

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO TABACO (*Nicotiana
tabacum*) VIA *Agrobacterium tumefaciens*, COM O GENE *Lhcb1*2*
DE ERVILHA**

RUI ALBERTO GOMES JUNIOR

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE.**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 2001

ERRATA

p.	item	linha	onde se lê	leia-se
10	2.1.3	sexta	... modulação por metabólitos...	... modulação por metabólitos, como CO ₂ , ATP, NADPH, ribulose 1,5-bifosfato e gliceraldeído-3-fosfato...
11	2.1.4	décima segunda	... complexo citocromo b6-f...	... complexo citocromo b6-f...
14	2.1.6	oitava	Com a proliferação dos sequenciamentos...	Devido à ampliação do número de sequenciamentos...
19	2.2	décima terceira	... necessidades químicas das plantas, e tornou-se possível recuperar plantas...	... necessidades nutricionais das plantas, tomando-se possível regenerar plantas...
36	4.2	oitava	...PCR positivas...	...positivas para a análise por PCR...
56	4.3	oitava	...locos...	...loci...
58	4.3	quinta	$X^2_{\text{calculado}} = (S_{\text{obs}} - S_{\text{esp}})^2 / S_{\text{esp}}$	$X^2_{\text{calculado}} = (R_{\text{obs}} - R_{\text{esp}})^2 / R_{\text{esp}} + (S_{\text{obs}} - S_{\text{esp}})^2 / S_{\text{esp}}$
65- 69	4.4	quinta	$X^2_{\text{calculado}} = (S_{\text{obs}} - S_{\text{esp}})^2 / 2$	$X^2_{\text{calculado}} = (R_{\text{obs}} - R_{\text{esp}})^2 / R_{\text{esp}} + (S_{\text{obs}} - S_{\text{esp}})^2 / S_{\text{esp}}$
69	4.4	vigésima nona	...necessárias de 7 a 8 gerações de autofecundação.	...necessárias de 6 a 7 gerações de autofecundação.
73	4.5	quinta	Os controles positivos de tabaco transgênico (Cab1 e Cab2), obtidos em estudos prévios, em nosso laboratório estão nas linhas 8 e 9, respectivamente.	O controle positivo de tabaco transgênico (Cab2), obtido em estudos prévios, em nosso laboratório, está na linha 8.
74	5	oitava	... transgene, e mostraram...	...transgene, mostraram...

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

§ Gomes Junior, Rui Alberto.

Transformação genética do tabaco (*Nicotina tabacum*) via *Agrobacterium tumefaciens*, com o gene *Lhcb1*2* de ervilha / Rui Alberto Gomes Junior. - - Piracicaba, 2001.
89 p. : il.

Dissertação (mestrado) - -. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Biomassa vegetal 2. Fotossíntese 3. Fumo transgênico 4. Transformação genética 5. Variação fenotípica I. Título

CDD 633.71

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

**À minha esposa,
Ana Cristina Perez Gomes,**

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, pela orientação, apoio e amizade, durante a realização deste trabalho;

À pós-doutoranda Mônica Tereza Veneziano Labate, pelos ensinamentos necessários para a realização do trabalho;

Aos colegas do laboratório de Genética Fisiológica, pela convivência, amizade e incentivo;

Aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ-USP;

Aos funcionários do Setor de Biblioteca Central e do Departamento de Genética da ESALQ-USP, pelos auxílios prestados.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Fotossíntese.....	3
2.1.1 Introdução.....	3
2.1.2 Absorção de luz e transporte de elétrons.....	4
2.1.3 Assimilação do carbono.....	6
2.1.4 Cloroplasto.....	10
2.1.5 Os fotossistemas das plantas superiores.....	13
2.1.6 Os genes <i>Lhc</i> (“Light harvesting complex”).....	14
2.1.7 O gene <i>Lhcb1*2</i>	15
2.2 Cultura de tecidos de plantas.....	18
2.3 Transformação genética de plantas.....	19
2.3.1 Introdução.....	19
2.3.2 Transformação indireta via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
2.3.3 O processo de infecção.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Espécie vegetal.....	26
3.2 Transformação de tabaco via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26

3.3 Preparo da <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para a inoculação.....	27
3.4 Gene quimérico.....	28
3.5 Cultivo das plantas transgênicas e selvagens.....	29
3.6 Extração do DNA genômico total	29
3.7 Identificação das plantas transformadas por PCR.....	30
3.8 Análise de segregação em canamicina.....	31
3.9 Análise da integração do DNA pela técnica southern blot.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Regeneração de plantas resistentes à canamicina.....	33
4.2 Identificação das plantas transgênicas por PCR.....	35
4.3 Teste da progênie T ₁ dos transformantes primários (T ₀).....	56
4.4 Identificação de transformantes homozigotos, através do teste da progênie T ₂	59
4.5 Análise da integração do DNA exógeno, através da técnica Southern blot.....	70
5 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
APÊNDICE.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADP = adenosina di-fosfato

ATP = adenosina tri-fosfato

ATPase = membro de uma grande classe de enzimas que catalisam processos que envolvem a hidrólise de ATP

ATP sintase = enzima que adiciona P_i ao ADP, para formar ATP

BAP = benzil amino purina

CAB = proteína de ligação da clorofila *a/b*

CTAB = brometo de cetil-trietilamônio

CR (CC) = centro de reação (“core complex”)

DO600nm = densidade ótica a 600 nanômetros, lida em espectrofotômetro

Kb = kilobase

Lhc = família de multigenes nucleares que formam o LHCI

LHCI = antena coletora de luz do PSI

LHCII = antena coletora de luz do PSII

LHCIIb = principal complexo do LHCII

Lhcb1*2 = principal proteína do LHCII

*Lhcb1*2* = gene da proteína Lhcb1*2

mRNA = RNA mensageiro

NAA = ácido naftaleno acético

NADH = nicotinamida adenina binucleotídeo, forma reduzida

NADPH = nicotinamida adenina binucleotídeo fosfato, forma reduzida

NG = não germinado

nptII = gene que confere resistência à canamicina para as células transformadas

pb = pares de base

PCR = reação da polimerase em cadeia

P_i = fósforo inorgânico

PL = planta

Plasmídeo Ti = plasmídeo de *Agrobacterium* capaz de transferir DNA para um genoma vegetal

“primers” = iniciadores da reação de PCR

PSI = fotossistema I

PSII = fotossistema II

rbcL = subunidade maior da RUBISCO

rbcL = gene cloroplastidial da subunidade maior da RUBISCO

rbcS = subunidade menor da RUBISCO

rbcS = pequena família de genes nucleares da subunidade menor da RUBISCO

rRNA = RNA ribossômico

RUBISCO = ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase

RuBP = ribulose 1,5 bifosfato

T-DNA = DNA de transferência

TP = triose fosfato

TR = transformante

tRNA = RNA transportador

Tween = polioxietilenosorbitol

T₀ = planta que sofreu originalmente o processo de transformação.

T₁ = primeira geração de autofecundação dos transformantes primários

T₂ = segunda geração de autofecundação

Vir = genes localizados no plasmídeo Ti, responsáveis pela transferência do T-DNA

3-PGA = ácido 3-fosfoglicérico

35S = promotor do vírus do mosaico da couve flor (CaMV)

Kb DNA = marcador de peso molecular

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO TABACO (*Nicotiana tabacum*) VIA
Agrobacterium tumefaciens, COM O GENE *Lhcb1*2* DE ERVILHA**

Autor: RUI ALBERTO GOMES JUNIOR

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO LABATE

RESUMO

O sistema coletor de energia luminosa (LHCII) funciona como um sistema antena associado a um centro de reação do PSII. O sistema antena é formado por moléculas de clorofila complexadas às proteínas CAB (“Chlorophyll *a/b* binding proteins”). As moléculas de clorofila são excitadas pela energia luminosa, e quando voltam para o estado de repouso dessa transição, tem-se a liberação de elétrons que são transportados do PSII para PSI, gerando NADPH e ATP. A proteína *Lhcb1*2* é a principal proteína CAB, e está associada à cerca de 50% das moléculas de clorofila do PSII. O emprego de técnicas de biotecnologia, como a transformação genética de plantas, representa uma ferramenta adicional para melhorar o potencial produtivo das espécies cultivadas. Por exemplo, o aumento de biomassa é uma característica de ser conseguida em diversas culturas e está relacionada, em grande parte, à capacidade fotossintética das plantas. As plantas superiores, são capazes de ajustar o tamanho do sistema antena (LHCII), localizados nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos, como observado em estudos anteriores, em nosso laboratório, sobre a regulação do processo fotossintético, em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1) que

superexpressaram o gene quimérico *Lhcb1*2* de ervilha. A expressão deste gene foi facilitada pelo promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). Neste caso foram obtidas duas linhagens que têm alta expressão desse transgene e os resultados mostraram que a expressão ectópica do gene *Lhcb1*2* resultou em um aumento da capacidade fotossintética das plantas transgênicas em condições limitantes de luz, e também em uma série de efeitos pleiotrópicos no desenvolvimento e anatomia foliar. Assim, o objetivo dessa dissertação foi o de obter-se um maior número de linhagens transgênicas de tabaco, para o estudo posterior de diferentes níveis de expressão do transgene, de forma a entender a relação entre o nível de expressão do transgene e os efeitos sobre o desenvolvimento, anatomia foliar e fisiologia das plantas transgênicas. O sistema de transformação de plantas utilizado foi o de *Agrobacterium tumefaciens*. A identificação dos transformantes feita por PCR. As plantas PCR positivas foram então autofecundadas, e suas progênes, avaliadas em meio seletivo. As plantas que apresentaram o padrão de seleção, de três plantas resistentes para uma suscetível à canamicina, foram selecionadas. Nove plantas de cada progênie resistente foram novamente autofecundadas, para a identificação de plantas homozigotas para o transgene. Dezesete linhagens, independentes e homozigotas para o transgene, foram obtidas de dezenove plantas com segregação mendeliana (3:1). A análise de Southern blot de 12 plantas PCR positivas e homozigotas para o transgene, apenas uma planta revelou-se negativa, e várias, apesar da segregação mendeliana, apresentaram mais de uma cópia do transgene integrado ao seu genoma.

**GENETIC TRANSFORMATION OF TOBACO (*Nicotiana tabacum*) VIA
Agrobacterium tumefaciens, WITH THE PEA *Lhcb1*2* GENE**

Author: RUI ALBERTO GOMES JUNIOR

Adviser : Prof. Dr. CARLOS ALBERTO LABATE

SUMMARY

The LHCII light harvesting complex acts as an antenna system, associated to the (PSII) core complex. The LHCII is formed by chlorophyll molecules associated to the CAB proteins (“chlorophyll *a/b* binding proteins”). The chlorophyll molecules are excited by the light energy, before returning to the steady state. From this transition, electrons are liberated and transferred from PSII to PSI, producing NADPH and ATP. The *Lhcb1*2* is the major CAB protein and binds around 50% of total PSII Chlorophyll molecules. The use of biotechnology techniques, such as plant genetic transformation, represent an additional tool to improve the productive potential of cultivated species. For example, the increase in biomass is a (desired) feature to be achieved in several cultures and is largely related, to the photosynthetic capacity of higher plants. The higher plants are able to adjust the size of the LHCII antenna system, located in the thylakoid membrane of the chloroplasts, as observed in previous work in our laboratory, concerning the regulation of the photosynthetic apparatus in transgenic tobacco plants overexpressing the chimeric pea *Lhcb1*2* gene. The expression of this gene was facilitated by the constitutive cauliflower mosaic virus 35S promoter (CaMV). In this case, two lines,

showing high expression of the transgene were obtained and the results showed that the ectopic expression of the *Lhcb1*2* lead to an enhanced photosynthetic capacity of these transgenic lines in limiting light conditions and also to a series of pleiotropic effects upon development and leaf anatomy. So, the aim of this work was to obtain a larger number of transgenic tobacco lines for a future study of the different levels of the transgene expression , to be able to understand the relation between the transgene expression level and its effects upon development , leaf anatomy and fisiology of these transgenic plants. The plant transformation system used was the *Agrobacterium tumefaciens* one. The identification of the transformants was made by PCR. The PCR positive plants where then selfcrossed, and their progeny, evaluated in selective medium. The plants wich showed a selective pattern of three resistant plants to one susceptible to kanamycin, were selected. Nine plants of each resistant progeny were selfcrossed a second time, for the identification of the homozygous transgenic lines. Seventeen independent homozygous transgenic lines were obtained, out of nineteen plants which showed Mendelian Segregation (3:1). From the Southern blot analysis of thirteen PCR positive plants, homozygous plants, only one was not a genuine transformant and others, showed more than one copy of the transgene integrated into their genome, although the pattern of the segregation was Mendelian.

1 INTRODUÇÃO

A transformação genética de plantas é uma técnica adicional para melhorar o potencial produtivo das espécies cultivadas. Por exemplo, o aumento da biomassa é uma característica desejável em diversas culturas e é consequência, em grande parte, da capacidade fotossintética das plantas.

A taxa de fotossíntese de uma planta depende da quantidade de luz que atinge as folhas. Em função destes fatores, as plantas ajustam o tamanho do sistema coletor de luz localizados nos tilacóides dos cloroplastos. Os sistemas coletores de luz (LHC, “Light Harvesting Complex I e II”) são compostos por pigmentos (clorofilas e carotenóides) e proteínas CAB (“Chlorophyll a/b Binding Protein”), associados aos fotossistemas (PSI e PSII, respectivamente). Em condições de baixa luminosidade, as plantas aumentam o tamanho dos LHCII por PSII, na tentativa de absorver uma maior quantidade de energia. (Dreyfuss & Thorbner, 1994).

As plantas superiores, são capazes de ajustar o tamanho do sistema antena (LHCII), localizados nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos, como observado em estudos anteriores, em nosso laboratório, sobre a regulação do processo fotossintético, em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1) que superexpressaram o gene quimérico *Lhcb1*2* de ervilha. A expressão deste gene foi facilitada pelo promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). Foram obtidas duas linhagens transformantes com alta expressão do transgene, e mostraram que a expressão ectópica deste gene resultou no aumento da capacidade fotossintética das plantas transgênicas em condições limitantes de luz, além de induzir uma série de efeitos pleiotrópicos que resultaram em aumento do período de desenvolvimento vegetativo e consequente atraso do florescimento,

aumento da biomassa vegetal, alterações morfológicas e anatômicas das folhas, com as transgênicas apresentando um maior número de cloroplastos por célula, além de um menor número de células por área. Do ponto de vista metabólico, as plantas transgênicas apresentam aumento do conteúdo de carboidratos (amido e sacarose), principalmente nas folhas mais jovens, maior conteúdo de amido nas sementes, aumento no tamanho das flores e redução do processo fotorrespiratório.

O objetivo desse trabalho foi obter novos transformantes de tabaco, com diferentes níveis de expressão do gene *Lhcb1*2* de ervilha.

Com os novos eventos de transformação, o que se pretende é correlacionar o nível de expressão com o efeitos fenotípicos, observados nos dois transformantes já obtidos. Como estes dois transformantes tem alto nível de expressão, espera-se obter plantas com níveis intermediários de expressão do transgene, para estudar-se, qual a mínima expressão necessária, para a obtenção de variações nas características fenotípicas relacionadas a estas plantas transgênicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fotossíntese

2.1.1 Introdução

A fotossíntese é um dos processos fisiológicos mais importantes para os seres vivos. Ela consiste na produção de carboidratos a partir de CO₂, água e energia luminosa. Nos vegetais mais desenvolvidos, o órgão sede da fotossíntese é a folha. Nela, encontram-se as células verdes dotadas de clorofila, responsáveis pelo processo fotossintetizante. Essas células constituem o chamado parênquima clorofiliano, em cujo interior encontram-se os cloroplastos, que são as organelas citoplasmáticas onde o processo fotossintético se desenvolve (Staeclin & Arntzen, 1986)

O principal objetivo em pesquisas na área de fotossíntese tem sido destinado ao estudo de aspectos funcionais e estruturais de processos de transdução de energia, envolvendo a coleta de energia e transporte de elétrons. O progresso tem sido significativo e, o processo fotossintético e os complexos protéicos supramoleculares envolvidos, foram descritos ao nível molecular (Kühlbrandt et al., 1994). Porém, pouco se conhece a respeito dos processos de aclimação, regulação e de proteção, que mantêm a eficiência fotossintética alta. Por isso, a importância de estudos sobre os mecanismos de regulação da expressão dos genes, que codificam proteínas fotossintéticas.

2.1.2 Absorção de luz e transporte de elétrons

A fase dependente de luz ou fotoquímica da fotossíntese é um evento que ocorre nas membranas dos tilacóides nos cloroplastos (Anderson & Styring, 1991), e consiste da conversão da energia solar em energia química representada pelo poder redutor e energético, presentes nas moléculas de NADPH e ATP produzidos. A membrana dos tilacóides contém pigmentos e uma complexa estrutura envolvida na coleta de luz, dispostas de maneira otimizada, para proporcionar a máxima eficiência na absorção da energia luminosa.

Nas reações fotossintetizantes de transferência de elétrons (também chamadas de reações da “fase clara” ou “fase luminosa”), a energia derivada da luz solar energiza um elétron da clorofila, capacitando-o a se mover através de uma cadeia transportadora de elétrons da membrana do tilacóide, de uma maneira muito semelhante ao movimento de elétrons na cadeia respiratória das mitocôndrias. A clorofila *a* do fotossistema II (PSII), quando excitada pela energia transferida do LHCI, promove a quebra da molécula de água, produzindo elétrons, prótons (H^+) e oxigênio. Como consequência da formação de um fluxo vetorial de elétrons na membrana dos tilacóides, têm-se a transferência de prótons e consequente acidificação do lúmen dos tilacóides. A diferença de potencial eletroquímico entre o estroma e o lúmen, direciona a produção de ATP pela ATPase. Todas estas reações são confinadas ao cloroplasto (Alberts et al, 1997). A cadeia transportadora de elétrons está ilustrada na Figura 1.

Os pigmentos (clorofila *a* e *b* e carotenóides), são complexados às proteínas CAB (“*Chlorophyll a/b Binding protein*”) e associados ao fotossistema II, formando antenas que são denominadas de LHCI (LHC – “Light Harvesting Complex”) (Green et al., 1991). O LHCI é o complexo protéico mais abundante do tilacóide de plantas superiores e não é apenas um componente-chave para a coleta e transferência de energia luminosa, mas também é essencial para a regulação e distribuição da energia de excitação dentro do aparato fotossintético em resposta às

flutuações de curto e longo prazo na intensidade e qualidade da luz (Anderson & Anderson, 1988).

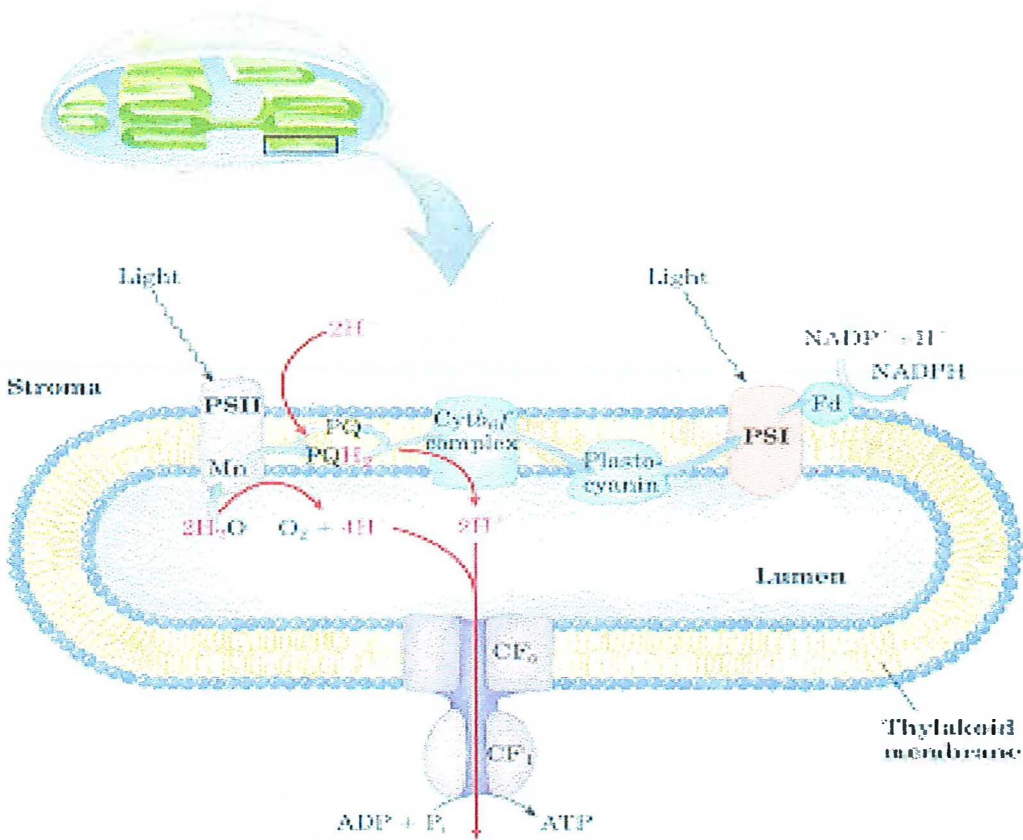


Figura 1 - Cadeia transportadora de elétrons nos tilacóides. Os elétrons (setas azuis), liberados da água, pelo PSII, são transferidos ao NADP^+ , através da cadeia transportadora do PSI, formando NADPH. Os prótons (linhas vermelhas), são liberados da água ou bombeados para o lúmen do tilacóide, pelo fluxo de elétrons da cadeia transportadora entre o PSII e o PSI, e reentram no estroma através do canal formado pela porção CF_0 da ATP sintase. A subunidade CF_1 da $\text{ATP}_{\text{sintase}}$, cataliza a síntese de ATP (Nelson & Cox, 2000).

Os polipeptídeos que formam o LHCII são codificados por famílias de multigenes nucleares, os genes *Lhc* (Jansson et al., 1992). Eles são traduzidos no citoplasma e depois importados pelo cloroplasto onde sofrem processamento para serem integrados às membranas dos tilacóides (Green et al., 1991).

A força assimilatória produzida durante a fase clara (ATP e NADPH) (Dietz & Huber, 1986), será utilizada posteriormente nas reações independentes de luz para fixação de CO₂.

2.1.3 Assimilação do carbono

Nas reações de fixação do carbono (reações da “fase escura”), o ATP e o NADPH gerados pelo transporte de elétrons, servem como fonte de energia e como força redutora, respectivamente, para dirigir a conversão de CO₂ em carboidratos. As reações de fixação do carbono, iniciam no estroma cloroplástico e continuam no citosol, produzindo sacarose nas folhas do vegetal. Das folhas, o açúcar é exportado para outros tecidos, e utilizado como fontes de moléculas orgânicas e energia para o crescimento (Alberts et al, 1997). Portanto, a produção de oxigênio (a qual necessita diretamente de energia luminosa) e a conversão de dióxido de carbono em carboidrato são processos separados. Entretanto, mecanismos elaborados de retroalimentação, interconectam os dois processos de forma a regular o processo fotossintético. As reações centrais da fotossíntese no cloroplasto, estão ilustradas na Figura 2.

Os vegetais superiores, apresentam em seus cloroplastos, um complexo enzimático capaz de catalizar a conversão de CO₂ em compostos orgânicos. Este processo de fixação do carbono foi elucidado por Melvin Calvin e Andrew Benson na década de 50.

Grande quantidade das plantas cultivadas, incluindo o fumo, possui o metabolismo C₃ de fotossíntese, onde a etapa inicial da fixação do carbono é a reação

do CO_2 com a ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) para formar duas moléculas de três carbonos, o 3-fosfoglicerato (Furbank & Taylor, 1995).

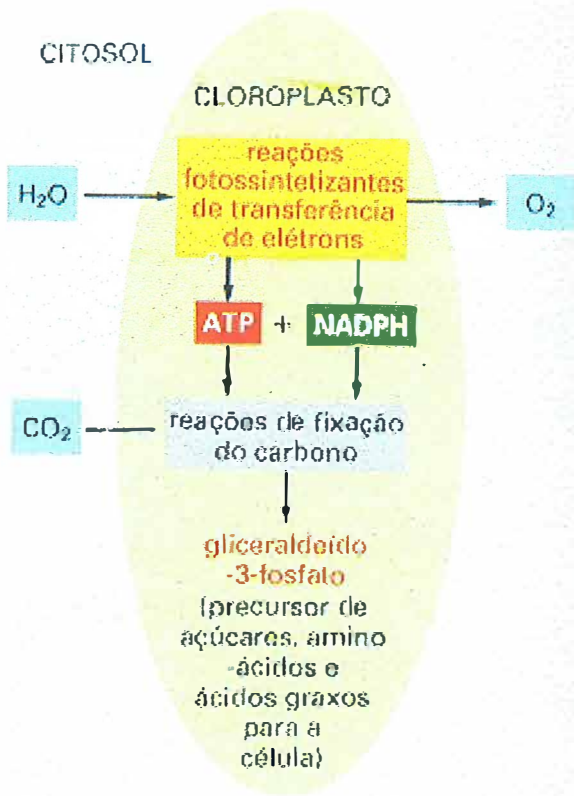


Figura 2 - A fotossíntese em um cloroplasto. A água é oxidada e oxigênio é liberado nas reações fotossintetizantes de transferência de elétrons, enquanto dióxido de carbono é assimilado para produzir carboidratos nas reações de fixação do carbono (Alberts et al., 1997).

O ciclo de Calvin-Benson pode ser dividido em três fases:

- Na primeira fase, ocorre a carboxilação, catalizada pela enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (RUBISCO). A enzima RUBISCO está localizada no estroma do cloroplasto, sendo formada por oito subunidades menores, codificadas por uma pequena família de genes nucleares, *rbcS*, e oito subunidades

maiores, codificadas por um gene cloroplastidial, *rbcL* e cataliza o primeiro passo da competição entre a redução fotossintética do carbono e o ciclo da fotorrespiração. A atividade oxigenase da RUBISCO diminui a eficiência da fotossíntese em plantas C_3 , uma vez que não representa ganho líquido de carbono. A ação carboxilase da enzima fixa o CO_2 a um açúcar de 5 carbonos, a ribulose 1,5-bifosfato (RuBP) e, em seguida, forma duas moléculas de 3-fosfoglicerato (Leegood, 1990). A assimilação do CO_2 ocorre na folha e depende da quantidade e atividade da RUBISCO presente, da concentração de seus substratos (RuBP e CO_2), da concentração de O_2 , que é inibidor competitivo, e da temperatura da folha. O nível de CO_2 no estroma é regulado pelo fosfato inorgânico (Pi) e pela taxa de difusão no fluido intercelular e no cloroplasto, e a disponibilidade de RuBP depende da intensidade da luz, que determina a capacidade da cadeia de transporte de elétrons gerar ATP e NADPH. Diferenças na taxa de assimilação de CO_2 entre folhas ocorrem devido à diferença na idade das folhas, nutrição da planta ou condições de luz durante o crescimento, que podem estar relacionadas à atividade da RUBISCO presente nas folhas (Leegood, 1990).

- A segunda fase do Ciclo de Calvin-Benson é a fase redutora, onde o ácido 3-fosfoglicerato (3-PGA) é convertido à triose fosfato (TP), catalizado pela enzima fosfoglicerato quinase e pela gliceraldeído fosfato desidrogenase dependente de $NADP^+$ (NADP-NAPDH) (Leegood, 1990).

- Na terceira fase, ocorre a regeneração de RuBP que é catalizada por uma série de enzimas: Triose-Fosfato Isomerase, Aldolase, Frutose 1,6-Bifosfatase, Sedoheptolose 1,7-Bifosfatase, Transquetolase, Ribose 5-Fosfato Isomerase, Ribulose 5-Fosfato 3-Epimarase, Ribulose 5-Fosfato Kinase (Leegood, 1990). Este RuBP entra novamente na primeira fase, tornando a reação cíclica.

- O ciclo de fixação do carbono ou ciclo de Calvin-Benson, de plantas com metabolismo C_3 , onde 3 moléculas de CO_2 irão formar uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato, está na Figura 3.

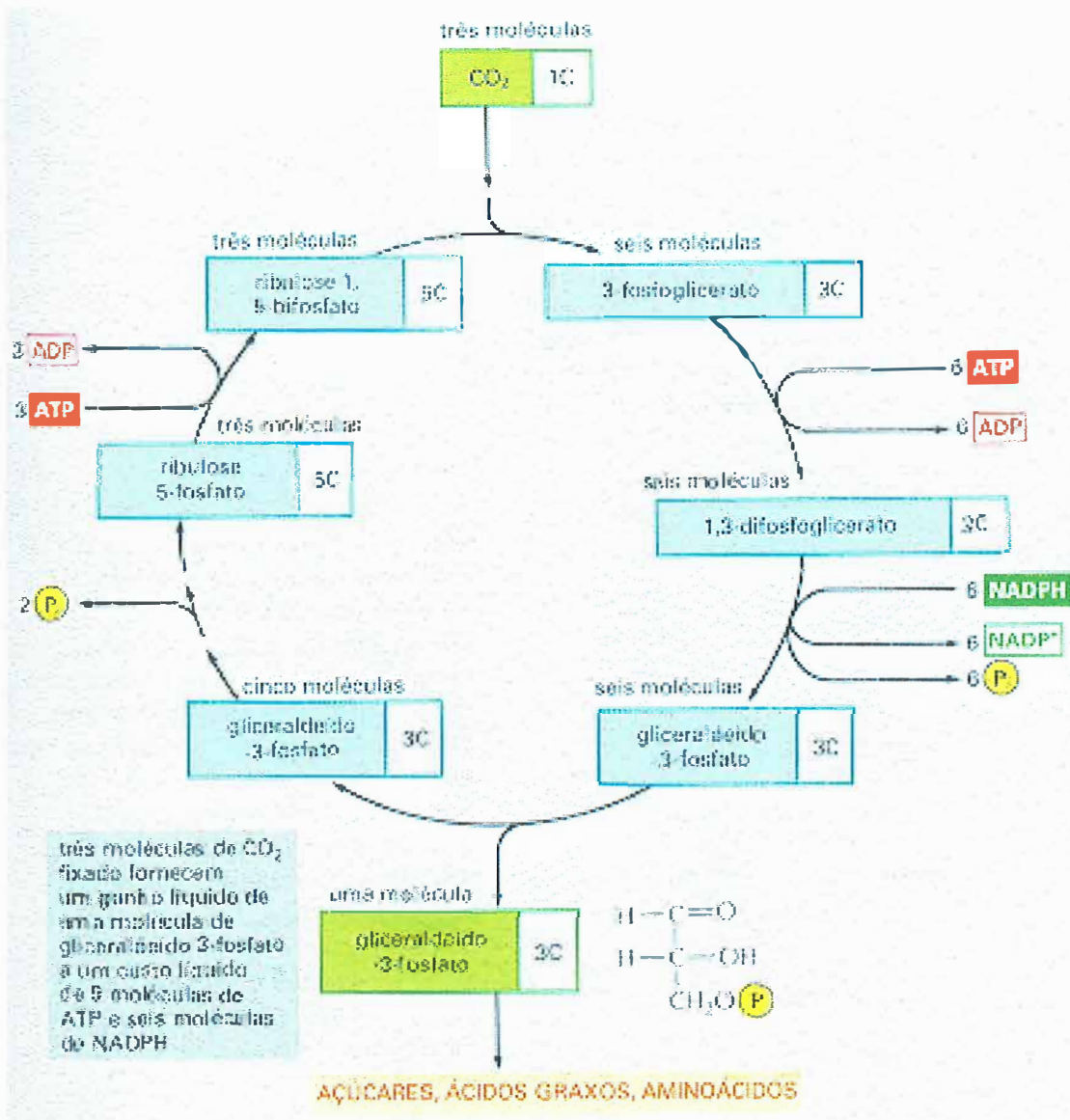


Figura 3 - O ciclo de fixação do carbono, através do qual se formam moléculas orgânicas a partir de CO_2 e H_2O . O número de átomos de carbono para cada tipo de molécula, está indicado na caixa branca. O ATP e o NADPH, necessários para a fixação do carbono, são produtos das reações fotossintetizantes de transferência de elétrons (Alberts et al., 1997).

O ciclo de Calvin-Benson é intermediário entre o transporte de elétrons e a síntese de produtos, e sensível às mudanças nas condições ambientais que causam alterações nas relações entre suprimento e demanda dos produtos do transporte de elétrons (Leegood, 1985). A atividade das enzimas relacionadas ao ciclo de Calvin-Benson é controlada de várias formas, sendo que a ativação pela luz e modulação por metabólitos permitem um ajuste rápido da atividade e síntese de proteínas, permitindo uma regulação em longo prazo da quantidade das enzimas do ciclo.

2.1.4 Cloroplasto

Em vegetais, a fotossíntese ocorre em uma organela intracelular especializada, o cloroplasto. Os produtos da fotossíntese são usados diretamente pelas células fotossintetizantes para a biossíntese e são também convertidos em um açúcar de baixo peso molecular (normalmente sacarose), que é exportado para suprir as necessidades metabólicas das outras várias células não fotossintetizantes do vegetal. Alternativamente, os produtos podem ser armazenados na forma de um polissacarídeo osmoticamente inerte (normalmente amido), que é mantido disponível como fonte de açúcar para uso futuro (Alberts et al, 1997).

Cada cloroplasto é rodeado por um sistema de dupla membrana que controla o tráfego molecular para seu interior e exterior. O estroma é formado por uma substância gelatinosa rica em enzimas, que convertem o CO₂ em carboidratos. Embebido pelo estroma, estão os tilacóides, nos quais a energia da luz é utilizada para oxidar a H₂O e formar ATP e NADPH, que são compostos ricos em energia necessária para converter o CO₂ em carboidratos. O grana é um conjunto de tilacóides empilhados. O lumem é a cavidade formada entre as duas membranas do tilacóide (Salisbury & Ross, 1992). A estrutura do cloroplasto está ilustrada na Figura 4.

Os pigmentos presentes nas membranas do tilacóide, consistem principalmente de dois tipos de clorofilas verdes, clorofila *a* e clorofila *b*, e dos

pigmentos amarelos a laranja, chamados carotenóides. Também são presentes no cloroplasto: DNA, RNA, ribossomos e várias enzimas. Todas estas moléculas estão abundantes no estroma, onde ambos, transcrição e tradução ocorrem. O DNA cloroplastidial, existe em 50 ou mais cópias circulares supercondensados por plastídio. Numerosos genes plátidiais codificam todos os t-RNA e r-RNA utilizados para a tradução. Cerca de 85 outros genes codificam proteínas envolvidas na transcrição, tradução e fotossíntese, mas muitas proteínas dos plastídios são codificadas por genes nucleares (Salisbury & Ross, 1992).

Quando tilacóides são separados de cloroplastos isolados e tratados com detergentes e outras soluções, quatro grandes complexos protéicos podem ser separados. Estes complexos são o fotossistema II, o fotossistema I, o complexo citocromo b6-f e a ATP sintase (Salisbury & Ross, 1992), ilustrados na Figura 1.

Segundo estudos filogenéticos, os cloroplastos descendem de bactérias fotossintetizantes produtoras de oxigênio, que foram endocitadas e que viveram em simbiose com células eucarióticas primitivas. Com o processo de evolução da endossimbiose entre a célula vegetal e o cloroplasto, a maior parte das proteínas cloroplásticas são codificadas por genes nucleares e sintetizadas sob a forma de precursores no citosol. Estes apresentam na extremidade amino terminal, uma seqüência de direcionamento chamada de peptídeo de trânsito, que é responsável pela translocação do precursor ao interior da organela (de Boer & Weisbeek, 1991).

Referências de que o peptídeo de trânsito é capaz de transportar proteínas estrangeiras ao interior dos cloroplastos, abrem novas perspectivas no estudo dos processos biológicos que ocorrem nestas organelas. Novas proteínas podem ser introduzidas com o objetivo de alterar a fisiologia das plantas, como melhorar a fotossíntese, além de proporcionar um vasto campo de trabalho no entendimento dos fenômenos biológicos tão importantes para o funcionamento das plantas.

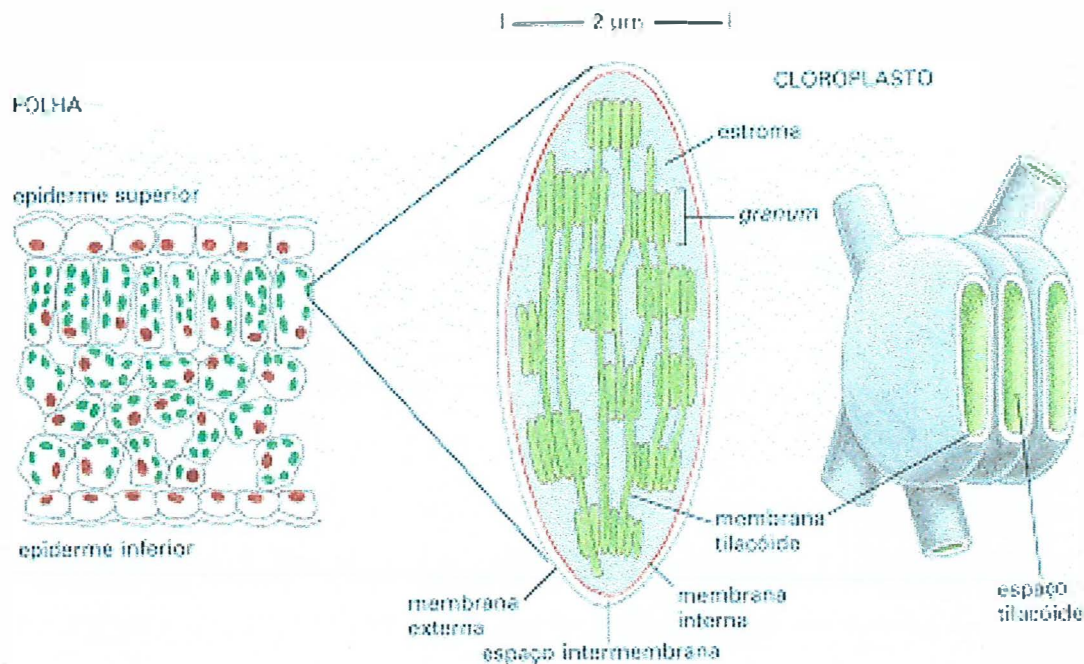


Figura 4 – O cloroplasto. Esta organela fotossintetizante contém três membranas (externa, interna e do tilacóide), que definem três compartimentos, o espaço intermembranas, o estroma e o espaço tilacóide. A membrana do tilacóide contém todos os sistemas geradores de energia do cloroplasto (Alberts et al., 1997).

O cloroplasto realiza vários outros processos metabólicos além da fotossíntese. Todos os ácidos graxos celulares e um bom número de aminoácidos, por exemplo, são sintetizados por enzimas no estroma cloroplástico. Da mesma forma, a força redutora de elétrons ativados pela luz dirige a redução de nitrito (NO_2^-) à amônia (NH_3) no cloroplasto, esta amônia fornece ao vegetal o nitrogênio para a síntese de aminoácidos e nucleotídeos. A importância metabólica do cloroplasto para as plantas e algas, portanto, estende-se muito além do que sua função na fotossíntese (Alberts et al, 1997).

2.1.5 Os fotossistemas das plantas superiores

A fotossíntese é formada por uma cadeia de reações que iniciam nas membranas dos tilacóides com a captação da energia solar pelos pigmentos associados a proteínas (LHCII e LHCI), e associados aos fotossistemas II e I. Complexos distintos de proteínas que ligam os pigmentos de clorofila *a* e *b*, e carotenóides formam os LHCII e LHCI (Green et al., 1991). As proteínas CAB (“Chlorophyll *a/b* binding protein”) orientam a disposição espacial das moléculas de clorofila e carotenóides, para que a energia seja transferida ao PSII de maneira eficiente (Küldbrandt et al., 1994). Cerca de 200 a 300 moléculas estão associadas a cada centro de reação (CR), formando uma unidade funcional do PSII (Horton et al., 1996). Os LHCII consistem de dois tipos distintos de complexos pigmento-proteína. O primeiro possui duas proteínas relacionadas, CP47 e CP43 (que estão acopladas a aproximadamente 50 moléculas de clorofila *a* ligadas ao centro de reação formando a parte central do PSII. O segundo tipo de complexo associado ao CR é o LHCIIb, consistindo de polipeptídeos de 20 a 30 kDa associados a clorofilas do tipo *a* e *b* e xantofilas.

O LHCIIb é o principal complexo, possui uma estrutura trimérica e está associado à aproximadamente 60% das clorofilas do PSII. O LHCIIb é composto por polipeptídeos de 28, 27 e 25 kDa, codificados pelos genes *Lhcb1*, *Lhcb2* e *Lhcb3*, respectivamente. As proteínas CAB estão organizadas em populações proximais (25 e 28 kDa) e distais (27 e 28 kDa). Os complexos menores estão associados a apenas 5% do total de clorofila do PSII (Küldbrandt et al., 1994). Acredita-se que esses complexos têm por função ligar o CR do PSII aos complexos LHCIIb. Um LHCII típico contém 5 complexos LHCIIb e 3 a 4 complexos menores, os quais formam juntos uma grande antena oligomérica na membrana dos tilacóides (Jansson, 1994).

Conforme a luminosidade disponível para o crescimento, as plantas são capazes de ajustar o tamanho do sistema coletor de luz (Anderson & Anderson, 1988). A quantidade dos complexos pigmento-proteína, determina a capacidade da

planta captar a energia solar. Em baixa luminosidade, a habilidade da planta manter boas taxas fotossintéticas é condicionada pela sua capacidade genética de aumentar a quantidade dos LHCII.

2.1.6 Os genes *Lhc* (“Light harvesting complex”)

Os genes *Lhc* são uma família de genes nucleares e que se expressam no cloroplasto, como visto anteriormente, e suas proteínas ligam as clorofilas *a* e *b* e outros pigmentos nos sistemas coletores de luz (LHC).

Com a proliferação dos sequenciamentos, quatro tipos distintos de proteínas CAB foram identificadas para o LHCI e seus genes foram designados *Lhca1* a *Lhca4*. Para o LHCII, foram encontrados seis tipos de proteínas para o subcomplexo maior e seus genes são denominados: *Lhcb1* a *Lhcb6* (Jansson, 1994).

As proteínas CAB são codificadas por genes nucleares que pertencem a uma família multigênica consistindo de pelo menos 5 genes em *Arabidopsis*, 6 em *Nicotiana tabacum*, 8 em *Nicotiana plumbaginifolia* e 15 genes em *Lycopersicon esculentum* (Jansson et al., 1992). Essas proteínas são sintetizadas no citoplasma e depois importadas pelo cloroplasto onde sofrem processamento para serem integradas às membranas dos tilacóides (Green et al., 1991).

Os genes *Lhc* do fotossistema II são regulados pela luz, tanto na transcrição quanto na pós-transcrição. A regulação da expressão gênica pela luz inicia com a absorção da luz pelos fitocromos que são fotorreceptores que absorvem luz vermelha. Estes fotorreceptores geram sinais, que são encaminhados por um intermediário, para ativar os fatores de transcrição ligados às suas seqüências dentro de regiões regulatórias dos genes (Anderson et al., 1994).

Os ciclos luz/escuro, chamados de ritmos circadianos, também são bastante importantes para a expressão dos genes regulados pela luz. Funções celulares e fisiológicas que continuam a oscilar ritmicamente sob condições ambientais constantes, em um período de 24 horas, são chamadas de ritmos circadianos e estão

sob o controle de um relógio circadiano endógeno (Anderson & Kay, 1997). A regulação através do relógio circadiano, serve para sincronizar e otimizar processos celulares e fisiológicos em antecipação às mudanças periódicas no ambiente da planta.

O relógio circadiano regula a expressão dos genes *Lhc* via controle de transcrição, sofrendo alterações independente da indução do ambiente em um período de 24h, que se manifesta na transcrição e pós-transcrição. As primeiras evidências do ritmo circadiano foram verificadas em tomates cultivados sem estímulo ambiental. No escuro contínuo, o nível de equilíbrio do mRNA, continuava a oscilar por quatro dias, acompanhado por uma diminuição gradual na amplitude de oscilação. Também quando as plantas foram expostas à regimes alternados de luz/escuro, este padrão de oscilação permanecia até a adaptação ao novo ambiente (Piechulla, 1988). Entretanto, o tempo e a amplitude máxima e mínima e o nível de expressão máxima eram alterados de acordo com a situação de luz.

2.1.7 O gene *Lhcb1*2*

A proteína *Lhcb1*2* é a mais abundante das proteínas CAB, sendo mais abundante que todas as outras proteínas CAB combinadas (Ort & Yocum, 1996). O gene *Lhcb1*2* e seus produtos têm sido usados como sistema modelo para pesquisa em muitas áreas de biologia vegetal, incluindo marcação de proteínas no cloroplasto, expressão gênica regulada pela luz, biogênese do cloroplasto, ritmos circadianos, balanço da excitação entre PSI e PSII, regulação da estrutura do tilacóide, fosforilação de proteínas e reconstituição de complexos pigmento-proteína.

As proteínas *Lhcb1*2* se associam às moléculas de clorofila, formando o trímero (Kühlbrandt & Wang, 1991). Os trimeros são formados por associação aleatória de três proteínas CAB, dos tipos *Lhcb1*1*, *Lhcb1*2* e *Lhcb1*3*, à moléculas de pigmentos. Os trimeros, resultantes da expressão dos genes *Lhcb*, associados à moléculas de clorofila, se ligam ao centro de reação II (CR II) (“core

complex” (CC II)), de maneira a formar o sistema antena do fotossistema II, conforme a Figura 5 (Larsson et al., 1987).

Os genes *Lhc* são naturalmente expressos em tecidos fotossintéticos. Isto significa que eles são expressos não apenas em folhas, mas também em outros tecidos verdes, como no caule, sépalas, e nas frutas verdes de tomates, por exemplo, pois a grande maioria dos pigmentos de clorofila da célula estão associadas com as proteínas CAB, então a aparência verde de um tecido, é por si só, uma boa indicação dos genes *Lhc* (Pichersky & Jansson, 1996).

Os embriões vegetais em condições de escuridão, não são verdes, e quando expostos à luz, tornam-se verdes, tendo o aparelho fotossintético completamente formado e a planta torna-se completamente autotrófica. Durante este processo, o nível de expressão dos genes *Lhc* vai de quase nada na escuridão a um altíssimo nível na presença da luz (Pichersky & Jansson, 1996).

A expressão do gene *Lhcb1*2* é positivamente regulada pela rota do fitocromo. Então, um pequeno pulso de luz vermelha ativa a transcrição do gene *Lhcb1*2* e um pulso de luz infravermelha reverte este processo (Tobin & Silverthorne, 1985). Porém, detalhes dos mecanismos deste fenômeno aguardam elucidação, assim como a transdução do sinal na rota do fitocromo. O gene *Lhcb1*2* também pode ser ativado pela luz azul (Palomares et al., 1991).

Em coníferas, o embrião tem a capacidade de formar clorofila *a* e *b* no escuro durante os estágios iniciais de desenvolvimento. Os genes *Lhc* são altamente expressos durante estes estágios, porém sua expressão declina rapidamente à medida que a capacidade de síntese de clorofila decai (Gustafsson et al., 1991). Isto indica que a síntese de clorofila por si só, ao invés da luz, é o maior determinante para a expressão dos genes *Lhc* em coníferas, além da ação dos fitocromos, que também estão envolvidos. Devido as dificuldades experimentais da separação da síntese de clorofila e estímulo luminoso em angiospermas, não é sabido se coníferas e angiospermas diferem a este respeito. Em *Ginko biloba*, uma gimnosperma sem a capacidade de sintetizar clorofila no escuro, a expressão dos genes *Lhc* não ocorre no

escuro (Chinn & Silverthorne, 1993), sugerindo que a síntese de clorofila é de fundamental importância na expressão dos genes *Lhc*.

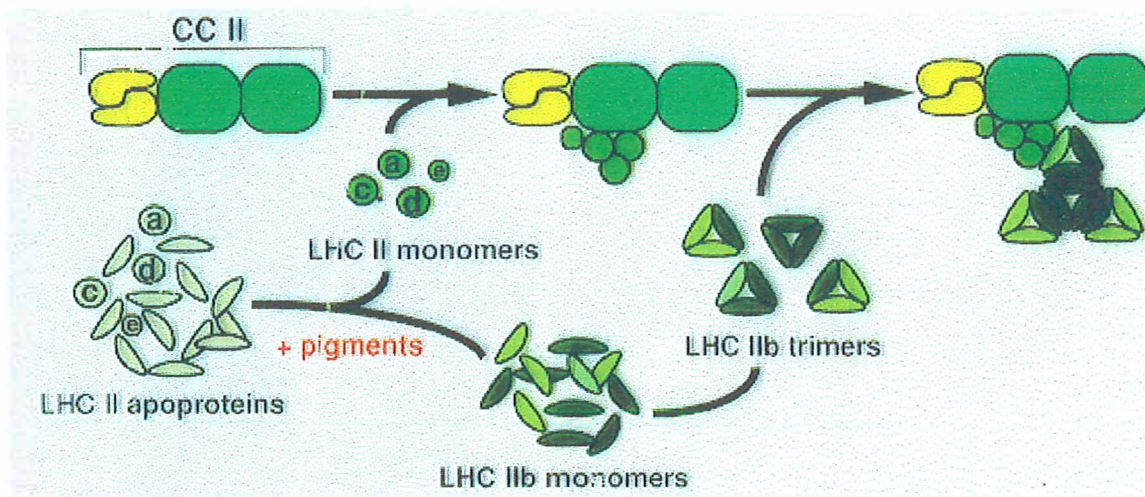


Figura 5 - Biossíntese das apoproteínas LHCII, para formar o sistema antena coletor de luz do fotossistema II. Para a formação dos trímeros, é necessário que as proteínas LHCIIb estejam associadas à pigmentos. CC II: “core complex” centro de reação (CR II) do LHCII (Dreyfuss & Thornber, 1994)

Em plantas cultivadas sob baixa luz, as quantidades das proteínas CAB é maior. (Larsson et al., 1987), indicando uma habilidade das plantas aumentarem seus sistemas coletores de luz através do aumento da expressão destes genes, para adaptar-se à condição ambiental.

Para aumentar o tamanho do LHCII e observar as consequências sobre a regulação do processo fotossintético, em estudos prévios, em nosso laboratório, foram transformadas plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1) com o gene quimérico *Lhcb1*2* de ervilha sob o controle do promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). Os resultados desse trabalho, que utilizou dois transformantes com alta expressão do transgene, mostraram que a

expressão ectópica do gene *Lhcb1*2* resultou no aumento da capacidade fotossintética das plantas transgênicas em condições limitantes de luz, além de induzir uma série de efeitos pleiotrópicos que resultaram em aumento do período de desenvolvimento vegetativo e consequente atraso do florescimento, aumento da biomassa vegetal, alterações morfológicas e anatômicas das folhas, com as transgênicas apresentando um maior número de cloroplastos por célula, além de um menor número de células por área. Do ponto de vista metabólico, as plantas transgênicas apresentam aumento do conteúdo de carboidratos (amido e sacarose), principalmente nas folhas mais jovens; maior conteúdo de amido nas sementes e aumento no tamanho das flores.

2.2 Cultura de tecidos de plantas

Trabalhos com propagação *in vitro* de plantas começaram no início deste século, Hanning em 1904, foi o primeiro a cultivar *in vitro* embriões imaturos de crucíferas. Laibach em 1925 foi o primeiro a visualizar a aplicação prática da cultura de embriões no melhoramento genético, recuperando plantas híbridas de cruzamentos incompatíveis entre *Linum austriacum* X *L. perenne*. White em 1934 foi o primeiro a estabelecer um trabalho de cultura de tecidos, com a elaboração de um meio líquido capaz de manter o crescimento de ápices caulinares de *Lycopersicon esculentum* por um período ilimitado. Ele utilizou em seus experimentos basicamente sais inorgânicos, sacarose e extrato de levedura (Torres et al., 1998).

Outra importante descoberta foi à identificação do primeiro fitormônio, a auxina, ácido indol acético por Kogh em 1934, e com a descoberta da primeira citocinina, a cinetina por Miler em 1955, o conhecimento sobre o controle químico da organogênese foi iniciado. Auxina e citocinina mostram uma ação sinérgica no crescimento e divisão celular. Concentrações elevadas de auxina, no balanço auxina/citocinina, favorecem a formação de raízes, enquanto que a relação inversa induz a regeneração da parte aérea (Torres et al., 1998).

Murashige & Skoog (1962), observaram que, ao adicionar extrato de folhas de fumo ao meio de cultura de calo, o crescimento deste tecido era 4 a 5 vezes maior ao ser comparada com o calo mantido em meio de White. Eles mostraram que a fração ativa do extrato era a inorgânica. Esse foi o ponto de partida para a elaboração do meio MS, atualmente o mais utilizado em trabalhos de cultura de tecidos.

A cultura de células e tecidos vegetais pode gerar uma variabilidade de natureza genética, dita variação somaclonal (Larkin & Scowcroft, 1981). Este é um termo que descreve um fenômeno que ocorre em plantas regeneradas *in vitro*, as quais possuem um fenótipo diferente das plantas doadoras de explantes. Entretanto, este efeito mutagênico da cultura de tecidos é indesejado quando o objetivo é a obtenção de plantas transgênicas regeneradas a partir de explantes transformados.

Com os estudos realizados, aumentaram os conhecimentos sobre as necessidades químicas das plantas, e tornou-se possível recuperar plantas a partir de células isoladas, e com o conhecimento dos mecanismos de transferência de DNA da *Agrobacterium tumefaciens* para plantas, via plasmídeo Ti, que Horsh et al. (1985) conseguiram produzir plantas transgênicas de tabaco pela inoculação de *A. tumefaciens* em folhas de tabaco, sendo esta a técnica mais utilizada em trabalhos de transformação de plantas.

2.3 Transformação genética de plantas

2.3.1 Introdução

A transformação genética é definida como sendo a introdução controlada de ácidos nucleicos em um genoma receptor, excluindo-se a introdução por fecundação. (Brasileiro & Dusi, 1999). As técnicas de transferência de genes, cultura de tecidos e biologia molecular representam uma nova forma para introduzir novas características em uma determinada planta. Genes oriundos de diferentes espécies vegetais, animais ou microorganismos podem ser introduzidos de forma

controlada em um genoma vegetal receptor. A fonte destes genes é a variabilidade genética existente na natureza. O gene responsável pela característica de interesse deve ser localizado e isolado do genoma, e ele será então caracterizado e introduzido em vetores para transformação de plantas.

O fenômeno da totipotência permite que plantas transgênicas, sejam obtidas de células originalmente transformadas com o DNA exógeno. Totipotência é a potencialidade que as células vegetais apresentam de se desenvolver em novas plantas. Avanços na pesquisa em reguladores de crescimento vegetais e cultura de tecidos, fazem com que um número crescente de plantas, muitas de interesse agrônomico, sejam regenerados a partir de uma única célula (Brasileiro & Carneiro, 1998).

A obtenção de plantas transgênicas pode ser explorada no melhoramento vegetal, mas também permite o estudo da fisiologia vegetal, metabolismo e bioquímica, regulação e expressão de genes. Também pode ser utilizada para extração de produtos medicinais, produção de anticorpos e metabólitos de interesse específico.

2.3.2 Transformação indireta via *Agrobacterium tumefaciens*

O *Agrobacterium tumefaciens* é um eficiente vetor na engenharia genética de plantas, principalmente de dicotiledôneas. Essas bactérias do solo, transferem naturalmente parte de seu genoma às células vegetais, no momento da infecção. O DNA da agrobactéria pode também ser manipulado por engenharia genética, de maneira a portar genes de interesse. No processo de infecção de células vegetais, a agrobactéria se encarregará de integrá-lo ao genoma vegetal. São por isso chamadas de “engenheiros genéticos naturais”. A regeneração de células que contém esse DNA exógeno, dará origem a plantas transgênicas, transmitindo o gene integrado à progênie de forma mendeliana (Brasileiro & Carneiro, 1998).

O conhecimento das bases moleculares do mecanismo de infecção por *Agrobacterium*, juntamente com o desenvolvimento de técnicas em biologia celular e molecular vegetal, abriram novas perspectivas para as pesquisas sobre a transferência de genes exógenos para plantas, utilizando aquela bactéria como vetor natural de transformação. A alta eficiência de transformação, o baixo custo operacional, assim como a simplicidade dos protocolos de transformação e de seleção, são as principais razões para a universalidade do uso do sistema *Agrobacterium*. (Brasileiro, 1998).

O princípio da transformação com um linhagem de *Agrobacterium* está baseado na seleção de uma ou mais células transformadas e a sua regeneração em planta transgênica. Assim, o método ideal de transformação deve combinar, ao mesmo tempo, a descontaminação do tecido infectado pela bactéria, a seleção das células que foram transformadas e que expressam o gene marcador, e a regeneração dessas células em plantas (Brasileiro, 1998).

Em 1985, foi desenvolvido o chamado método de infecção de folhas de tabaco. Pedacos de folhas de tabaco foram mergulhados em meio líquido com *Agrobacterium*, e transferidos para meio de regeneração sólido, onde explantes e bactérias eram co-cultivados por dois ou três dias. Em seguida, foram transferidos para o mesmo meio, contendo carbenicilina, para eliminar as bactérias, e canamicina, como agente seletivo (Horsh et al., 1985). Este método mostrou-se prático e de ampla aplicação, e vem sendo usado em um número crescente de espécies, ao mesmo tempo em que modificações são feitas para otimização do método.

2.3.3 O processo de infecção

O processo que permite o aparecimento da doença da *Agrobacterium* é peculiar, pois depende da transferência de uma série de genes (oncogenes), que originalmente encontram-se em um plasmídeo da bactéria, para a planta hospedeira. Para que os sintomas da doença se manifestem, é ainda necessário, que os genes transferidos integrem-se no genoma do hospedeiro, este processo está ilustrado na

Figura 6. O conhecimento do processo de infecção pelo *Agrobacterium* permitiu aproveitá-lo para a transformação genética de plantas, onde genes de interesse devem ser transferidos ao hospedeiro, em lugar dos oncogenes.

O movimento da bactéria em direção à célula hospedeira inicia o processo de infecção. O *Agrobacterium* somente infecta a planta, se esta apresentar um ferimento, pois a planta nesta situação irá exudar compostos fenólicos, que irão atrair a bactéria para esta região (Nester et al., 1984). Esta atração ocorre devido a um quimiotactismo positivo da bactéria em relação aos compostos fenólicos exudados e a presença de um a seis flagelos na membrana da bactéria, o que proporciona a sua mobilidade no solo.

A bactéria então se liga na célula vegetal. Os genes envolvidos nesta ligação estão localizados no cromossomo da bactéria e incluem os genes *chvA*, *chvB*, *pscA* e *att*. Mutações nestes locos, tornam as bactérias avirulentas a muitas espécies de plantas (Matthysse, 1987). A síntese de fibrilas de celulose pela bactéria, vai reforçar a ligação das células bacterianas ao redor das células vegetais (Matthysse et al., 1981).

Compostos fenólicos e açúcares liberados pelas plantas serão reconhecidos pela proteína de membrana VirA, que vai então ativar os genes situados na região de virulência (região *vir*) (Stachel & Nester, 1986). Com a ativação dos genes *vir*, ocorrem alterações na região do T-DNA do plasmídeo Ti, acarretando a transferência do plasmídeo Ti para a célula vegetal.

A proteína VirG é ativada pela VirA, e atua como um ativador transcricional dos demais operons *vir*, atuando nas regiões promotoras destes operons. A proteína VirG tem a propriedade de ligar-se ao plasmídeo Ti quando fosforilada, em uma seqüência regulatória de 12 pb chamada *vir box*, responsável pela indução dos genes da região de virulência, presente nas regiões 5' de todos os operons *vir*, estimulando a transcrição desses genes (Roitsch et al., 1990).

A clivagem do T-DNA é realizada pelas proteínas VirD1 e VirD2, que são também responsáveis pela atividade topoisomerase, de maneira similar ao início

da transferência conjugativa de um plasmídeo (Scheffele et al., 1995). A proteína VirD1 tem atividade topoisomerase, que converte o DNA supercondensado num DNA relaxado, permitindo que a proteína VirD2 clive a fita inferior do DNA e esta se ligue na região 5' do DNA clivado, protegendo esta região de exonucleases no *Agrobacterium* e nas células da planta hospedeira (Ghai & Das, 1989). Esta proteína tem também uma função ativa no movimento da fita-T do *Agrobacterium* em direção às células da planta (Ward & Barnes, 1988). As proteínas VirD interagem com as proteínas VirC1 e VirC2 codificadas pelo operon *virC*, estimulando o corte ou o relaxamento da fita-T (Ji et al., 1988).

O operon *virE* codifica duas proteínas que estabilizam a fita-T. A proteína VirE2 se liga à fita-T e a protege contra nucleases vegetais. A proteína VirE1 aumenta a estabilidade da proteína VirE2 (McBride & Knauf, 1988). As proteínas VirE formam um complexo com o T-DNA. A proteína VirE2 tem um sinal com função de direcionar o complexo ao núcleo da célula hospedeira (Citovsky et al. 1992).

O operon *virB* é formado por 11 genes. Esses genes têm homologia com os genes *tra* do plasmídeo conjugativo *RP4*, capaz de transferir DNA para bactérias gram positivas e negativas e leveduras. Os genes *tra* são responsáveis pela formação de poros necessários para a transferência do plasmídeo durante a conjugação bacteriana (Lessi & Lanka, 1994). Então, as proteínas VirB do plasmídeo Ti devem ser responsáveis pela formação de poros na membrana que permitem a exportação do T-DNA.

O operon *virH* produz proteínas capazes de inativar compostos antimicóticos secretados pelas plantas no processo de infecção (Hooykaas & Beijersbergen, 1994). Quando chega ao núcleo da célula hospedeira, o T-DNA é então inserido ao DNA nuclear da célula. Esta inserção é aleatória, segundo estudos de mapeamento genético.

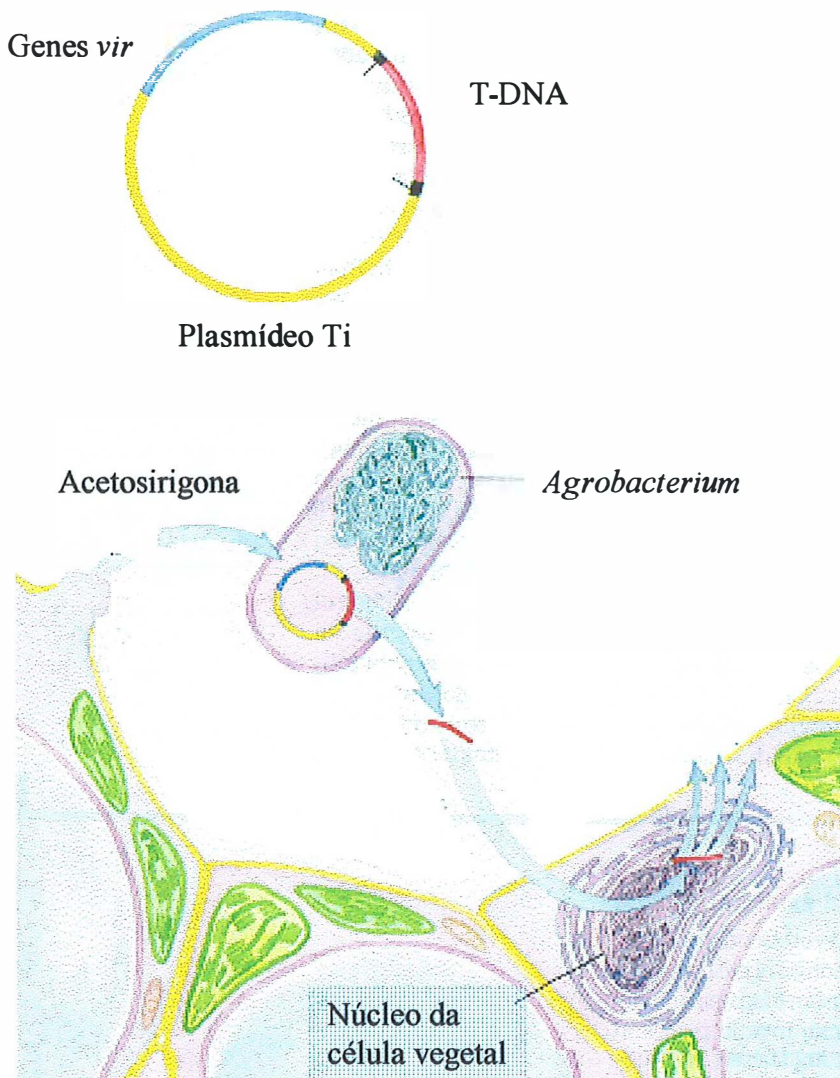


Figura 6 - Plasmídeo Ti e a transferência do T-DNA pela *Agrobacterium tumefaciens*. Células vegetais feridas produzem e liberam o composto fenólico acetosirigona. Quando a bactéria detecta este composto, os genes *vir* do plasmídeo Ti são expressos. Os genes *vir* codificam enzimas necessárias para a introdução do T-DNA no genoma da célula infectada. Uma cópia de fita única do T-DNA é sintetizada e transferida para a célula vegetal, onde é convertida em DNA dupla fita e integrado ao cromossomo vegetal. Os genes localizados no T-DNA são então expressos pela célula vegetal (Nelson & Cox, 2000).

A integração do T-DNA ocorre preferencialmente dentro de regiões ativas transcricionalmente, e uma ou mais cópias do T-DNA podem ser transferidas e integradas aleatoriamente, podendo ser cópias em tandem que se localizam num mesmo loco, ou cópias em 2 ou mais locos diferentes (Jorgensen et al., 1987).

As construções quiméricas, são formadas pela integração de promotores de plantas ou bacterianos associados a genes de interesse, e um ou mais gene marcador, podendo este ser um gene bacteriano que confere resistência a drogas ou antibióticos (Klee et al., 1987). O marcador utilizado deve ser eficiente na seleção das células transformadas. Estas construções quiméricas, podem ser clonadas ao plasmídeo Ti do *Agrobacterium*, na região do T-DNA, para se ter um vetor de transformação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécie vegetal

Por se tratar de uma espécie representante do metabolismo C3, e apresentar protocolo de transformação padronizado, *Nicotiana tabacum*, foi utilizada na transformação gênica.

3.2 Transformação de tabaco via *Agrobacterium tumefaciens*

O vetor binário pEND4K carregando o gene quimérico *Lhcb1*2* foi introduzido em células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* (linhagem LBA4404), segundo Hofgen e Willmitzer (1988), para transformação do tabaco, por infecção de discos foliares (Horsch et. al., 1985; Deroles & Gardner, 1988). Esse gene foi clonado juntamente com um marcador de seleção (o gene *nptII*) (Bevan et. al., 1983), no vetor pUC19 (Yanisch-Perron et al., 1985). Ambos os genes estão sob o controle do promotor 35S do CaMV (Kay et. al., 1987) e da sequência "leader" (sequência 5', não traduzida do RNA) do vírus do mosaico da alfafa (ativador da tradução). Esse marcador permite selecionar plantas transgênicas, resistentes à canamicina.

Folhas jovens de plantas cultivadas em câmara de crescimento, sob condições controladas de temperatura (25°C), umidade, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, foram colhidas, lavadas e rapidamente

imersas em etanol 70%, por 10 segundos, antes de serem esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio 1%, contendo Tween 20 (0.05%), por 10 minutos, sob agitação.

Após esterilização, as folhas foram lavadas seis vezes, com água estéril. Discos foliares de 1 cm de diâmetro, foram cortados sobre filtro de papel estéril, transferidos para placas de Petri, contendo 10 ml da cultura da *Agrobacterium* recombinada, em fase logarítmica de desenvolvimento ($DO_{600nm} = 0,5$ a $0,6$), e incubados por 5 min, com leve agitação manual. Os discos foliares inoculados, foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura MS (APÊNDICE 1), acrescido de vitaminas, 1mg.l^{-1} BAP, $0,1\text{ mg.l}^{-1}$ NAA (Murashige & Skoog 1962; Deroules & Gardner, 1988), por 48h. Após esse período, os discos foram transferidos para esse mesmo meio MS, contendo 500 mg.l^{-1} de carbenicilina, que inibe o desenvolvimento da *Agrobacterium*, e 100 mg.l^{-1} de canamicina, para seleção dos brotos transformantes. Após 4 semanas, os brotos que regeneraram dos calos formados nesse meio seletivo, foram transferidos para meio MS contendo 500 mg.l^{-1} de carbenicilina e 100 mg.l^{-1} de canamicina, mas sem hormônios, de forma a se estimular o enraizamento. Os brotos que enraizaram foram transferidos para vasos contendo 50% de vermiculita e 50% de substrato orgânico, mantidos em câmara de crescimento, sob condições controladas de umidade, luminosidade e temperatura.

3.3 Preparo da *Agrobacterium tumefaciens* para a inoculação

O meio YEP (APÊNDICE 2) foi utilizado para o crescimento de colônias isoladas da *Agrobacterium* recombinada. A este meio foram adicionados 100 mg.l^{-1} de rifampina e 50 mg.l^{-1} de canamicina. Estrias do estoque da bactéria, mantido em glicerol 50% à -80°C , foram feitas em placas de Petri, contendo meio YEP, mantidas à 27°C por aproximadamente 3 dias, até a formação de colônias isoladas.

O meio AB líquido (APÊNDICE 3) foi utilizado para a multiplicação da colônia isolada da bactéria recombinante. Ao meio AB líquido, adicionou-se

canamicina (50 mg.l^{-1}). Uma colônia isolada, proveniente da placa com meio YEP, foi transferida para Erlenmeyer contendo 200 ml de meio AB, onde permaneceu por 48 a 72 horas, a 28° C , sob constante agitação (200 rpm). A densidade da bactéria, foi monitorada por leitura em espectrofotômetro, até a fase logarítmica de crescimento ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,5 \text{ a } 0,6$).

3.4 Gene quimérico

O gene quimérico ilustrado na Figura 7, juntamente com o mapa de restrição, é constituído do gene *Lhcb1*2* de ervilha, e está sob o controle do promotor constitutivo 35S, do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). O peptídeo trânsito da subunidade menor da rubisco, foi inserido na região anterior ao gene *Lhcb1*2*, para direcionamento do polipeptídeo completo, do citoplasma onde este é sintetizado, até o cloroplasto, onde será expresso. O gene marcador de seleção utilizado foi o *nptII* (neomicina fosfotransferase), que confere resistência à canamicina, sob o controle do promotor *nos*, da nopalina sintetase.

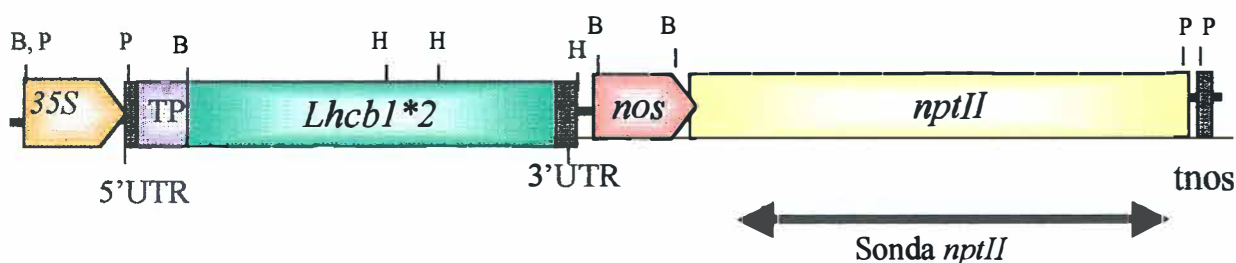


Figura 7 - Gene quimérico utilizado na transformação de plantas de tabaco. 35S: promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor. 5' UTR: região 5' não transcrita derivada do gene *Lhcb1* de ervilha. 3' UTR: região 3' não transcrita. *Lhcb1*: gene *Lhcb1* de ervilha. *nos*: promotor constitutivo da nopalina sintetase. *nptII*: gene da neomicina fosfotransferase, que confere resistência à canamicina. tnos: terminador do gene da nopalina sintetase. Sítios de restrição: B – BamHI, H – HindIII, P – PstI

3.5 Cultivo das plantas transgênicas e selvagens.

Após 40 a 45 dias de germinação, as plântulas com cerca de 2 a 3cm, foram transplantadas do meio de cultura, para vaso com uma mistura, em proporções iguais de vermiculita e substrato orgânico, onde permaneceram até o final dos experimentos e, diariamente, acrescentou-se solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950). Estas plantas foram cultivadas por aproximadamente 1 mês em câmara de crescimento, com temperatura (25°C), fotoperíodo (16 horas de luz) e intensidade luminosa ($200\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) controlados. Quando as plantas atingiram cerca de 30 cm, amostras circulares de 5cm² de tecido foliar, foram coletadas e congeladas rapidamente com nitrogênio líquido. As amostras foram então, armazenadas em freezer a -80°C, para serem utilizadas na extração de DNA e posterior identificação das plantas transgênicas por PCR.

Somente as plantas PCR positivas foram mantidas e transferidas para casa de vegetação, com fornecimento diário de água e solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950). As inflorescências emitidas pelas plantas transgênicas, foram protegidas com sacos de papel, para indução da autofecundação das flores e posterior coleta das sementes para o teste de segregação da progênie.

3.6 Extração do DNA genômico total

O protocolo utilizado foi descrito por Doyle e Doyle (1987), que utiliza o detergente CTAB (brometo de cetil-trietilamônio). Amostras de tecido foliar coletadas e maceradas em nitrogênio líquido foram utilizadas para a extração do DNA. As amostras, foram submetidos à alta condição salina (0,7M NaCl), que forma complexos estáveis, mas solúveis, do DNA com o detergente CTAB. Em seguida, a concentração salina foi reduzida para um valor abaixo de 0,4M, para precipitação dos ácidos nucleicos complexados ao detergente. O precipitado foi então ressuscitado

em solução salina de alta concentração (0,8M NaCl), e armazenado à 5°C por 12 horas (Doyle & Doyle, 1987).

A qualidade das amostras de DNA extraídas, foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando-se 10µl da amostra acrescido de 1µl do tampão da amostra IV (Sambrook et al, 1989)(APÊNDICE 7), em corrida de 40 minutos à 80 Volts, e a quantificação das mesmas, foi feita de forma comparativa ao padrão de peso molecular $\lambda_{\text{integrato}}$ 500ng.ml⁻¹ (Gibco BRL). O tamanho da fita de DNA foi comparado ao marcador de peso molecular λ 1Kb DNA laeder (Gibco BRL).

3.7 Identificação das plantas transformadas por PCR

Discos foliares de 5 cm de diâmetro (100 mg) das plantas (transformantes putativos) que enraizaram em canamicina, foram utilizados para a extração do DNA genômico, para análise das plantas por PCR. “Primers” específicos, para o transgene *Lhcb1*2*, foram utilizados; a descrição detalhada das sequências de nucleotídios (de 5' para 3') e os respectivos produtos de amplificação seguem no AP.

Os sítios de anelamento dos conjuntos de “primers” utilizados nas reações, estão esquematizados na Figura 8. As condições da reação: 94°C por 2 min., seguidos de 30 ciclos de 94°C por 45 seg., 50°C por 30 seg. e 72°C por 2 min., foram utilizadas para a amplificação. 10 µl de cada reação de PCR foram analisados em gel de 1% de agarose, e as bandas visualizadas por coloração com brometo de etídio.

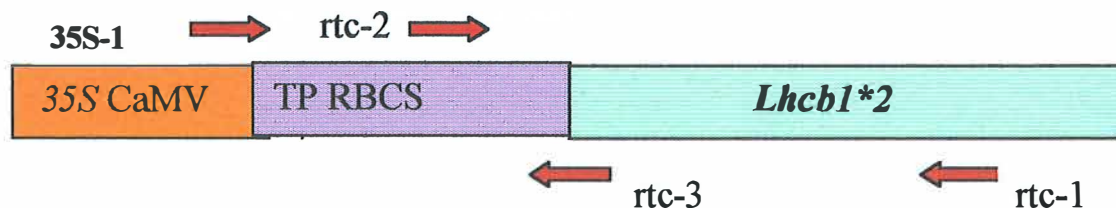


Figura 8 - Construção do gene quimérico e locais de anelamento dos “primers”

Foi utilizado o conjunto de “primers” rtc-1 e rtc-2, cujo produto da amplificação, é uma seqüência de 488 pb, correspondente à região do transgene delimitada pelos “primers”.

3.8 Análise de segregação em canamicina

Dois testes de segregação foram feitos, o primeiro, com a primeira geração de autofecundação (T_1) dos transformantes primários (T_0), para se determinar os transformantes que segregaram 3:1, e o segundo, com a segunda geração de autofecundação (T_2), para a identificação de transformantes homozigotos para o gene de resistência ao antibiótico seletivo. A planta que sofreu originalmente o processo de transformação foi denominada transformante primário (T_0).

A razão da segregação do transgene foi monitorada pela expressão do gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina. Sementes coletadas de plantas transgênicas T_0 , T_1 e T_2 , foram esterelizadas com tratamento de álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%, e lavagens sucessivas com água estéril, antes de serem semeadas em meio MS suplementado com 100 mg.l^{-1} de canamicina. A segregação do locus com o gene quimérico foi obtida, determinando-se a freqüência das sementes T_1 resistentes ao antibiótico após autofecundação. A segregação encontrada foi confirmada pelo teste X^2 com 5% de probabilidade (Derol & Gardner, 1988).

Para a avaliação das progênies, 50 sementes foram semeadas em placas de Petri, com meio MS contendo o agente seletivo, por quarenta dias. As plantas que sobreviveram e se desenvolveram normalmente, foram consideradas resistentes.

3.9 Análise da integração do DNA pela técnica southern blot

Entre as diversas aplicações, a técnica de Southern blot, permite analisar seqüências de DNAs exógenos integradas no genoma vegetal pela *Agrobacterium* ou qualquer outro sistema de transformação genética.

O método utilizado, consiste das seguintes etapas:

- O DNA vegetal extraído das células (10 µg), foi digerido com um excesso (50 unidades) da enzima de restrição HindIII, que corta internamente o transgene nos sítios de restrição, ilustrados na Figura 8.

- Os produtos obtidos pela digestão do DNA foram separados de acordo com o tamanho, por eletroforese em gel de agarose (1%), em corrida de 14 horas, a 35 volts, em tampão TBE 0,5X (APÊNDICE 5)

- O DNA, ainda no gel, foi depurinado em solução de depuração (APÊNDICE 10), desnaturado em solução de desnaturação (APÊNDICE 9) e neutralizado em solução de neutralização (APÊNDICE 8), antes de ser transferido para uma membrana de nylon HybondN⁺ (Amersham, Pharmacia).

- O DNA foi fixado à membrana em alta temperatura (80°C), por 2 horas.

- O DNA fixado à membrana foi hibridizado contra a sonda de DNA do gene *nptII*, utilizando-se o kit da Pharmacia “Gene images random prime labelling module”, para a marcação da mesma com a fluoriscéina, e o kit “Images CDP-Star detection module”, também da Pharmacia, foi utilizado para a detecção dos pontos de hibridização, por sensibilização das chapas de Raio X com a reação luminosa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Regeneração de plantas resistentes à canamicina

Foram realizados dois ensaios de transformação de plantas de tabaco, via inoculação de discos foliares com *Agrobacterium tumefaciens*.

No primeiro ensaio, foram inoculados 408 discos foliares de 1 cm², e no segundo, foram inoculados 356 discos. Sempre juntamente com discos controles, ou seja não inoculados, em meio com agente seletivo, para confirmar a eficiência do antibiótico em inibir as células não transformadas. Um segundo controle foi feito, com discos não inoculados em meio de cultura MS, sem agente seletivo, para analisar a taxa de regeneração dos tecidos de tabaco em ausência do antibiótico, de forma comparativa, para avaliarmos o efeito do antibiótico na regeneração.

Não houve desenvolvimento de calos e brotos, a partir de discos foliares não inoculados em meio com agente seletivo (Figura 9), enquanto que os mesmos discos, desenvolveram calos vigorosos em meio sem agente seletivo (Figura 10), de forma equivalente aos calos formados por discos inoculados em meio com agente seletivo (Figura 11), que formaram brotações resistentes ao agente seletivo, demonstrando a capacidade do antibiótico em selecionar as células transformadas.

Dos 408 discos inoculados no primeiro ensaio, 55 plantas enraizaram em meio com agente seletivo, e no segundo ensaio, 51 plantas resistentes à canamicina foram obtidas.

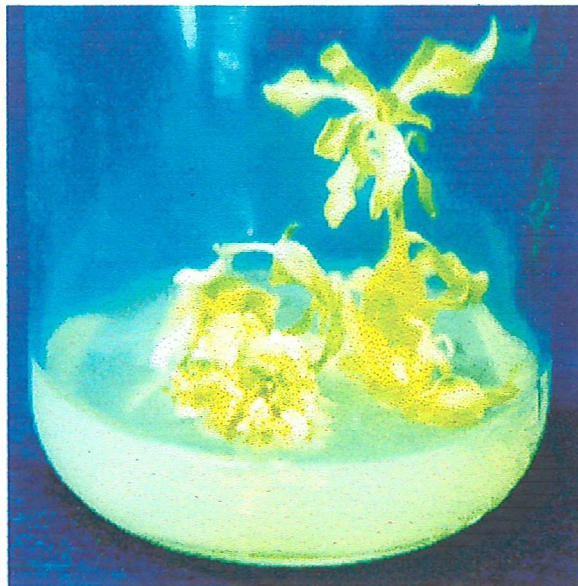


Figura 9 - Regeneração de calos e brotos, a partir de discos foliares não inoculados (controle), em meio com agente seletivo

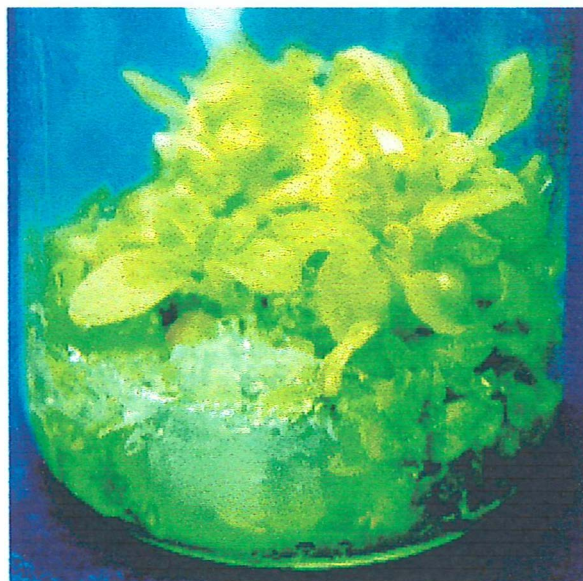


Figura 10 - Regeneração de calos e brotos, a partir de discos foliares não inoculados (controle), em meio sem agente seletivo



Figura 11 - Regeneração de calos e brotos, a partir de discos foliares inoculados, em meio com agente seletivo

Esta alta eficiência de regeneração de plantas, reflete a capacidade do tabaco de ser usado como planta modelo, nos estudos de transformação genética de plantas, pois a metodologia de cultura e regeneração de tecidos está bem estabelecido, além de ser facilmente infectado pelo *Agrobacterium tumefaciens* (Brasileiro et al., 1988).

4.2 Identificação das plantas transgênicas por PCR

Com o DNA das plantas resistentes à canamicina extraído, foi feita a análise por PCR, com todas as plantas que enraizaram em canamicina, tanto as obtidas no primeiro, quanto as obtidas no segundo experimento de transformação. As plantas regeneradas em antibiótico, foram identificadas pelas letras TR (transformante), seguida do número, que identifica como um independente evento de transformação. As plantas resistentes à canamicina, do primeiro experimento, foram numerados de 0 a 99, de acordo com o número do calo de origem, resistente ao agente

seletivo. As plantas resistentes à canamicina originárias do segundo experimento foram numerados a partir de 100, facilitando assim a identificação do experimento de origem de cada transformante. As plantas PCR e Southern blot negativas, foram consideradas escapes (E), ou seja, toleram o antibiótico, mas não apresentam o transgene integrado ao genoma.

As corridas de eletroforese, com o produto da reação de PCR das plantas resistentes à canamicina, juntamente com os controles, estão nas Figuras 12 a 30. Nas plantas PCR positivas, o produto da reação de PCR, com “primers” específicos que flanqueiam o transgene, é de 488 pb (pares de base), tornando uma banda que migra no gel próxima à posição correspondente a 500 pb do marcador de peso molecular 1Kb ladder (Gibco BRL) comprimento dos segmentos de DNA, que podem ser visualizados no gel.

Das 55 plantas resistentes à canamicina, obtidas no primeiro experimento de transformação, somente 36 são PCR positivas para o transgene, e das 51 plantas resistentes à canamicina obtidas no segundo experimento, 35 eram PCR positivas. A grande quantidade de plantas PCR positivas, em relação ao total de plantas resistentes à canamicina, é devido à alta eficiência desse sistema de seleção das células transformadas.

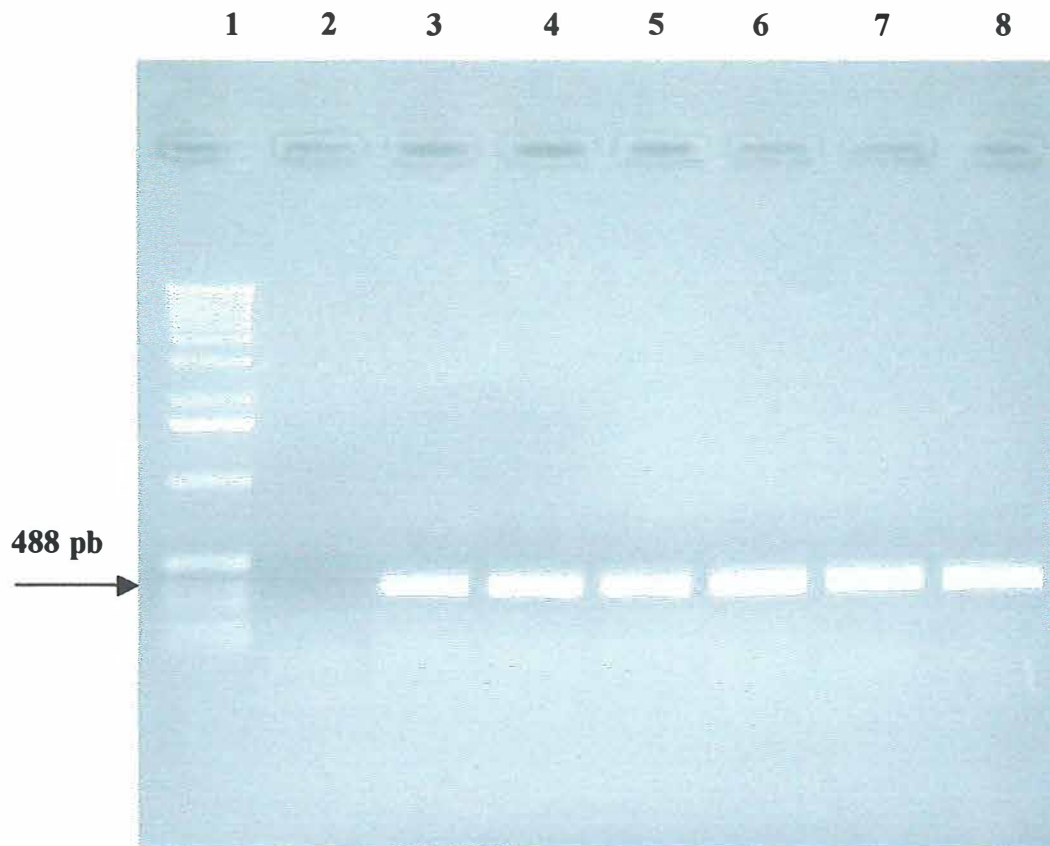


Figura 12 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). Os controles positivos de tabaco transformados (Cab1 e Cab2), obtidos em trabalhos prévios, em nosso laboratório, estão nas linhas 7 e 8, respectivamente. Linhas 3, 4, 5, 6 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, dos transformantes TR-01, TR-17, TR-35 e TR-70, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

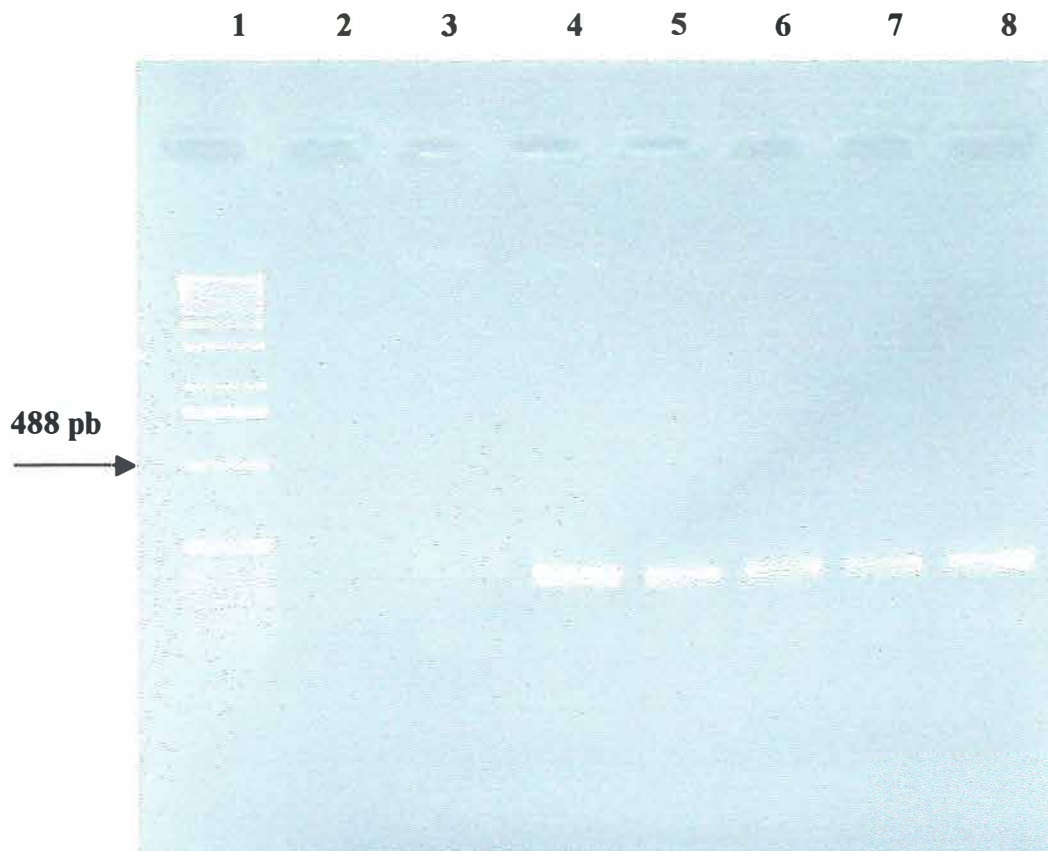


Figura 13 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (Cab2), obtido em estudos prévios, em nosso laboratório, está na linha 8. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, na linha 3 tem-se um escape, e nas linhas seqüentes os transformantes TR-28, TR-30, TR-44 e TR-69, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

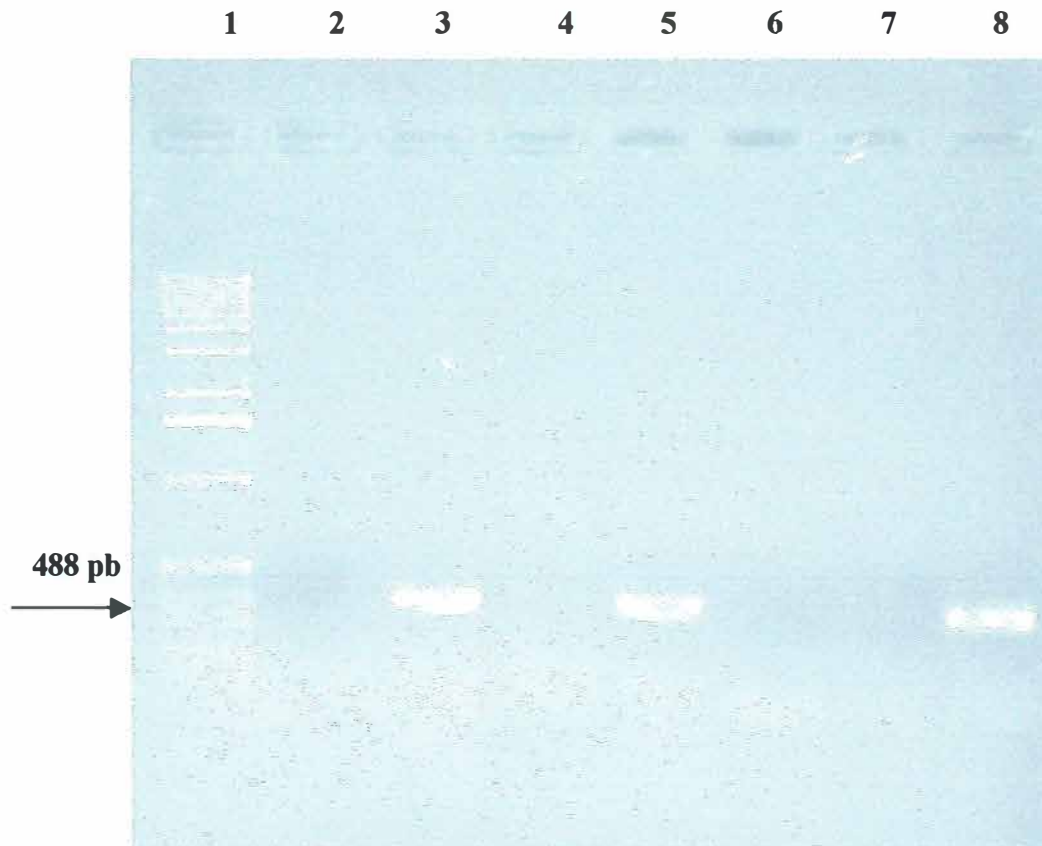


Figura 14 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (Cab2), obtido em estudos prévios, em nosso laboratório, está na linha 8. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, nas linhas 4, 6 e 7 tem-se escapes, e nas linhas 3 e 5 os transformantes TR-78 e TR-89, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

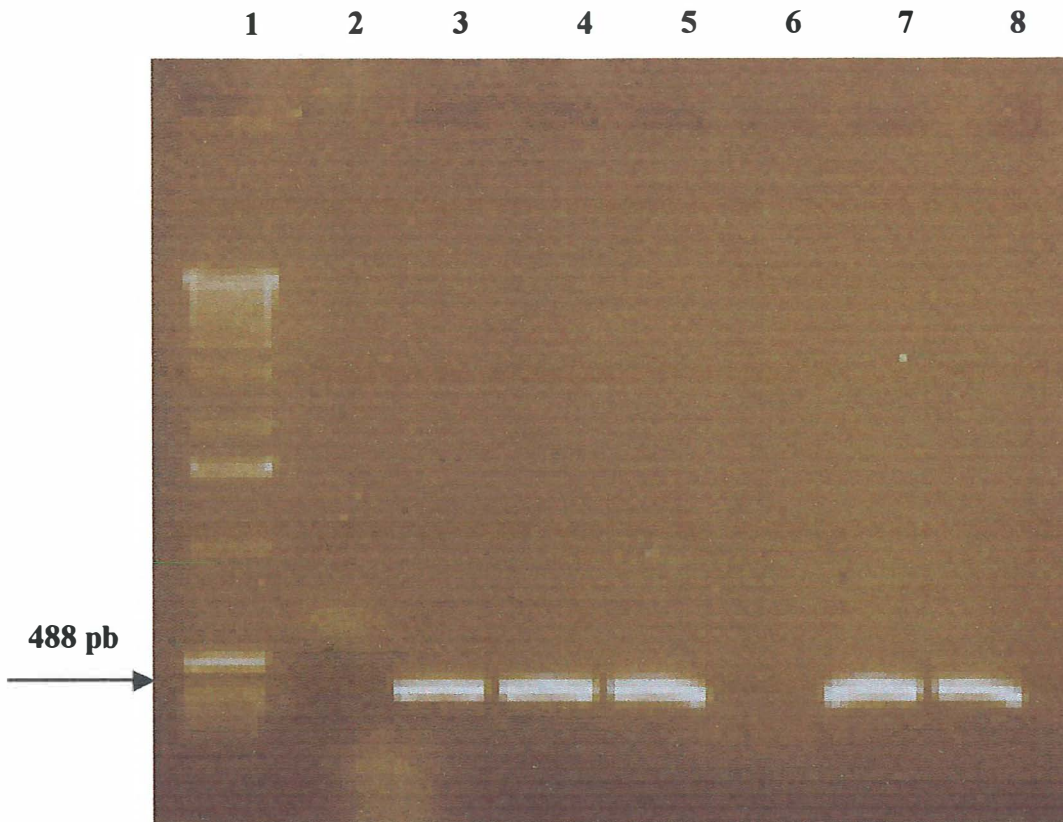


Figura 15 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). Os controles positivos de tabaco transformados (Cab1 e Cab2), obtidos em trabalhos prévios, em nosso laboratório, estão nas linhas 7 e 8, respectivamente. Linhas 3, 4 e 5 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, dos transformantes TR-14, TR-29 e TR-41, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

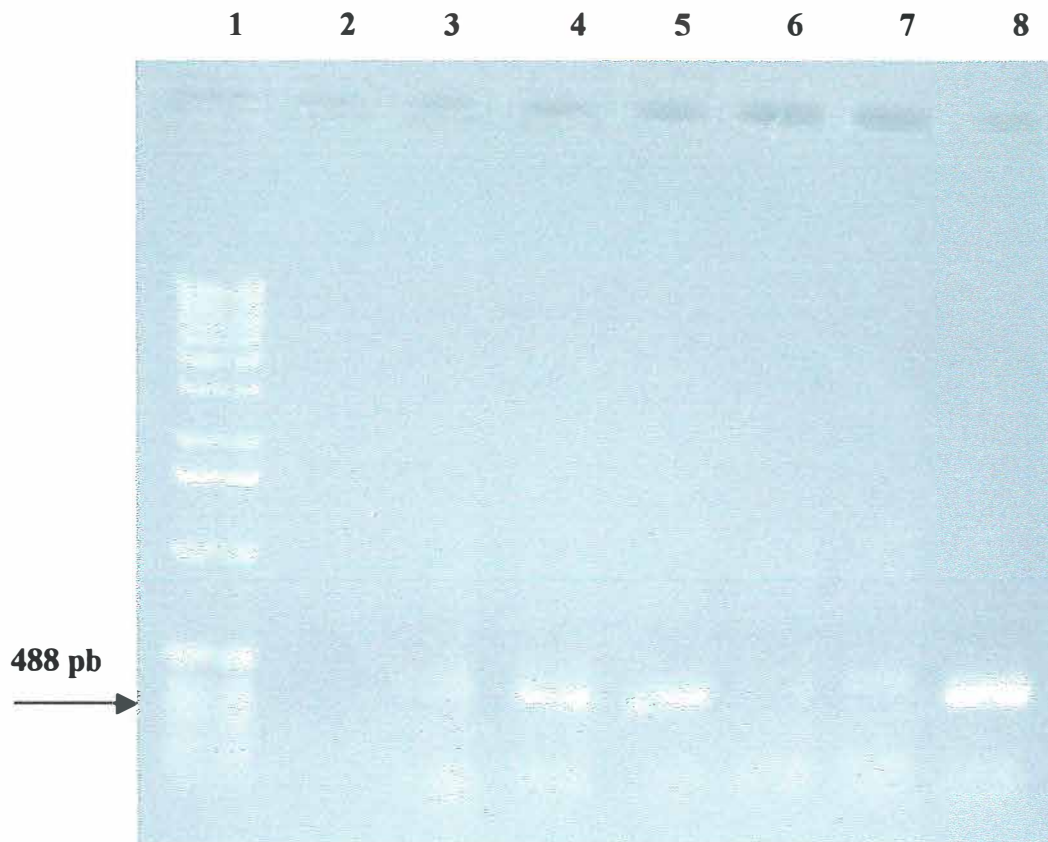


Figura 16 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (Cab2), obtido em estudos prévios, em nosso laboratório, está na linha 8. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, nas linhas 3, 6 e 7, têm-se escapes, nas linhas 4 e 5 estão os transformantes TR-45 e TR-50, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

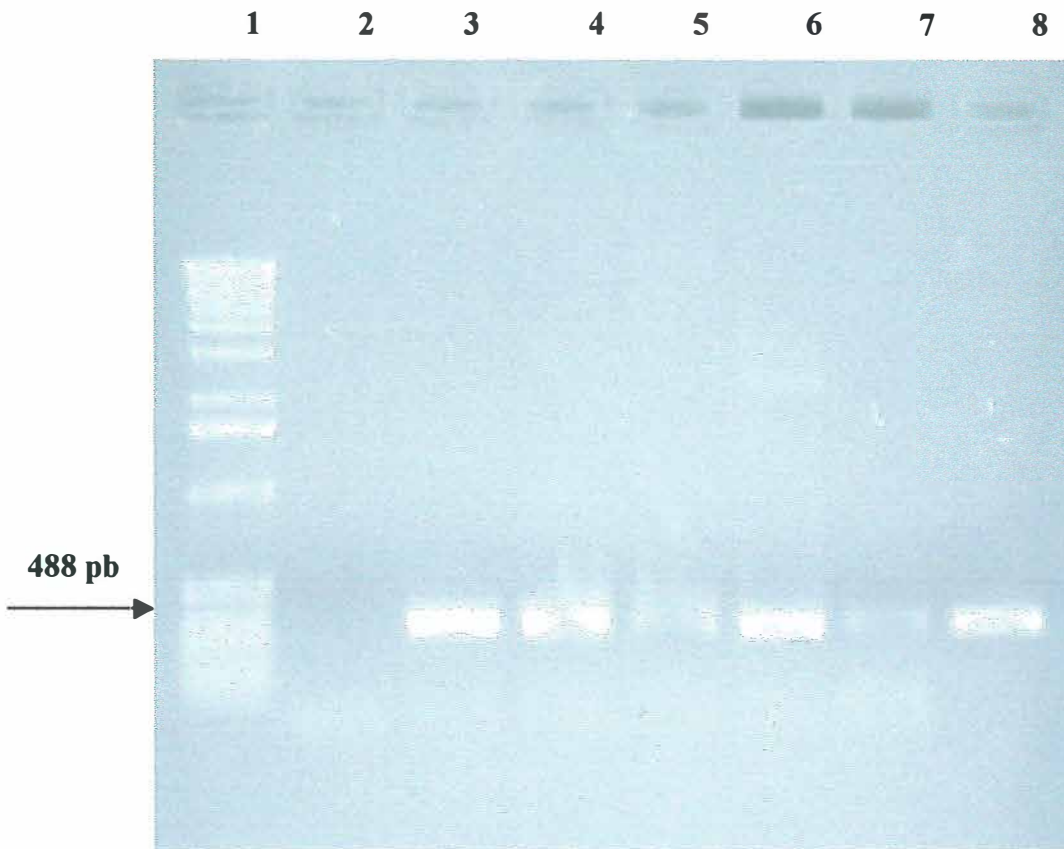


Figura 17 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (Cab2), obtido em estudos prévios, em nosso laboratório, está na linha 8. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, nas linhas 5 e 7, têm-se escapes, nas linhas 3, 4 e 6 estão os transformantes TR-57, TR-65 e TR-72, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

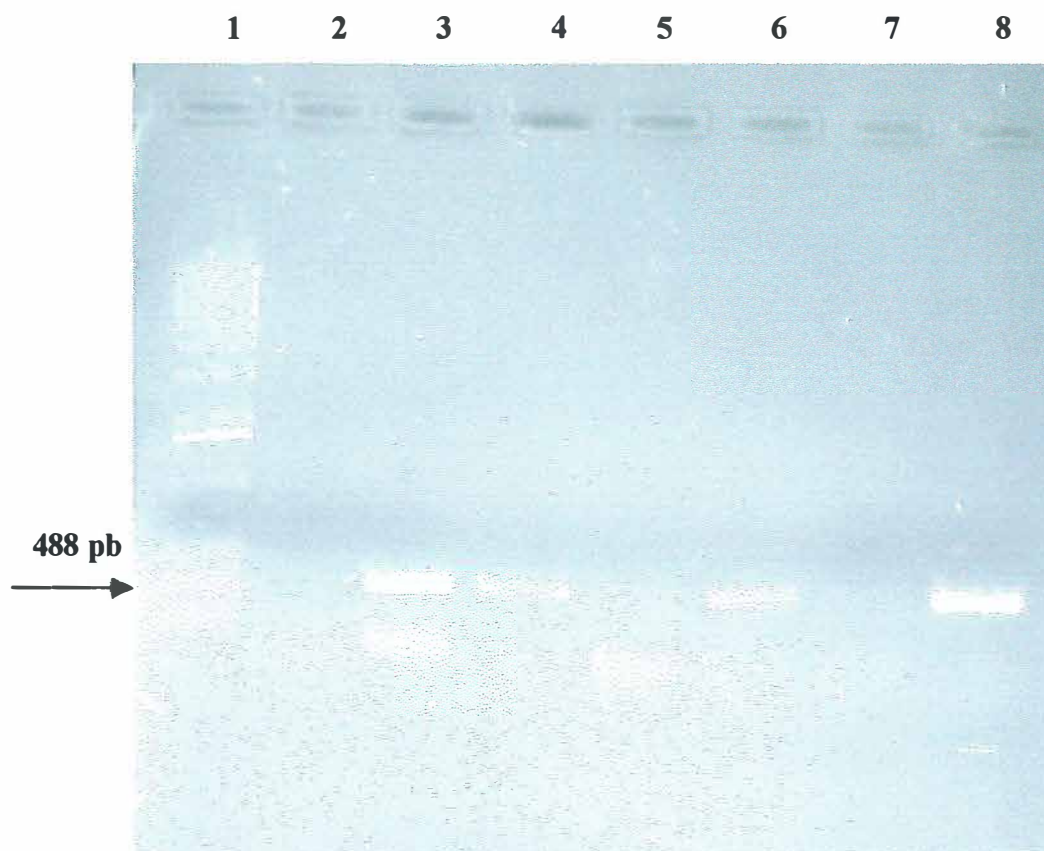


Figura 18 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (Cab2), obtido em estudos prévios, em nosso laboratório, está na linha 8. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, nas linhas 5 e 7, têm-se escapes, nas linhas 3, 4 e 6 estão os transformantes TR-02, TR-10 e TR-18, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

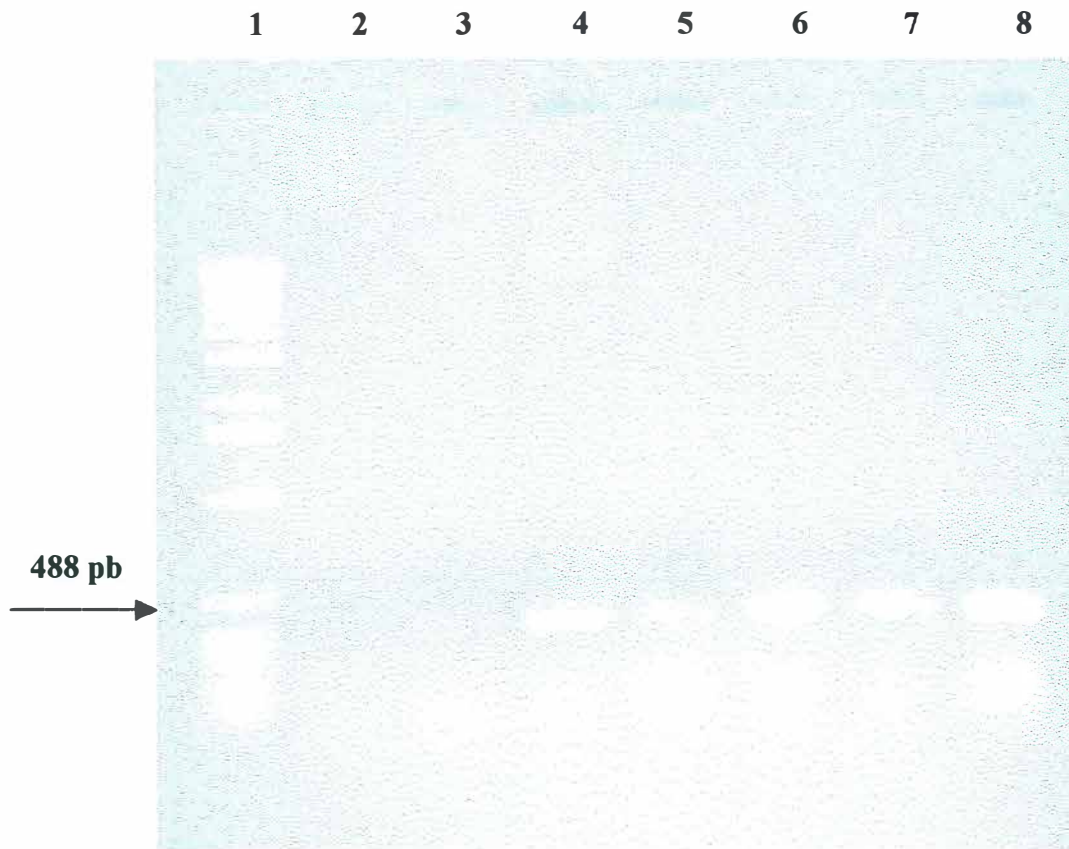


Figura 19 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (*rtc-1* + *rtc-2*). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (*Cab2*), obtido em estudos prévios, em nosso laboratório, está na linha 8. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, na linha 3, têm-se um escape, nas linhas 4, 5, 6 e 7 estão os transformantes TR-56, TR-63, TR-68 e TR-99, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

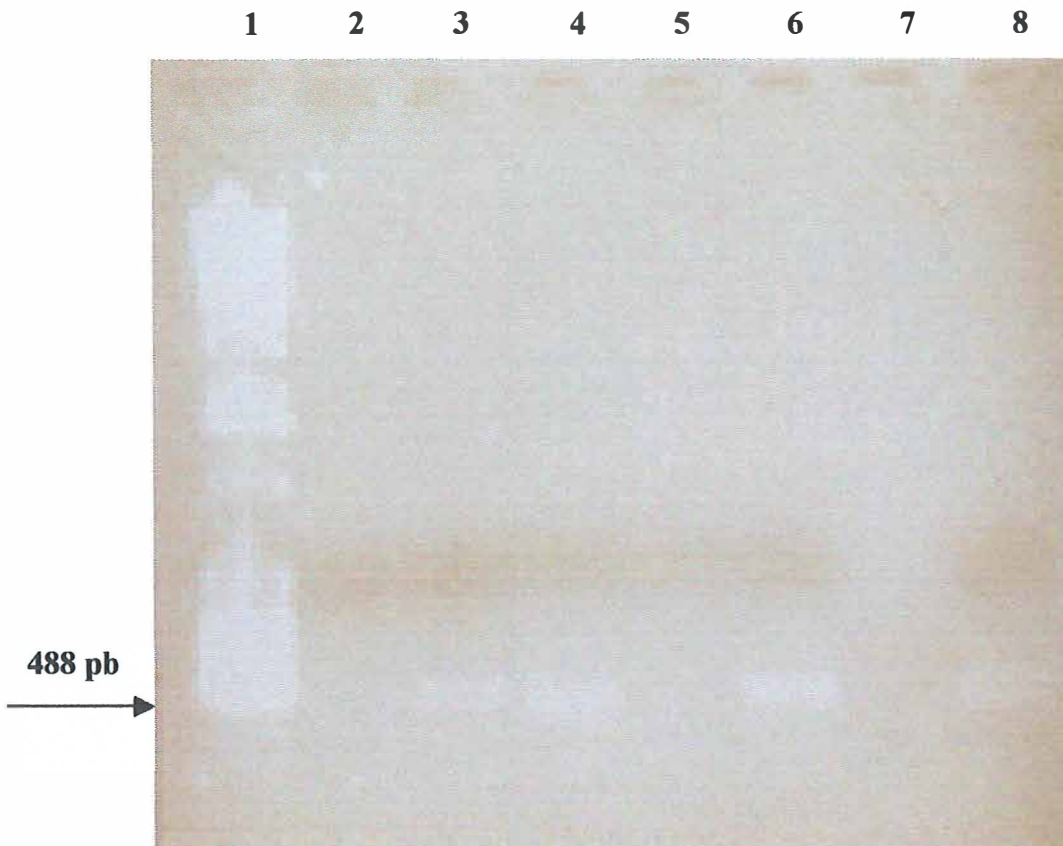


Figura 20 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (Cab1), obtido em estudos prévios, em nosso laboratório, está na linha 8. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, nas linha 5 e 7, têm-se escapes, nas linhas 3, 4 e 6 estão os transformantes TR-22, TR-37 e TR-51, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

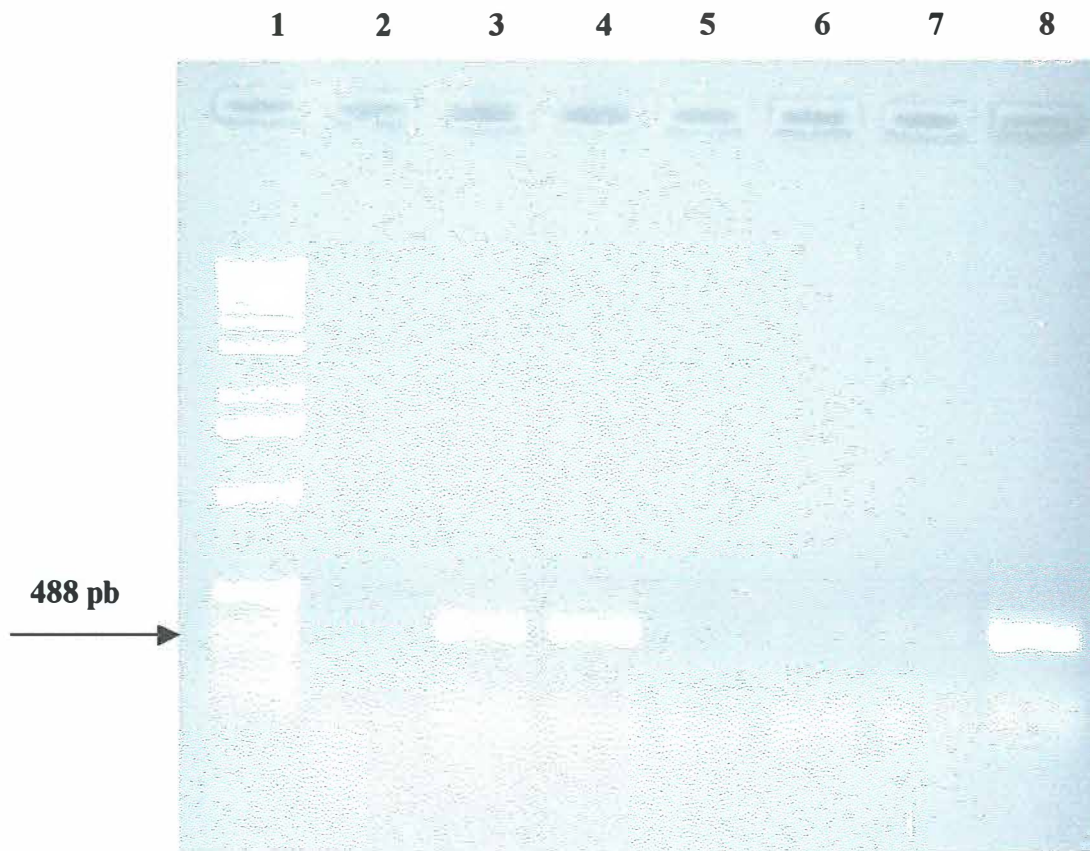


Figura 21 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (Cab1), obtido em estudos prévios, em nosso laboratório, está na linha 8. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, nas linha 5, 6 e 7, têm-se escapes, nas linhas 3 e 4 estão os transformantes TR-06 e TR-09, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

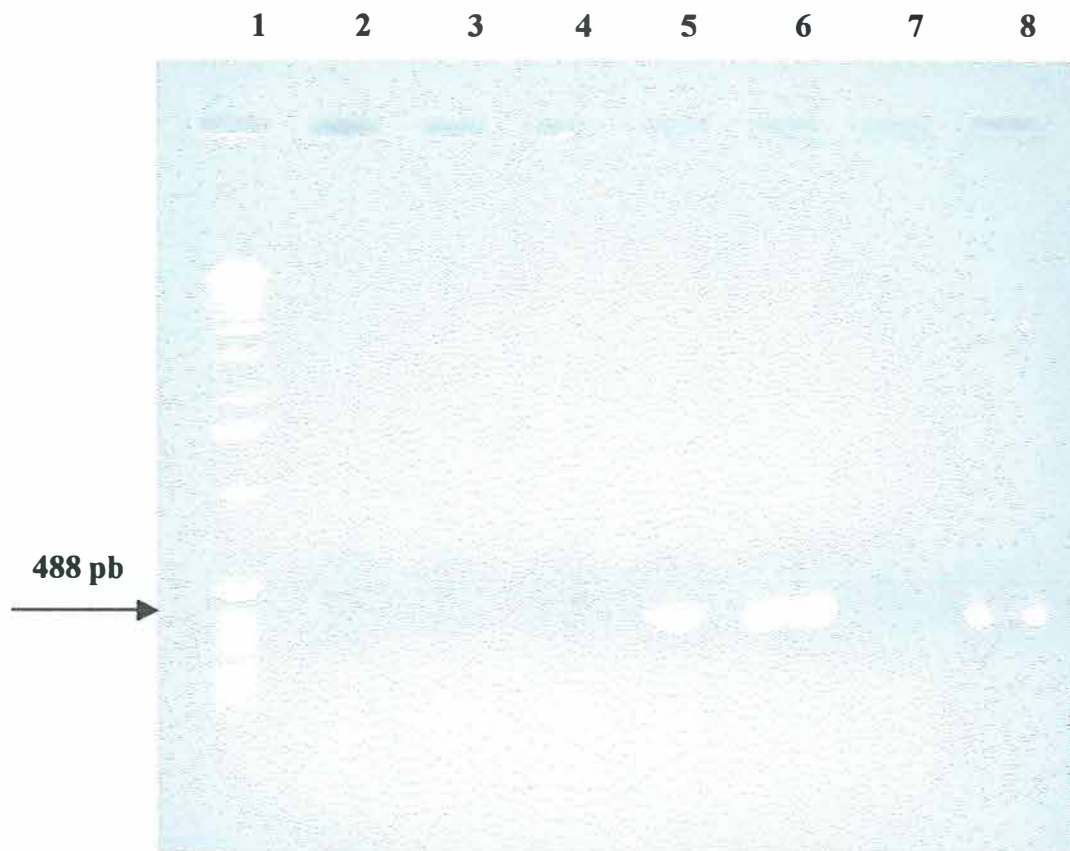


Figura 22 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (Cab1), obtido em estudos prévios, em nosso laboratório, está na linha 8. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, nas linha 3, 4 e 7, têm-se escapes, nas linhas 5 e 6 estão os transformantes TR-71 e TR-75, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

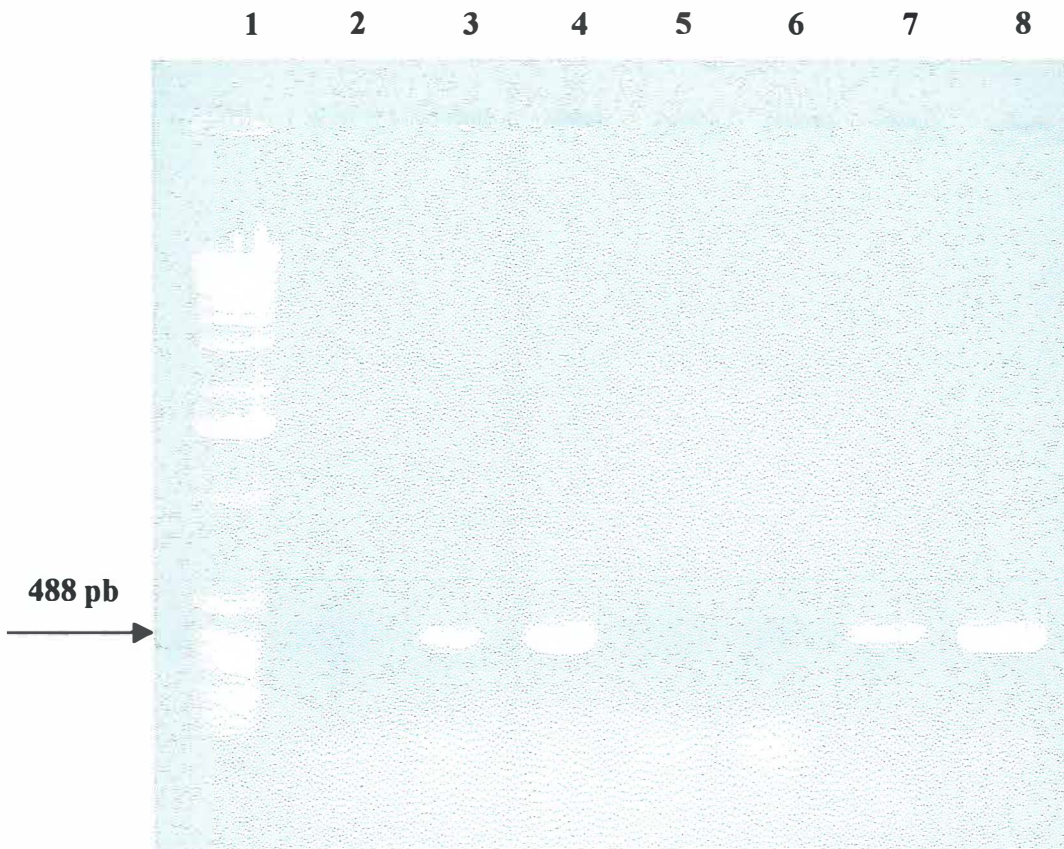


Figura 23 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (Cab1), obtido em estudos prévios, em nosso laboratório, está na linha 8. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, nas linhas 5 e 6, têm-se dois escapes, nas linhas 3, 4 e 7 estão os transformantes TR-19, TR-26 e TR-33, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

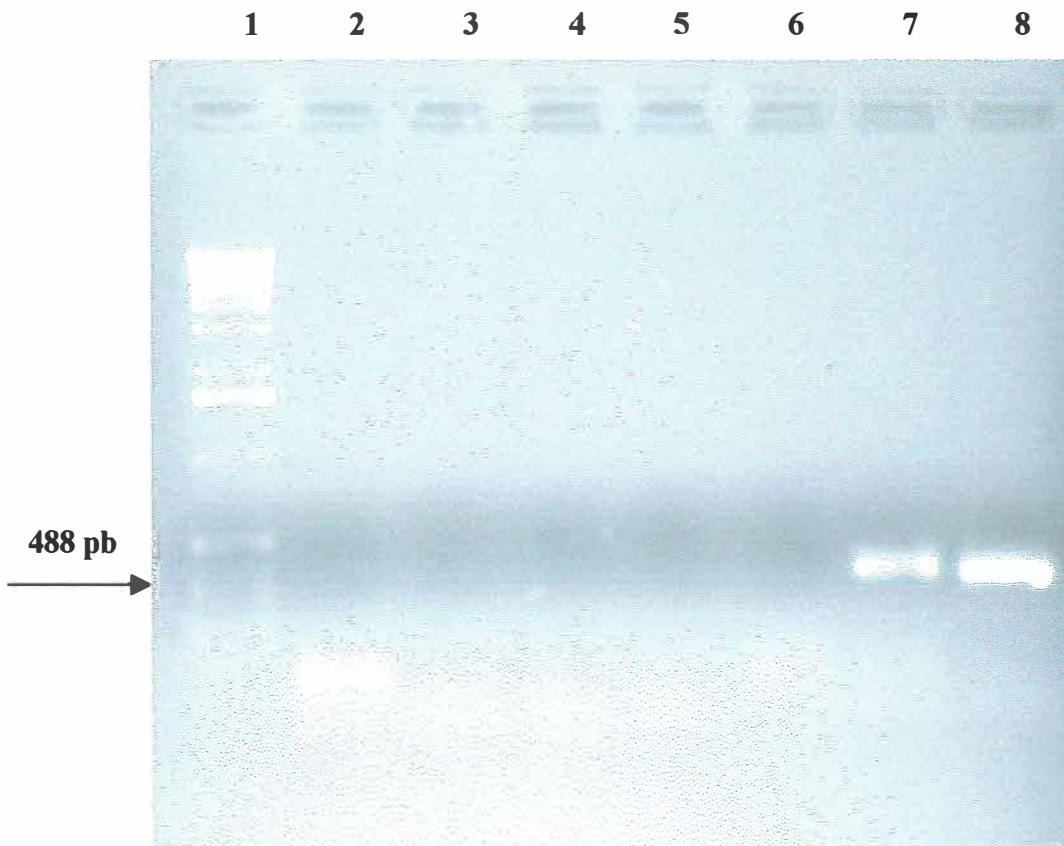


Figura 24 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (Cab1), obtido em estudos prévios, em nosso laboratório, está na linha 8. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, nas linha 3, 4, 5 e 6, têm-se quatro escapes, na linha 7 está o transformante TR-107. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

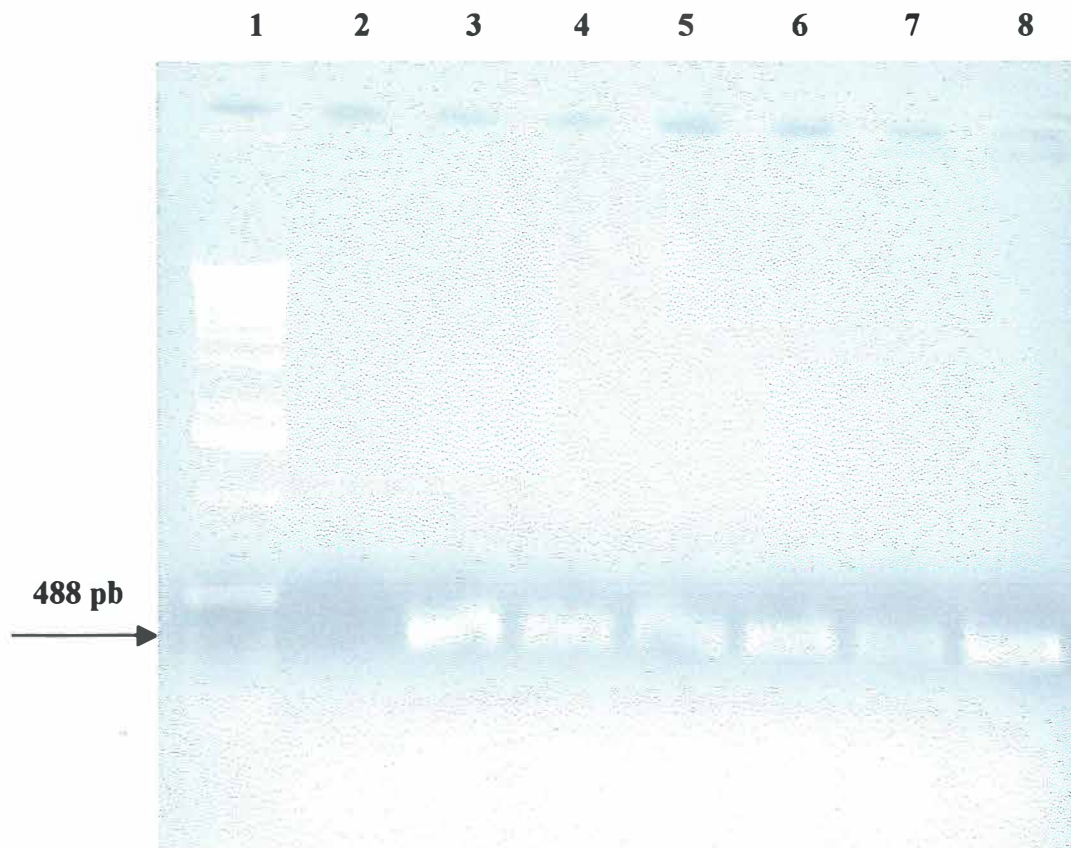


Figura 25 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (*rtc-1* + *rtc-2*). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (*Cab1*), obtido em estudos prévios, em nosso laboratório, está na linha 8. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, dos transformantes TR-109, TR-110, TR-111, TR-112 e TR-113, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

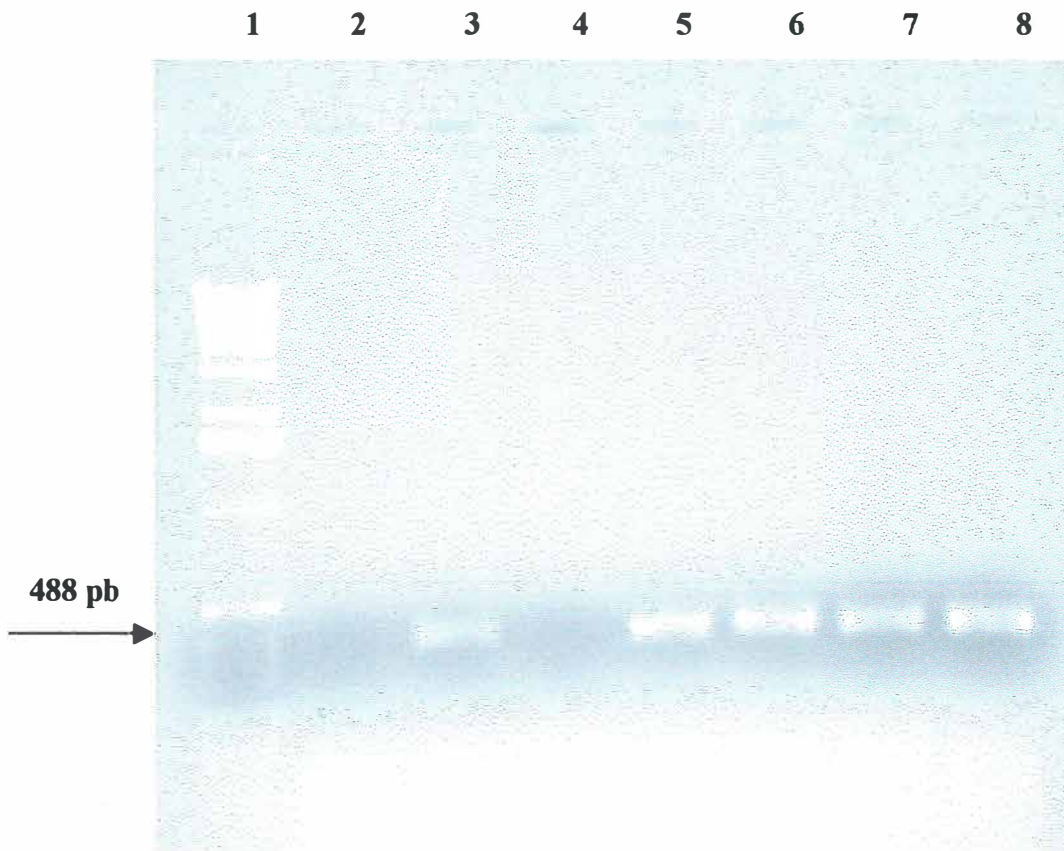


Figura 26 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (Cab1), obtido em estudos prévios, em nosso laboratório, está na linha 8. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, na linha 4 tem-se um escape, e nas linhas 3, 5, 6 e 7 os transformantes TR-115, TR-117, TR-118 e TR-119, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

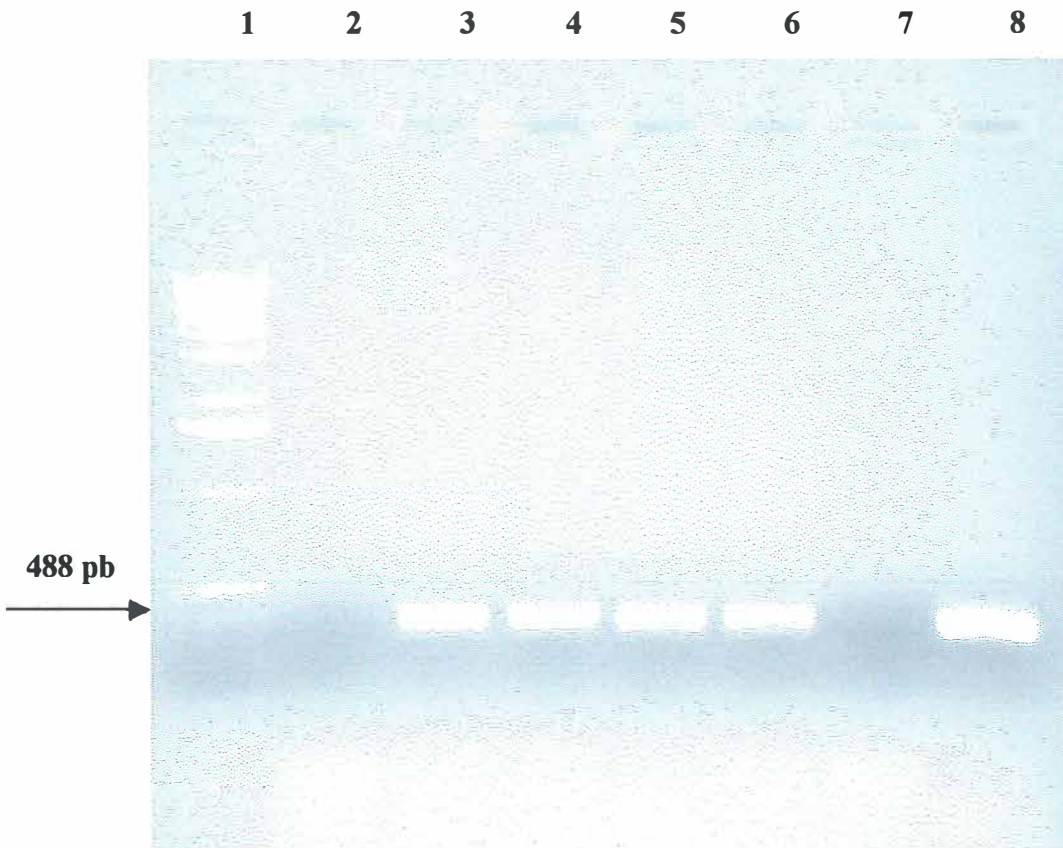


Figura 27 -- Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (Cab2), obtidos em estudos prévios, em nosso laboratório está na linha 8. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, na linha 7 tem-se um escape, e nas linhas 3, 4, 5 e 6 os transformantes TR-121, TR-122, TR-123 e TR-124, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

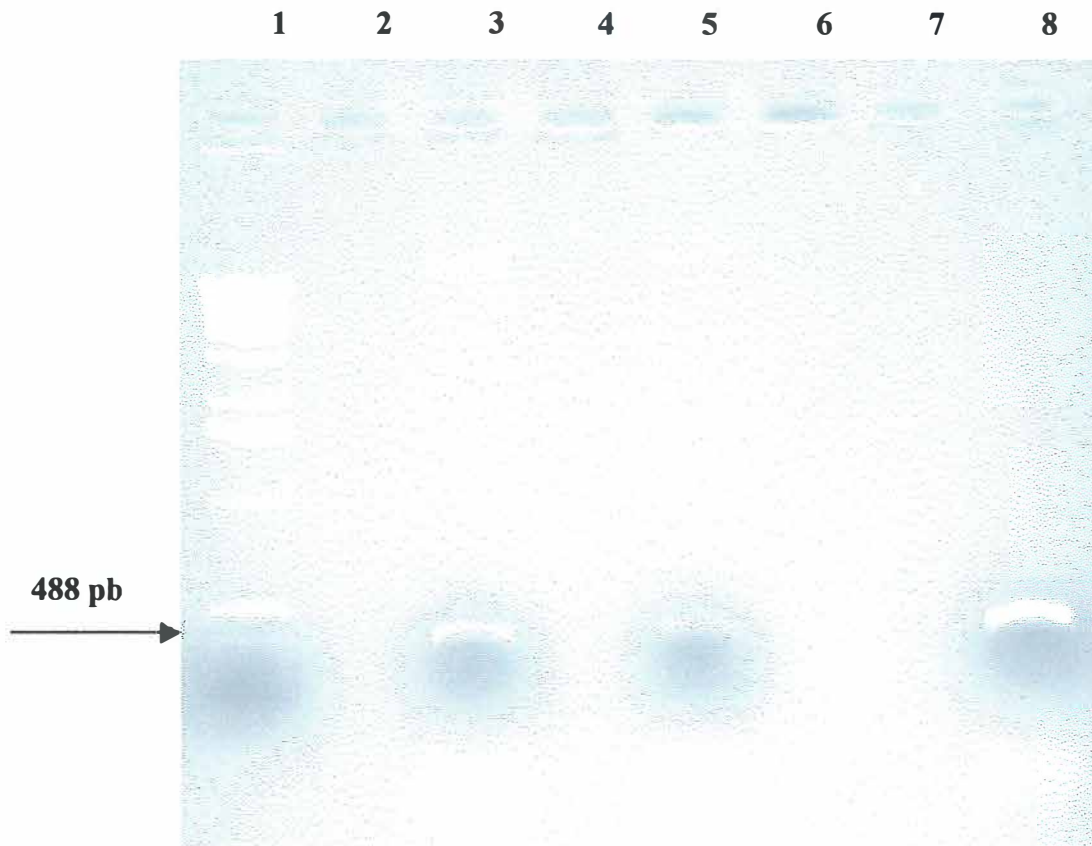


Figura 28 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (Cab2), obtidos em estudos prévios, em nosso laboratório está na linha 8. Linhas 3, 4, 5, 6 e 7 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, na linha 4, 6 e 7 tem-se três escapes, e nas linhas 3 e 5 os transformantes TR-150 e TR-151, respectivamente. O produto de PCR esperado (488 pb) está indicado com a seta

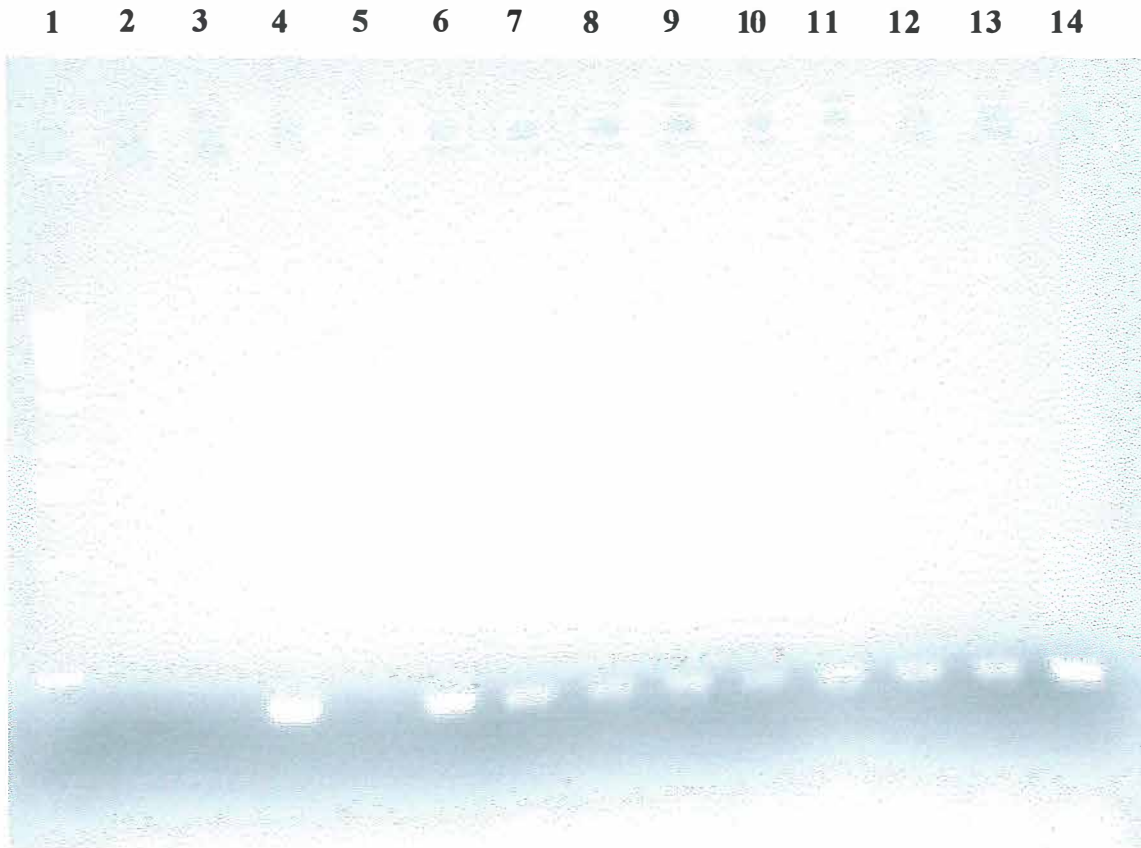


Figura 29 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). Linha 1 refere-se ao padrão de peso molecular (DNA 1Kb, Gibco BRL). A linha 2 refere-se à amostra do tampão usado na reação (sem DNA). O controle positivo de tabaco transgênico (Cab2), obtidos em estudos prévios, em nosso laboratório está na linha 14. Linhas 3 a 13 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, nas linhas 3 e 5 tem-se dois escapes, e nas linhas 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 os transformantes TR-127, TR-129, TR-130, TR-131, TR-132, TR-133, TR-134, TR-136 e TR-137 , respectivamente

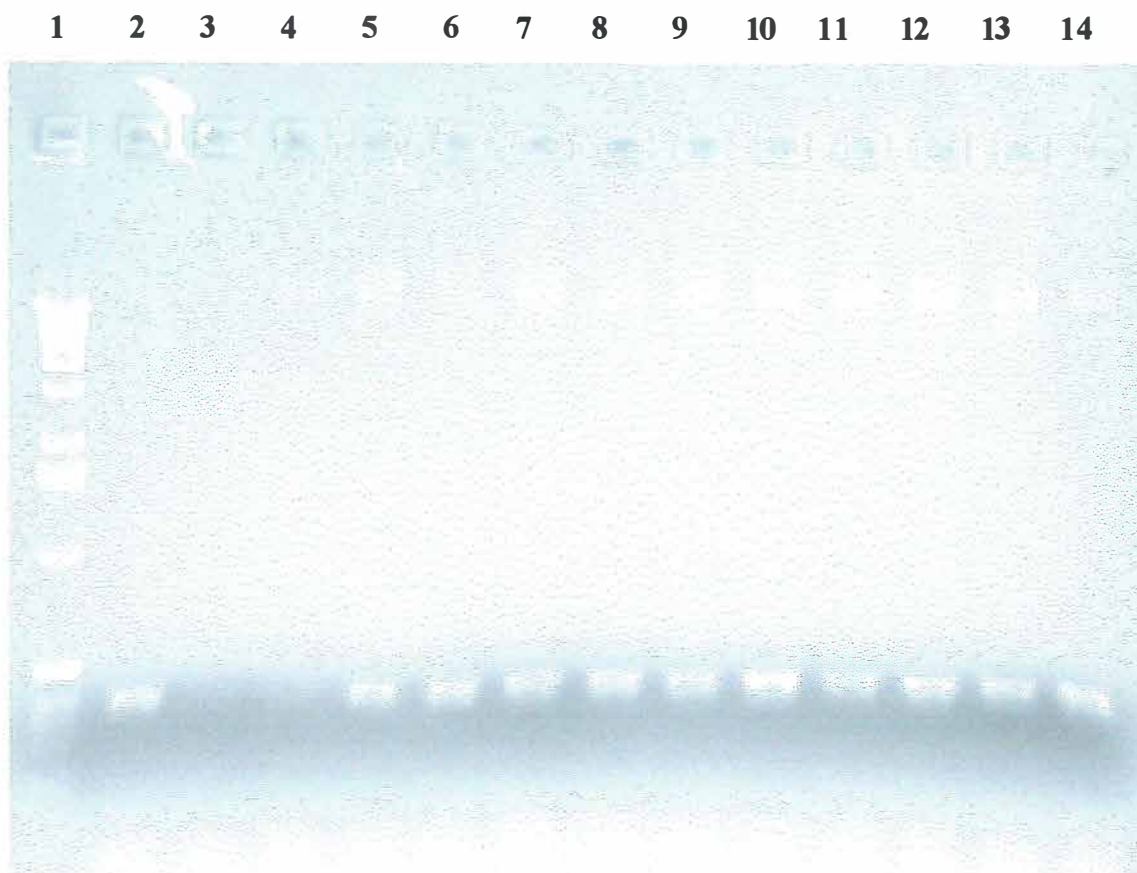


Figura 30 – Separação dos produtos da reação de PCR seguidos de amplificação para o conjunto de “primers” (rtc-1 + rtc-2). O controle positivo de tabaco transgênico (Cab1), obtido em estudos prévios, em nosso laboratório está na linha 14. Linhas 1 a 13 se referem a amostras de plantas resistentes à canamicina, nas linhas 2 e 3 tem-se dois escapes, e nas linhas 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 os transformantes TR-138, TR-141, TR-142, TR-143, TR-144, TR-145, TR-146, TR-147, TR-148 e TR-149, respectivamente

4.3 Teste da progênie T₁ dos transformantes primários (T₀)

Devido ao sistema de transformação utilizado, uma ou mais cópias do transgene podem ser inseridas aleatoriamente no genoma, o que configurará o nível de expressão gênica (Brasileiro, 1988).

Quando uma ou mais cópias do transgene são inseridas no mesmo locus, o transgene será herdado de forma mendeliana, segregando na proporção de 3 plantas com o transgene para 1 sem o transgene. O transgene poderá segregar de maneira mendeliana, mesmo com mais cópias dispersas em diversos locos, se ocorrer o silenciamento das cópias adicionais, e apenas uma cópia for expressa (Bevan et al., 1983; Deroles & Gardner, 1988).

Se o transgene for inserido e se expressar em vários loci, ele será herdado de maneira quantitativa, tendo diversas plantas com o transgene para um pequeno número de plantas sem o transgene na progênie, nessa última, pode-se encontrar, diferentes níveis de resistência (Bevan et al., 1983; Deroles & Gardner, 1988).

Os resultados do teste de segregação, das plantas T₁ (progênie de T₀) (Tabela 1), realizados pelo teste de Qui-quadrado (X^2), a 5% de probabilidade (Tabela 2) mostram o padrão de segregação 3:1.

Denove transformantes que segregaram 3:1, foram utilizadas em trabalhos seguintes, uma vez que, o transgene é herdado de forma qualitativa (Horsch et al., 1984). Este número de transformantes é suficiente para se obter um número necessário de plantas com diferentes níveis de expressão do transgene, para estudos posteriores de expressão gênica.

Tabela 1. Teste de segregação em canamicina com a progênie T₁. Resultados de 200 plantas sementeadas em quatro placas de Petri (repetições), por linhagem transgênica avaliada. TR: transformante; R: resistente à canamicina; S: suscetível à canamicina; NG: não germinado; nd: não determinado

TR	Repetição 1			Repetição 2			Repetição 3			Repetição 4		
	R	S	NG	R	S	NG	R	S	NG	R	S	NG
1	30	11	9	31	11	8	32	9	9	36	12	2
2	17	0	33	32	0	18	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6	9	0	41	5	1	44	16	2	32	9	0	41
9	42	2	6	41	2	7	48	0	2	46	2	2
10	33	9	8	28	9	13	26	7	17	29	7	14
14	14	34	2	35	6	9	nd	nd	nd	nd	nd	nd
17	39	6	5	38	5	7	44	3	3	43	5	2
18	45	1	4	44	4	2	37	4	9	43	1	6
19	16	3	31	11	1	38	11	0	39	10	2	38
22	38	11	1	36	12	2	32	13	5	26	10	14
26	38	12	0	30	13	7	32	11	7	36	12	2
28	41	7	2	44	4	2	46	3	1	43	6	1
29	42	6	2	42	6	2	45	2	3	44	2	4
30	38	8	4	31	14	5	32	11	7	27	10	13
33	28	9	13	36	12	2	31	11	8	31	10	9
35	30	14	6	35	8	7	32	10	8	35	13	2
37	30	11	9	39	8	3	37	12	1	34	10	6
41	28	11	11	36	13	1	36	11	3	37	13	0
44	34	13	3	33	11	6	35	12	3	26	9	15
45	3	0	47	10	6	34	nd	Nd	nd	nd	nd	nd
51	34	11	5	37	11	2	32	10	8	33	11	6
56	24	8	18	32	11	7	36	14	0	35	13	2
57	26	8	16	17	7	26	25	8	17	25	8	17
63	43	5	2	43	4	3	37	3	10	43	3	4
65	30	3	17	33	1	16	32	3	15	27	3	20
69	35	10	5	37	10	3	35	6	9	32	12	6
70	36	10	4	32	10	8	36	7	7	36	6	8
71	30	13	7	36	14	0	17	7	26	13	4	33
72	14	0	36	35	0	15	nd	Nd	nd	nd	nd	nd
75	22	3	25	44	3	3	35	1	14	43	1	6
78	25	13	12	27	11	12	38	5	7	27	10	13
89	35	12	3	33	13	4	32	11	7	35	13	2
99	14	4	32	14	5	31	17	6	27	19	6	25

Tabela 2. Resultado do teste de segregação de T₁ avaliado pelo teste Qui-quadrado a 5% de probabilidade. TR: transformante; R: resistente à canamicina; S: suscetível à canamicina. Resultados de 200 plantas sementeadas em quatro placas de Petri (repetições), por linhagem transgênica avaliada

TR	Total _{observado}		Total _{esperado}		X ² _{calculado}	Segregação 3:1 (FX ² _{5%})
	R	S	R	S		
1	129	43	129	43	0.0000	positivo
2	49	0	36.75	12.25	12.2500	.
6	39	3	31.5	10.5	5.3571	.
9	177	6	137.25	45.75	34.5369	.
10	116	32	111	37	0.6757	positivo
14	49	40	66.75	22.25	14.1601	.
17	164	19	137.25	45.75	15.6407	.
18	169	10	134.25	44.75	26.9846	.
19	48	6	40.5	13.5	4.1667	.
22	132	46	133.5	44.5	0.0506	positivo
26	136	48	138	46	0.0870	positivo
28	174	20	145.5	48.5	16.7474	.
29	173	16	141.75	47.25	20.6680	.
30	128	43	128.25	42.75	0.0015	positivo
33	126	42	126	42	0.0000	positivo
35	132	45	132.75	44.25	0.0127	positivo
37	140	41	135.75	45.25	0.3992	positivo
41	137	48	138.75	46.25	0.0662	positivo
44	128	45	129.75	43.25	0.0708	positivo
45	13	6	14.25	4.75	0.3289	*
51	136	43	134.25	44.75	0.0684	positivo
56	127	46	129.75	43.25	0.1749	positivo
57	93	31	93	31	0.0000	positivo
63	166	15	135.75	45.25	20.2224	.
65	122	10	99	33	16.0303	.
69	139	38	132.75	44.25	0.8828	positivo
70	140	33	129.75	43.25	2.4292	positivo
71	96	38	100.5	33.5	0.6045	positivo
72	49	0	36.75	12.25	12.2500	.
75	144	8	114	38	23.6842	.
78	117	39	117	39	0.0000	positivo
89	135	49	138	46	0.1957	positivo
99	64	21	63.75	21.25	0.0029	Positivo

4.4 Identificação de transformantes homozigotos, através do teste da progênie T₂.

De cada linhagem que apresentou segregação 3:1, foram autofecundada 9 plantas T₁, resistentes à canamicina, para a obtenção de transformantes homozigotos. Esse número de plantas autofecundadas teve como base o mesmo critério de seleção, a probabilidade de uma planta resistente à canamicina, que segrega 3:1, ser homozigota para o transgene é de 33,3%, assim, a probabilidade de encontrar 1 planta homozigota em 9 é de 97,4%.

Dos 19 transformantes que segregaram 3:1, identificou-se plantas homozigotas em 17 eventos de transformação. Como o transgene destas plantas segrega para apenas um locus, e este está em homozigose, então a característica expressa pelo gene ectópico está fixada ao vegetal, e será herdada para toda sua progênie em autofecundações posteriores (Horsch et al, 1984; Derol & Gardner, 1988).

Inicialmente, para alguns transformantes, utilizou-se 3 placas de Petri com 50 plântulas em meio contendo agente seletivo, para testar a progênie T₂ de forma individualizada e posteriormente, utilizou-se somente 2 placas por progênie, por ser um número suficiente de plantas para a análise. Os resultados da análise da resistência das progênies T₂, em meio contendo agente seletivo (Tabelas 3 a 7), e a análise dos resultados pelo teste Qui-quadrado (Tabelas 8 a 11), são apresentados a seguir

Além da identificação das plantas homozigotas, a progênie das plantas heterozigotas confirmou que os transformantes segregam 3:1.

Tabela 3. Resultados do teste de segregação das progênies T₂, dos transformantes (TR) TR-01, TR-10, TR-22 e TR-26. R e S: plântulas resistentes e suscetíveis à canamicina, respectivamente. NG: sementes não germinadas. PL: número da planta T₁ autofecundada. nd: não determinado

TR	PL	Repetição 1			Repetição 2			repetição 3		
		R	S	NG	R	S	NG	R	S	NG
1	1	47	0	3	45	0	5	47	0	3
	2	47	0	3	46	0	4	nd	nd	nd
	3	33	16	1	34	12	4	34	10	6
	4	32	9	9	34	12	4	nd	nd	nd
	5	37	11	2	34	10	6	35	12	3
	7	46	0	4	44	0	6	45	0	5
	9	48	0	2	46	0	4	48	0	2
10	2	40	0	10	30	0	20	nd	nd	nd
	3	32	0	18	35	0	15	nd	nd	nd
	4	45	0	5	42	0	8	nd	nd	nd
	6	30	13	7	15	5	30	nd	nd	nd
	7	29	7	14	18	7	25	nd	nd	nd
	8	34	9	7	35	10	5	nd	nd	nd
	9	32	11	7	35	9	6	nd	nd	nd
22	1	34	12	4	30	8	12	nd	nd	nd
	2	39	0	11	38	0	12	nd	nd	nd
	3	30	7	13	30	8	12	nd	nd	nd
	4	27	9	14	nd	nd	50	nd	nd	nd
	5	25	14	11	nd	nd	50	nd	nd	nd
	6	45	0	5	44	0	6	nd	nd	nd
26	1	36	12	2	35	11	4	nd	nd	nd
	2	36	13	1	33	16	1	nd	nd	nd
	3	33	14	3	34	14	2	nd	nd	nd
	4	43	0	7	47	0	3	nd	nd	nd
	5	33	0	17	36	0	14	nd	nd	nd
	6	45	0	5	46	0	4	nd	nd	nd
	7	33	17	0	36	11	3	nd	nd	nd
	8	30	10	10	30	18	2	nd	nd	nd

Tabela 4. Resultados do teste de segregação das progênies T₂, dos transformantes (TR) TR-30, TR-33, TR-35 e TR-37. R e S: plântulas resistentes e suscetíveis à canamicina, respectivamente. NG: sementes não germinadas. PL: número da planta T₁ autofecundada. nd: não determinado

TR	PL	Repetição 1			Repetição 2			Repetição 3		
		R	S	NG	R	S	NG	R	S	NG
30	1	30	11	9	30	12	8	nd	nd	nd
	2	27	10	13	22	12	16	nd	nd	nd
	3	35	12	3	34	9	7	nd	nd	nd
	4	33	9	8	29	11	10	nd	nd	nd
	5	30	16	4	29	9	12	nd	nd	nd
	7	34	11	5	nd	nd	50	nd	nd	nd
	33	1	37	9	4	38	8	4	nd	nd
2		34	13	3	35	12	3	nd	nd	nd
3		35	13	2	38	9	3	nd	nd	nd
4		36	11	3	40	7	3	nd	nd	nd
5		30	14	6	35	10	5	nd	nd	nd
7		34	13	3	39	10	1	nd	nd	nd
8		32	10	8	29	7	14	nd	nd	nd
9		44	0	6	43	0	7	nd	nd	nd
35		1	42	0	8	47	0	3	nd	nd
	2	19	7	24	12	3	35	nd	nd	nd
	4	24	12	14	10	2	38	nd	nd	nd
	5	38	9	3	30	18	2	nd	nd	nd
	6	37	8	5	30	16	4	nd	nd	nd
	7	19	0	31	22	0	28	nd	nd	nd
	8	35	10	5	36	10	4	nd	nd	nd
	9	43	0	7	36	0	14	nd	nd	nd
	37	1	29	11	10	36	13	1	nd	nd
2		38	0	12	42	0	8	nd	nd	nd
4		33	15	2	38	9	3	nd	nd	nd
5		34	13	3	37	10	3	nd	nd	nd

Tabela 5. Resultados do teste de segregação das progênies T₂, dos transformantes (TR) TR-41, TR-44, TR-51 e TR-56. R e S: plântulas resistentes e suscetíveis à canamicina, respectivamente. NG: sementes não germinadas. PL: número da planta T₁ autofecundada. nd: não determinado

TR	PL	Repetição 1			Repetição 2			Repetição 3		
		R	S	NG	R	S	NG	R	S	NG
41	1	36	11	3	38	6	6	nd	nd	nd
	2	29	13	8	39	7	4	nd	nd	nd
	3	31	14	5	37	9	4	nd	nd	nd
	4	30	8	12	24	4	22	nd	nd	nd
	5	36	11	3	35	13	2	nd	nd	nd
	6	32	13	5	35	10	5	nd	nd	nd
	8	47	0	3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	44	1	36	9	5	34	11	5	nd	nd
3		36	12	2	34	10	6	35	12	3
4		47	0	3	32	0	18	40	0	10
5		35	13	2	40	7	3	nd	nd	nd
7		34	9	7	32	12	6	33	8	9
9		32	11	7	36	9	5	35	11	4
51	1	45	0	5	40	0	10	nd	nd	nd
	2	36	10	4	36	12	2	nd	nd	nd
	3	47	0	3	46	0	4	nd	nd	nd
	4	28	12	10	29	13	8	nd	nd	nd
	7	29	12	9	35	8	7	nd	nd	nd
	8	30	13	7	38	11	1	nd	nd	nd
	9	46	0	4	44	0	6	nd	nd	nd
	56	1	37	10	3	32	16	2	nd	nd
2		43	0	7	49	0	1	nd	nd	nd
3		36	8	6	34	10	6	nd	nd	nd
4		44	0	6	46	0	4	nd	nd	nd
5		30	19	1	42	0	8	nd	nd	nd
6		49	0	1	48	0	2	nd	nd	nd
7		36	0	14	41	0	9	nd	nd	nd
8		32	12	6	31	15	4	nd	nd	nd

Tabela 6. Resultados do teste de segregação das progênies T₂, dos transformantes (TR) TR-57, TR-69, TR-70 e TR-71. R e S: plântulas resistentes e suscetíveis à canamicina, respectivamente. NG: sementes não germinadas. PL: número da planta T₁ autofecundada. nd: não determinado

TR	PL	Repetição 1			Repetição 2			Repetição 3		
		R	S	NG	R	S	NG	R	S	NG
57	2	32	13	5	37	12	1	nd	nd	nd
	3	46	0	4	45	0	5	nd	nd	nd
	4	30	12	8	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	5	49	0	1	47	0	3	nd	nd	nd
	6	50	0	0	48	0	2	nd	nd	nd
	7	43	0	7	38	0	12	nd	nd	nd
	8	50	0	0	46	0	4	nd	nd	nd
	69	2	47	0	3	45	0	5	nd	nd
3		25	10	15	38	12	0	nd	nd	nd
4		38	9	3	36	12	2	nd	nd	nd
6		37	9	4	33	13	4	nd	nd	nd
7		32	14	4	28	16	6	nd	nd	nd
8		43	0	7	38	0	12	nd	nd	nd
70	1	45	0	5	44	0	6	nd	nd	nd
	2	28	13	9	24	14	12	nd	nd	nd
	3	36	0	14	48	0	2	nd	nd	nd
	5	25	11	14	31	9	10	nd	nd	nd
	6	24	18	8	30	13	7	nd	nd	nd
	7	30	0	20	37	0	13	nd	nd	nd
	8	27	7	16	25	12	13	nd	nd	nd
	71	1	39	0	11	38	0	12	nd	nd
2		9	2	39	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3		8	7	35	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4		44	0	6	49	0	1	nd	nd	nd
5		35	11	4	34	14	2	nd	nd	nd
6		35	13	2	26	8	16	nd	nd	nd
7		38	10	2	31	16	3	nd	nd	nd

Tabela 7. Resultados do teste de segregação das progênies T₂, dos transformantes (TR) TR-78, TR-89 e TR-99. R e S: plântulas resistentes e suscetíveis à canamicina, respectivamente. NG: sementes não germinadas. PL: número da planta T₁ autofecundada. nd: não determinado

TR	PL	PLACA 1			PLACA 2			PLACA 3		
		R	S	NG	R	S	NG	R	S	NG
78	6	38	7	5	33	16	1	nd	nd	nd
	7	36	12	2	33	14	3	nd	nd	nd
	9	36	12	2	34	14	2	nd	nd	nd
89	1	45	0	5	46	0	4	48	0	2
	2	36	14	0	35	11	4	30	14	6
	4	37	11	2	35	9	6	32	14	4
	5	48	0	2	46	0	4	44	0	6
	6	48	0	2	43	0	7	45	0	5
	7	43	0	7	44	0	6	42	0	8
	8	36	8	6	34	14	2	34	10	6
	9	31	13	6	35	14	1	39	8	3
	99	1	41	0	9	nd	nd	nd	nd	nd
2		39	0	11	10	0	40	nd	nd	nd
3		36	12	2	35	13	2	nd	nd	nd
4		35	8	7	33	13	4	nd	nd	nd
5		35	12	3	38	12	0	nd	nd	nd
6		47	0	3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7		36	11	3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8		38	10	2	31	17	2	nd	nd	nd

Tabela 8. Resultados do teste de segregação de T_2 , avaliado pelo teste Qui-quadrado a 5% de probabilidade ($FX^2_{5\%}$). PL: número da planta T_1 autofecundada. TR: evento de transformação. R e S: plântulas resistentes e suscetíveis à canamicina, respectivamente

TR	PL	Total _{observado}		Total _{esperado}		$X^2_{calculado}$	Homozigose ($FX^2_{5\%}$)	
		R	S	R	S			
1	1	139	0	139	0	0	Positiva	
	2	93	0	93	0	0	Positiva	
	3	101	38	139	0	722	.	
	4	66	21	87	0	220,5	.	
	5	106	33	139	0	544,5	.	
	7	135	0	135	0	0	Positiva	
	9	142	0	142	0	0	Positiva	
	10	2	70	0	70	0	0	Positiva
		3	67	0	67	0	0	Positiva
4		87	0	87	0	0	Positiva	
6		45	18	63	0	162	.	
7		47	14	61	0	98	.	
8		69	19	88	0	180,5	.	
9		67	20	87	0	200	.	
22		1	64	20	84	0	200	.
		2	77	0	77	0	0	Positiva
	3	60	15	75	0	112,5	.	
	4	27	9	36	0	40,5	.	
	5	25	14	39	0	98	.	
	6	89	0	89	0	0	Positiva	
26	1	71	23	94	0	264,5	.	
	2	69	29	98	0	420,5	.	
	3	67	28	95	0	392	.	
	4	90	0	90	0	0	Positiva	
	5	69	0	69	0	0	Positiva	
	6	91	0	91	0	0	Positiva	
	7	69	28	97	0	392	.	
	8	60	28	88	0	392	.	

Tabela 9. Resultados do teste de segregação de T₂, avaliado pelo teste Qui-quadrado a 5% de probabilidade (FX²_{5%}). PL: número da planta T₁ autofecundada. TR: evento de transformação. R e S: plântulas resistentes e suscetíveis à canamicina, respectivamente

TR	PL	Total _{observado}		Total _{esperado}		X ² _{calculado}	Homozigose (FX ² _{5%}).
		R	S	R	S		
30	1	60	23	83	0	264,5	.
	2	49	22	71	0	242	.
	3	69	21	90	0	220,5	.
	4	62	20	82	0	200	.
	5	59	25	84	0	312,5	.
	7	34	11	45	0	60,5	.
33	1	75	17	92	0	144,5	.
	2	69	25	94	0	312,5	.
	3	73	22	95	0	242	.
	4	76	18	94	0	162	.
	5	65	24	89	0	288	.
	7	73	23	96	0	264,5	.
	8	61	17	78	0	144,5	.
	9	87	0	87	0	0	Positiva
35	1	89	0	89	0	0	Positiva
	2	31	10	41	0	50	.
	4	34	14	48	0	98	.
	5	68	27	95	0	364,5	.
	6	67	24	91	0	288	.
	7	41	0	41	0	0	Positiva
	8	71	20	91	0	200	.
	9	79	0	79	0	0	Positiva
	37	1	65	24	89	0	288
2		80	0	80	0	0	Positiva
4		71	24	95	0	288	.
5		71	23	94	0	264,5	.

Tabela 10. Resultados do teste de segregação de T₂, avaliado pelo teste Qui-quadrado a 5% de probabilidade (FX²_{5%}). PL: número da planta T₁ autofecundada. TR: evento de transformação. R e S: plântulas resistentes e suscetíveis à canamicina, respectivamente

TR	PL	Total _{observado}		Total _{esp}		X ² _{calculado}	Homozi gose (FX ² _{5%})
		R	S	R	S		
41	1	74	17	91	0	144,5	.
	2	68	20	88	0	200	.
	3	68	23	91	0	264,5	.
	4	54	12	66	0	72	.
	5	71	24	95	0	288	.
	6	67	23	90	0	264,5	.
	8	47	0	47	0	0	Positiva
	44	1	70	20	90	0	200
3		105	34	139	0	578	.
4		119	0	119	0	0	Positiva
5		75	20	95	0	200	.
7		99	29	128	0	420,5	.
9		103	31	134	0	480,5	.
51	1	85	0	85	0	0	Positiva
	2	72	22	94	0	242	.
	3	93	0	93	0	0	Positiva
	4	57	25	82	0	312,5	.
	7	64	20	84	0	200	.
	8	68	24	92	0	288	.
	9	90	0	90	0	0	Positiva
	56	1	69	26	95	0	338
2		92	0	92	0	0	Positiva
3		70	18	88	0	162	.
4		90	0	90	0	0	Positiva
5		72	19	91	0	180,5	.
6		97	0	97	0	0	Positiva
7		77	0	77	0	0	Positiva
8		63	27	90	0	364,5	.

Tabela 11. Resultados do teste de segregação de T₂, avaliado pelo teste Qui-quadrado a 5% de probabilidade (FX²_{5%}). PL: número da planta T₁ autofecundada. TR: evento de transformação. R e S: plântulas resistentes e suscetíveis à canamicina, respectivamente

TR	PL	Total _{observado}		Total _{esperado}		X ² _{calculado}	Homozigose (FX ² _{5%})
		R	S	R	S		
57	2	69	25	94	0	312,5	.
	3	91	0	91	0	0	Positiva
	4	30	12	42	0	72	.
	5	96	0	96	0	0	Positiva
	6	98	0	98	0	0	Positiva
	7	81	0	81	0	0	Positiva
	8	96	0	96	0	0	Positiva
	69	2	92	0	92	0	0
3		63	22	85	0	242	.
4		74	21	95	0	220,5	.
6		70	22	92	0	242	.
7		60	30	90	0	450	.
8		81	0	81	0	0	Positiva
70	1	89	0	89	0	0	Positiva
	2	52	27	79	0	364,5	.
	3	84	0	84	0	0	Positiva
	5	56	20	76	0	200	.
	6	54	31	85	0	480,5	.
	7	67	0	67	0	0	Positiva
	8	52	19	71	0	180,5	.
	71	1	77	0	77	0	0
3		8	7	15	0	24,5	.
4		93	0	93	0	0	Positiva
5		69	25	94	0	312,5	.
6		61	21	82	0	220,5	.
7		69	26	95	0	338	.

Tabela 12. Resultados do teste de segregação de T₂, avaliado pelo teste Qui-quadrado a 5% de probabilidade (FX²_{5%}). PL: número da planta T₁ autofecundada. TR: evento de transformação. R e S: plântulas resistentes e suscetíveis à canamicina, respectivamente

TR	PL	Total _{observado}		Total _{esperado}		X ² _{calculado}	Homozigose (FX ² _{5%})
		R	S	R	S		
78	6	71	23	94	0	264,5	.
	7	69	26	95	0	338	.
	9	70	26	96	0	338	.
89	1	139	0	139	0	0	Positiva
	2	101	39	140	0	760,5	.
	4	104	34	138	0	578	.
	5	138	0	138	0	0	Positiva
	6	136	0	136	0	0	Positiva
	7	129	0	129	0	0	Positiva
	8	104	32	136	0	512	.
	9	105	35	140	0	612,5	.
	99	1	41	0	41	0	0
2		49	0	49	0	0	Positiva
3		71	25	96	0	312,5	.
4		68	21	89	0	220,5	.
5		73	24	97	0	288	.
6		47	0	47	0	0	Positiva
7		36	11	47	0	60,5	.

O teste de progênie utilizado mostrou-se muito eficiente; várias plantas homozigotas, foram obtidas na maioria dos eventos de transformação. A grande vantagem do uso do teste é a rapidez; apenas 2 gerações de autofecundação, foram necessárias para a fixação do caráter. Para a fixação de um caráter, normalmente são necessárias de 7 a 8 gerações de autofecundação (Vencovsky & Barriga, 1992). Sem o teste de progênie, a fixação do caráter é menos controlada, e fica relacionada à alta probabilidade do genótipo se fixar ao longo de várias gerações de autofecundação (Vencovsky & Barriga, 1992).

A maior desvantagem do teste, é a grande quantidade de material empregado, nove plantas foram autofecundadas para cada transformante no segundo ciclo de autofecundação, enquanto que se apenas uma planta fosse autofecundada para cada transformante, a fixação do caráter dependeria de várias gerações de autofecundação.

4.5 Análise da integração do DNA exógeno, através da técnica Southern blot.

Doze transformantes homozigotos para o transgene foram selecionados para a análise por Southern blot (Figuras 31 e 32). Destas 12 plantas, 11 hibridizaram com a sonda utilizada. Ocorreu um escape, apesar de tratar-se de uma planta PCR positiva, e que segregou 3:1. Isso vem mostrar a necessidade da análise de Southern blot, para a confirmação da integração do transgene, de forma estável no genoma dos transformantes (Lewin, 2000).

As plantas que hibridizaram com a sonda utilizada, apresentaram de 1 a 3 bandas, correspondentes ao número de cópias do transgene, as amostras de plantas utilizadas são dos transformantes primários (T_0), que são hemizigotas para o transgene, assim, o transgene está em apenas um cromossomo, por par de cromossomos homólogos (Ji et al., 1988). Os resultados da análise de Southern blot estão ilustrados nas Figuras 31 e 32.

Os transformantes TR35, TR41, TR44, TR51, TR56, TR57 e TR71, apresentaram apenas uma banda, o que sugere que o transgene foi inserido em apenas um locus no genoma vegetal.

O transformante TR22 apresentou 3 bandas, já os transformantes TR26, TR33 e TR99 apresentaram 2 bandas, assim estas plantas possuem, respectivamente 3 e 2 cópias do transgene por genoma haplóide. Apesar de terem mais de uma cópia, estas plantas mantiveram a segregação 3:1, ao longo das gerações. Uma possibilidade, seria as cópias num mesmo locus, segregando conjuntamente. A outra possibilidade, poderia ser relacionada ao silenciamento de cópias adicionais, restando apenas uma cópia que se expressa, e que segregaria como um único locus.

Houve uma grande diversibilidade quanto ao padrão de bandas, evidenciado pela análise de Southern blot. O transformante TR-22 apresentou três bandas de 4, 6 e 8 Kb. O TR-26 duas bandas, de 7 e 11 Kb, o TR57 uma única banda de 12 Kb, o TR99 duas bandas de 7 e 12 Kb, o TR33 duas bandas de 8 e 10 Kb, o TR35 uma única banda de 10 Kb, o TR 41 , uma única banda de 9 Kb, o TR44 , uma única banda entre 7 a 8 Kb, o TR51 uma banda de 11 Kb e o TR56 possui uma única banda entre 6 e 7 Kb.

Este polimorfismo no padrão de bandas, confirma que as plantas transgênicas obtidas, são provenientes de eventos distintos de transformação (Sambrook et al., 1989), ou seja, são linhagens independentes com padrão de expressão, a ser determinado, diferentes para o transgene utilizado.

A obtenção de plantas com diferentes níveis de expressão desse transgene, é necessária, para se correlacionar a variação da expressão desse transgene, à efeitos pleiotrópicos resultantes em plantas de tabaco previamente transformadas com este mesmo gene, como por exemplo, a capacidade fotossintética dessas plantas. Com essas plantas será possível realizarmos um estudo detalhado dos efeitos da expressão diferencial desse transgene.

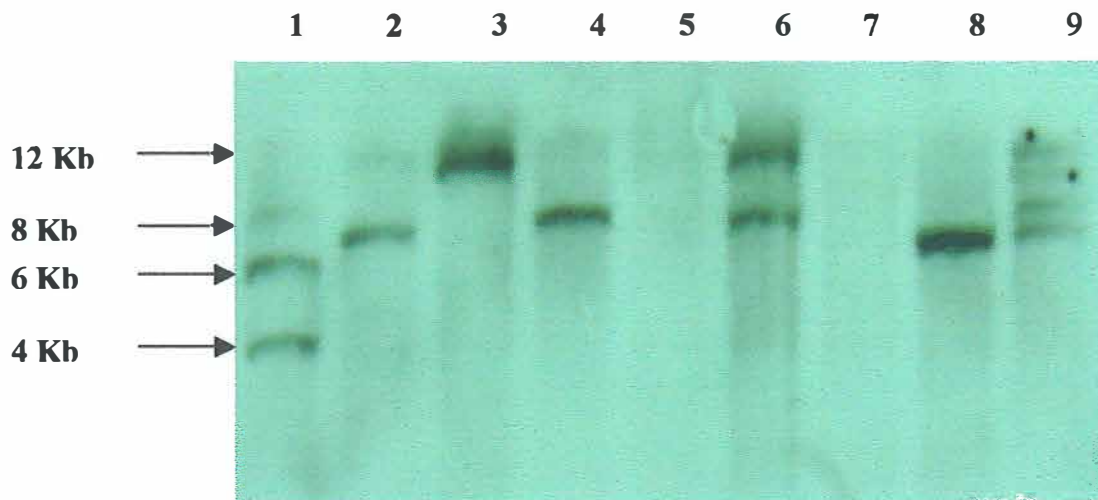


Figura 31 - Análise de Southern blot. Linha 1 corresponde ao transformante TR-22, a linha 2 ao TR-26, a linha 3 ao TR-57, a linha 4 ao TR-71, na linha 5 tem-se um escape, e a linha 6 ao TR-99. O controle negativo (WT = planta selvagem), está na linha 7. Os controles positivos de tabaco transgênico (Cab1 e Cab2), obtidos em estudos prévios, em nosso laboratório estão nas linhas 8 e 9, respectivamente. As setas indicam o comprimento dos fragmentos de DNA em kilobase, em relação ao marcador de peso molecular 1Kb laeder (Gibco BRL)

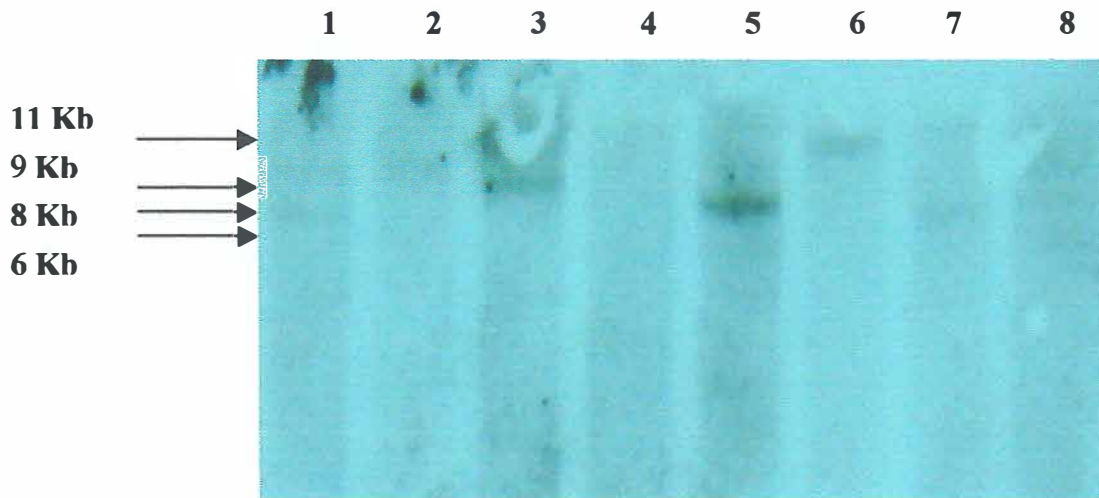


Figura 32 - Análise de Southern blot. Linha 1 corresponde ao transformante TR-33, linha 2 ao TR-35, linha 3 ao TR-41, o controle negativo (WT = planta selvagem), está na linha linha 4, linha 5 ao TR-44, linha 6 ao TR-51 e linha 7 ao TR-56. Os controles positivos de tabaco transgênico (Cab1 e Cab2), obtidos em estudos prévios, em nosso laboratório estão nas linhas 8 e 9, respectivamente. As setas indicam o comprimento dos fragmentos de DNA em kilobase, em relação ao marcador de peso molecular 1Kb laeder (Gibco BRL)

5 CONCLUSÕES

O sistema de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, foi eficiente para a obtenção de plantas transgênicas de tabaco, com o gene *Lhcb1*2* de ervilha. Doze novos eventos de transformação confirmados pelo teste southern blot, e que estão em homozigose, graças as autofecundações e testes de progênie aos quais os transformantes foram submetidos.

As plantas transgênicas de tabaco, que superexpressaram o gene *Lhcb1*2* de ervilha (Cab1 e Cab2), obtidas em estudos prévios do laboratório, com alta expressão do transgene, e mostraram que a expressão ectópica deste gene resultou no aumento da capacidade fotossintética das plantas transgênicas em condições limitantes de luz, apresentaram uma série de efeitos pleiotrópicos, que aparentemente estão ligados ao nível de expressão do transgene. Dessa forma, foram obtidas novas plantas transgênicas de tabaco, e espera-se encontrar nestas, níveis de expressão variáveis (baixo, médio e alto), para investigar se os efeitos observados nas primeiras plantas transgênicas estão mesmo associados ao nível de expressão do transgene, ou se os efeitos só ocorrem a partir de uma certa expressão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D.
Biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p.1294.
- ANDERSON, B.; STYRING, S. Photosystem II: Molecular organization, function and acclimatation. In: KROGMANN, D. W. (Ed.) **Currents topics in bioenergetics.** London: Academic Press, 1991. chap.16, p.2-81.
- ANDERSON, J. M.; ANDERSON, B. The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. **Trends in Biochemical Science**, v.13, n.9, p.351-355, 1988.
- ANDERSON, S. L.; TEAKLE, G. R.; MARTINO-CATT, S.; KAY, S. A. Circadian clock and phytochrome-regulated transcription is conferred by a 78 bp cis-acting domain of the *Arabidopsis* CAB2 promoter. **The Plant Journal**, v.6, n.4, p.457-470, 1994.
- ANDERSON, S. L.; KAY, S. A. Phototransduction and circadian clock pathways regulating gene transcription in higher plants. In: HALL, J. C.; DUNLAP, J. C. (Eds.). **Advances in Genetics.** San Diego: Academic Press, 1997. chap.35, p.1-34.
- ANKENBAUER, R. G.; NESTER, E. W. Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: structural specificity and activities of monosaccharides. **Journal of Bacteriology**, v.72, n.11, p.6442-6446, 1990.

- BEVAN, M. W.; FLAVELL, R. B.; CHILTON, M. D. A chimeric antibiotic resistant gene as a selectable marker for plant cell transformation. **Nature**, v.304, n.5922, p.184-187, 1983.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. Introdução à transformação genética de plantas. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Eds.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. p.13-16.
- BRASILEIRO, A. C. M. Co-cultura com linhagens desarmadas de *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Eds.) **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. cap.7, p.111- 126.
- BRASILEIRO, A. C. M & DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1999. v.2, cap.2, p.679-736.
- CHINN, E.; SILVERTHORNE, J. Light-dependent chloroplast development and expression of a light-harvesting chlorophyll a/b binding protein in the gymnosperm *Ginkgo biloba*. **Plant Physiology**, v.103, n.103, p.727-732, 1993.
- CITOVSKY, V.; ZUPAN, J.; WARNICK, D.; AMBRINSKI, P. Nuclear localization of *Agrobacterium* VirE2 protein in plant cells. **Science**, v.256, n.4065, p.1802-1805, 1992.
- CLARK, M. S. **Plant molecular biology: a laboratory manual**. Berlin: Springer, 1997. p.529.
- DE BOER, A. D.; WEISBEEK, P. J. Chloroplast protein topogenesis, import, sorting and assembly. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1071, n.3, p.221-253, 1991.

- DEROLES, S. C.; GARDNER R. G. Expression and inheritance of kanamycin resistance in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Molecular Biology**, v.11, n.3, p.355-364, 1988.
- DIETZ, K. J.; HEBER, U. Light and CO₂ limitation of photosynthesis and state of the reactions regenerating ribulose 1,5-biphosphate or reducing 3-phosphoglycerate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.848, n.3, p.392-410, 1986.
- DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.2, p.13-15, 1987.
- DRAPER, J.; SCOTT, R.; ARMITAGE, P.; WALDEN, R. **Plant genetic transformation and gene expression: a laboratory manual**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988. p.355.
- DREYFUSS, B. W.; THORBNER, J. P. Assembly of the light-harvesting complexes (LHCs) of photoystem II. Monomeric LHCIIb complexes are intermediates in the formation of oligomeric LHCIIb complexes. **Plant Physiology**, v.106, n.3, p.829-839, 1994.
- FURBANK, R. T.; TAYLOR, W. C. Regulation of photosynthesis in C₃ and C₄ plants. A molecular approach. **The Plant Cell**, v.7, n.7, p.797-807, 1995.
- FÜTTERER, J. Expression Signals and Vectors. In: POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. (Eds.). **Gene transfer to plants**. Berlin: Springer, 1995. chap.5, p.219-236.
- GAMA, M. I. C. Identificação de plantas transgênicas por PCR. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Eds). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. cap.12, p.179-190.

- GHAI, J.; DAS, A. The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid encodes a DNA-relaxing enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, n.9, p.3109-3113, 1989.
- GREEN, B. R.; PRICHERSKY, E.; KLOPPSTECH, K. Chlorophyll a/b binding proteins an extended family. **Trends in Biochemical Science**, v.16, n.5, p.181-186, 1991.
- GUSTAFSSON, P.; JANSSON, S.; LIDHOLM, J.; LUNDBERG, A. K. Structure and regulation of photosynthetic genes of *Pinus sylvestris* (Scots pine) and *Pinus contorta* (lodgepole pine). **Forest Ecology Management**, v.43, n.3-4, p.287-300, 1991.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture of growing plants without soil**. Berkley: University of California, 1950. p.328.
- HOEKEMA, A.; HIRSCH, P. R.; HOOYKAAS, P. J. J.; SCHILPEROOT, R. A. A binary vector strategy based on separation of *vir* and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, v. 303, n.5913, p.179-180, 1983.
- HOFGEN, R.; WILLMITZER, L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. **Nucleic Acids Research**, v.16, n.20, p.9877-9883, 1988.
- HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERSERGEN, A. G. M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.157-179, 1994.
- HORSCH, R. B.; FRALEY, R. T.; ROGERS, S. G.; SANDERS, P. R.; LLOYD, A.; HOFFMANN, N. Inheritance of functional foreign genes in plants. **Science**, v.223, n.4635, p.496-498, 1984.

- HORSCH, R. B.; FRY, J. E.; HOFFMANN, N. L.; EICHHOLT, Z. D.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, v.227, n.4691, p.1229-1231, 1985.
- HORTON, P.; RUBAN, A. V.; WALTERS, R. G. Regulation of light harvesting in green plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.655-684, 1996.
- JANSSON, S.; PICHERSKY, E.; BASSI, R.; GREEN, B. R.; IKEUCHI, M.; MELLIS, A.; SIMPSON, D. J.; SPANGFORT, M.; STAEHELIN, L. A.; THORNBER, J. P. A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants. **Plant Molecular Biology Report**, v.10, n.5, p.242-253, 1992.
- JANSSON, S. The light harvesting chlorophyll a/b binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1184, n.1, p.1-19, 1994.
- JI, J.M.; MARTINEZ, A.; DABROWSKI, M.; VELUTHAMBI, K. GELVIN, S. B.; REAM, W. The overdrive enhancer sequence stimulates production of T-strands from the *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid. In: STASKAWICZ, B.; AHLQUIST, P.; YODER, P. (Eds). **Molecular biology of plant-pathogen interaction**. New York: Liss, 1988. chap.2, p.19-31.
- JIN, S.; PRUSTI, R. K.; ROITSCH, T.; ANKENBAUER, R. G.; NESTER, E. W. Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. **Journal of Bacteriology**, v.172, n.9, p.4945-4950, 1990.

- JORGENSEN, R. A.; SNYDER, C.; JONES, J. D. G. T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed in *A. tumefaciens* C58 derivatives. **Molecular and General Genetics**, v.207, n.2-3, p.471-477, 1987.
- KAY, R.; CHAN, A.; DALY, M. Duplication of the CaMV 35S promoter sequences create a strong enhancer for plant genes. **Science**, v.236, n.4806, p.1299-1302, 1987.
- KLEE, H. J.; HORSCH, R. B.; ROGERS, S. G. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. **Annual Review of Plant Physiology**, v.38, p.467-486, 1987.
- KO, K.; KO, Z.W.; TURPIN, D. H.; LABATE, C. A.; MOHANTY, N.; GRANELL, A. Overproduction of chlorophyll a/b binding protein enhances photosynthetic activity in transgenic tobacco. In: MURATA, N. (Ed). **Research in photosynthesis**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers , 1992. v.2, chap.8, p.445-448.
- KÜHLDBRANDT, W. Three-dimensional structure of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex. **Nature**, v.307, n. 5950, p.478-480, 1984.
- KÜHLDBRANDT, W.; WANG, D. N. Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography. **Nature**, v.350, n.6314, p.130-134, 1991.
- KÜHLDBRANDT, W.; WANG, D. N.; FUJIYOSHI, Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. **Nature**, v.367, n.6464, p.614-621, 1994.

- LARKIN, P.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v.60, n.4, p.197-214, 1981.
- LARSSON, U. K.; ANDERSON, J. M.; ANDERSSON, B. Variations in the relative content of the peripheral and tightly bound LHCII subpopulations during thylakoid light adaptation and development. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.894, n.1, p.69-75, 1987.
- LEEGOOD, R. C. Regulation of photosynthetic CO₂-pathway enzymes by light and other factors. **Photosynthesis Research**, v.6, n.3, p.247-259, 1985.
- LEEGOOD, R. Enzymes of the Calvin Cycle. In: LEA, P. J. (Ed). **Methods in plants biochemistry**. London: Academic Press, 1990. chap.3, p.15-37.
- LESSI, M.; LANKA, E. Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. **Cell**, v.77, n.3, p.321-324, 1994.
- LEWIN, B. **Genes VII**. New York: Oxford University Press, 2000. p.990.
- MATTHYSSE, A. G.; HOLMES, K. V.; GURLITZ, R. H. G. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. **Journal of Bacteriology**, v.145, n.1, p.583-595, 1981.
- MATTHYSSE, A. G. Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v.169, n.1, p.313-323, 1987.

- McBRIDE, K. E.; KNAUF, V. C. Genetic analysis of the VirE operon of the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6. **Journal of Bacteriology**, v.170, n.4, p.1430-1437, 1988.
- McGRATH, J. M.; TERZAGHI, W. B.; SRIDHAR, P.; CASHMORE, A. R.; PICHERSKY, E. Sequence of the fourth and fifth photosystem II type I chlorophyll a/b-binding protein genes of *Arabidopsis thaliana* and evidence for the presence of a full complement of the extended CAB gene family. **Plant Molecular Biology**, v.19, n.5, p.725-733, 1992.
- MOHR, H.; SCHOPFER, P. **Plant physiology**. Berlin: Springer, 1995. p.629.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: principles of biochemistry**. New York: Worth Publishers, 2000. p.1152.
- NESTER, E. W.; GORDON, M. P.; AMASINO, R. M. AND YANOFSKY, M. F. Crown gall: a molecular and physiological analysis. **Annual Review of Plant Physiology**, v.35, p.387-413, 1984.
- OTTEN, L.; CADAY, J.; GÉRARD, J. C.; FOURNIER, P.; CROUZET, P.; PAULUS, F. Evolution of agrobacteria and their Ti plasmids – a review. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.5, n.4, p.279-287, 1992.
- ORT, D. R.; YOCUM, C. F. **Advances in photosynthesis**. Oxigem photosynthesis: the light reactions. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1996. v.4, p.682.

PALOMARES, R.; HERRMAN R. G.; OELMULLER, R. Different blue-light requirement for the acumulation of transcripts from nuclear genes for thylakoid proteins in *Nicotiana tabacum* and *Lycopersicon esculentum*. **Journal Photochemistry Photobiol Biology**, v.11, n.2, p.151-162, 1991.

PICHERSKY, E; JANSSON, S. The light-harvesting chlorophyll a/b binding popypeptides and their genes in angiosperm and gymnosperm species. In: ORT, D. R.; YOCUM, C. F. (Eds.) **Advances in Photosynthesis: oxygenic photosynthesis; the light reactions**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. v.4, p.507-521, 1996.

PIECHULLA, B. Plastid and nuclear mRNA fluctuations in tomato leaves – diurnal and cirdadian rhythms during extended dark and light periods. **Plant Molecular Biology**, v.11, n.3, p.345-353, 1988.

PIECHULLA, B. ‘Circadian clock’ directs the expression of plant genes. **Plant Molecular Biology**, v.22, n.3, p.533-542, 1993.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Eds) **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. cap.11, p.163-175.

ROITSCH, T.; WANG, H.; JIN, S.; NESTER, E. W. Mutational analysis of the VirG protein, a transcriptional activator of *Agrobacterium tumefacien* virulence genes. **Journal of Bacteriology**, v.172, n.10, p.6054-6060, 1990.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992. p.682

- SAMBROOK, J. FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Plainview: Laboratory Press, 1989. p.765.
- SCHEIFFELE, P.; PANSENGRAU, W.; LANKA, E. Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA processing. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.3, p.1269-1276, 1995.
- SCHULER, M. A.; ZIELINSKI, R. E. **Methods in plant molecular biology**. San Diego: Academic Press, 1989. p.171.
- STACHEL, S. E.; NESTER, E. W. The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. **Embo Journal**, v.5, p.1445-1454, 1986.
- STAEHELIN, L. A.; ARNTZEN, C. J. **Photosynthesis III: photosynthetic membranes and light harvesting systems**. Berlin: Springer, 1986. p.802.
- TOBIN, E. M.; SILVERTHORNE, J. Light regulation of gene expression in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.36, p.569-593, 1985.
- TORRES, A. T.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v.1, cap.1, p.11-20.
- TREBST, A.; AVRON, M. **Photosynthesis I: photosynthetic electron transport and photophosphorylation**. Berlin: Springer, 1977. p.730.
- VENCOVSKY, R; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. p.496.

- WARD, E. R.; BARNES, W.M. VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly to the 5' end of T-strand DNA. **Science**, v.242, n.4880, p.927-930, 1988.
- YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J. E MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC 19 vectors. **Gene**, v.33, n.1, p. 103-119, 1985.
- ZAMBRYSKI, P. C.; HOOS, H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **Embo Journal**, v.2, n.12, p.2143-2150, 1983.
- ZAMBRYSKI, P. C. Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. **Annual Review of Genetics**, v.22, p.1-30, 1988.
- ZAMBRYSKI, P. C.; TEMPÉ, J.; SCHELL, J. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids into plants. **Cell**, v.56, n.2, p. 193-201, 1989.
- ZAMBRYSKI, P. C. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. **Annual Review of Plant Physiology**, v.43, p.465-490, 1992.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Composição do meio MS

Componenete	Quantidade (g.l ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1,65
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,44
KNO ₃	1,90
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,372
KH ₂ PO ₄	0,172
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,0412
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0278
H ₃ BO ₃	0,0062
MnSO ₄ .1H ₂ O	0,0169
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0086
KI	0,00083
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,00025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,000025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,000025
Ácido nicotínico	0,0005
Piridoxina-HCl	0,0005
Tiamina-HCl	0,0001
Sacarose	20,0
Agar	8,0

APÊNDICE 2 - Composição do meio YEP

Componenetes	Quantidade (g.l ⁻¹)
Bacto extrato de levedura	10,0
Bacto peptona	10,0
NaCl	5,0
Bacto Agar	10,0

APÊNDICE 3 - Composição do meio AB líquido

Componente	Quantidade (g.l ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	3,0
NaH ₂ PO ₄	1,0
NH ₄ Cl	1,0
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,3
KCl	0,15
CaCl ₂	0,01
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,0025
Glucose	5

APÊNDICE 4 - Descrição e seqüência de bases dos “primers” que anelam ao transgene

"Primer"	Descrição	Seqüência de bases
rtc1	Interno ao gene <i>Lhcb1*2</i> - posição 1400c (Cashmore, 1984)	CCTTGAACCACACAGCTTCG
rtc2	Corresponde a uma seqüência do peptídeo trânsito da rubisco, rbcS-TP	CCATGACTGGATTCCCAGTG
rtc3	Corresponde a uma seqüência do peptídeo trânsito da rubisco, rbcS-TP, clonada ao transgene <i>Lhcb1*2</i>	CTTCTCTACAGGATCCATGC
35S-1	Correspondente ao promotor 35S do CaMV	CCACTATCCTTCGCAAGACC

APÊNDICE 5 - Composição do tampão de corrida e do gel (TBE 0,5X)

Componente	Quantidade (g.l ⁻¹ ; ml.l ⁻¹)
Tris-HCl	54g
Ácido bórico	27,5g
EDTA 0,5M	20ml

APÊNDICE 6 - Composição do tampão TE. mM: milimolar

Componente	Concentração
Tris-HCl	10mM
EDTA	1mM

APÊNDICE 7 - Composição do tampão da amostra IV (Sambrook et al., 1989)

Componente	Quantidade g.ml ⁻¹
Azul de bromofenol	0,0025
Sacarose	0,4

APÊNDICE 8 - Composição da solução de Neutralização

Componente	Quantidade (g.l ⁻¹)
NaCl	87,66
Tris-HCl	60,56

APÊNDICE 9 - Composição da solução de Denaturação

Componente	Quantidade (g.l ⁻¹)
NaCl	87,66
NaOH	20

APÊNDICE 10 - Composição da solução de Depuração. M: molar

Componente	Concentração
HCL	0,25M