeito na referida espécie. Ainda para *C. fimbriatum*, Colli & Kerbauy (1993) e Peres *et al.* (1999) observaram que a adição de diferentes concentrações de auxinas como AIA, AIB ou 2,4-D também apresentaram a tendência geral de inibir a formação de gemas caulinares, e estimular a produção de calos em segmentos de ápices radiculares de aproximadamente 0,5cm de comprimento. Enquanto AIA apresentou esta resposta principalmente no escuro, 2,4-D respondeu em ambas as condições,

* Maria Aurineide Rodrigues é doutoranda pelo Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, USP.

para as mesmas concentrações utilizadas, e AIB inibiu a formação de PLBs no escuro, estimulando calos nas duas condições.


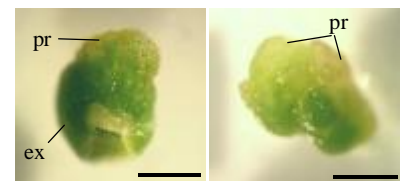

A combinação de ANA e BA estudada ($0,25\text{mg.L}^{-1} \times 0,25\text{mg.L}^{-1}$) não promoveu resultados interessantes sob o ponto de vista do presente estudo, pois resultou na inibição da formação de gemas caulinares e calos, e até mesmo do crescimento de raízes que se originam naturalmente em meio sem adição de hormônios (Fig. 9 e 10e). Novamente, os tratamentos com BA originaram estruturas contendo gemas caulinares (categorias 6 e 7, Tab.3), apresentadas nas figuras 9 e 10f-g.

Os resultados de cultura de segmentos radiculares indicaram que os segmentos SRs, cultivados em meio contendo BA ou AIB, aparentemente apresentaram-se como os mais interessantes e foram escolhidos para os estudos subsequentes pelos seguintes motivos:

1. As estruturas induzidas por BA (intumescências) pareceram formar múltiplas gemas a partir de um único explante, o que seria interessante para aproveitar melhor os tecidos submetidos à transformação, durante a regeneração;
2. As estruturas produzidas com AIB originam calos friáveis, o que primeiramente seria interessante para facilitar a seleção de células transformadas, permitindo que ocorra a regeneração de plantas transformadas com menor grau de quimerismo.

Para verificar a veracidade destas possibilidades, foram realizados estudos histológicos de ambos os tipos de estruturas.

Tabela 3. Descrição e ilustração das categorias morfológicas originadas de diferentes tratamentos com reguladores. **cf:** agregados celulares friáveis. **pr:** proliferação celular. **ex:** explante SR original. **int:** intumescência com prováveis gemas. **rz:** raiz. **pf:** primórdio foliar. Barras = 1mm.

Categoria	Morfologia específica	Descrição	Imagens
1	Ausência de crescimento ou pequena intumescência	Explante sem crescimento, somente intumescida, formando uma estrutura arredondada. Diâmetro entre 1 a 2mm. Coloração verde escura.	
2	Início de proliferação celular	Ocorrência de intumescência como o da categoria 1, porém com morfologia disforme ou visível início de proliferação celular na região próxima ao ápice, formando uma protuberância. Explantes com diâmetro entre 1,5 a 2,5mm.	
3	Raízes	Formação direta de raízes a partir do explante. As raízes possuíam coloração verde escura.	

4	Massa celular	Agregados celulares friáveis de cor amarelada, ou verde clara, envolvendo toda a superfície do explante.	
5	Massa celular Com raízes	Agregados celulares friáveis, com formação de raízes. Aparentemente, a formação das raízes ocorre na extremidade próxima ao ápice do explante.	
6	Intumescência grande, com gemas caulinares	Estrutura globular (intumescência) comparativamente grande, originada da região próxima ao ápice. Diâmetro maior que 2,5mm, chegando até 6mm, de coloração verde escura. Pode ser arredondada ou disforme, provavelmente com presença de gemas caulinares . Pode apresentar primórdios foliares. Esta categoria será resumida como "gema".	
7	Intumescência grande avançada, com gemas e raízes.	Apresenta a mesma estrutura globular da categoria 6, porém em estágio avançado, possuindo primórdios foliares e raízes bem visíveis (surgindo da estrutura). Geralmente com diâmetro e massa maiores que os da categoria 6.	

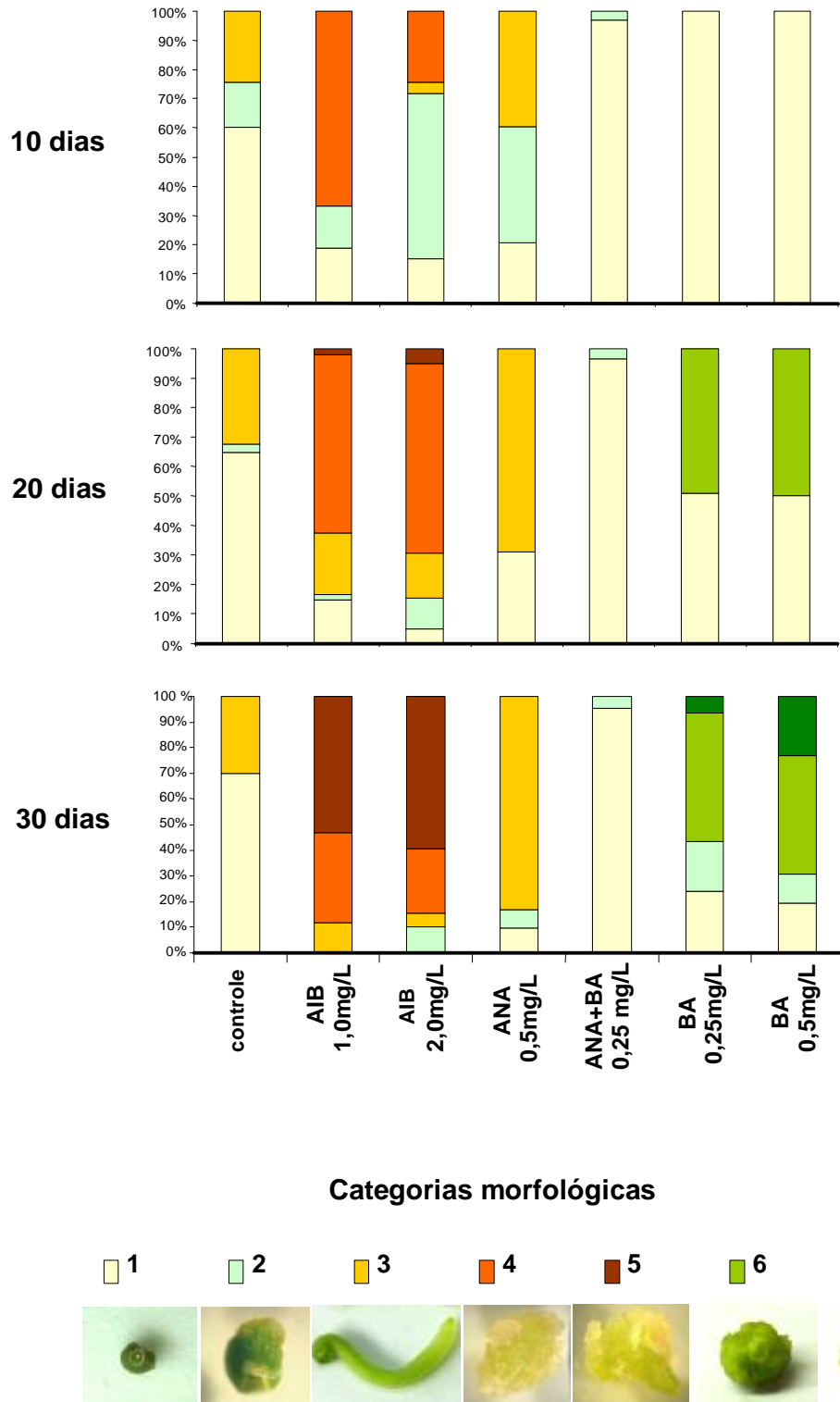


Figura 9. Porcentagem das categorias fenotípicas (1 a 7) observadas nos diferentes tratamentos de SRs (1º segmento subapical) com reguladores de crescimento em 10, 20 e 30 dias de experimento.

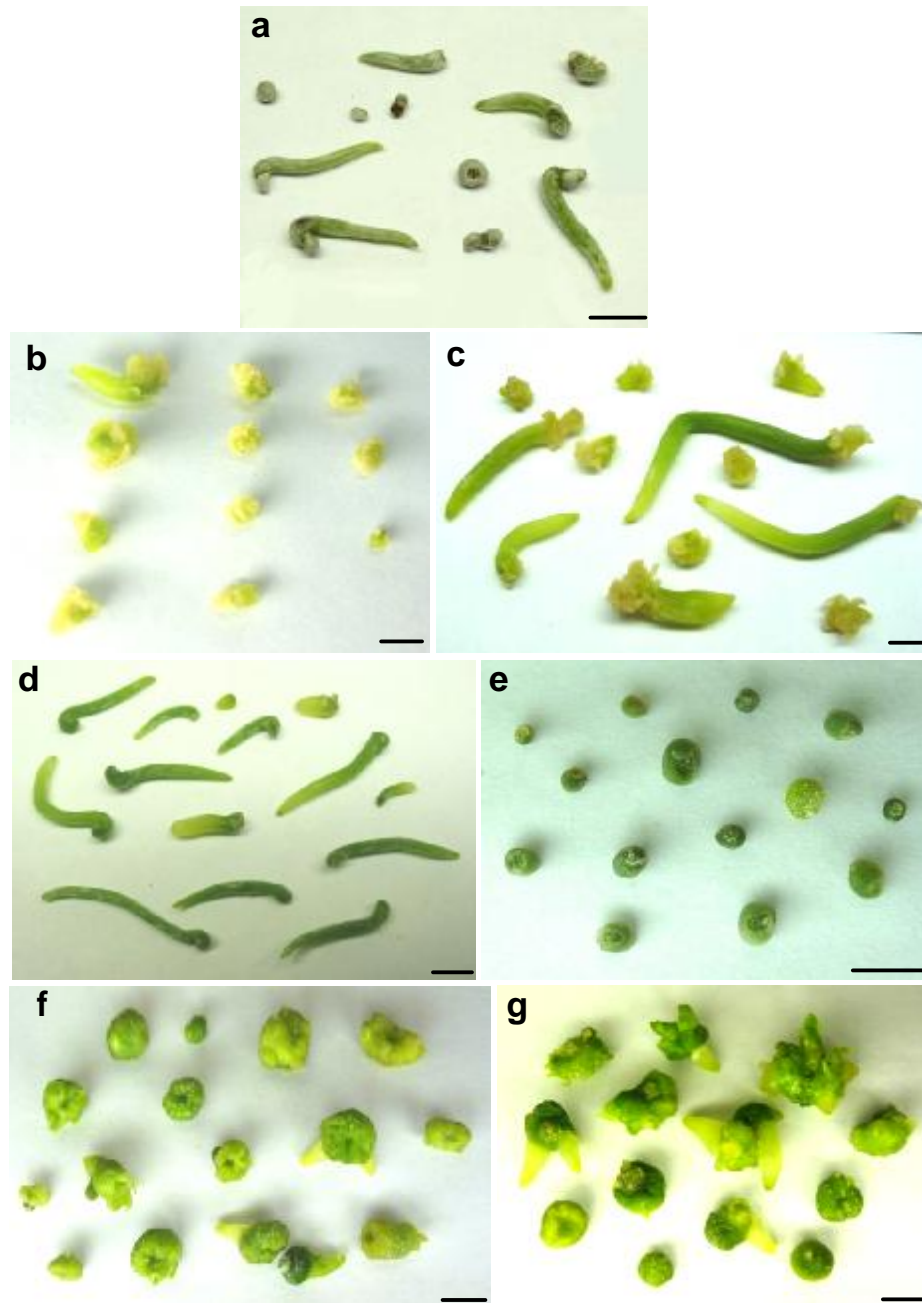


Figura 10. Tratamentos de SRs (1^o segmento subapical) com diversos reguladores de crescimento durante 30 dias. **a:** controle. **b:** AIB 1,0 mg.L⁻¹. **c:** AIB 2,0 mg.L⁻¹. **d:** ANA 0,5 mg.L⁻¹. **e:** ANA 0,25 mg.L⁻¹ + BA 0,25 mg.L⁻¹. **f:** BA 0,25 mg.L⁻¹. **g:** BA 0,5 mg.L⁻¹. Barras: 5mm.

4.2.3. Caracterização histológica de SRs incubados na presença e ausência de AIB e BA

SRs inoculados na ausência e presença de AIB e BA foram analisados histologicamente a fim de verificar a adequação destas estruturas como material para bombardeamento e subsequente regeneração de plantas. Para tanto, é condição inescapável a presença de células em processo de divisão celular, localizadas preferencialmente na região do explante acessível ao bombardeamento.

1) Controles: SRs recém isolados e SRs incubados na ausência de hormônios, por 15 dias

Foram utilizadas como fonte de explantes raízes jovens e vigorosas obtidas de plantas com cerca de 3 meses de idade, conforme é mostrado na figura 11A, nestas, o meristema apical radicular apresentava uma intensa atividade mitótica e extensa área de células derivadas em divisão celular (Fig. 11A). O primeiro corte para eliminação da região apical meristemática e isolamento do segmento radicular (corte da região proximal, próximo ao ápice) encontrava-se a uma distância entre 500 a 800µm a partir do ápice. Esta região de corte corresponde a uma faixa do órgão em que ainda é possível observar divisões celulares e, ao mesmo tempo, o início da diferenciação das células dos tecidos vasculares, expansão das células do córtex, velame em proliferação (epiderme multisseriada) e também o final da coifa (Fig. 11B). Nesta faixa também se observaram idioblastos contendo ráfides.

Decorridos 15 dias do isolamento dos segmentos, os tecidos incubados na ausência de reguladores de crescimento mostravam-se completamente diferenciados (Fig. 12). Na região externa observou-se a camada multisseriada do velame bem desenvolvida, seguida da exoderme, parênquima cortical (com células intensamente vacuoladas e contendo muitos cloroplastos) e mais internamente, a endoderme. Na região interna observou-se o cilindro vascular

delimitado pelo periciclo, o floema e o xilema primário circundando uma região central de parênquima medular.

2) SRs incubados em $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de AIB

Após 5 dias de tratamento com $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de AIB, observou-se a ocorrência de divisões celulares em toda a região proximal do segmento isolado (Fig. 13D e E). Estas divisões parecem levar à reconstrução de um primórdio apical radicular e o estabelecimento de uma nova raiz. Aparentemente, a formação direta de raízes pode ocorrer também a partir do periciclo, conforme sugerem as divisões celulares detectadas nas seções transversais de explantes no 15º dia de incubação (Fig. 14C e D). Este fato é visível macroscopicamente, uma vez que a formação de raízes nos explantes tratados com AIB deu-se na região seccionada proximal ou lateralmente, embora não tenha sido observado o crescimento de ambos os tipos em um mesmo explante. A formação de raízes diretamente dos segmentos subapicais não representa, em princípio, uma rota organogenética compatível com os propósitos de transformação genética no momento.

O tratamento com $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de AIB provoca perturbações na organização dos tecidos já visíveis a partir do 5º dia após o isolamento e inoculação dos SRs. Esta perturbação foi bem evidente principalmente no velame ainda em desenvolvimento, o qual apresenta-se irregular (Fig. 13C e F). No 15º dia de incubação, observaram-se pontos de ruptura e degeneração da exoderme e velame, expondo as células parenquimáticas do córtex, bem como uma substancial expansão destas últimas (14A e B). Evidências sugerem que esses dois eventos associados foram os responsáveis pela formação das massas celulares friáveis observadas macroscopicamente. Nestas, todavia, não foram detectadas células em divisão mitótica. Desta forma, essas estruturas foram descartadas para fins de utilização para obtenção de eventos de transformação genética.

3) SRs incubados em 0,5mg.L⁻¹ de BA

Igualmente ao que fora observado nos SRs tratados com AIB, nos segmentos incubados com BA (Fig. 15A, B e C) foi observada, no 5º dia de incubação, a presença de divisões celulares em toda a extensão da região proximal. Entretanto, no 15º dia de incubação, as divisões restringiam-se às células do cilindro vascular, não sendo encontrado figuras mitóticas nas células do córtex nem nas da epiderme. O velame, por sua vez, apresentava-se completamente diferenciado (Fig. 15D). Mais internamente, cerca de 500µm da extremidade proximal, observou-se o início de divisões periclinais nas células do periciclo (Fig. 15D e E, setas vermelhas). Tais divisões nas células do sistema vascular próximo à extremidade proximal, bem como nas do periciclo da região diferenciada, parecem resultar, em estágios mais avançados, da formação de estruturas conspícuas, como observada no 30º dia de cultura (Fig. 16A). Esta estrutura, denominada inicialmente de “intumescência”, é constituída na porção mais apical de células meristemáticas, a partir das quais se originam as parenquimáticas posicionadas na porção mais inferior. Nestas intumescências foi possível se observar a formação de gemas caulinares e primórdios foliares (Fig. 16A e B), além de núcleos bem definidos de células em divisão, parecidos a pacotes meristemáticos (Fig. 16C).

Quando estas estruturas foram transferidas para o meio PHV8 e após 1 mês, foi observada a formação de múltiplas plantas a partir de cada uma delas (Fig. 17), na qual pode ser considerado o envolvimento dos pacotes meristemáticos.

Considerando-se as análises histológicas acima expostas, diversos motivos acenam para a utilização dos SRs incubados em BA no estabelecimento de um protocolo de transformação genética. Um deles é a presença nos SRs de células ainda meristemáticas, que na presença de BA mostraram elevada atividade de divisão mitótica. Segundo a literatura, os tecidos meristemáticos são os mais adequados para introdução de genes durante a transformação genética (Iida *et al.*, 1991; Sangwan, 1992; Villemont *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1999; Guidolim, 2003). Estas células meristemáticas se enquadram, morfológicamente, na descrição feita por Sangwan *et al.* (1992) para células competentes à

transformação: células pequenas, isodiamétricas, com paredes primárias delgadas, núcleo proeminente e citoplasma denso. Devido à secção dos explantes, estas células tornam-se mais expostas ao bombardeamento, potencializando a introdução dos genes e o contato posterior com o agente seletivo. Igualmente importante é o fato de que as mesmas células susceptíveis a introdução de genes são também as responsáveis pela formação da estrutura intumescida geradora de gemas caulinares. Da mesma forma, as gemas caulinares também se formam superficialmente na estrutura, facilitando o mesmo processo de seleção. Por último, as estruturas intumescidas apresentam a vantagem de poder ser seccionadas e subcultivadas para produção de novas gemas, possibilitando o aumento das etapas de seleção de células transformadas sem a passagem por fase de calo, além de aumentar o potencial para formação de novas plantas. Assim, o emprego de SRs para a transformação e posterior indução de estruturas com gemas múltiplas durante a seleção de transformantes apresenta características que se assemelham à utilização de PLBs e PCMs descritos em literatura.

Tanto os PCMs quanto os PLBs têm sido os são os materiais vegetais mais utilizados em estudos de transformação genética em orquídeas. Uma das vantagens citadas na literatura é a facilidade de obtenção destas estruturas, uma vez que resultam da germinação de sementes (PCMs) ou de processos de clonagem *in vitro* (PLBs). Uma vez que a produção de calos e células em suspensão é geralmente difícil de ser obtida para a maioria das espécies orquidáceas, também em nosso laboratório, não se conseguiu até o momento o estabelecimento de cultura de calos para *Catasetum*. De qualquer forma, é importante mencionar que a utilização de calos para fins de micropropagação tem representado uma fonte nada desprezível de variações somaclonais em muitas plantas (D'Amato, 1978; Li *et al.*, 2007).

Os diferenciais existentes na utilização de estruturas obtidas no presente trabalho e os PCMs é que os primeiros apresentam a vantagem de produção de múltiplas gemas em uma única estrutura, enquanto os PCMs e PLBs contém uma única gema. Um segundo diferencial é a possibilidade de utilização de um único germoplasma para a produção de transgênicos, uma vez que as

estruturas portadoras de gemas múltiplas são originadas de raiz, e os PCMs são obtidos através de sementes. Embora o emprego de uma variedade maior de genótipos seja interessante para o estabelecimento de um protocolo de transformação genética. Uma vez isto feito, ele poderá ser adequado com maior facilidade a outros genótipos de plantas taxonomicamente afins.

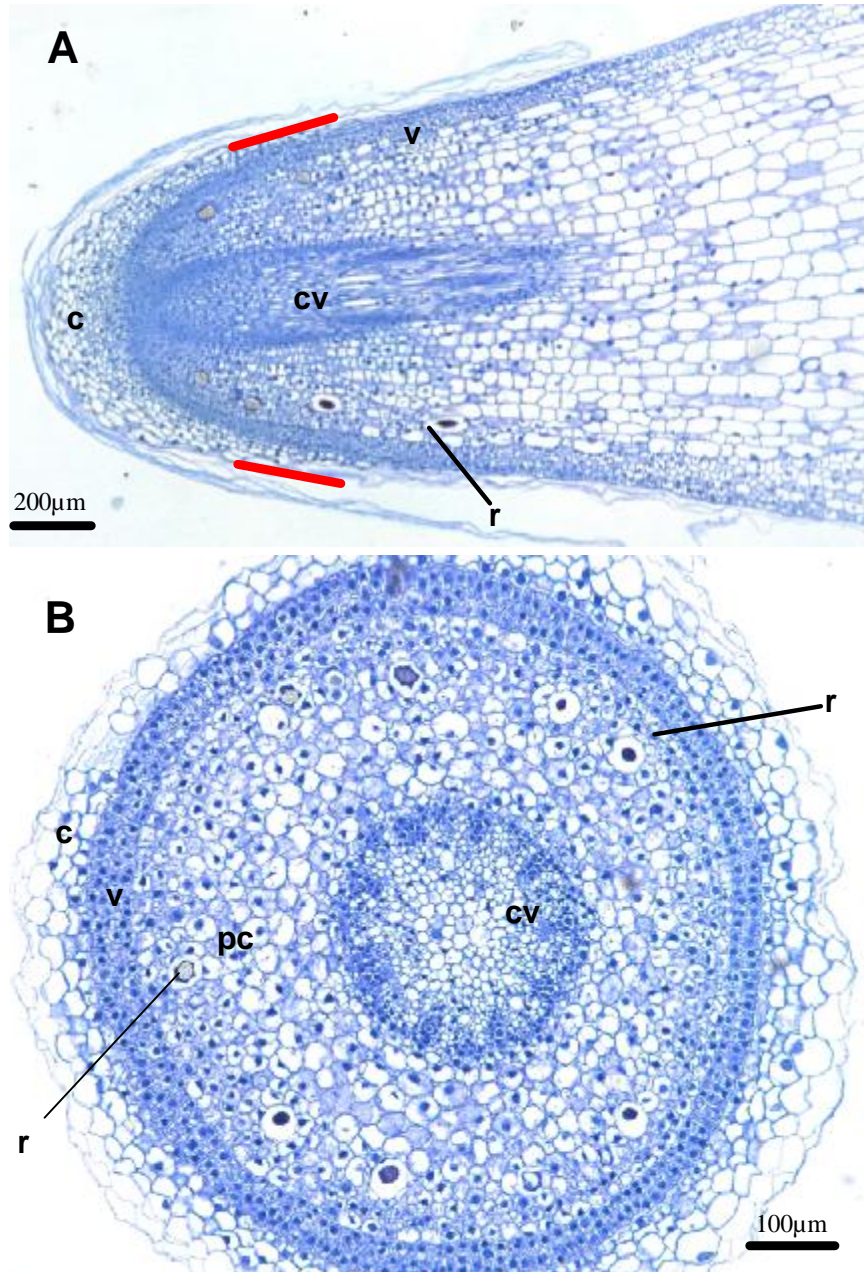


Figura 11 Ápices radiculares imediatamente antes da obtenção dos segmentos (controle 0h). **A:** seção longitudinal mediana de um ápice. **Linhas vermelhas:** faixa delimitando a extremidade proximal do segmento subapical (2°), o corte que o delimita é realizado aproximadamente entre 500-800µm a partir do ápice. **B:** seção transversal da região em que o primeiro corte é realizado.. **c:** coifa. **v:** velame em diferenciação (epiderme multisseriada). **pc:** células do parênquima cortical em diferenciação. **cv:** células do sistema vascular em diferenciação. **r:** idioblasto contendo ráfides.

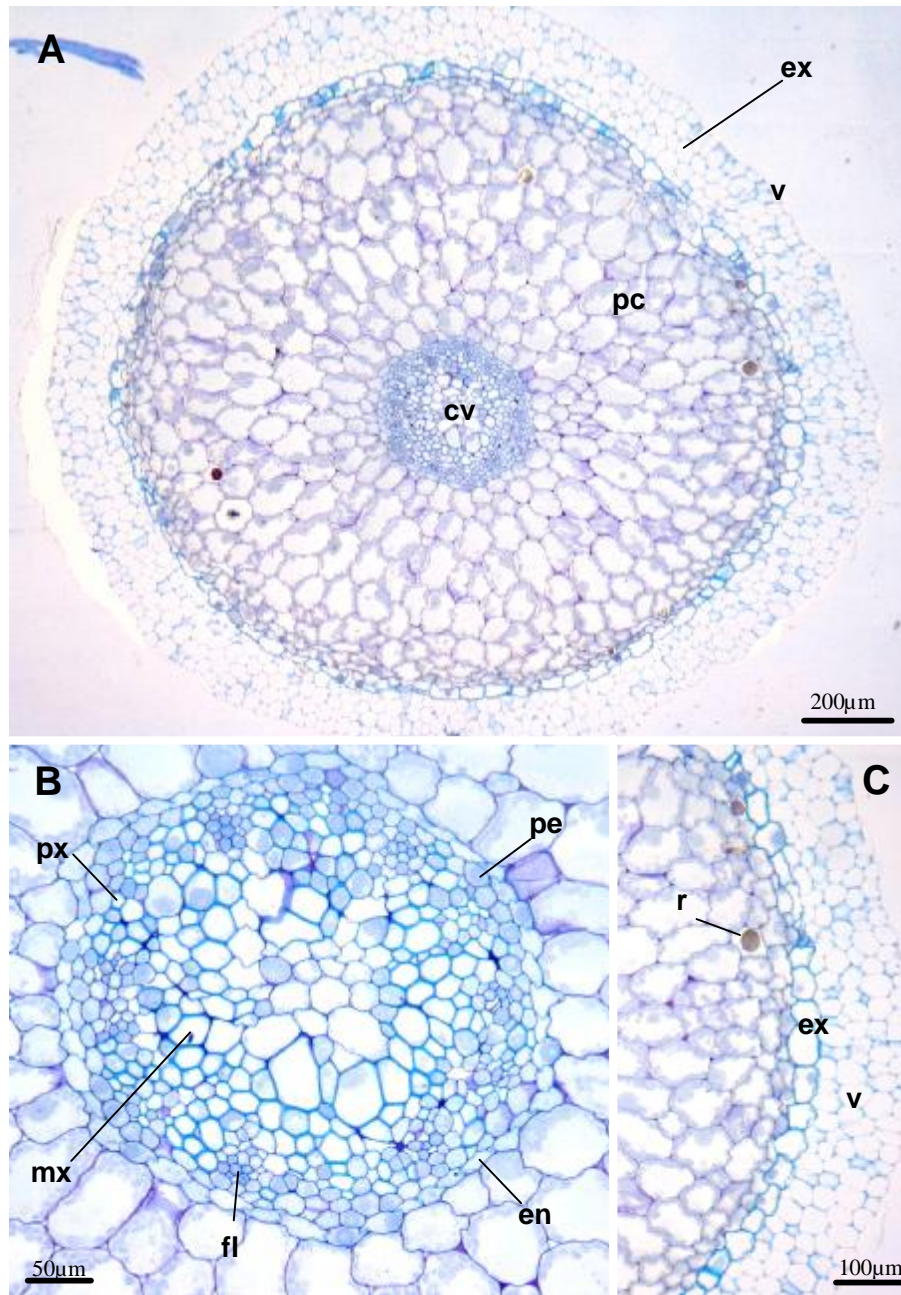


Figura 12 Seções transversais de SRs no 15º dia após o isolamento, mantidos na ausência de hormônios. **A:** panorama geral do explante, evidenciando os tecidos já diferenciados. **B:** detalhe do cilindro vascular. **C:** detalhe da exoderme e velame. **cv:** cilindro vascular. **ex:** exoderme. **en:** endoderme. **fl:** floema. **mx:** metaxilema. **pc:**parênquima cortical. **pe:** periciclo. **px:** protoxilema. **r:**ráfides. **v:** velame.

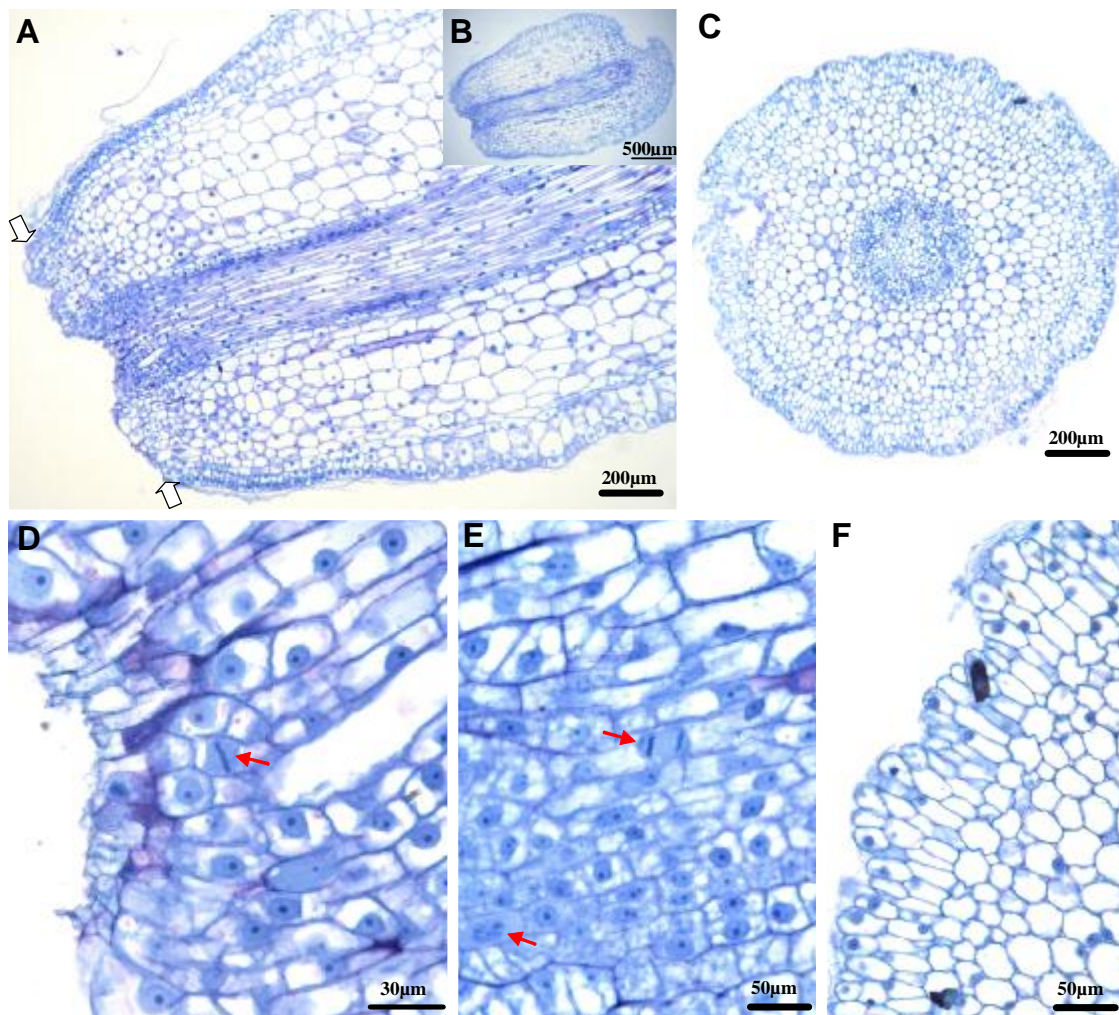


Figura 13. SRs incubados na presença de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB, após 5 dias. **A e B:** vista geral de seções longitudinais. Setas largas indicam a região proximal (região voltada ao meristema apical radicular). **C:** seção transversal mediana do explante. **D e E:** detalhes da superfície seccionada voltada em direção ao ápice, evidenciando figuras mitóticas (setas vermelhas). **D:** região do cilindro vascular. **E:** região cortical. **F:** detalhe do velame, evidenciando perturbação na organização do mesmo.

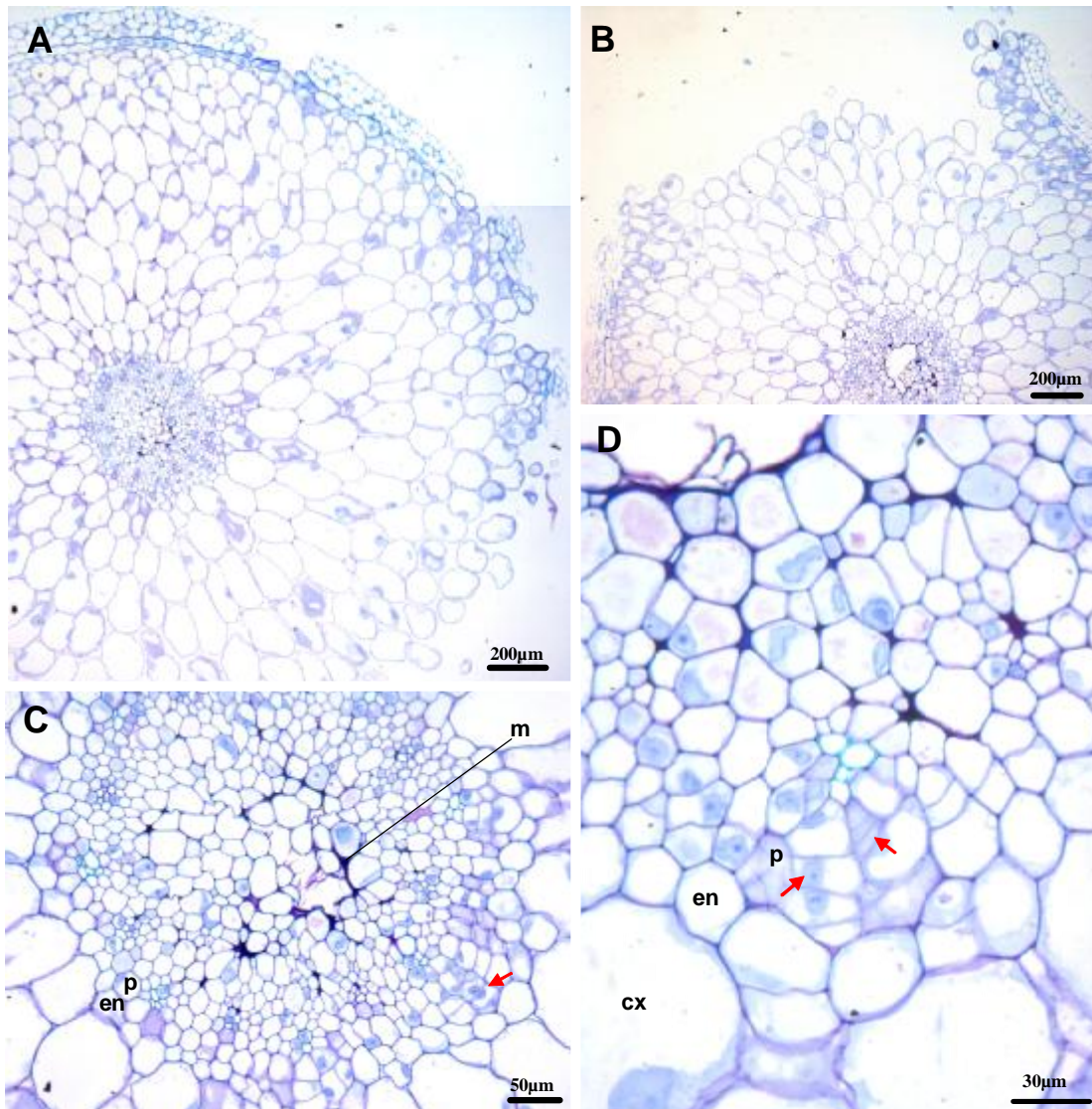


Figura 14. Seções transversais de SRs mantidos na presença de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB no 15^o dia. **A e B:** parênquima cortical, com células expandidas e ruptura da epiderme. **C e D:** detalhe do cilindro vascular, com divisões celulares no periciclo, para formação de raiz lateral (setas vermelhas). **cx:** córtex. **en:** endoderme. **m:** material residual intercelular. **p:** periciclo.

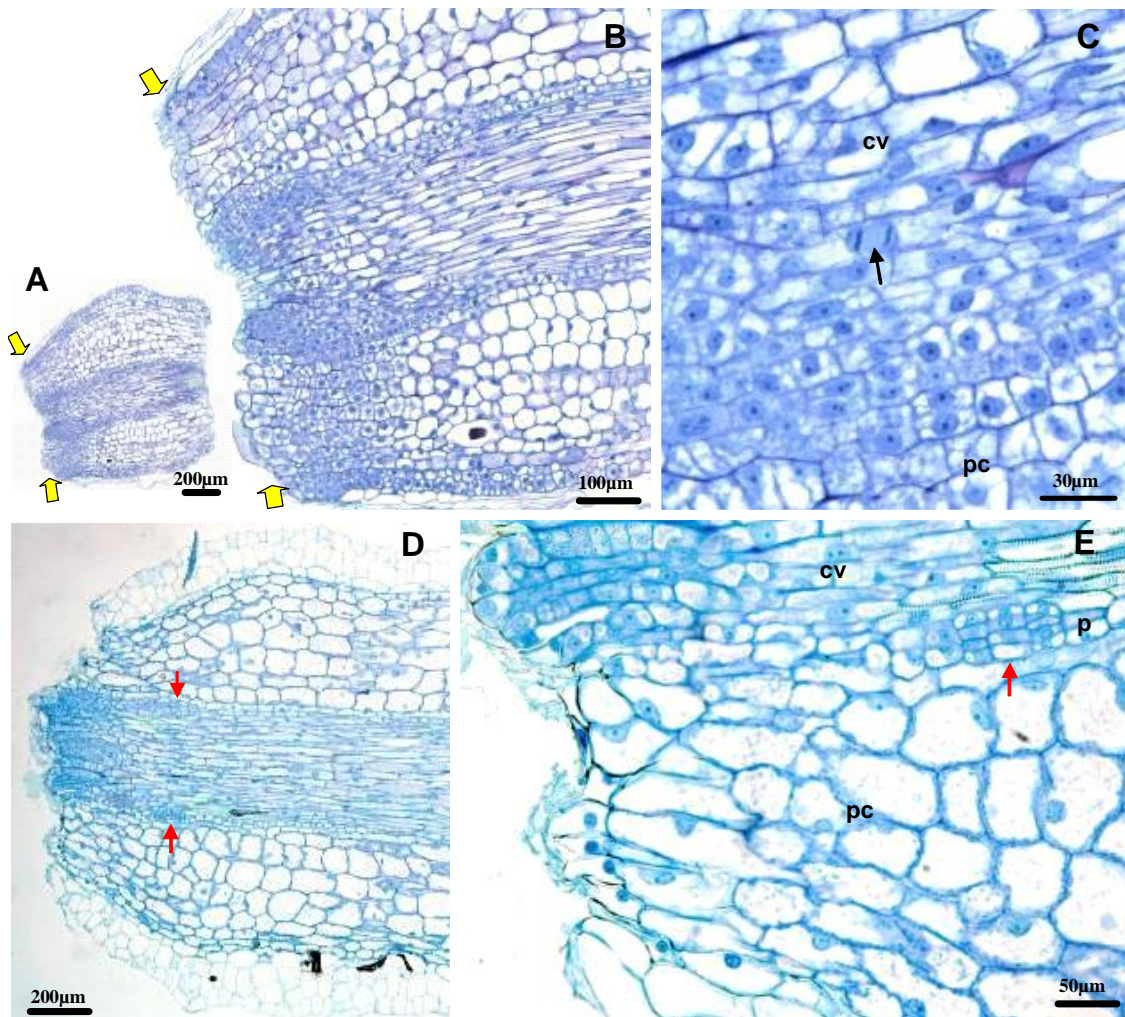


Figura 15. Seções longitudinais de SRs (2^{os}) no 5^o e 15^o dia de incubação na presença de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BA. **A, B e C:** aspecto geral dos explantes no 5^o dia, evidenciando divisões celulares próximas à superfície proximal (voltada para o ápice). Setas amarelas largas: região proximal. **C:** divisão celular na região proximal (seta preta). **D e E:** seções longitudinais de SRs incubados em $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BA, no 15^o dia. **E:** detalhe mostrando a ocorrência de divisões apenas nas células do sistema vascular, mas não nas células do parênquima cortical e velame. Setas vermelhas: divisões periclinais no periciclo. **cv:** células do sistema vascular. **pc:** células do parênquima cortical. **p:** periciclo.

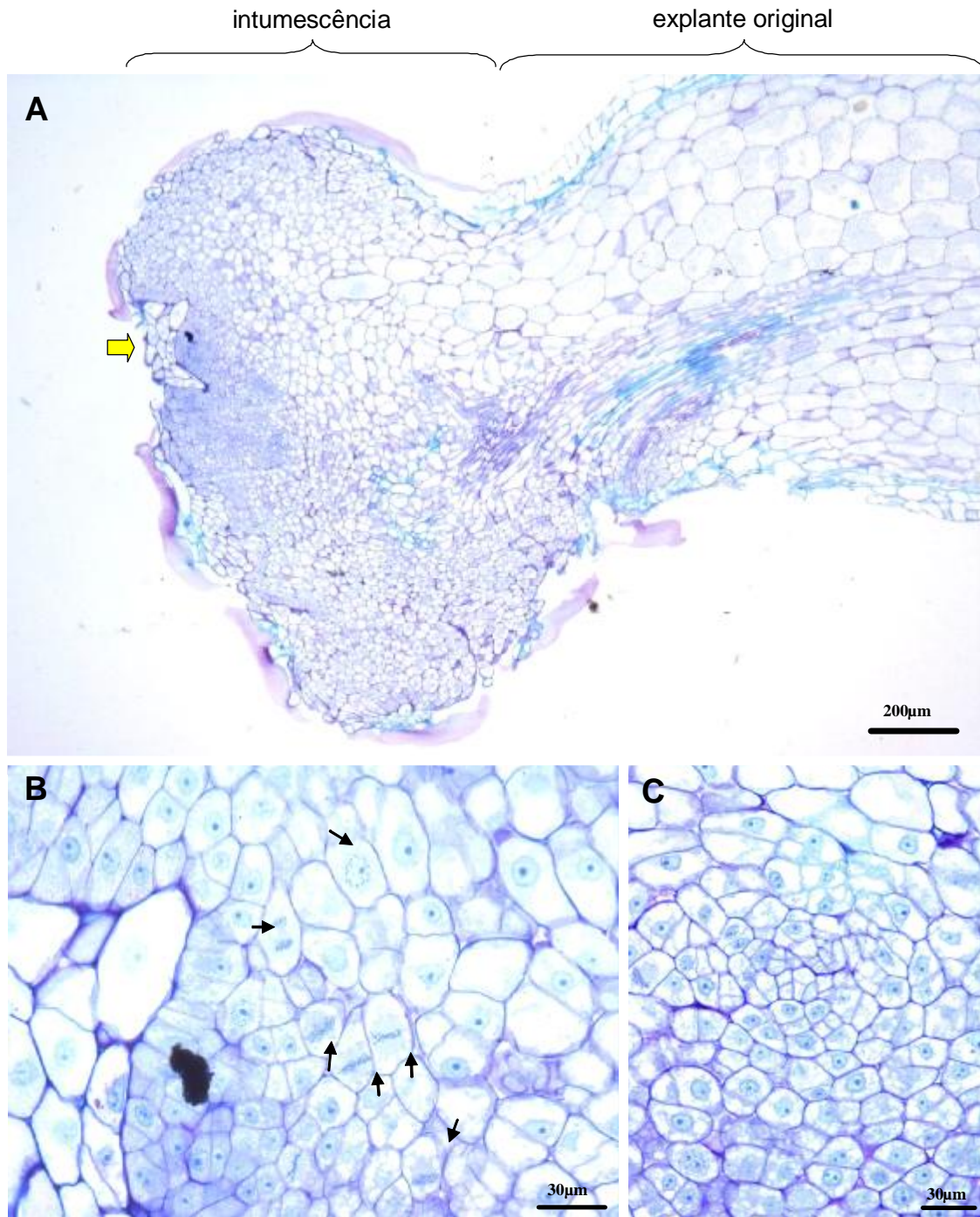


Figura 16. Seções longitudinais de SRs (2^{os}) incubados por 30 dias com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BA. **A:** intumescência formada na região proximal do SR. Seta larga amarela: gema caulinar. **B:** detalhe da gema em A, evidenciando células em divisão celular (setas pretas). **C:** agrupamento de células em divisão celular no interior da intumescência.



Figura 17. Fase de multiplicação de plantas a partir de intumescências com gemas múltiplas, após 30 dias em meio Phv8.

4.3. Determinação da concentração de higromicina para seleção de tecidos

A definição da dose de antibiótico a ser utilizada para a seleção de tecidos geneticamente modificados é dependente do estabelecimento de uma curva dose-resposta. Experimentos foram realizados com base em dados disponíveis na literatura e variavam de 0 a 50mg.L⁻¹. (Yu *et al.*, 1999; Belarmino & Mii, 2000; Chai *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 2003; Men *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Mishiba *et al.*, 2005; Chin *et al.*, 2007 e Suwanaketchanatit *et al.* 2007).

4.3.1. Determinação da concentração de higromicina para seleção de CEs e ARs

A porcentagem de sobrevivência dos CEs foi registrada levando-se em conta a sobrevivência da gema, e não de outras regiões do explante (caule), uma vez que o primeiro é essencial e responsável pelo crescimento e desenvolvimento em plantas. Após 10 dias de incubação com o antibiótico, a concentração mínima de higromicina que efetivamente iniciou a redução da taxa de sobrevivência das gemas laterais dos CEs em relação ao controle foi de 25mg.L⁻¹ (61,67%), enquanto que as menores concentrações (5 e 15 mg.L⁻¹) não alteraram ou reduziram minimamente a porcentagem de sobrevivência (100 e 96,67%, respectivamente). As concentrações maiores (35 e 50 mg.L⁻¹) reduziram proporcionalmente a sobrevivência (35% e 15%, respectivamente). Porém nenhuma das concentrações utilizadas resultou em morte de 100% das gemas (Fig. 18).

Paralelamente, foi medida a massa fresca dos explantes (Fig. 18A). Todas as concentrações empregadas do antibiótico resultaram em significativa redução da massa fresca em relação ao controle. Até mesmo as concentrações mais baixas (5 e 15 mg.L⁻¹) apresentaram grande e visível diferença no crescimento (29,24mg e 20,64mg, respectivamente, em relação ao controle: 118,60mg). Assim, embora as concentrações abaixo de 15mg.L⁻¹ não terem provocado

diminuição significativa da sobrevivência, são inibidores do crescimento e retardam o desenvolvimento das gemas destes explantes em plantas.

O comportamento dos ARs nas diferentes concentrações de higromicina, apresentou semelhanças com aqueles descritos acima para as gemas laterais. A menor concentração de higromicina utilizada (5mg.L^{-1}) foi suficiente para inibir o crescimento dos ARs em mais de 10 mm (Fig. 19), sendo que as concentrações seguintes ($15, 25, 35$ e 50mg.L^{-1}) praticamente não apresentaram crescimento.

Uma redução gradativa de sobrevivência foi observada com o aumento da concentração de higromicina (Fig. 19). Nos tratamentos com $15, 25, 35$ e 50mg.L^{-1} , a taxa de sobrevivência dos ARs foi de $81,3\%$, $50,0\%$, $38,33\%$ e $22,03\%$, respectivamente.

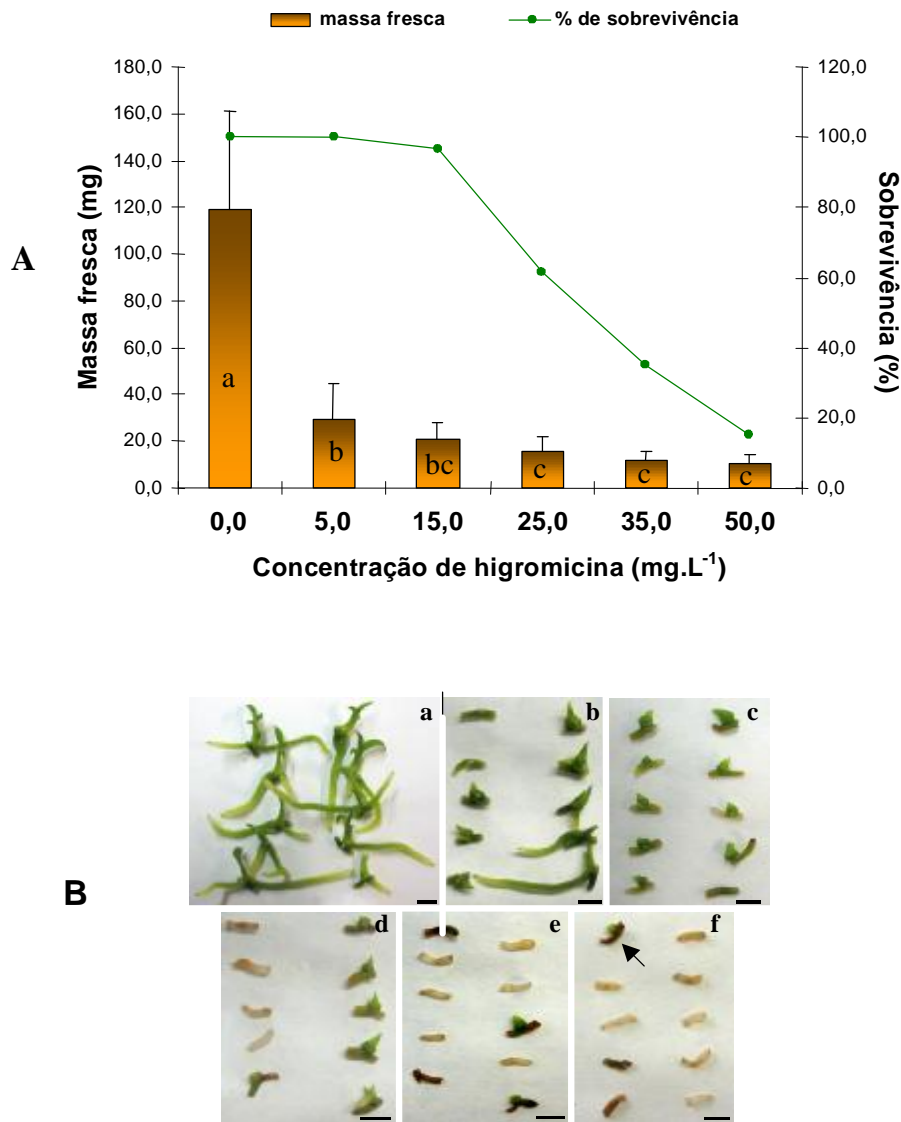


Figura 18. Porcentagem de sobrevivência de gemas laterais de CE's após 10 dias de tratamento com diferentes concentrações de higromicina, seguido da transferência para meio sem antibiótico, até completar 60 dias. **A:** massa fresca e porcentagem de sobrevivência de CE's (N=60 explantes). As letras nas colunas indicam o resultado da análise pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$): tratamento com letras iguais não apresentam diferenças significativas entre si, e tratamento com letras diferentes são significativamente diferentes. Barras nas colunas: desvio padrão. **B:** fenótipo dos CE's após 60 dias. **a:** controle 0mg.L^{-1} . **b:** 5mg.L^{-1} . **c:** 15mg.L^{-1} . **d:** 25mg.L^{-1} . **e:** 35mg.L^{-1} . **f:** 50mg.L^{-1} . Escala: 5mm.

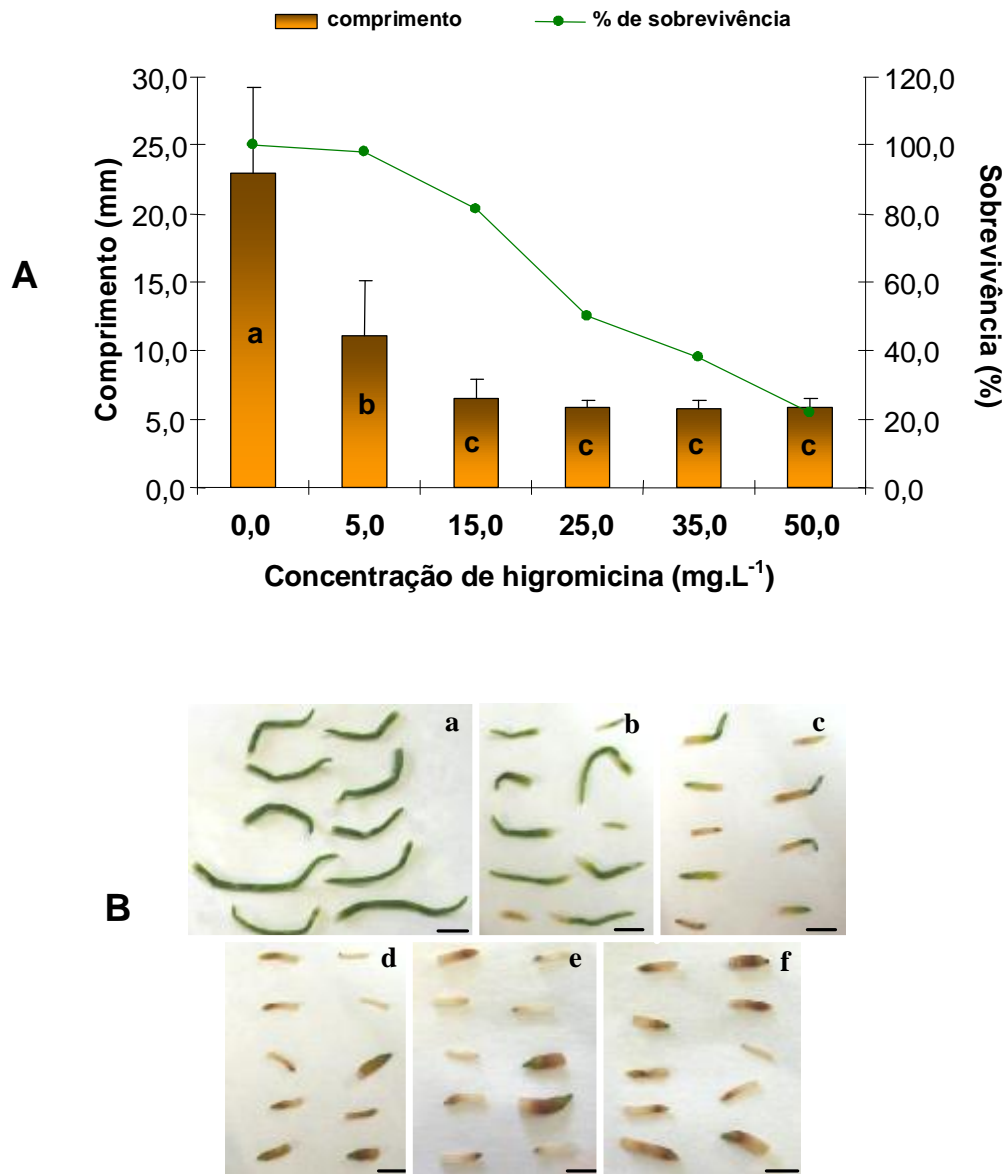


Figura 19. Porcentagem de sobrevivência e crescimento de ARs após 10 dias do tratamento com diferentes concentrações de higromicina por 10 dias, seguido da transferência para meio sem antibiótico, até completar 60 dias. **A:** crescimento e porcentagem de sobrevivência de ARs (N=60 explantes). As letras nas colunas indicam o resultado da análise pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$): tratamento com letras iguais não apresentam diferenças significativas entre si, e tratamento com letras diferentes são significativamente diferentes. Barras nas colunas: desvio padrão. **B:** aspecto dos ARs após 60 dias de experimento. **a:** controle 0mg.L⁻¹. **b:** 5mg.L⁻¹. **c:** 15mg.L⁻¹. **d:**25mg.L⁻¹. **e:** 35mg.L⁻¹. **f:** 50mg.L⁻¹. Escala: 5mm.

Foram encontradas dificuldades nada desprezíveis para se definir, adequadamente, os atributos visuais necessários à distinção entre tecidos mortos e vivos, ou um tecido viável de um inviável, após o tratamento com antibiótico. A viabilidade dos tecidos foi deficientemente resolvida por meio da transferência dos explantes para um meio desprovido de higromicina após o término dos tratamentos. Desta forma, os tecidos viáveis expostos à luz puderam retomar a coloração esverdeada (produção de clorofila, tanto em caules quanto em raízes) e nos casos em que a gema apresentou-se viável, o explante voltou a se desenvolver. Entretanto, nos tratamentos com concentrações de higromicina mais elevadas (acima de 25mg.L^{-1}), a maioria dos explantes utilizados mantiveram-se sem alteração de cor e crescimento após um período máximo de 40 dias após o tratamento, ou na presença de antibiótico. Quando visualizados sob estereoscópio, foi possível observar que alguns destes explantes apresentavam gemas com um crescimento quase imperceptível e sem mudança de coloração, deixando dúvidas quanto à sua condição de vivo ou morto. Uma alternativa para reduzir as dúvidas foi a utilização do teste de tetrazólio. Em tecidos onde ocorre respiração (ou seja, tecidos vivos onde há formação de poder redutor), esta substância é reduzida a um composto de coloração avermelhada, insolúvel em água, denominado formazan (Steponkus e Lamphear, 1967). Após testes para padronização todos os explantes tratados com higromicina que não apresentaram um desenvolvimento perceptível foram submetidos ao teste de tetrazólio (Fig. 20).



Figura 20. Gema lateral de CE sem desenvolvimento aparente, após incubação em higromicina. O tratamento com tetrazólio revela a sobrevivência de parte da gema (seta azul). A escama que recobria a gema foi retirada para facilitar a observação. Barra: 1mm.

A partir destes resultados optou-se pela utilização de 25mg.L^{-1} de higromicina para seleção dos ARs submetidos aos procedimentos de transformação genética. Vale lembrar que esta também foi a concentração na qual as porcentagens de sobrevivência das gemas de CEs foram as mais próximas de 50% (61,67%). Nesta concentração, houve uma inibição visível do crescimento longitudinal dos explantes radiculares e um pequeno desenvolvimento de parte das gemas laterais dos CEs. Estes resultados indicam que a higromicina apresenta ótimo poder de seleção em ambos os explantes de *C. pileatum*. A concentração selecionada apresenta-se dentro da faixa rotineiramente mencionada em literatura, cujos extremos são de $1,5\text{mg.L}^{-1}$ para PLBs de *Phalaenopsis* (Chai *et al.*, 2002) e 50mg.L^{-1} para PCMs de *Dendrobium* (Yu *et al.*, 1999) e calos de *Phalaenopsis* (Belarmino & Mii, 2000).

Entretanto, conforme sinalizaram os resultados, a seleção de ambos os materiais com 25mg.L^{-1} por apenas 10 dias poderia resultar em um número elevado de escapes, ou seja, de tecidos e/ou plantas que se desenvolvem sem que tenham o cassete genético integrado ao genoma. Assim, para um maior refinamento do processo de seleção, procurou-se, de forma complementar, aquilatar o efeito do aumento do período de tratamento dos explantes na concentração definida de higromicina, conforme é mostrado no próximo experimento.

4.3.2. Ampliação do período de tratamento de CEs e ARs na presença de 25mg.L⁻¹ de higromicina

A incubação dos materiais foi estendida para 60 dias, com a mensuração sendo feita a cada 20 dias. Comparativamente ao material controle, no 20º dia em higromicina, tanto as gemas laterais de CEs (Fig. 21) quanto os ARs (Fig. 22) não mais apresentaram alteração nos respectivos parâmetros de análise considerados, indicando a ausência total de crescimento e desenvolvimento. Os valores de massa fresca média dos CEs em 20, 40 e 60 dias foram, respectivamente, de 15,59, 14,05 e 14,07mg, em relação ao controle de 275,74mg (Fig. 21A). Os comprimentos médios dos ARs tratados foram de 6,69, 6,70 e 6,50mm, respectivamente, no 20º, 40º e 60º dias (Fig. 22A). No tratamento controle, houve a formação de plantas a partir da conversão das gemas apicais radiculares em caulinares; neste caso ocorria a paralisação do alongamento da raiz, aumentando a variação experimental (Fig. 22B, setas vermelhas).

Pôde-se observar que no 20º dia de tratamento, a sobrevivência das gemas laterais decresceu substancialmente (20%) a do controle, alcançando valores muito baixos no 40º e 60º dia (7,14% e 2,86%, respectivamente – Fig. 26A). Da mesma forma, no 20º dia, a sobrevivência de ARs foi de 64,81%, reduzindo-se para 7,41% e 3,70%, no 40º e 60º dia, respectivamente (Fig. 22A).

Estes resultados indicam uma diferença na dinâmica das sobrevivências entre ambos os materiais, quando na presença de 25mg.L⁻¹ de higromicina, sendo mais lenta nos ARs e mais intensa nos CEs. Sob a perspectiva da seleção de ambos os materiais na presença desse antibiótico, é inescapável reconhecer a presença de tecidos vivos, ainda que em baixa frequência, mesmo após 60 dias de incubação.

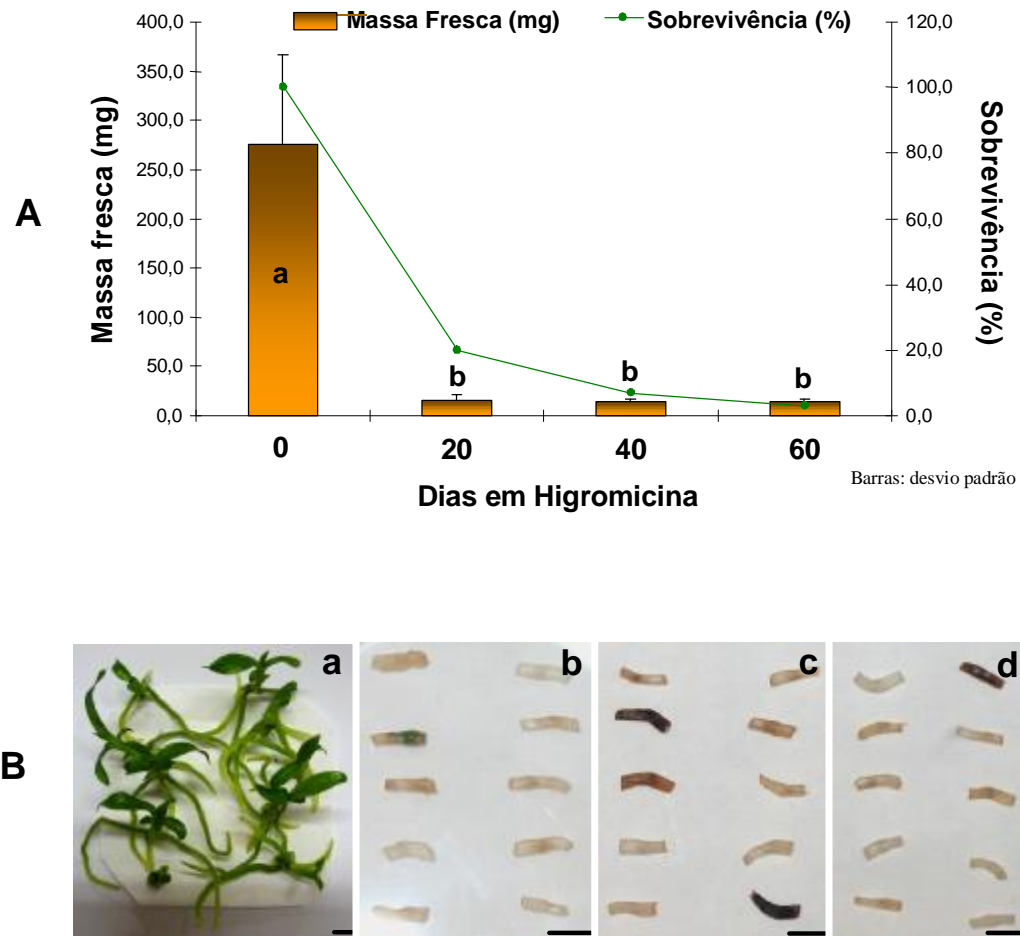
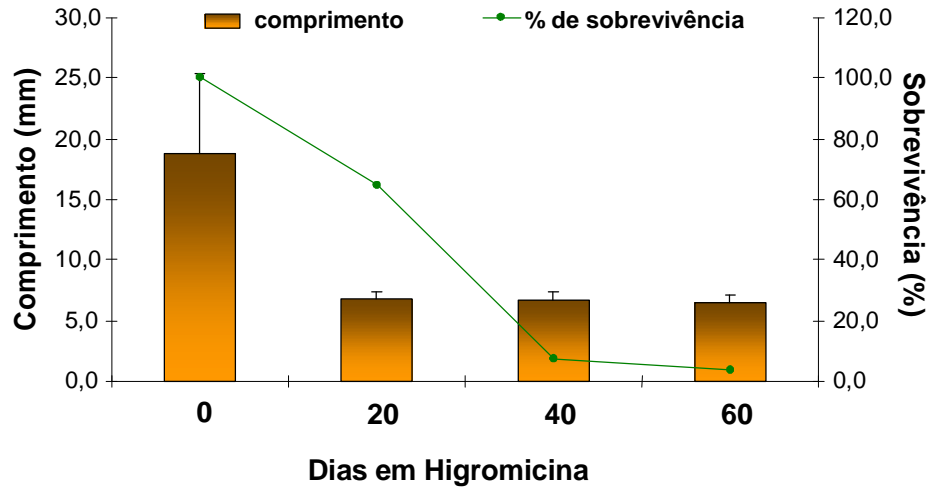
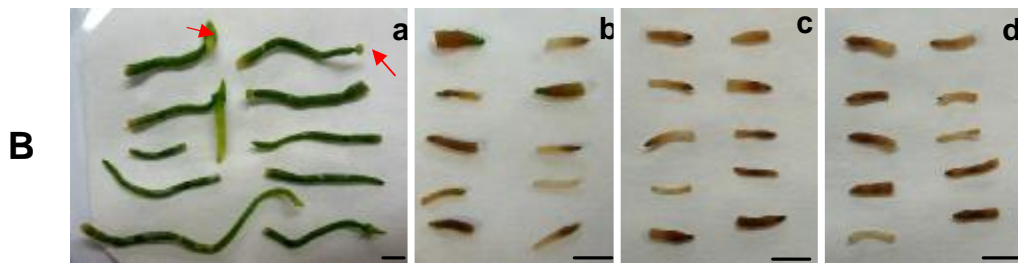


Figura 21. CE's tratados com 25mg.L^{-1} de higromicina ao longo de 60 dias, seguido da transferência para meio sem antibiótico ($N=70$ explantes). **A:** Massa fresca e porcentagem de sobrevivência nos diferentes tratamentos. Letras nas colunas indicam o resultado da análise pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$): tratamento com letras iguais não apresentam diferenças significativas, e tratamento com letras diferentes são significativamente diferentes. Barras nas colunas: desvio padrão. **B:** aspecto dos CE's após 60 dias de experimento, em diferentes tempos em higromicina. **a:** 0 dias. **b:** 20 dias. **c:** 40 dias. **d:** 60 dias. Escala: 5mm.

Figura
seguid
crescer
nas c
tratam
tratam
coluna
difer
Escala:



dias,
. A:
atras
,05):
s, e
nas
, em
dias.



4.3.3. Determinação da concentração de higromicina para a seleção de SRs

Para a definição da concentração de higromicina mais favorável à seleção de SRs, foram testadas diferentes concentrações deste antibiótico, na ausência dos reguladores de crescimento. Cada tratamento foi observado e mensurado no 20º, 40º e 60º dia.

A sobrevivência dos explantes foi mais intensamente afetada na concentração de 10 mg.L⁻¹ de higromicina. Entre 0,5 e 5,0 mg.L⁻¹ não houve grande variação na porcentagem de sobrevivência, sendo que esta apresentou uma leve redução apenas na concentração de 5,0mg.L⁻¹. A presença de 10mg.L⁻¹ do antibiótico foi letal à quase totalidade dos explantes no 60º dia, porém nenhum dos tratamentos empregados resultou em 100% de letalidade (Fig. 23).

Considerando que o agente seletivo deva ter a capacidade de discriminar os materiais resistentes daqueles não resistentes, mas não necessariamente ser letal, a incubação com 10 mg.L⁻¹ de higromicina durante 40 dias para seleção dos eventos de transformação, apesar de permitir a sobrevivência de 37,5% dos explantes não transformados, inibiria o seu crescimento, o que seria suficiente para identificar tecidos resistentes. Entretanto, como os SRs apresentam crescimento bastante moroso, mesmo quando na presença de hormônios, o prolongamento do período de seleção fez-se necessário, conforme será mostrado nos próximos experimentos

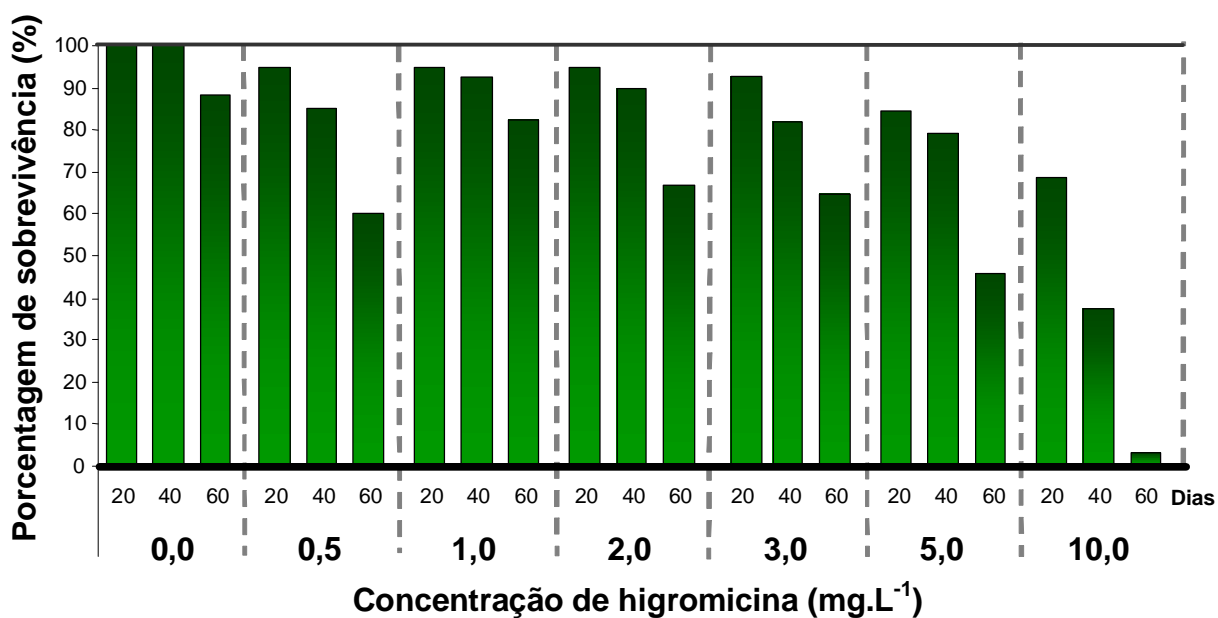


Figura 23. Porcentagem de sobrevivência de SRs submetidos à diversas concentrações de higromicina, na ausência de reguladores, ao longo de 60 dias de tratamento ($N_{\text{tratamento}}=40$).

4.4. Seleção e regeneração de tecidos transformados

4.4.1. Seleção de CEs e ARs, após uma semana do bombardeamento

Baseando-se nas etapas anteriormente estudadas, foi realizado o primeiro teste de bombardeamento de partículas com o objetivo de verificar a transformação e seleção de células a partir de CEs e ARs. Os explantes foram bombardeados com *35S:uidA* ou *Pthi1:uidA*, analisados quanto à expressão de *uidA* após 24 horas e uma semana dos bombardeamentos (Tab. 4) e transferidos para o meio contendo 25mg.L^{-1} de higromicina.

Após 24 horas dos bombardeamentos, os testes histoquímicos revelaram uma substancial expressão transiente de *uidA* regulado por 35S nos CEs; dos 19 explantes analisados, 94,74% apresentaram expressão, e destes, 83,33% continham pelo menos um ponto azul diretamente nas gemas (Fig. 24a-b), essas responsáveis pela regeneração e crescimento de novas plantas. Algumas destas gemas apresentaram-se intensamente coradas (Fig. 24b). Em média, observaram-se 29,74 pontos azuis por explante tratado (Tab. 4).

Neste mesmo período foi também observada a expressão de *uidA* regulado por *Pthi1* em 100% dos explantes caulinares analisados (Fig. 25a-b). Destes, 38,88% dos pontos azuis foram observados nas gemas com incidência média de 13,11 pontos por explantes (Tab. 4). Quanto aos ARs, o promotor 35S promoveu valores de expressão semelhantes ao dos segmentos caulinares, ou seja, 94,74% dos explantes (N=19), e *Pthi1* promoveu expressão em 70% dos explantes (N=18). A média de pontos azuis foi de 26,56 e 10,07, para 35S e *Pthi1*, respectivamente (Fig. 24 e 25c-d).

Após 7 dias da transferência para fotoperíodo de 16 horas de luz, sem seleção por antibiótico, a expressão por 35S e *Pthi1* nos CEs manteve-se em níveis similares ou levemente menores do que em 24 horas, sendo que as médias de pontos azuis por explante praticamente não se alteraram, e as porcentagens dos explantes que apresentaram expressão foram de 94,74% e 94,12% dos explantes analisados, respectivamente (Tab. 4; Fig. 24 e 25e-f). Entretanto,

observou-se uma diminuição na porcentagem de gemas portadoras de pontos azuis, ou seja, 55,56% e 23,53%, para 35S e *Pthi1*, respectivamente (Tab. 4). Em relação aos ARs, entretanto, foram observados resultados diferentes entre os promotores: enquanto a expressão de *uidA* regulado por *Pthi1* apresentou uma leve redução (de 70% em 24 horas para 60% após 7 dias – Tab. 4 e Fig. 25g), 35S apresentou redução acentuada de 94,74% para 50% após 7 dias (Tab. 4 e Fig. 24g-h). As médias de pontos por explantes corados reduziram de 26,56 para 4,54 e de 10,07 para 3,83, com 35S e *Pthi1*, respectivamente (Tab. 4).

Tabela 4. Análise histoquímica de segmentos CEs e ARs na 24^a hora e no 7^o dia após os bombardeamentos com 35S:*uidA* ou *Pthi1:uidA*.

Promotor	Explantes	Tempo após bombardeamento	Explantes expressando <i>uid1</i> ¹ (%)	Pontos por explante ²	Gemas ou ápices expressando <i>uidA</i> ³ (%)	Pontos por gema ou ápice ⁴
35S	CEs	24h	94,74	29,74	83,33	5,27
		7d	94,74	30,28	55,56	2,57
	ARs	24h	94,74	26,56	66,67	5,75
		7d	50,00	4,54	7,69	1,00
<i>Pthi1</i>	CEs	24h	100,0	13,11	38,89	3,83
		7d	94,12	16,69	23,53	2,00
	ARs	24h	70,00	10,07	20,00	1,25
		7d	60,00	3,83	0,00	0,00

¹Porcentagem de explantes com pontos azuis em relação ao total de explantes analisados.

²Média de pontos por explantes que expressaram *uidA*.

³Porcentagem de explantes cujas gemas (CEs) ou os 2 primeiros milímetros do ápice (ARs) apresentaram ao menos 1 ponto azul em relação ao total de explantes que expressaram *uidA*.

⁴Média de pontos por gema (CEs) ou ápice (ARs) que expressaram *uidA*.

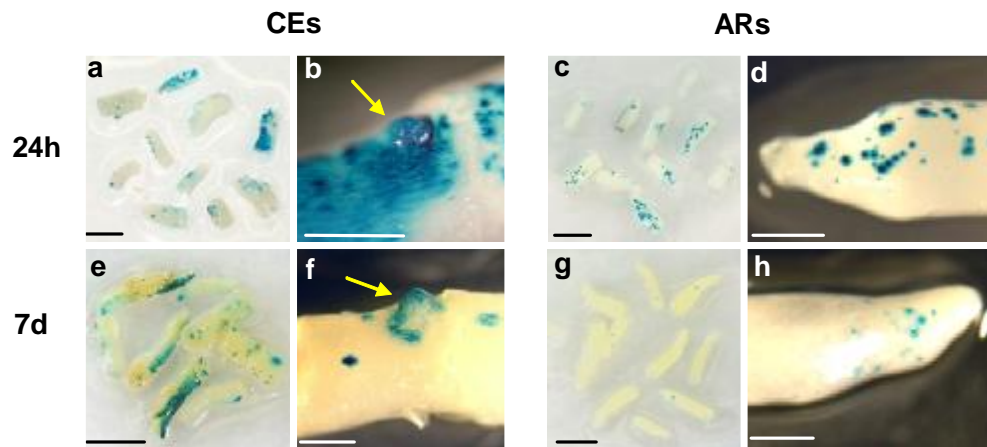


Figura 24. Expressão de *uidA* regulado por 35S após 24 horas e 7 dias do bombardeamento. **a-d:** 24h após o bombardeamento. **e-h:** 7 dias após o bombardeamento. **a, b, e, f:** CEs. **c, d, g, h:** ARs. **Setas amarelas:** detalhe de gema expressando *uidA*. Barras pretas = 5 mm. Barras brancas = 2 mm.

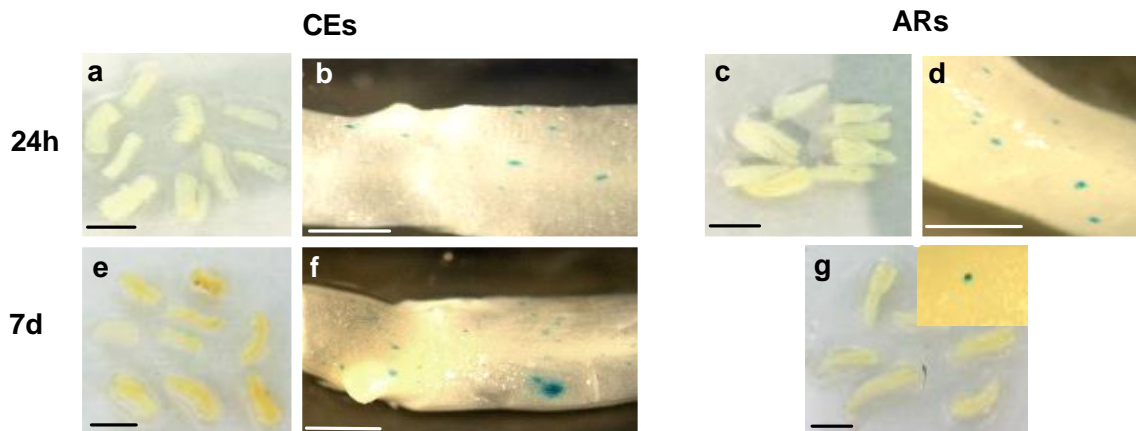


Figura 25. Expressão de *uidA* regulado por *Pthi1* após 24 horas e 7 dias do bombardeamento. **a-d:** 24h após o bombardeamento. **e-g:** 7 dias após o bombardeamento. **a, b, e, f:** CEs. **c, d, g:** ARs. Barras pretas = 5 mm. Barras brancas = 2 mm.

Os explantes restantes foram transferidos para meio contendo 25mg.L⁻¹ de higromicina para seleção das células transformadas e regeneração de plantas. Entretanto, após 20 dias de seleção nenhuma das gemas havia iniciado visivelmente o desenvolvimento em plantas, apesar de muitos explantes terem desenvolvido coloração verde escura, devido à transferência para a luz. Da mesma forma, os ápices radiculares não apresentaram crescimento algum após a transferência para meio seletivo. Após dois meses de seleção, todos os CEs se encontravam intensamente oxidados, enquanto os ARs apresentavam coloração branca, com a extremidade apical oxidada.

Estes materiais foram transferidos para meio não seletivo e mantidos por três meses. Neste período, não houve crescimento em quaisquer dos tecidos, indicando a inviabilidade e/ou ausência de sobrevivência das células transformadas. O curto período entre os bombardeamentos e a transferência para meio seletivo pode ter sido responsável pela total falta de recuperação de tecidos eventualmente transformados, uma vez que os tecidos injuriados durante os bombardeamentos podem não ter conseguido se recuperar do primeiro estresse, antes da aplicação do segundo estresse de seleção. Russel, *et al.* (1992), mencionaram que o estresse provocado por injúrias mecânicas torna os explantes mais sensíveis aos antibióticos. Este estresse, associado ao lento crescimento e desenvolvimento comum em orquídeas, pode ter sido potencializado pelo efeito danoso do processo de seleção. Isso posto, um segundo experimento foi realizado, voltado à recuperação de tecidos transformados, por meio do prolongamento do período entre o bombardeamento e a transferência para meio seletivo.

4.4.2. Seleção de CEs e ARs, após duas e três semanas do bombardeamento

Após os bombardeamentos, lotes de materiais foram incubados por duas e três semanas na ausência de agente seletivo, visando a recuperação das injúrias e retomada do crescimento, antes da transferência para meio de seleção. Um lote controle foi mantido na ausência de antibiótico para acompanhamento da expressão de *uidA* durante quatro semanas.

Em relação aos ARs, a expressão de *uidA* foi observada após 48 horas e uma semana do bombardeamento, como no experimento anterior (Item 4.4.1). Entretanto, após este período, nenhum dos explantes radiculares apresentou expressão, mesmo antes da transferência para meio seletivo. A não detecção de expressão pode ter sido devido à manutenção do crescimento das raízes nas semanas subseqüentes ao bombardeamento, chegando ao triplo do comprimento inicial. O crescimento das raízes implica na diferenciação do tecido mais externo, o velame, uma camada multisseriada de células epidérmicas que ao longo do desenvolvimento entram em apoptose para a formação do revestimento com função de absorção de umidade e proteção mecânica das raízes aéreas. Nas condições testadas, os bombardeamentos parecem não ter sido profundos o suficiente para ultrapassar as células de células da protoderme e do velame.

Em relação aos CEs, foi observado expressão de *uidA* regulado por 35S nos caules e nas gemas em desenvolvimento até a 4ª semana, porém somente nos explantes não submetidos ao agente seletivo. Apesar de esta expressão apresentar uma redução contínua no número de pontos por explante e pontos por gema ao longo deste tempo (Tab. 5), a manutenção da expressão indica a provável integração de algumas cópias do gene no genoma de algumas células. Já o declínio na expressão reflete, provavelmente, a degradação das múltiplas moléculas incorporadas no ato do bombardeamento mas não integradas ao genoma, e a morte de parte das células transformadas. Trabalhando com tecidos de *Dendrobium*, Nan & Kuehnle (1995) observaram que a expressão transiente de *uidA* regulado por 35S foi reduzida de 60% para 20% dos explantes na primeira e na segunda semana após os bombardeamentos, respectivamente. Adicionalmente, os autores observaram também uma redução de 11 para 1 ponto

azul por explante que havia apresentado expressão. Já Tee *et al.* (2003), acompanhando diariamente a expressão transiente de GFP regulado por três diferentes promotores em calos deste mesmo gênero, observaram um maior nível de expressão em 2 dias, mas diminuição para níveis muito baixos no 7º dia. Apesar do método de bombardeamento gerar uma frequência relativamente elevada de expressão transiente, Gordon-Kamm *et al.* (1990) estimaram que o número de transformações estáveis de células de *Zea mays* seria cerca de 1000 vezes menor do que as que apresentavam expressão transiente.

Ainda em relação à 35S, observou-se que a expressão de *uidA* ocorreu em regiões sem crescimento, como por exemplo, na parte caulinar original do explante (Fig. 26c,e, setas pretas), ou na segunda escama que recobre a gema (Fig. 26c, seta verde), visto que a mais superficial foi retirada antes do bombardeamento. Entretanto, até mesmo os pontos localizados na gema em crescimento não aumentaram de tamanho, mantendo-se como pequenos pontos em meio aos tecidos não transformados (Fig. 26d, setas vermelhas). Estes resultados indicam mais uma vez que os bombardeamentos parecem não ter sido capazes de atingir as células meristemáticas da gema, não levando ao aumento expressivo no número das células transformadas.

A expressão de *Pthi1*, por sua vez, foi inicialmente reduzida, apresentou leve aumento até o fim da primeira semana (Fig. 27a, b, c), desaparecendo ao final da terceira semana. O desaparecimento desta expressão pode ter ocorrido pela competição entre as células transformadas e as não transformadas, em detrimento das primeiras, que podem não ter sido capazes de se manter e crescer em meio à grande maioria de células não transformadas, estas últimas em vantagem seletiva pela ausência de antibiótico.

Por fim, nenhum explante em meio contendo higromicina apresentou pontos ou regiões azuis, mesmo ainda possuindo parte dos tecidos verdes e não oxidados nos momentos de análise. Provavelmente, as regiões expressando o gene *hpt* são muito pequenas em relação às regiões não transformadas e não foram capazes de conferir resistência à higromicina. Uma outra hipótese seria de que uma vez que as regiões azuis encontram-se no interior de um conjunto organizado e integrado de tecidos em desenvolvimento, os quais são

interdependentes anatômica e fisiologicamente, estas células transformadas não seriam capazes de sobreviver individualmente, na ausência de todo o conjunto.

Tabela 5. Análise histoquímica de CEs na 48^a hora e ao longo de 4 semanas após os bombardeamentos com 35S:*uidA* ou *Pthi1:uidA*.

Promotor	Tempo após bombardeamento	CEs expressando <i>uidA</i> (%) ¹	Pontos por CE ²	Gemas expressando <i>uidA</i> (%) ³	Pontos por gema ⁴
35S	48h	84,62	6,69	92,31	1,77
	1 semana	60,00	3,00	60,00	1,40
	2 semanas	69,57	2,57	52,17	0,87
	3 semanas	77,78	1,44	55,56	0,67
	4 semanas	62,50	0,88	25,00	0,50
<i>Pthi1</i>	48h	20,00	0,50	10,00	0,20
	1 semana	20,00	0,70	20,00	0,30
	2 semanas	10,53	0,21	10,53	0,11
	3 semanas	0	0	0	0
	4 semanas	0	0	0	0

¹Porcentagem de CEs com pontos azuis em relação ao total de explantes analisados.

²Média de pontos por CEs que expressaram *uidA*.

³Porcentagem de CEs cujas gemas apresentaram ao menos 1 ponto azul em relação ao total de CEs que expressaram *uidA*.

⁴Média de pontos por gema que expressaram *uidA*.

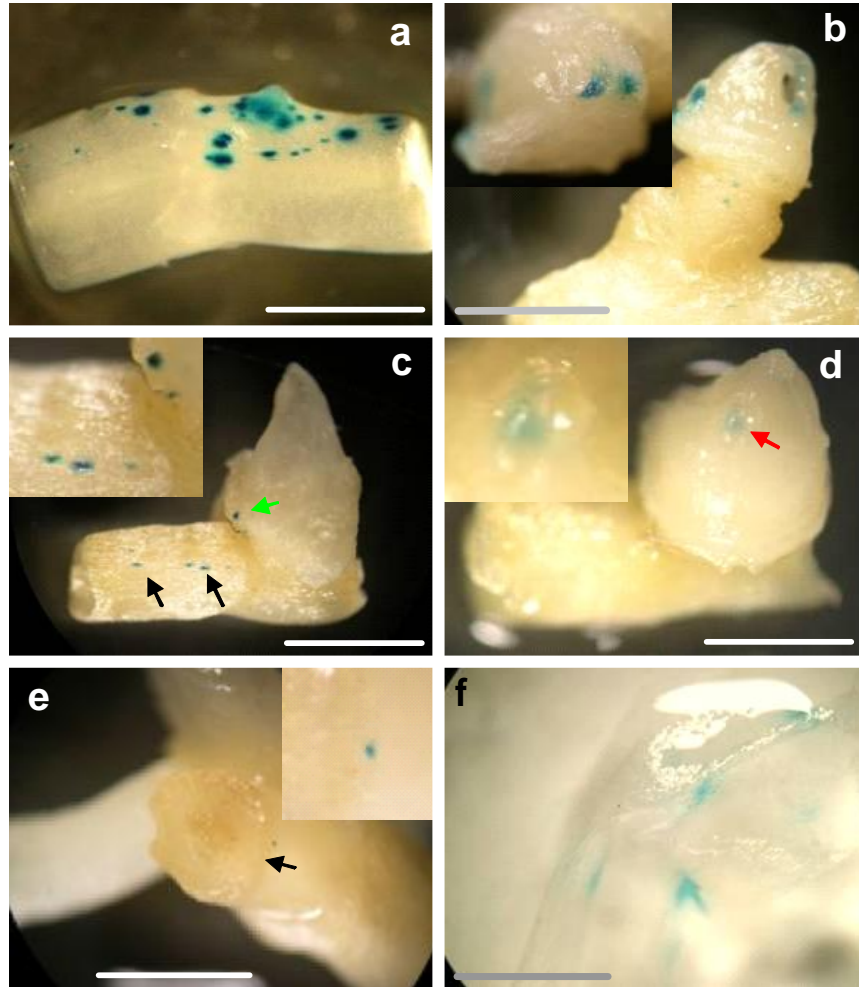


Figura 26. Expressão de *uidA* regulado por 35S em CEs, ao longo de 4 semanas após os bombardeamentos. **a:** 48h após o bombardeamento. **b:** uma semana após o bombardeamento. **c:** duas semanas após o bombardeamento. **d:** três semanas. **e:** quatro semanas. **f:** epiderme de *Allium cepa*, 48 horas após o bombardeamento (controle do bombardeamento). Barras: 2 mm.

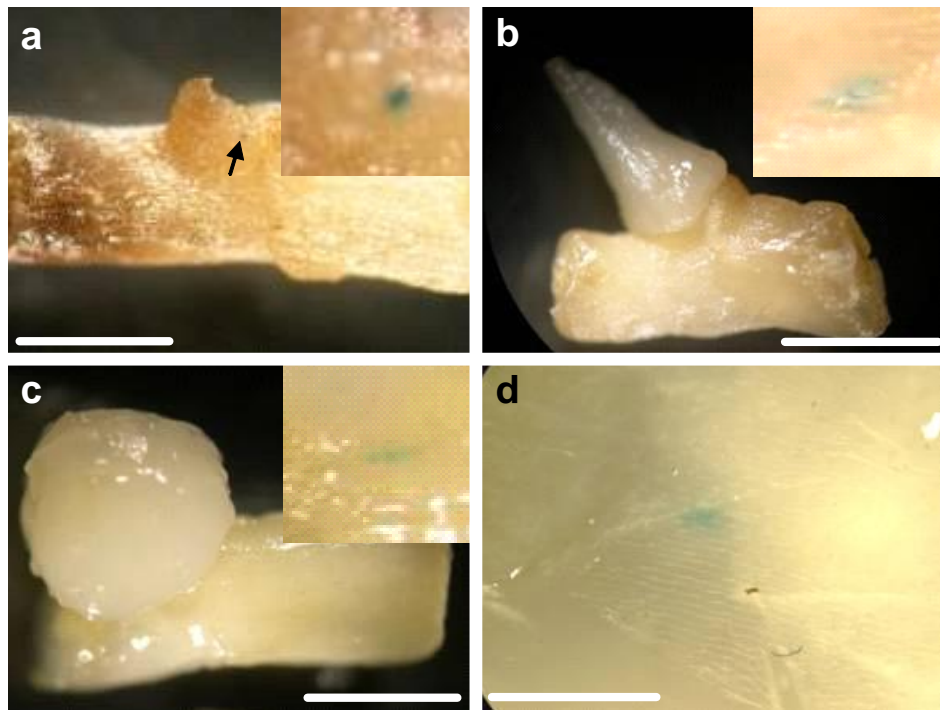


Figura 27. Expressão de *uidA* regulado por *Pthi1* em CEs, ao longo de 2 semanas após os bombardeamentos. **a:** 48h após o bombardeamento. **b:** uma semana após o bombardeamento. **c:** duas semanas após o bombardeamento. **d:** epiderme de *Allium cepa*, 48 horas após o bombardeamento (controle do bombardeamento). Barras: 2 mm.

4.4.3. Bombardeamento de SRs recém-isolados e seleção de intumescências após duas ou três semanas

A expressão de *uidA* foi acompanhada durante 4 semanas após o bombardeamento de SRs recém-isolados. Neste período, foi observada a expressão de 35S e de *Pthi1* em SRs mantidos tanto na ausência do antibiótico, quanto nos lotes transferidos para meio contendo 10mg.L⁻¹ de higromicina após duas e três semanas do bombardeamento (Tab. 6, Fig. 28 e 29). A expressão manteve-se na extremidade proximal, região esta de incidência direta dos tiros, e a partir da qual ocorre o crescimento da intumescência formadora de gemas caulinares.

Nos explantes transformados com 35S e não submetidos à seleção, ocorreu uma redução da expressão até a terceira semana, seguido de uma elevação da expressão na quarta semana. A transferência do lote de SRs para meio contendo higromicina, após duas semanas ("Higro1"), permitiu o aumento do número de explantes expressando *uidA*, mesmo que de forma momentânea, como visto na terceira semana (Tab. 6, coluna higro1, 3 semanas; Fig. 28h). A expressão neste lote após a quarta semana, apesar de menor do que no controle sem antibiótico, ainda foi maior do que no lote transferido para higromicina somente após três semanas ("Higro2"). Estes resultados indicam que este tratamento foi o melhor dentre os testados para a manutenção dos tecidos transformados em meio de seleção.

Quanto ao promotor *Pthi1*, houve uma redução da expressão de *uidA* até o seu desaparecimento após a quarta semana, em explantes não submetidos à higromicina (Tab. 6, Fig. 29). Na presença de higromicina, no entanto, a expressão foi capaz de se manter em 20% dos explantes (Tab. 6, Fig. 29f-h), indicando que para este promotor, a presença de agente seletivo foi essencial para manter a expressão, provavelmente devido ao favorecimento seletivo conferido pelo gene *hpt* em relação às células não transformadas. De maneira semelhante ao 35S, os explantes mantidos no tratamento "Higro1" apresentaram maior número de pontos por intumescência, resultado este melhor do que o obtido

com os explantes controles em meio sem seleção na terceira semana, e melhor do que o tratamento “Higro2” na quarta semana.

Tabela 6. Análise histoquímica de SRs na 48^a hora e ao longo de quatro semanas após os bombardeamentos com *35S:uidA* e *Pthi1:uidA*, na ausência e presença 10 mg.L⁻¹ de higromicina.

Promotor	Tempo após bombardeamento	Higromicina	SRs expressando <i>uidA</i> (%) ¹	Pontos por explante ³	Intumescências expressando <i>uidA</i> (%) ²	Pontos por intumescência ⁴	
35S	48h	-	100,00	16,37	94,74	6,11	
	1 semana	-	80,00	4,90	87,50	3,40	
	2 semanas	-	83,33	2,17	80,00	1,67	
	3 semanas	-	40,00	1,0	100,00	1,0	
		Higro1*	70,00	1,0	100,00	1,0	
	4 semanas	-	50,00	1,2	100,00	1,2	
		Higro1*	30,00	0,6	100,00	0,6	
		Higro2**	20,00	0,5	100,00	0,5	
	Pthi1	48h	-	71,43	3,10	80,0	1,71
		1 semana	-	80,00	2,87	100,00	2,00
2 semanas		-	58,33	1,58	100,00	1,58	
3 semanas		-	30,00	0,3	100,00	0,3	
		Higro1*	30,00	0,4	100,00	0,4	
4 semanas		-	-	-	-	-	
		Higro1*	20,00	0,4	100,00	0,4	
		Higro2**	20,00	0,2	100,00	0,2	

¹Porcentagem de SRs com pontos azuis em relação ao total de explantes analisados.

²Média de pontos por SRs que expressaram *uidA*.

³Porcentagem de SRs cujas intumescências apresentaram ao menos 1 ponto azul em relação ao total de SRs que expressaram *uidA*.

⁴Média de pontos por intumescência que expressaram *uidA*.

*Higro1: SRs transferidos para meio seletivo duas semanas após os bombardeamentos.

**Higro2: SRs transferidos para meio seletivo três semanas após os bombardeamentos.

Apesar da diminuição no número e na intensidade de pontos, regiões expressando *uidA* parecem ter aumentado de tamanho no interior das intumescências, provavelmente em decorrência de proliferação celular (Fig. 28e, f, g, h, i; Fig. 29f, g,h). Estes explantes, quando seccionados longitudinalmente, permitiram observar o aumento discreto da região azul (Fig. 30), indicando que as células transformadas provavelmente se dividiram durante o crescimento da intumescência.

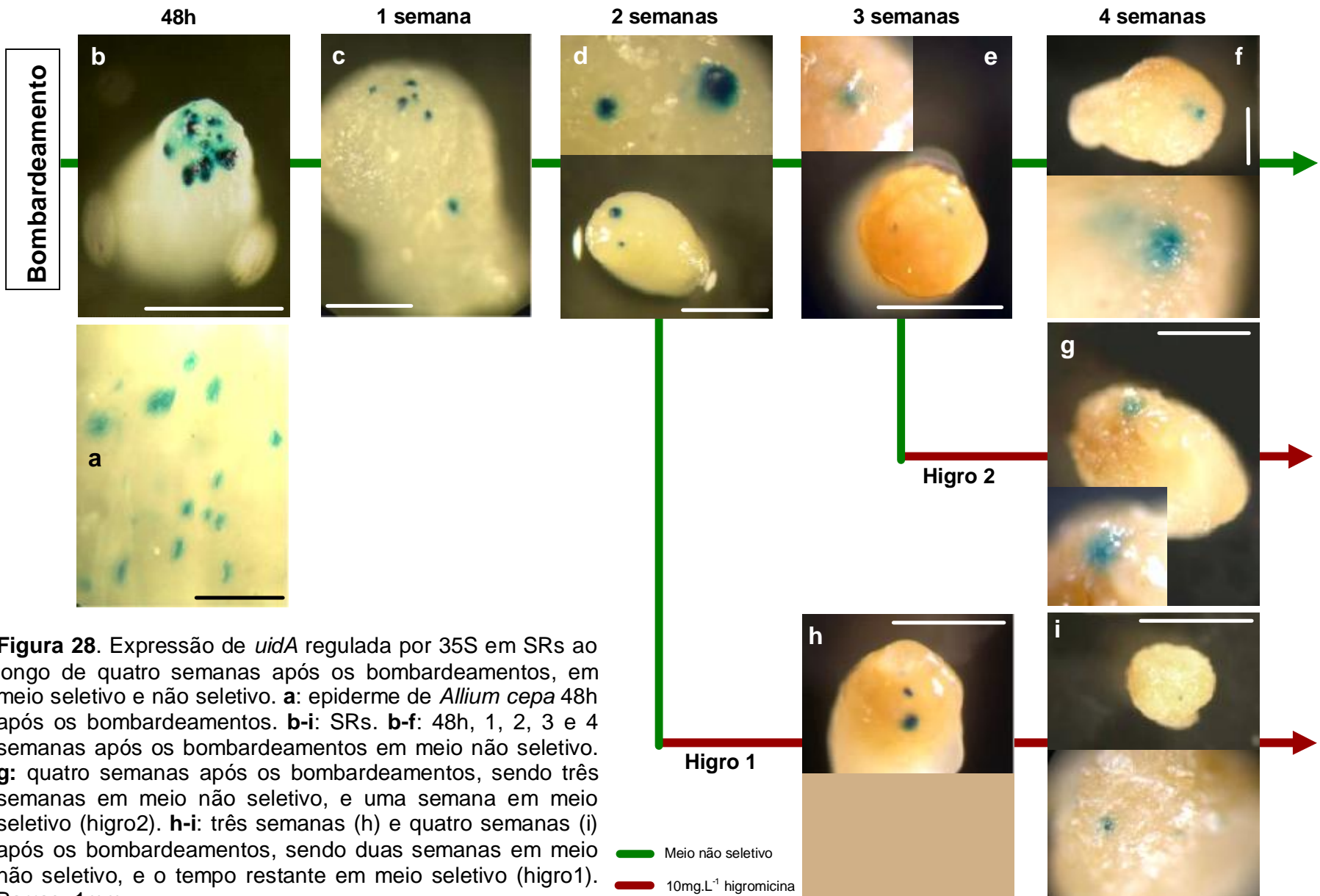
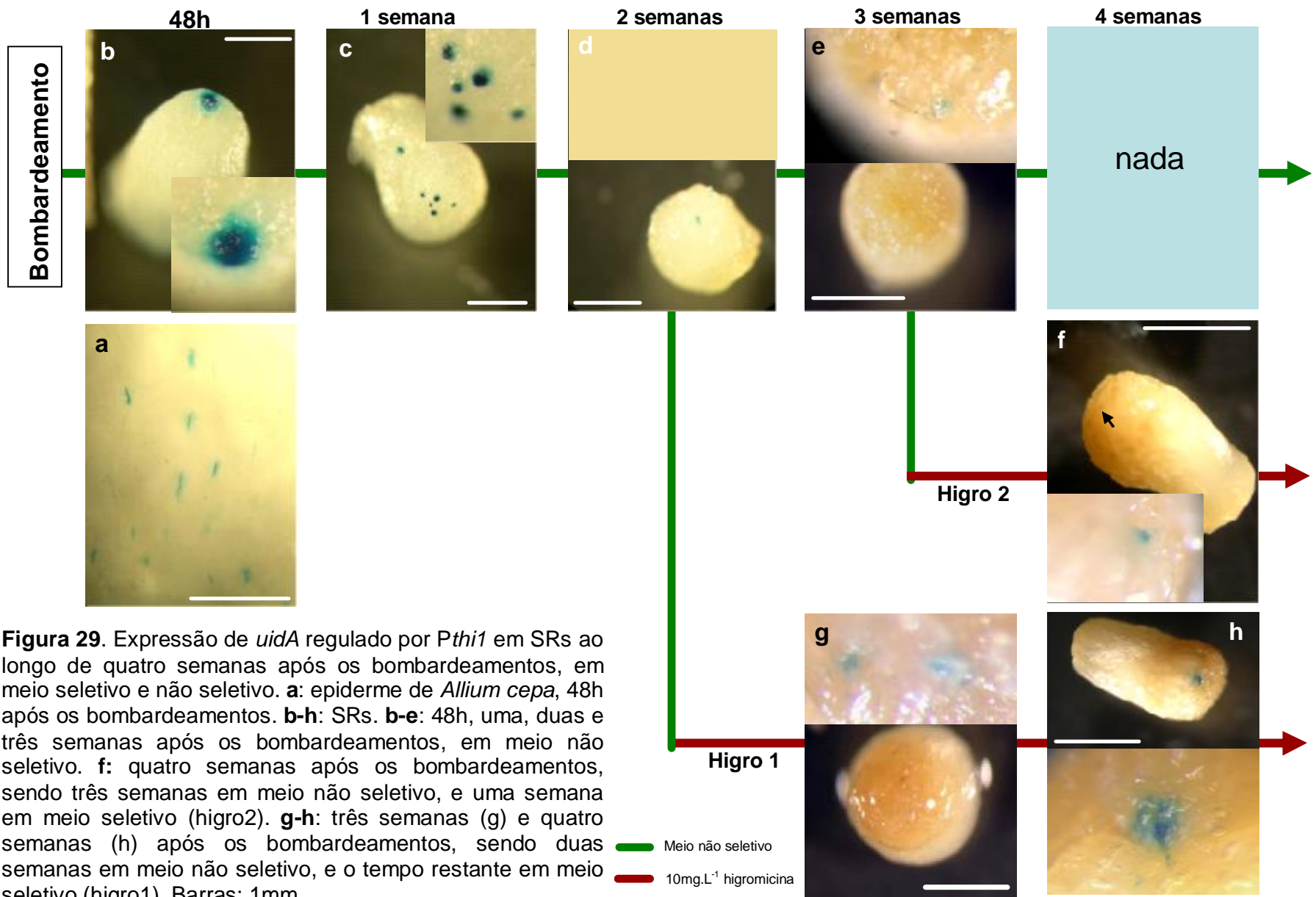


Figura 28. Expressão de *uidA* regulada por 35S em SRs ao longo de quatro semanas após os bombardeamentos, em meio seletivo e não seletivo. **a:** epiderme de *Allium cepa* 48h após os bombardeamentos. **b-i:** SRs. **b-f:** 48h, 1, 2, 3 e 4 semanas após os bombardeamentos em meio não seletivo. **g:** quatro semanas após os bombardeamentos, sendo três semanas em meio não seletivo, e uma semana em meio seletivo (higro2). **h-i:** três semanas (h) e quatro semanas (i) após os bombardeamentos, sendo duas semanas em meio não seletivo, e o tempo restante em meio seletivo (higro1). Barras: 1mm.



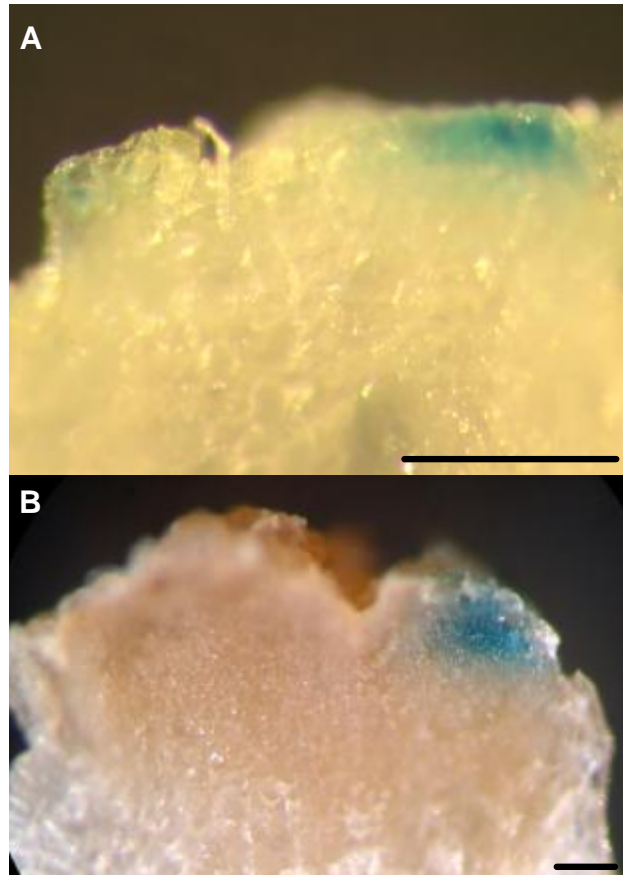


Figura 30. Crescimento das áreas expressando *uidA* regulado por 35S, em quatro semanas, na presença de $0,5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA. **A:** SRs, 48h após o bombardeamento, mostrando expressão superficial de *uidA*, na extremidade proximal do explante. **B:** SRs após quatro semanas do bombardeamento em higromicina (“Higro1”), contendo área expressando *uidA* em crescimento juntamente com a intumescência. Barras: $200\mu\text{m}$.

Após três meses dos bombardeamentos, 100% dos explantes dos tratamentos controles (sem seleção) apresentavam-se vivos (Tab.7). Na maioria dos SRs houve formação de intumescências grandes, além de presença de órgãos como raízes e gemas (Fig. 31a,d). Entretanto, a ausência de seleção impediu a manutenção de células transformadas, sendo observada uma única região azul, muito suave, a partir da expressão de 35S, em um único SR (Fig. 32a).

Em relação aos explantes mantidos em meio seletivo, quatorze deles, bombardeados com 35S ou *Pthi1*, sobreviveram nos tratamentos com higromicina (somando-se “Higro1” e “Higro2”, Tab.7). Dentre eles, principalmente nos explantes bombardeados com *Pthi1*, foi observada a retomada do crescimento e a formação de intumescências verdes e vigorosas em meio aos tecidos oxidados (Fig. 31e,f). Já em relação aos SRs bombardeados com 35S, a maioria daqueles que sobreviveram não desenvolveram intumescências, ou estas não foram capazes de resistir à seleção, durante os subcultivos mensais (Fig. 31b, c).

Foram observadas diferenças entre os explantes transferidos para o meio seletivo duas ou três semanas após os bombardeamentos (“Higro1” e “Higro2”, respectivamente). Explantes selecionados após três semanas apresentaram capacidade menor de crescimento, tanto com 35S quanto com *Pthi1* em relação aos selecionados após duas semanas. No primeiro (“Higro2”), apesar da sobrevivência de cinco explantes bombardeados com 35S (Tab7), o crescimento das intumescências foi completamente inibido (Fig. 31c). Já com *Pthi1*, dentre os dois explantes sobreviventes, apenas um apresentou intumescência capaz de se desenvolver no tratamento “Higro2” (Fig. 31f). A expressão de *uidA* nestes tratamentos também foi muito baixa.

Os tratamentos “Higro1”, por sua vez, apresentaram melhores resultados, principalmente com *Pthi1* (Tab.7). Com este promotor, foi observado maior número de sobreviventes (5), maior porcentagem de sobrevivência (14,29%), maior formação de intumescências (Fig. 31e) e maior porcentagem de explantes vivos expressando *uidA* (Tab. 7, Fig. 32c). Justamente neste tratamento, foi encontrada também uma gema em desenvolvimento intensamente corada (Fig. 32c). Este resultado concretiza a possibilidade de recuperação de gemas

transformadas, mesmo que seja necessário o subcultivo destes tecidos por um tempo mais prolongado, para eliminação das células não transformadas. Expressão de *35S:uidA* também foi observada no tratamento “Higro1”, porém a intensidade desta foi muito baixa, ou ocorreu em regiões muito pequenas de tecido. O melhor resultado deste tratamento foi a coloração intensa de uma pequena região na base de uma intumescência em crescimento (Fig. 32b).

Tabela 7. Sobrevivência e análise histoquímica de SRs após três meses dos bombardeamentos com pCAMBIA 1281Z+35S ou pCAMBIA 1281Z+*Pthi1*, na ausência (controle) e na presença de 10 mg.L⁻¹ de higromicina.

Promotor	Tratamento	N total	Sobreviventes (N)	Sobreviventes (%)	SRs expressando <i>uidA</i> (N)	SRs expressando <i>uidA</i>
35S	Controle	40	40	100,00	1	1/40
	Higro1*	56	2	3,57	1	1/2
	Higro2**	46	5	10,87	2	2/5
Pthi1	Controle	40	40	100,00	0	0
	Higro1*	35	5	14,29	3	3/5
	Higro2**	50	2	4,00	1	1/2

*Higro1: SRs transferidos para meio seletivo duas semanas após os bombardeamentos.

**Higro2: SRs transferidos para meio seletivo três semanas após os bombardeamentos

Ao longo dos três meses foram observadas, então, diferenças na manutenção da expressão dos dois promotores testados neste trabalho. Apesar de 35S expressar-se fortemente logo após os bombardeamentos e no início do processo de seleção, como era o esperado, *Pthi1* apresentou expressão mais consistente após este período. Além das diferenças estruturais e regulatórias existentes entre os promotores, é importante observar que estes estão inseridos no mesmo plasmídeo pCAMBIA1281Z. Desta forma, o gene de seleção *hpt* é regulado pelo mesmo promotor (35S de CaMV) e assim, não deveriam haver diferenças no processo de regeneração entre os tratamentos bombardeados com o plasmídeo pCAMBIA 1281Z, mesmo que contendo construções *promotor:uidA* diferentes. Entretanto, já foi extensamente visto que a repetição do promotor 35S num mesmo cassete de transformação pode acarretar o silenciamento dos mesmos (Bhullar *et al.*, 2003; Mishiba *et al.*, 2005a). Este silenciamento pode

interferir no processo de seleção, impedindo que células contendo os transgenes não sejam selecionadas, uma vez que não há produção e atividade das proteínas responsáveis por conferir resistência ao agente seletivo. Entretanto, para averiguação destas hipóteses são necessários estudos moleculares da expressão do gene *hpt*.

Com base nos resultados aqui apresentados, pode-se concluir que a combinação entre o bombardeamento com pCAMBIA1281Z+*Pthi1*, manutenção por duas semanas em meio não seletivo para restabelecimento dos tecidos e início da proliferação celular e, por último, a transferência para meio seletivo com 10mg.L⁻¹ de higromicina apresentaram-se interessantes para seleção de SRs de *C. pileatum*.

Uma vez que o crescimento de orquídeas é relativamente lento, mostrou-se importante um maior foco no período de pré-seleção, voltado à retomada do crescimento das culturas, antes do período de seleção propriamente dito. Não deixa de ser interessante salientar que apenas em poucos trabalhos publicados com este grupo de plantas foi obtido sucesso na seleção de orquídeas transgênicas sem esta fase de pré-seleção (Belarmino & Mii, 2000; Yu *et al.*, 2001 e 2002; Liao *et al.*, 2003a; Men *et al.*, 2003b; Yang *et al.*, 2003a; Chin *et al.*, 2007). Outros trabalhos utilizaram um período pré-seletivo mínimo de 2 dias (Knapp *et al.*, 2000; Men *et al.*, 2003a) alcançando até três meses, ou seja, até o completo desenvolvimento dos PLBs (Kuehnle & Sugii, 1992; Yu *et al.*, 1999; Liao *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2005).

Conforme já mencionado, após três meses de seleção, foi possível de se obter uma gema parcialmente transgênica *Pthi1:uidA*. Todavia, neste caso, é plausível supor que esta gema levaria à formação de uma planta quimérica com células não transgênicas. Para redução desta possibilidade, o subcultivo destes tecidos repetidas vezes, com a eliminação dos tecidos mortos e até mesmo indução de novas gemas seria o passo seguinte para a produção de plantas completamente transgênicas. Em plantas de *Dendrobium*, por exemplo, o processo de seleção demorou de seis a oito meses devido a estes subcultivos (Yu *et al.* 2001, 2002; Yang *et al.*, 2003a).

Outra alternativa para eliminação dos tecidos não transformados seria a alternância entre períodos de seleção com o de crescimento dos tecidos. Mishiba *et al.* (2005b) utilizaram esta estratégia para seleção de protocormos de *Phalaenopsis* infectados com *Agrobacterium*. Após uma semana do co-cultivo, os protocormos foram selecionados durante dois meses e duas semanas sob 20mg.L^{-1} de higromicina. Os protocormos que mantiveram coloração verde foram seccionados ao meio, e as partes mantidas em ausência de antibiótico por um mês, para o restabelecimento dos tecidos e crescimento de PLBs. Estes PLBs, por sua vez, foram transferidos novamente para meio com 20mg.L^{-1} de higromicina, para seleção dos resistentes. Entretanto, quando protocormos verdes foram mantidos em meio seletivo, sem a passagem pela etapa intermediária, as plantas apresentaram crescimento anormal, com coloração amarronzada, sugerindo, segundo os autores, a presença de tecidos quiméricos, e indicando a necessidade desta alternância na seleção. Estratégia semelhante foi utilizada por Chai *et al.* (2002), que observaram que tecidos não transformados não produziam raízes em 3mg.L^{-1} de higromicina. Assim, PLBs de plantas crescidas nesta concentração por dois meses (cujas partes apresentaram coloração azul quando submetidas ao teste histoquímico de β -glucuronidase), foram subcultivadas em $1,5\text{mg.L}^{-1}$ de higromicina até a nova formação de plantas, e o ciclo repetido por vezes, até a obtenção de tecidos homogêneos. Estas estratégias diminuem o risco de perda das células transformadas e buscam reduzir a incidência de quimeras, apesar de exigir tempo de seleção mais prolongado.

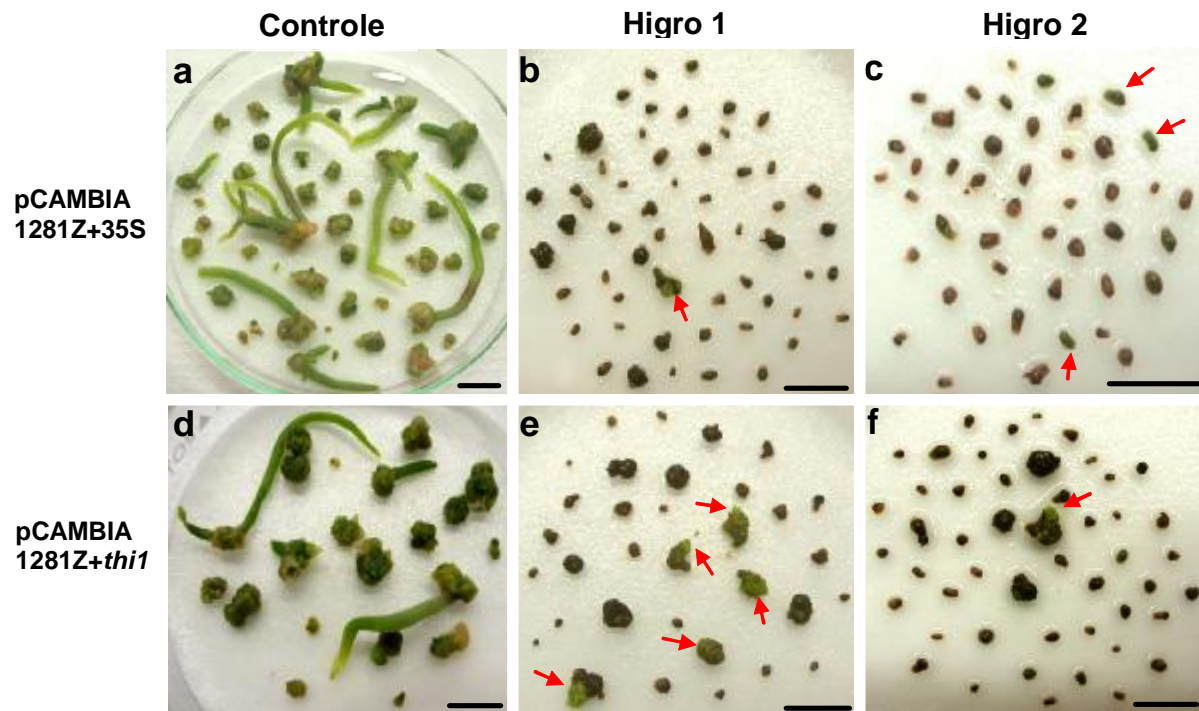


Figura 31. Aspecto geral das culturas de SRs, três meses após o bombardeamento com *35S:uidA* ou *Pthi1:uidA*, em meio seletivo e não seletivo. **a-c:** *35S:uidA*. **d-f:** *Pthi1:uidA*. **a,d:** controle sem higromicina. **b,e:** Higro1. **c,f:** Higro2. Setas vermelhas: sobrevivência de SRs e crescimento de intumescências contendo gemas. Barras: 5mm.

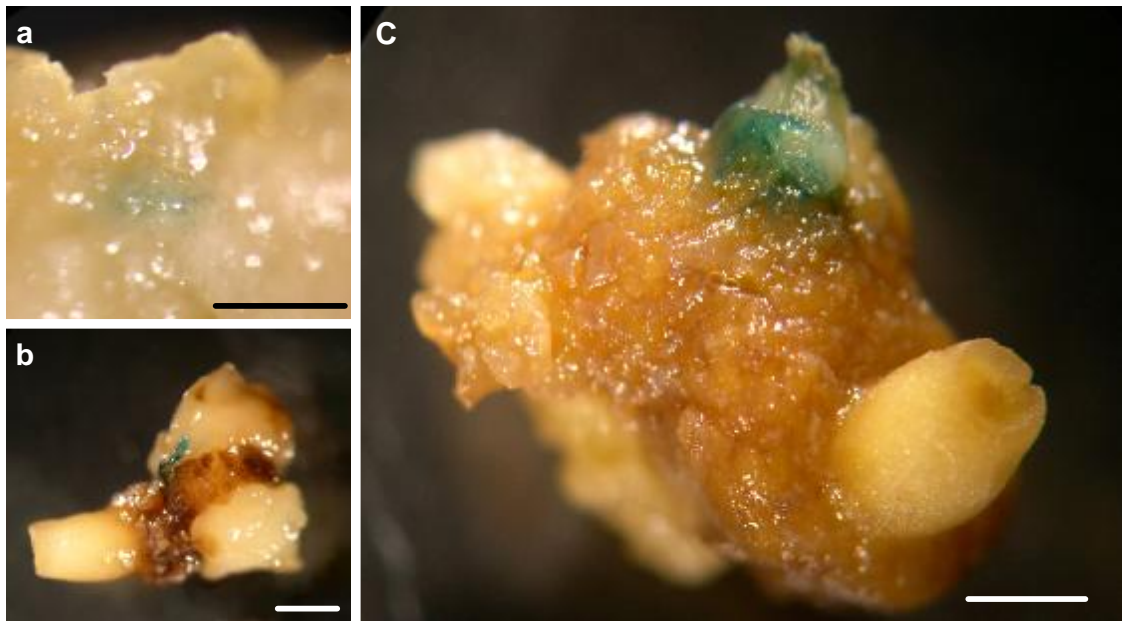


Figura 32. Expressão de *uidA* em culturas de SRs, três meses após os bombardeamentos, mantidos em meio seletivo a partir do início da terceira semana após os bombardeamentos (“Higro1”). **a:** baixa expressão de *uidA* regulado por 35S em SRs não submetidos à seleção. A expressão de *uidA* ocorreu na base da estrutura em crescimento. **b:** expressão de *uidA* regulado por 35S em SRs submetidos à seleção “higro1”. **c:** gema expressando *uidA* regulado por *Pthi1*. Barra preta: 200μm. Barras brancas: 1mm.

5. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

1. **Análise de promotores:** dentre os promotores testados, 35S, PTE027 e *Pthi1* foram os que melhores se expressam em tecidos de *C. pileatum*. Dente eles, foram testados o 35S e *Pthi1* para transformação permanente e seleção de plantas geneticamente modificadas.
2. **Cultura de tecidos de SRs:** dentre os três segmentos radiculares estudados, o primeiro segmento subapical (SR) apresentou maior capacidade de sobrevivência e formação de estruturas gemíferas, na presença de BA. Análises histológicas demonstraram que estas intumescências eram constituídas por células meristemáticas em intensa divisão celular, e presença de primórdios de gemas na superfície. Estas gemas, quando transferidas para meio Phv8, originaram plantas, após somente um mês de cultura. A concentração mais favorável de BA para indução de gemas foi de 0,5mg.L⁻¹.
3. **Concentração de higromicina:** foi selecionada a concentração de 25mg.L⁻¹ para CEs e ARs, e 10mg. L⁻¹ para SRs.
4. **Seleção de células transformadas e regeneração de plantas:** as gemas laterais de CEs e explantes ARs não se apresentaram como uma fonte de tecidos meristemáticos adequados para fins de transformação genética. Em relação à SRs, foi observada a manutenção da expressão de *uidA* em células mantidas em meio seletivo, por 4 semanas. Após 3 meses de seleção, foi observada uma gema expressando parcialmente *uidA*, regulado por *Pthi1*, indicando que estes tecidos conseguem crescer em meio seletivo e formar órgãos. As gemas podem ser subcultivadas em meio seletivo para eliminação dos tecidos não transformados, e, posteriormente, transferidas para meio Phv8 para crescimento de plantas.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A transformação genética é uma estratégia que vem sendo utilizada em larga escala, integrando atualmente o conjunto de ferramentas utilizadas para estudo de diferentes aspectos da biologia. Além disso, esta vem sendo utilizada também em programas de melhoramento de plantas comercialmente importantes. No campo da floricultura, a maioria dos estudos em orquídeas vem sendo realizada somente com plantas de *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Cymbidium* e *Oncidium*. Na área de pesquisa básica, apenas estudos recentes com *Dendrobium* são pioneiros no isolamento e estudo de genes específicos de orquídeas (Yu *et al.*, 2000, 2001 e 2002; Yang *et al.*, 2003a). Entretanto, espécies vegetais menos comerciais ou não conhecidos como modelos experimentais ainda esbarram não só na falta de protocolos de transformação, como antes disto, na escassez de estudos até mesmo em cultura de tecidos. Embora constituída de plantas essencialmente herbáceas, as orquidáceas possuem ciclos de vida relativamente longos, fato este que se reflete na morosidade de sua cultura *in vitro* e nas limitações impostas aos estudos de transformação genética, principalmente na seleção dos tecidos transformados. Em que pese os esforços despendidos até o presente, os resultados têm sido relativamente morosos e limitados, quando comparados aos de outros grupos vegetais. Ainda se faz necessária a identificação de genótipos mais adequados de espécies orquidáceas aos protocolos de transformação e regeneração, apesar do tamanho substancial da família.

Através deste projeto, procurou-se avaliar o potencial tanto de um genótipo de *Catasetum pileatum* quanto o de seus tecidos meristemáticos de diferentes origens como modelos experimentais de interesse. Estes últimos ainda são uma alternativa pouco considerada nos estudos até agora realizados. A partir dos resultados obtidos, foi possível definir alguns passos mais adequados à transformação genética para esta espécie orquidácea, resumidos no protocolo preliminar descrito a seguir:

Protocolo preliminar de transformação genética de *Catasetum pileatum*:

1. Isolamento de SRs e transferência para o centro de placa de Petri contendo meio VW básico (Item 3.2.2.), adicionado de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de BA. Deve-se posicionar os SRs com as regiões proximais voltadas para cima.
2. Bombardeamento de micropartículas, podendo-se utilizar plasmídeo contendo o promotor *Pthi1* como regulador da expressão do gene de interesse.
3. Transferência para meio VW básico (Item 3.2.4.), contendo $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de BA e manutenção sob condições de luz por duas semanas.
4. Transferência para meio VW básico, com BA e 10mg.L^{-1} de higromicina. Manutenção por três meses, ou até observação de crescimento de tecidos verdes.
5. Isolamento destes tecidos e subcultivo no mesmo meio seletivo, até eliminação completa dos tecidos não transformados.
6. Transferência das gemas transgênicas para meio Phv8, para crescimento de plantas.

Ao longo do trabalho e do estabelecimento do protocolo de transformação, uma estratégia não linear para execução das etapas foi fundamental para a detecção de alternativas e necessidades não previstas inicialmente, uma vez que quase não haviam estudos preliminares sobre a possibilidade de transformação destes materiais. Nesse sentido, apesar de alguns parâmetros já terem sido definidos previamente, como a utilização do promotor 35S, optou-se por avaliar o potencial de outros promotores. Esta iniciativa acabou de fato mostrando-se interessante, uma vez que levou à observação da funcionalidade de outros promotores para a expressão de *uidA* em tecidos de *C. pileatum*, dentre os quais *Pthi1* apresentou-se até mais favorável do que o 35S para a seleção de tecidos transformados, os quais, com este promotor, apresentaram maior área de expressão de *uidA*, após os três meses de seleção.

O processo de seleção em *C. pileatum*, ainda não totalmente concluído, foi substancialmente dificultado devido à grande estabilidade estrutural e fisiológica dos tecidos de *C. pileatum*. Suas células meristemáticas possuem uma dependência profunda do ambiente circundante, sendo que a inibição do crescimento pelo agente seletivo, somada à liberação de compostos fenólicos tóxicos, afetam profundamente a sobrevivência e o crescimento também das células transformadas, principalmente nos explantes CEs e ARs. As dificuldades de se trabalhar com meristemas já formados, levaram à necessidade de estabelecimento de um protocolo de regeneração de gemas diferente dos já existentes para *Catsetum*. Através do estabelecimento da técnica de cultura de segmentos radiculares foi possível a obtenção de estruturas mais adequadas à seleção e regeneração de plantas transformadas geneticamente. Todos os trabalhos com orquídeas até então, haviam utilizado embriões germinados (PCMs), ou estruturas semelhantes a estas (PLBs), obtidas por micropropagação. Alguns trabalhos utilizaram calos, os quais são mais difíceis de serem obtidas e, posteriormente, de gerar plantas. Apesar de PCMs e PLBs conterem células periféricas meristemáticas, a utilização de tecidos potencialmente meristemáticos dos SRs para a transformação genética foi inédito para orquídeas. Certamente, serão necessários mais estudos a respeito dos subcultivos e prolongamento da seleção para eliminação completa dos tecidos não transformados, conforme tem sido realizado em um bom número de trabalhos encontrado na literatura.

Os passos seguintes necessários para a caracterização dos tecidos transformados são os testes moleculares. Utilizando-se seqüências iniciadoras específicas para *uidA* ou *hpt*, será possível constatar por meio de PCR se houve ou não integração dos transgenes no genoma das células. Caso se pretenda conhecer o número e localização das cópias integradas, poderá ser feita uma hibridização de sondas no DNA genômico ("Southern Blot"). e caso se pretenda saber o nível de expressão destes genes, podem ser verificado pela hibridização com sondas de RNA ("Northern Blot").

Um aspecto bastante relevante para o estabelecimento de um protocolo de transformação e seleção de tecidos transformados de orquídeas será a utilização de um gene repórter não letal, como por exemplo, o *gfp*. Por meio deste, a

expressão do transgene, a sobrevivência e o crescimento dos tecidos transformados poderiam ser monitorados ao longo do processo de seleção, sem a necessidade de perda dos mesmos, e possibilitando também eventuais intervenções microcirúrgicas, para isolamento dos grupos transformados. A seleção de tecidos transformados manualmente, utilizando-se de um gene marcador não letal, foi realizada com sucesso por Chia *et al.*(1994). Entretanto, os autores conseguiram este fato pela utilização de estruturas mais maleáveis, os calos, e através do dispêndio de grande trabalho manual. Recentemente, Suwanaketchanatit *et al.* (2007) reportaram um processo acoplado de seleção, utilizando-se a seleção fina conferida pela higromicina com o acompanhamento do processo através de *gfp*. Neste estudo, os autores puderam observar a recuperação de células transformadas ao longo dos 120 dias de seleção de PCMs. Estas células eram muito poucas logo após os bombardeamentos, mas ao longo dos subcultivos, foi observado o crescimento destas regiões e a formação de PLBs completamente transgênicos no final do processo de seleção. Desta forma, os autores conseguiram uma eficiência de transformação de 19,87%.

Como aprimoramento dos métodos, é possível ainda testar-se *Agrobacterium tumefaciens* como agente para transformação destes SRs. Uma vez que o bombardeamento promove a entrada de um grande número de cópias dos genes, de forma menos precisa, este processo pode interferir na expressão dos transgenes e mesmo resultar no silenciamento dos mesmos. Um número elevado de cópias também aumenta as chances de integração em regiões não desejadas do genoma, podendo ser letal ou deletéria às células.

As perspectivas de ações nas áreas de pesquisa básica e aplicada, após a obtenção de um protocolo de transformação genética para *Catsetum*, são animadoras. Plantas transgênicas de *Catsetum* poderiam contribuir para o estudo de diversos aspectos únicos deste modelo (Item 1.2.), como por exemplo, através da redução ou elevação do conteúdo de citocininas, alteração no transporte polar de auxinas nas raízes ou contendo sequências de fatores de transcrição fusionadas a sequências de genes repórteres podem contribuir para o entendimento tanto do processo de conversão, como o de crescimento no escuro.

Nas áreas de pesquisa aplicada, certamente a indução de menor sensibilidade ao etileno poderia aumentar o tempo de vida curto das flores desta planta, aspecto este de alto valor comercial. Resistência à doenças, condições bióticas adversas e alteração na incidência de floração são outros aspectos geralmente desejáveis no melhoramento de orquídeas, e que pelo processo clássico pode levar muitos anos.

Dadas as semelhanças fisiológicas substanciais entre os cinco gêneros constitutivos das *Catasetineas*, todos estes com espécies de valor comercial, é plausível supor que os conhecimentos de transformação aqui adquiridos para *Catasetum pileatum* possam ser aplicados para os seus gêneros afins.

Até o momento e o alcance de nosso conhecimento, este é o primeiro protocolo de transformação para uma espécie orquídea sul-americana, desenvolvido no Brasil. Claro está, que estudos ainda serão necessários à obtenção de um protocolo completo e de plantas efetivamente transgênicas; porém os resultados aqui apresentados representam o início desta jornada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, A. C. (1999) Estudos anatômicos da organogênese *in vitro* de soja e otimização do processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. 109p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ANGEL, S. M. & BAULCOMBE, D. C. (1997) Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *EMBO J.* 16:3675-3684.
- ARAÚJO, P. G. de; ROSSI, M.; JESUS, E. M. de; SACCARO JR, N. L.; KAJIHARA, D.; MASSA, R.; FELIX, J. M. de; DRUMMOND, R. D.; FALCO, M. C.; CHABREGAS, S. M.; ULIAN, E. C.; MENOSSE, M.; VAN SLUYS, M.-A. (2005) Transcriptionally active transposable elements in recent hybrid sugarcane. *The Plant Journal*, 44: 707-717.
- ARNIM, A. G. V.; DENG, X.-W. & STACEY, M. G. (1998) Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene* 221: 35-43.
- BELARMINO, M. M.; MII, M. (2000) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of phalaenopsis orchid. *Plant Cell Reports*. 19: 435- 442.
- BIRCH, R. G. (1997) Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48: 297- 326.
- BHULLAR, S.; CHAKRAVARTHY, S.; ADVANI, S.; DATTA, S.; PENTAL, D.; BURMA, P. K. (2003) strategies for development of functionally equivalent promoters with minimum sequence homology for transgene expression in plants: cis-elements in a novel DNA context versus domain swapping. *Plant Physiology*, 132: 988-998.
- BONNET Jr., H. T. & TORREY, J. G. (1966) Comparative anatomy of endogenous bud and lateral root formation in *Convolvulus arvensis* root cultured *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 53(5): 496-507.
- BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. (1998) Manual de transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA, SPI. EMBRAPA, CENARGEN. 309p.
- BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. (1999) Transformação genética de plantas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (Eds). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. V. 2. Brasília: Embrapa. 864p.

- CAMPOS, K. O. (2006) Variações metabólicas e hormonais envolvidas nos primeiros momentos da conversão do meristema de raízes de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) em gemas vegetativas. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CHABREGAS, S. M.; LUCHE, D. D.; VAN SLUYS, M.-A.; MENCK, C. F. M.; SILVA-FILHO, M. C. (2003) Differential usage of two in-frame translational start codons regulates subcellular localization of *Arabidopsis thaliana* THI1. *Journal of Cell Science* 116: 285-291.
- CHAER, L.; RODRIGUES, M. A. & KERBAUY, G. B. (2006) Efeito do estresse hídrico e do ácido abscísico na atividade e conversão do meristema apical radicular de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) em gemas caulinares. *Resumo em XVI Congresso da SBSP, Piracicaba – SP*.
- CHAI, M. L.; XU, C. J.; SENTHIL, K. K.; KIM, J. Y.; KIM, D. H. (2002) Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Scientia Horticulturae* 96:213-224.
- CHAI, D.; LEE, S. M. & YU, H. (2007) L-Methionine sulfoximine as a novel selection agent for genetic transformation of orchids. *Journal of Biotechnology* 131: 466–472.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W. & PRASHER, D. C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* (263) 802-805.
- CHAN, Y.-L.; LIN, K.-H.; SAN, J. Y.; LIAO, L.-J.; CHEN, W.-H. & CHAN, M.-T. (2005) Gene stacking in *Phalaenopsis* orchid enhances dual tolerance to pathogen attack. *Transgenic Research* 14:279-288.
- CHANG, C.; CHEN, Y.-C.; HSU, Y.-H.; WU, J.-T.; HU, C.-C.; CHANG, W.-C. & LIN, N.-S. (2005) Transgenic resistance to *Cymbidium* mosaic virus in *Dendrobium* expressing the viral capsid protein gene. *Transgenic Research* 14: 41-46.
- CHENG, M.; LOWE, B. A.; SPENCER, T. M.; YE, X. & ARMSTRONG, C. L. (2004) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 40:31-45.
- CHIA, T.-F.; CHAN, Y.-S.; CHUA, N. H. (1994) The firefly luciferase gene as a non-invasive reporter for *Dendrobium* transformation. *The Plant Journal*. 6(3): 441-446.
- CHIN, D. P.; MISHIBA, K.-I. & MII, M. (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies in *Cymbidium*. *Plant Cell Rep* 26:735–743.

- COLLI, S. & KERBAUY, G. B. (1993) Direct root tip conversion of *Catsetum* into protocorm-like bodies. Effects of auxin and cytokinin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 33: 39-44.
- COSTA, R. M. A.; MORGANTE, P. G.; BERRA, C. M.; NAKABASHI, M.; BRUNEAU, D.; BOUCHEZ, D.; SWEDER, K. S.; VAN SLUYS, M.-A; MENCK, C. F. M. (2001) The participation of *AtXPB1*, the *XPB/RAD25* homologue gene from *Arabidopsis thaliana*, in repair and pant development. *The Plant Journal*, 28(4): 385-395.
- COURTIAL, B.; FEUERBACH, F.; EBERHARD, S.; ROHMER, L.; CHIAPELLO, H.; CAMILLERI, C.; LUCAS, H. (2001) *Tnt1* transposition events are induced by in vitro transformation of *Arabidopsis thaliana*, and transposed copies integrate into genes. *Mol. Genet. Genomics*, 265: 32-42.
- D'AMATO, F. (1978) Chromosome numeric variation in cultured cell and regenerated plants. In *Frontiers of Plant tissue Culture*; THORPE, T. A. ed.; *University of Calgary Off Set Print Services, Calgary*; p. 287-295.
- De BLOCK, M. (1993) The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implication for the plant breeding. *Euphytica*. 71: 1-14.
- EKLÖF, S.; ASTOT, C.; BLACKWELL, J.; MORITZ, T.; OLSSON, O.; SANDBERG, G. (1997) Auxin-cytokinin interactions in wild-type and transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol*. 38: 225-235.
- ELLENBERG, J.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. & PRESLEY, J. F. (1999) Dual-colour imaging with GFP variants. *Trends in Cell Biology* 9:52-56.
- ELLIS, D.D.; McCABE, D., RUSSEL, D.; MARTINELL, B. & McCOWN, B. H. (1991) Expression of inducible angiosperm promoters in a gymnosperm, *Picea glauca* (white spruce). *Plant Molecular Biology* 17: 19-2.
- ELMAYAN, T. & VAUCHERET, H. (1996) Expression of single copies of a strong expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant Journal* 9:787-793.
- FRANCK, A.; GUILLEY, H.; JONARD, G.; RICHARDS, K.; HIRTH, L. (1980) Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell* 21:285-294.
- GALLOIS, J.-L.; NORA, F. R.; MIZUKAMI, Y. & SABLowski, R. (2004) WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes & Development* 18:375-380.

- GELDNER, N.; RICHTER, S.; VIETEN, A.; MARQUARDT, S.; TORREZ-RUIZ, R.A.; MAYER, U.; JÜRGENS, G. (2004) Partial loss-of-function alleles reveal a role for *GNOM* in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis*. *Development*, 120: 389-400
- GORDON-KAMM, W. J.; SPENCER, T. M.; MANGONO, M. L., et al. (1990) Transformation of maize cells and regeneration and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2:603-618.
- GRANDBASTIEN, M.-A. (1998) Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends in Plant Science*, 3(5):181-187
- GRIESBACH, R. J. (1994) An improved method for transforming plants through electrophoresis. *Plant Science* 102: 81-89.
- GRITZ, L. & DAVIES, J. (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25:179-188.
- GUIDOLIN, A. F. (2003) Regeneração de Plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via *Agrobacterium*. 100p. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- HAYASHI, A. H.; PENHA, A. S.; RODRIGUES, R. R. & APPEAZZATO-DA-GLÓRIA, B. C. (2001) Anatomical studies of shoot bud-forming roots of Brazilian tree species. *Aust. J. Bot.* 49: 745–751.
- IIDA, A.; YAMASHITA, T.; YAMADA, Y.; MORIKAWA, H. (1991) Efficiency of particle-bombardment-mediated transformation is influenced by cell cycle stage in synchronized cultured cells of tobacco. *Plant Physiol.* 97: 1585- 1587.
- IKEDA, K.; KAKAYASHIKI, H.; TAKAGI, M.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. (2001) Heat shock, copper sulfate and oxidative stress activate the retrotransposon *MAGGY* resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Genet. Genomics*, 266: 318-325.
- JACH, G.; BINOT, E.; FRINGS, S.; LUXA, K. & SCHELL, J. (2001) Use of red fluorescent protein from *Discosoma* sp. (dsRED) as a reporter for plant gene expression. *The Plant Journal* 28(4): 483-491.
- JEFFERSON, R. A.; BURGESS, S. M. & HIRSH, D. (1986) β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8447-8451.

- KARNOVSKY, M. J. (1965) A formaldehyde-glutaldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137-139.
- KERBAUY, G.B. (1984a) Regeneration of protocorm-like bodies through *in vitro* culture of roots tips of *Catasetum* (Orchidaceae). *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 113: 287-291.
- KERBAUY, G. B. (1984b) Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture, *Plant Cell Reports*. 3: 27-29.
- KERBAUY, G. B. (1991) *In vitro* conversion of *Cattleya* root tips cells into protocorm-like bodies. *Journal of Plant Physiology*. 138: 248-251.
- KERBAUY, G.B.; COLLI, S.; MAJEROWICZ, N. (1995) Manutenção da atividade meristemática apical em caules de *Catasetum* (Orchidaceae) pelo etileno e escuro: implicações com uma estratégia de micropropagação. In: *Resumos do V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal*, Lavras, p. 3.
- KERBAUY, G.B.; ESTELITA, M.E.M. (1996) Formation of protocorm-like bodies from sliced apexes of *Clowesia warszewiczii*. *Rev. Brasil. Fisiol. Veg.* 8: 157-159.
- KERBAUY, G. B. & COLLI, S. (1997) Increased conversion of root tip meristems of *Catasetum fimbriatum* into protocorm-like bodies mediated by ethylene. *Lindleyana* 12(2): 59-63.
- KERBAUY, G. B. (1999). Cultura de raízes e regeneração de plantas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (Eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. V. 1. Brasília: Embrapa.
- KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. (1987) High- velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*. 327: 70-73.
- KNAPP, J. E.; KAUSCH, A. P.; CHANDLEE, J. M. (2000) Transformation of three genera of orchid using the *bar* gene as a selectable marker. *Plant Cell Reports*. 19: 893- 898.
- KRAUS, J. E. (1986) Formação e desenvolvimento *in vitro* de estruturas semelhantes a protocormos em ápices radiculares de *Catasetum pileatum* Reichb. F. (Orchidaceae): aspectos fisiológicos, estruturais e histoquímicos. 200p. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- KRAUS, J.E.; MONTEIRO, W. R. (1989) Formation of protocorm-like bodies from root apices of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) cultivated *in vitro*. I. Morphological aspects. *Annals of Botany*. 64: 491-498.

- KUEHNLE, A. R.; SUGII, N. (1992) Transformation of *Dendrobium* orchid using particle bombardment of protocorms. *Plant Cell Reports*. 11: 484-488.
- KUMAR, A. & BENNETZEN, J. L. (1999) Plant retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* 33:479-532.
- LACORTE, C.; ARAGÃO, F. J. L.; VAINSTEIN, M. H.; RECH, E. L. (1999) Biobalística. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (Eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. V. 2. Brasília: Embrapa. 864p.
- LACROIX, B.; TZFIRA, T.; VAINSTEIN, A. & CITOVSKY, V. (2006) A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. *Trends in Genetics* 22(1): 29-37.
- LAZZERI, P & DUNNWELL, J. M. (1984) Establishment of isolated root cultures of *Brassica* species and regeneration from cultured-root segments of *Brassica oleracea* var. *italica*. *Annals of Botany*, 54:351-361.
- LI, S.-H.; KUOH, C.-S.; CHEN, Y.-H.; CHEN, H.-H. & CHEN, W.-H. (2005) Osmotic sucrose enhancement of single-cell embryogenesis and transformation efficiency in *Oncidium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81:183-192.
- LI, X.; YU, X.; WANG, N.; FENG, O.; DONG, Z.; LIU, L.; SHEN, J. & LIU, B. (2007) Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 156-168.
- LIAO, L.-J.; PAN, I.-C.; CAHN, Y.-Y.; HSU, Y.-H.; CHEN, W.-H. & CHAN, M.T. (2004) Transgene silencing in *Phalaenopsis* expressing the coat protein of Cymbidium Mosaic Virus is a manifestation of RNA-mediated resistance. *Molecular Breeding* 13: 229-242.
- LIAU, C.-H.; YOU, S.-J.; PRASAD, V.; HSIAO, H.-H.; LU, J.-C.; YANG, N.-S.; CHAN, M.-T. (2003a) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an *Oncidium* orchid. *Plant Cell Reports*. 21:993-998.
- LIAU, C.-H.; LU, J.-C.; PASAD, V.; HSIAO, H.-H.; YOU, S.-J.; LEE, J.-T.; YANG, N.-S.; HUANG, H.-E.; FENG, T.-Y.; CEN, W.-H. & CHAN, M.-T. (2003b) The sweet pepper ferredoxin-like protein (*pflp*) conferred resistance against soft rot disease in *Oncidium* orchid. *Transgenic Research* 12: 329-336.
- LUTHRA, R.; VARSHA, R. K. D.; ASHOK, K. S.; KUMAR, S. (1997) Microprojetele mediated plant transformation: A bibliographic search. *Euphytica*. 95: 269-294.

- MATSUBAYASHI, Y.; GOTO, T.; SAKAGAMI, Y. (2004) Chemical nursing: phyto-sulfonamide improves genetic transformation efficiency by promoting the proliferation of surviving cells on selective media. *Plant Cell Reports* 23: 155-158.
- MEN, S.; MING, X.; WANG, Y.; LIU, R.; WEI, C.; LI, Y. (2003a) Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment. *Plant Cell Reports* 21(6): 592-598.
- MEN, S.; MING, X.; LIU, R.; WEI, C. & LI, Y. (2003b) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 63-71.
- MORGANTE, P. G.; BERRA, C. .M.; NAKABASHI, M.; COSTA, R. M. A.; MENCK, C. F. M.; VAN SLUYS, M.-A. (2005) Functional *XPB/RAD25* redundancy in Arabidopsis genome: characterization of *AtXPB2* and expression analysis. *Gene* 344:93-103.
- MACHADO, C. R.; PRAEKELT, U. M.; COSTA de OLIVEIRA, R.; BARBOSA, A. C. C.; BYRNE, K. L.; MEACOCK, P. ^a; MENCK, C. F. M. (1997) Dual role for the yeast *THI4* gene in thiamine biosynthesis and DNA damage tolerance. *Journal of Molecular Biology* 273: 114-121.
- MATZKE, M.A.; METTE, M. F.; MATZKE, A. J. M. (2000) Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant molecular Biology* 43: 401-415.
- McCULLEN, C. A. & BINNS, A. N. (2006) *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:101–27.
- MISHIBA, K.-i.; NISHIHARA, M.; NAKATSUKA, T.; ABE, Y.; HIRANO, H.; YOKOI, T.; KIKUCHI, A.; YAMAMURA, S. (2005a) Consistent transcriptional silencing of 35S-driven transgenes in gentian. *The Plant journal* 44:541-556.
- MISHIBA, K.I.; CHIN, D. P.; MII, M. (2005b) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination. *Plant Cell Reports*, 24:297-303.
- MIKI, B. & MCHUGH, S. (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of biotechnology* 107:193-232.
- MORGANTE, P. G.; BERRA, C. .M.; NAKABASHI, M.; COSTA, R. M. A.; MENCK, C. F. M.; VAN SLUYS, M.-A. (2005) Functional *XPB/RAD25* redundancy in Arabidopsis genome: characterization of *AtXPB2* and expression analysis. *Gene* 344:93-103.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NAKABASHI, M. (2005) Genes parálogos *AtXPB1* e *AtXPB2*: estudo da duplicação e expressão em *Arabidopsis thaliana*. 111p. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NAN, G.-L.; KUEHNLE, A. R. (1995) Factors affecting gene delivery by particle bombardment of *Dendrobium* orchids. *In vitro cell. Dev. Biol.- Plant.* 31: 131-136.
- NAN, G.-L.; TANG, C.-S.; KUEHNLE, A. R.; KADO, C. I. (1997) *Dendrobium* orchids contain an inducer of *Agrobacterium* virulence genes. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 51: 391-399.
- NISHIMURA, C; OHASHI, Y; SATO, S; KATO, T; TABATA, S; UEGUCHI, C. (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16(6):1365-1377.
- ODELL, J. T.; NAGI, F. & CHUA, N.-H. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
- OWN, D. W.; WET, J. R. DE; HELINSKI, D. R.; HOWELL, S. H.; WOOD, K. V. & DELUCA, M. (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 4778: 856 – 859.
- PANG, S.-Z.; DeBOER, D.; WAN, Y.; YE, C.; LAYTON, J. C.; NEHER, M. K.; JOY; ARMSTRONG, C. L.; FRY, J. E.; HINCHEE, M. A. W. & FROMM, M. E. (1996) An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol.* 112: 893-900.
- PERES, L.E.P.; AMAR, S.; KERBAUY, G.B.; SALATINO, A.; ZAFFARI, G.R.; MERCIER, H. (1999) Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinins ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). *J. Plant Physiol.* 155: 551-555.
- PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. (1999) High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae). *Plant Cell Reports.* 18: 1002-1006.
- PHILIP, V. J. & NAINAR, A. Z. (1986) Clonal propagation of *Vanilla planifolia* (Salisb.) Ames using Tissue culture. *J. Plant Physiol.* 122: 211-215.

- PHILLIPS, R. L.; KAEPLER, S. M. & OLHOFT, P. (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5222-5226.
- POTENZA, C.; ALEMAN, L.; SENGUPTA-GOPALAN, C. (2004) Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 40:1–22.
- POTRIKUS, I. (1990) Gene transfer to plants: assessment and perspectives. *Physiologia Plantarum*. 79: 125-135.
- REN, S.; SHIPPEN, D. E.; McKIGHT, T. D. (2003) Activation of telomerase by synergistic action of a novel zinc finger protein and auxin. 14th International Conference on *Arabidopsis* Reserch. University of Wisconsin-Madison. In: YOO, S. Y.; BOMBLIES, K.; YOO, S. K. Y.; YANG, J. W.; CHOI, M. S.; LEE, J. S.;
- WEIGEL, D.; AHN, J. H. (2005) The 35S promoter used in selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. *Planta* 221:523-530.
- RIBEIRO, D. T.; FARIAS, L. P.; de ALMEIDA, J. D.; KASHIWABARA, P. M.; RIBEIRO, A F. C.; SILVA-FILHO, M. C.; MENCK, C. F. M.; VAN SLUYS, M.-A. (2005) Functional characterization of the *thi1* promoter region from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 56(417): 1797-1804.
- ROBERTSON, D. (2004) VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:495–51.
- RODRIGUES, M. A.; FRESCHI, L & KERBAUY, G. B. (2006a) Influência das espécies citocinínicas exógenas e endógenas na indução da competência e conversão de ápices radiculares de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) em gemas caulinares. *Resumo em XVI Congresso da SBSP, Piracicaba – SP.*
- RODRIGUES, M. A.; FRESCHI, L.; CECCANTINI, G.C.T.; PURGATTO, E. & KERBAUY, G. B. (2006b) Envelhecimento provoca mudanças morfológicas e ganho de competência no meristema apical radicular de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) para conversão em gemas caulinares. *Resumo em XVI Congresso da SBSP, Piracicaba – SP.*
- RODRIGUES, M. A.; FRESCHI, L & KERBAUY, G. B. (2007a) Effects of auxin transport on competence acquisition to root apical meristem conversion of *Catasetum fimbriatum* into buds. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 43:S40–S61.

- RODRIGUES, M. A.; FRESCHI, L.; MAGALHÃES, J. R.; MERCIER, H. & KERBAUY, G. B. (2007b) Óxido nítrico no ganho de competência para conversão do meristema apical adicular de *Catasetm fimbriatum* em gemas caulinares. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, vol. 19, suplemento, resumo apresentado no XICBFV - Gramado – RS.
- RUSSELL, J. A.; ROY, M. K & SANFORD, J. C. (1992) Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiol.* 98: 1050-1056.
- SAKAI, W. S. (1973) Simple method for differential staining of parafilm embedded plant material using toluidine blue O¹. *Stain technology* 48:247-249.
- SALOMÉ, J.R. (2007) Comportamento do mercado exterior de flores e plantas. Artigo em Hypertexto. Disponível em:
<http://www.infobibos.com/Artigos/2007_3/flores/index.htm>. Acesso em: 10/1/2008.
- SÁNCHEZ, M. I. (1988) Micropropagation of *Cyrtopodium* (Orchidaceae) through root tip culture. *Lindleyana*. 3: 93- 96.
- SANFORD, J. C. (1990) Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum*. 79: 206-209.
- SANGWAN, R. S.; BOURGEOIS, Y.; BROWN, S.; VASSEUR, G.; SANGWAN-NORREEL, B. (1992) Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 188: 439- 456.
- SHARMA, K.; BHATNAGAR-MATHUR, P. & THORPE, T. A. (2005) Genetic transformation technology: status and problems. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 41:102–112.
- SHEEN, J.; HWANG, S.; NIWA, Y.; KOBAYASHI, H & GALBRAITH, D. W. (1995) Green fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *The Plant Journal* 8(5): 777-784.
- SRISKANDARAJAH, S.; MIBUS, H. & SEREK, M. (2007) Transgenic *Campanula carpatica* plants with reduced ethylene sensitivity. *Plant Cell Rep* 26:805–813.
- STEPONKUS, P. & LANPHEAR, F. (1967) Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol.* 42, 1423-1426.
- STEWART, J. & BUTTON, J. (1978) Development of callus and plantlets from *Epidendrum* root tips cultured *in vitro*. *Am. Orchid Soc. Bull.* 47(7): 607-612.

- STEWART JR, C. N. (2005) Monitoring the presence and expression of transgenes in living plants. *Trends in Plant Science* 10(8): 390-396.
- SU, V.; HSU, B.-D. (2003) Cloning and expression of a putative cytochrome P450 gene that influences the colour of *Phalaenopsis* flowers. *Biotechnology Letters* 25: 1933-1939.
- SUZUKI, R.M.; KERBAUY, G.B. (1999) Efeito da giberelina sobre o crescimento de plantas de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae), incubadas na presença e ausência de luz. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 11:172-173.
- SUZUKI, R.M.; KERBAUY, G.B.; ZAFFARI, G.R. (2004) Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catasetum fimbriatum*. *Journal of Plant Physiology*, 161(8): 929-935.
- SUWANAKETCHANATIT, C.; PILUEK, J.; PEYACHOKNAGUL, S. & HUEHNE, P. S. (2007) High efficiency of stable genetic transformation in *Dendrobium* via microprojectile bombardment. *Biologia Plantarum* 51(4): 720-727.
- TAKAHASHI, E. K. (2002) Transferência do gene *atacina A* para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística. 156p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- TAKEDA, S.; SUGIMOTO, K.; OTSUKI, H.; HIROCHIKA, H. (1999) A 13-bp cis-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon Tto1 is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors. *The Plant Journal*, 18(40): 383-393.
- TANAKA, M.; SENDA, Y. & HASEGAWA, A. (1976) Plantlet formation by root-tip culture in *Phalaenopsis*. *Am. Orchid Soc. Bull.* 45:1022-1024.
- TEE, C. S.; MARZIAH, M.; TAN, C. S.; ABDULLAH, M. P. (2003) Evaluation of different promoters driving the GFP reporter gene and selected target tissues for particle bombardment of *Dendrobium* Sonia 17. *Plant Cell Reports* 21:452-458.
- TEE, C. S. & MARZIAH, M. (2005) Optimization of biolistic bombardment parameters for *Dendrobium* Sonia 17 calluses using GFP and GUS as the reporter system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 77-89.
- TORREY, J. G. (1958) Endogenous bud and root formation by isolated roots of *Convolvulus* grown *in vitro*. *Plant Physiol.* 33:258-263.
- TZAFIRA, T. & CITOVSKY, V. (2006) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 147-154.

- VACIN, E.F.; WENT, F.W. (1949) Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.* 110: 605-617.
- VAN SLUYS, M. A. (1999) *Agrobacterium*: um vetor natural para transformação em plantas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (Eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. V. 2. Brasília: Embrapa. 864p.
- VAZ, A. P.; KERBAUY, G. B. & FIGUIEREDO-RIBEIRO, R. C. L. (1998) Changes in soluble carbohydrates and starch partitioning during vegetative bud formation from root tips of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 105–111.
- VILLEMONT, E.; DUBOIS, F.; SANGWAN, R. S.; VASSEUR, G.; BOURGEOIS, Y.; SANGWAN-NORREEL, B. (1997) Role of the cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta*. 201: 160-172.
- WEIGEL, D.; AHN, J. H.; BLÁZQUEZ, M. A.; BOREVITZ, J. O.; CHRISTENSEN, S. K.; FANKHAUSER, C.; FERRÁNDIZ, C.; KARDAILSKY, I.; MALANCHARUVIL, E. J.; NEFF, M. M.; NGUYEN, J. T.; SATO, S.; WANG, Z-Y.; XIA, Y.; DIXON, A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J.; YANOFSKY, M. F.; CHORY, J. (2000) activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 122:1003-1013.
- WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.; SCHMÜLLING, T. (2003) Cytokinin – deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*. 15: 2532-2550.
- XU, J.; HOFHUIS, H.; HEIDSTRA, R.; SAUER, M.; FRIML, J. & SCHERES, B. (2006) A Molecular Framework for Plant Regeneration. *Science* 311: 385-388.
- YANG, J.; LEE, H.-J.; SHIN, D. M.; OH, S. K.; SEON, J. H.; PAEK, K. Y.; HAN, K.-H. (1999) Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. *Plant Cell Reports*. 18: 978- 984.
- YANG, S. H.; YU, H. & GOH, C. J. (2003a) Functional characterisation of a cytokinin oxidase gene *DSCKX1* in *Dendrobium* orchid. *Plant Molecular Biology* 51: 237-248.
- YANG, S.; YU, H.; XU, Y. & GOH, C. J. (2003b) Investigation of cytokinin-deficient phenotypes in *Arabidopsis* by ectopic expression of orchid *DSCKX1*. *FEBS Letters* 555 291-296.

- YOO, S. Y.; BOMBLIES, K.; YOO, S. K. Y.; YANG, J. W.; CHOI, M. S.; LEE, J. S.; WEIGEL, D.; AHN, J. H. (2005) The 35S promoter used in selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. *Planta* 221:523-530.
- YOU, S. J.; LIAU, C. H.; HUANG, H. E.; FENG, T. Y.; PRASAD, V.; HSIAU, H. H.; LU, J. C.; CHAN, M. T. (2003) Sweet pepper ferredoxin-like protein (pflp) gene as a novel selection marker for orchid transformation. *Planta*. 217(1):60-65.
- YU, Z.; CHEN, M.; NIE, L.; LU, H.; MING, X.; ZHENG, H.; QU, L.-J.; CHEN, Z. (1999) Recovery of transgenic orchid plants with hygromycin selection by particle bombardment to protocorms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 58: 87-92.
- YU, H.; YANG, S. H. & Goh, C. J. (2000) *DOH1*, a class 1 *knox* gene, is required for maintenance of the basic plant architecture and floral transition in orchid. *The Plant Cell* 12:2143-2159.
- YU, H.; YANG, S. H.; GOH, C. J. (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Dendrobium* orchid with 1 *knox* gene *DOH1*. *Plant Cell Reports*. 20: 301-305.
- YU, H.; YANG, S. H. & GOH, C. J. (2002) Spatial and temporal expression of the orchid floral homeotic gene *DOMADS1* is mediated by its upstream regulatory regions. *Plant Molecular Biology* 49: 225–237.
- ZAMBRYSKI, P. (1988) Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annual Review of Genetics*. 22: 1-30.