UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

MORFOGÊNESE *In Vitro* E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA-MEDIADA POR Agrobacterium tumefaciens DE CLONES COMERCIAIS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao L.*)

THIAGO EDSON RIBEIRO DA SILVA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2008

THIAGO EDSON RIBEIRO DA SILVA

MORFOGÊNESE *In Vitro* E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA-MEDIADA POR Agrobacterium tumefaciens DE CLONES COMERCIAIS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao L.*)

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Biotecnologia e Genômica

Orientador: Prof. Marcio Gilberto Cardoso Costa

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2008

THIAGO EDSON RIBEIRO DA SILVA

MORFOGÊNESE *In Vitro* E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA-MEDIADA POR Agrobacterium tumefaciens DE CLONES COMERCIAIS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao L.*)

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular

APROVADO: 31 de março de 2008

Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida	Drª. Fabienne Micheli
UESC	CIRAD/UESC
Prof. Dr. Marcio Gilberto Cardoso Costa	Prof. Dr. Sérgio H. Brommonschenkel
UESC – Orientador	UFV

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Edson Israel da Silva (*in memorian*) e Marilene Ribeiro da Silva, pelo amor, carinho e dedicação que me proporcionaram trilhar este árduo caminho.

A todos cacauicultores que têm esperança de alcançarem a revitalização da cacauicultura regional.

A eles dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e pelos amigos, colegas, professores, pais e familiares que me concedeu, os quais me ajudaram e me deram suporte para eu buscar meus objetivos.

À Universidade Estadual de Santa Cruz, pela oportunidade de realização deste curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado da Bahia pela bolsa e a Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao professor Márcio Gilberto Cardoso Costa pela amizade, excelente orientação, ativo acompanhamento do trabalho, pela calma, compreensão, ensinamentos e incentivos constantes.

A professora Maria de Fátima Alvim, pela confiança e sugestões de grande valia, que contribuíram consideravelmente para a melhor execução deste trabalho.

Aos demais integrantes da comissão de orientação Júlio Cézar de Mattos Cascardo e Abelmon da Silva Gesteira pelas dicas, sugestões e acompanhamento.

Aos colegas de curso, em especial a Cristiano Villela, Braz Tavares, Vanderli Andrade Souza e Virgínia Lúcia Fontes Soares pelos incentivos e colaborações.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais: Jamilly Azevedo Leal Sena, Amanda Ferreira da Silva Mendes, Luciana Cardoso Cidade, Laís Freire, Tharcila Braz, Diana Matos, Mayana Passos, José Emárcio Torres e Antônio Carlos (Pelé) pela amizade, companheirismo, cooperação, paciência, alegrias, excelente convívio e compreensão por eu dedicar meu tempo de realização de trabalhos em

comum no laboratório para finalizar os experimentos e trabalhar no computador. Vocês são especiais!

Aos funcionários da gerencia de laboratórios (GERLAB) e vigilantes que sempre se esforçaram para ajudar no que precisava em qualquer hora do dia e da noite.

Ao setor de Produção de Sementes da Ceplac (PROSEC), na pessoa do Sr. Silvio, pela prestatividade e ajuda na coleta de botões florais de cacau.

À Almirante Cacau, nas pessoas da Nay e Delvani, que colaboraram na parte de morfogênese *in vitro* dando excelentes sugestões sobre a embriogênese somática em cacau.

A todos professores que contribuíram para meu crescimento profissional e humano, especialmente a professora Solange França, e os professores Dário Anhert e Marcelo Mielke que me deram credibilidade para participar da seleção do curso.

A todos meus familiares que colaboraram dando uma palavra de incentivo e ânimo nos momentos de dificuldade e cansaço (Tia Ana, Marta e Vó Ana).

A minhas irmãs Jeilly Vivianne e Sabrina Marina e minha mãe que ”seguraram as pontas” quando estive ausente no trabalho familiar para me dedicar a este trabalho.

A minha noiva Andréa Weberling que teve paciência, foi companheira, e esteve junto comigo em todos os momentos desta etapa de minha formação profissional.

A meu pai por ter me ensinado que o saber é o bem mais precioso que alguém pode ter, e que nunca devo deixar de buscá-lo.

ÍNDICE

EXTRATO ..... **xi**
ABSTRACT ..... **xiii**
LISTA DE FIGURAS ..... **xv**
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ..... **xvi**
INTRODUÇÃO **1**
REVISÃO DE LITERATURA **4**
1. O cacaueiro *4*
1.1. Histórico da cacauicultura *4*
1.2. Importância sócio-econômica e agroecológica da cacauicultura *6*
1.3. Recursos genéticos *6*
1.4. Genômica *7*
2. Morfogênese in vitro *8*
2.1. Aspectos gerais *8*
2.2. Componentes genéticos da morfogênese in vitro *9*
2.2.1. Aspectos genéticos da embriogênese somática *9*
2.2.2. Aspectos genéticos da organogênese de brotos *10*
2.3. Morfogênese in vitro em cacaueiro *10*
3. Transformação genética *12*
3.1. Aspectos gerais *12*
3.2. Transformação genética em cacaueiro *16*
4. Oxalato decarboxilase (OxDc) de Flammulina velutipes *18*
OBJETIVOS **20**
CAPÍTULO 1: Otimização da embriogênese somática primária e secundária em clones comerciais de cacaueiro ('TSH 565' e 'TSH 1188') para aplicação em trabalhos de transformação genética **21**
Resumo *21*
1. Introdução *23*
2. Materiais e métodos *25*
2.1. Material vegetal *25*
2.2. Coletas *25*
2.3. Desinfestação *26*

2.4. Fonte de explantes 27
2.5. Introdução de material in vitro 27
2.6. Embriogênese somática primária 28
2.7. Embriogênese somática secundária..... 29
2.8. Conversão de embriões somáticos em plântulas 30
2.9. Experimentos de morfogênese in vitro 30
2.9.1. Avaliação da influência dos agentes vedantes na indução de embriões somáticos primários..... 31
2.9.2. Avaliação da influência do tipo e concentração da fonte de carbono na indução de embriões somáticos primários 31
2.9.3. Avaliação da influência do tipo e concentração de poliaminas na indução de embriões somáticos secundários..... 32
2.10. Delineamento experimental..... 33
3. Resultados 34
3.1. Caracterização da embriogênese somática em ' TSH 1188' e 'TSH 565' 34
3.2. Efeito de diferentes agentes vedantes das placas de petri na indução de embriões somáticos primários..... 38
3.3. Efeito da fonte e concentração de carbono em meio de indução de embriões somáticos primários (ED) 39
3.4. Efeito do tipo e concentração de poliaminas na indução de embriões somáticos secundários..... 45
4. Discussão..... 50
4.1. Efeito de diferentes agentes vedantes das placas de petri na indução de embriões somáticos primários..... 50
4.2. Efeito da fonte e concentração de carbono em meio de indução de embriões somáticos primários (ED) 51
4.3. Efeito do tipo e concentração de poliaminas na indução de embriões somáticos secundários..... 53
5. Conclusões..... 56
6. Referências bibliográficas 58
CAPÍTULO 2: Avaliação dos fatores que afetam a eficiência de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* em clones comerciais de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) 61

Resumo *61*
1. Introdução *63*
2. Materiais e métodos *65*
2.1. Material vegetal *65*
2.2. Cultivo do material in vitro *65*
2.3. Tipo de explante utilizado *65*
2.4. Transformação genética com Agrobacterium tumefaciens *65*
2.5. Experimentos de otimização do protocolo de transformação genética *67*
2.5.1. Efeito do antibiótico higromicina *67*
2.5.2. Efeito de antibióticos utilizados no controle de Agrobacterium ... *67*
2.5.3. Efeito da sonicação dos explantes *68*
2.5.4. Efeito do tempo de incubação dos explantes em Agrobacterium *68*
2.5.5. Efeito da concentração de Agrobacterium *68*
2.5.6. Efeito da concentração de acetosseringona no meio de co-cultivo *69*
2.6. Ensaio histoquímico de GUS *69*
2.7. Avaliação dos experimentos *69*
2.8. Delineamento experimental *70*
3. Resultados *71*
3.1. Efeito do antibiótico higromicina na regeneração de embriões somáticos secundários *80*
3.2. Efeito de antibióticos para o controle de Agrobacterium na regeneração de embriões somáticos secundários *82*
3.3. Efeito da sonicação dos explantes na eficiência de transformação *85*
3.4. Efeito do tempo de incubação dos explantes em Agrobacterium *87*
3.5. Efeito da concentração de Agrobacterium *88*
3.6. Efeito da concentração de acetosseringona no meio de co-cultivo *90*
4. Discussão *92*
4.1. Efeito do antibiótico higromicina *92*
4.2. Efeito de antibióticos para o controle de Agrobacterium na regeneração de embriões somáticos secundários *93*
4.3. Efeito da sonicação dos explantes, acetosseringona, concentração de Agrobacterium e tempo de incubação na eficiência de transformação *95*

5. Conclusões..... 98
6. Referências bibliográficas 99
CAPÍTULO 3: Transformação genética do clone comercial de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) 'TSH 565' com o gene oxalato decarboxilase (OxDc). 102
Resumo.....102
1. Introdução 104
2. Materiais e métodos 106
2.1. Material vegetal 106
2.2. Cultivo do material in vitro 106
2.3. Tipo de explante utilizado para procedimento de transformação 106
2.4. Transformação genética com Agrobacterium tumefaciens.....106
3. Resultados 108
4. Discussão.....114
5. Conclusões.....115
6. Referências bibliográficas 116
CONCLUSÕES GERAIS 118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....119

EXTRATO

SILVA, Thiago Edson Ribeiro da, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Março de 2008. **Morfogênese *in vitro* e transformação genética-mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de clones comerciais de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.).** Orientador: Prof. Dr. Marcio Gilberto Cardoso Costa. Co-orientador: Prof. Dr. Júlio Cézar de Mattos Cascardo. Colaborador: Prof. Dr. Abelmon da Silva Gesteira.

A vassoura-de-bruxa do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), doença causada pelo fungo hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa*, tem causado grandes perdas econômicas e uma crise social desde a sua chegada, no final da década de 1980, na maior região produtora de cacau no Brasil, a região sul da Bahia. Além das práticas e técnicas convencionais utilizadas desde então para o combate da doença, abordagens biotecnológicas como cultura de tecidos e transformação genética de plantas têm se destacado como promissoras para serem aplicadas no seu controle. O objetivo do presente estudo foi estabelecer um sistema eficiente de regeneração *in vitro*, via embriogênese somática, e de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para clones comerciais de cacaueiro ('TSH 565' e 'TSH 1188'), para aplicação em estudos funcionais de genes candidatos de resistência envolvidos na interação *T. cacao – M. perniciosa*. Primeiramente, avaliou-se a influência de fatores como o genótipo, agentes vedantes de placas de petri, tipo e concentração de açúcares e poliaminas na regeneração de embriões somáticos. Os resultados obtidos demonstraram que os genótipos avaliados apresentaram diferentes respostas morfogênicas *in vitro*, com o 'TSH 565' produzindo um maior número médio de embriões por explante (5,55) em comparação ao 'TSH 1188' (1,60). Porém, muitos desses embriões apresentaram morfologia anormal, dificultando a sua conversão em plântulas, em comparação ao 'TSH 1188'. Observou-se que explantes de ambos os genótipos cultivados em placas de petri seladas com fita cirúrgica produziram freqüências significativamente maiores de calos embriogênicos (1,5 vezes mais) em comparação aos demais agentes vedantes testados. Em relação a fonte de carbono, a resposta foi genótipo-específica, em que para 'TSH 565' a melhor combinação de açúcar em meio de desenvolvimento embrionário (ED) foi aquela em que se utilizou 4% de sacarose no primeiro

subcultivo (2 semanas), seguido de subcultivos subsequentes (a cada 2 semanas) em meio contendo 3% de sacarose, e para 'TSH 1188' foram os subcultivos em meio ED contendo apenas 3% de sacarose. A suplementação de poliaminas no meio de cultura aumentou significativamente a regeneração de embriões somáticos secundários, com 'TSH 565' produzindo 6,4 vezes mais embriões leitosos em meio contendo 1000 μM de espermina quando comparado ao controle. Posteriormente, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações do antibiótico higromicina, para seleção dos embriões transformados, e dos antibióticos cefotaxima, timentin e meropenem, para o controle de *Agrobacterium*, na embriogênese somática secundária dos clones 'TSH 565' e 'TSH 1188', bem como os efeitos da sonicação, tempo de incubação dos explantes em *Agrobacterium*, concentração de *Agrobacterium* e concentração de acetosseringona ou suspensão de células de tabaco (*feeder-layer*) em meio de co-cultivo na eficiência de transferência do gene *GUSint*. Observou-se que concentrações de 10 a 15 mg L^{-1} de higromicina reduziram drasticamente a regeneração de embriões somáticos em ambos os genótipos, embora inibição completa não foi observada nessas concentrações. Em relação aos antibióticos empregados no controle de *Agrobacterium*, observou-se que todos aqueles testados tiveram um efeito negativo na embriogênese somática de 'TSH 565'. Nesse caso, recomenda-se a utilização de timentin, a 150 $mg.L^{-1}$, ou meropenem, a 6,25 $mg.L^{-1}$, devido aos menores efeitos negativos observados. Os melhores parâmetros para transformação genética de 'TSH 565' incluem a sonicação dos explantes por 150 segundos, seguido de incubação em solução de *Agrobacterium* por 20 minutos, na concentração de OD_{600}=1,0. Finalmente, explantes cotiledonares de 'TSH 565' foram usados em experimentos de transformação genética com o gene oxalato decarboxilase (OxDC), do fungo *Flamullina velluptes*. Cerca de 550 embriões somáticos foram produzidos, os quais serão caracterizados quanto a sua natureza transgênica e micropropagados como linhagens transformantes independentes, objetivando a futura avaliação da resistência das plantas obtidas contra o fungo *M. perniciosa*.

Palavras-chave: embriogênese somática; engenharia genética; genômica; biotecnologia; cacau; *Crinipellis*

ABSTRACT

SILVA, Thiago Edson Ribeiro da, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, March 2008. ***In vitro* morphogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of elite clones from cacao (*Theobroma cacao* L.).** Advisor: Prof. Dr. Marcio Gilberto Cardoso Costa. Committee members: Prof. Dr. Júlio Cézar de Mattos Cascardo and Prof. Dr. Abelmon da Silva Gesteira.

Cacao (*Theobroma cacao* L.) witches' broom disease, caused by the hemibiotrophic basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, has imposed both economic and social crises since its appearance in the major Brazilian's producing region of cacao, Southeast of Bahia State, in the late of 1980s. In addition to conventional procedures adopted to control witches' broom, biotechnological approaches such as plant tissue culture and genetic transformation are valuable tools to reinforce the combat against the disease. The objective of the present study was to establish efficient systems of *in vitro* regeneration, via somatic embryogenesis, and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of elite clones from cocoa ('TSH 565' e 'TSH 1188'), for application on functional genomics studies of cacao candidate resistance genes to *M. perniciosa*. First, it was evaluated the influence of factors affecting somatic embryogenesis in cacao, including the genotype, Petri dish sealing material, carbon source and concentration on embryo development (ED) medium, and polyamines on culture media. It was observed that the genotypes showed distinct responses *in vitro*, with 'TSH 565' producing higher numbers of somatic embryos per explant (5.55) as compared to 'TSH 1188' (1.60). However, most of the embryos produced by 'TSH 565' were abnormals in morphology as compared to those produced by 'TSH 1188'. Explants of both genotypes cultivated in Petri dishes sealed with two rounds of micropore tape showed significantly higher formation of embryogenic callus as compared to those explants cultivated in Petri dishes sealed with Parafilme or PVC transparent film. As to carbon source and concentration on (ED) medium, the response was genotype-specific. In 'TSH 565', higher numbers of somatic embryos per explant were produced when the explants were incubated for two weeks on ED medium containing 4% sucrose, followed by subsequent subcultures (each 2 weeks) on ED medium

containing 3% sucrose. In ‘TSH 1188’, on the other hand, better responses were produced when the explants were subcultured (each two weeks) on ED medium containing only 3% sucrose. The supplementation of polyamines in the culture media increased significantly the regeneration of somatic embryos in ‘TSH 565’. It was observed that explants cultured on culture medium supplemented with 1000 μM spermine produced 6.4 times more somatic embryos than those cultured on medium devoid of polyamines. Second, it was evaluated the effect of different concentrations of the antibiotics hygromycin, for selection of transformed embryos, and cefotaxime, timentin, and meropenen, for *Agrobacterium* control, on somatic embryogenesis of cacao, as well as the effects of sonication, *Agrobacterium* concentration, period of explant incubation in *Agrobacterium* solution, and acetosyringone concentration or tobacco feeder-layers on cocultivation medium on the efficiencies of *GUSint* gene transfer. It was observed that concentrations of 10-15 $mg.L^{-1}$ hygromycin drastically reduced somatic embryo regeneration in both ‘TSH 565’ and ‘TSH 1188’, although complete inhibition of somatic embryogenesis was not observed in these antibiotic concentrations. Cefotaxime, timentin, and meropenem have all a negative effect on somatic embryogenesis of ‘TSH 565’, apart of concentration used on culture medium. The use of timentin, at 150 $mg.L^{-1}$, or meropenem, at 6,25 $mg.L^{-1}$, is recommended since they caused the lower negative impact on somatic embryogenesis as compared to other antibiotic concentrations used. The better efficiencies of *GUSint* gene transfer for ‘TSH 565’ included 150 seconds explant sonication, $5x10^8$ $cfu.mL^{-1}$ *Agrobacterium* concentration, and 20 minutes of explant incubation in *Agrobacterium* solution. The presence of acetosyringone or tobacco feeder-layers on cocultivation medium did not affect the efficiency of *GUSint* gene transfer. Finally, cotyledonary explants from ‘TSH 565’ were used in experiments of genetic transformation with *A. tumefaciens* containing the gene oxalate decarboxylase (OxDc), from the fungus *Flamullina velluptes*. About 554 putative transformed somatic embryos were produced, which will be further characterized as to their transgenic nature and clonally propagated as independent transgenic somatic embryo lines, aiming the future evaluation of resistance against the fungus *M. perniciosa*.

Keywords: **somatic embryogenesis; genetic engineering; genomics; biotechnology; cocoa; *Crinipellis***

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INTRODUÇÃO

O cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta perene, arbórea, típica de clima tropical e nativa da região de floresta úmida da América, onde vegeta no sub-bosque. Por apresentar essas características, encontrou na Bahia um local propício, não só para seu estabelecimento e sua propagação, mas também para se tornar na economicamente mais importante cultura da região sul do estado, gerando emprego e importantes divisas para o estado e para o país.

Por sua vez, a região que proporcionou condições ótimas para o desenvolvimento desta cultura também favoreceu o estabelecimento do fungo *Moniliophthora perniciosa* (sin. *Crinipellis perniciosa*), agente causador da doença vassoura de bruxa do cacaueiro. A chegada desse fungo à região, no fim da década de 1980, desmantelou a estrutura produtiva. Desde então, vários esforços buscando combater a doença têm sido implementados para manter a remanescente produção atual em níveis econômicos sustentáveis. Práticas de controle químico, biológico e cultural, como poda fitossanitária, aliado ao melhoramento genético da espécie e a clonagem de genótipos-elite têm sido adotadas para o controle da doença, porém limitados avanços têm sido alcançados até então.

A propagação vegetativa ou clonagem tem sido bem utilizada na recuperação da lavoura de cacau sul-baiana, pelo uso de estacas enraizadas e garfos para substituição das copas das árvores de clones oriundos de programas de melhoramento que apresentam como principal características a resistência ao fungo e elevada produtividade. A clonagem é uma estratégia importante nos programas de melhoramento, dado que é a forma mais rápida para se capitalizar recursos genéticos (PEREIRA, 2001). Porém, a propagação vegetativa é considerada uma estratégia de fim de linha, pois com ela obtém-se o máximo de ganho genético em uma única geração, porém, a partir daí nenhum ganho adicional é obtido (PEREIRA, 2001), fazendo-se necessário o uso de outras ferramentas que permitam a utilização dos recursos genéticos existentes, mais rapidamente.

Tipicamente, são necessários de 3 a 6 anos para se produzir uma planta de cacau com maturidade sexual suficiente para uso em um programa de melhoramento (NIEMENAK, 2008). Assim, o melhoramento de cacau aliado a novas tecnologias, que reduzam o tempo de obtenção de um cultivar melhorado, é urgentemente necessário.

Nos últimos anos, o desenvolvimento da biotecnologia tem proporcionado a incorporação de novas tecnologias aos programas de melhoramento genético de plantas. Dentre os métodos de maior avanço estão aqueles de cultura de tecidos, que possibilitam a rápida propagação clonal *in vitro*, levando a produção uniforme de plantas com alto valor genético, a transformação genética, levando a incorporação de novos genes de interesse sem alterar outras características desejáveis da variedade, e a genômica funcional, permitindo identificar de uma maneira rápida e global aqueles genes conferindo importantes características agronômicas. Para o cacaueiro, a embriogênese somática oferece um sistema para propagação clonal de plantas ortotrópicas, sendo a principal via de regeneração *in vitro*. Esse sistema de regeneração também tem sido usado com sucesso na transformação genética de cacaueiro. Estudos de genômica funcional da interação *T. cacao* - *M. perniciosa* também têm fornecido importantes conhecimentos sobre a interação planta-patógeno (GESTEIRA et al., 2007).

O presente estudo teve como objetivo geral estabelecer um sistema eficiente de regeneração *in vitro*, via embriogênese somática, e de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para clones comerciais de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), para aplicação em estudos funcionais de genes candidatos de resistência ao fungo *Moniliophthora perniciosa*. No primeiro capítulo, avaliou-se a influência de fatores como o genótipo, agentes vedantes das placas de petri, tipo e concentração de açúcares e poliaminas na regeneração *in vitro* de embriões somáticos de ‘TSH 565’ e ‘TSH 1188’, de modo a otimizar o processo de embriogênese somática nesses clones. No segundo capítulo, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações dos antibióticos higromicina, cefotaxima, timentin e meropenem, na embriogênese somática secundária dos clones ‘TSH 565’ e ‘TSH 1188’, bem como os efeitos da sonicação, tempo de incubação dos explantes em *Agrobacterium*, concentração de *Agrobacterium* e concentração de acetosseringona ou suspensão de células de tabaco (*feeder-layer*) em meio de co-cultivo na eficiência de transferência do gene *GUSint*. No terceiro capítulo, explantes

cotiledonares de ‘TSH 565’ foram usados em experimentos de transformação genética com o gene oxalato decarboxilase (OxDC), do fungo *Flamullina velluptes*, visando a produção de plantas de cacaueiro transgênicas e futura avaliação da resistência ao fungo *M. perniciosa*.

REVISÃO DE LITERATURA

1. O cacaueiro

1.1. Histórico da cacauicultura.

O cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta originária da Amazônia e domesticada por diferentes civilizações do continente americano. Já foi o segundo produto mais importante na lista de exportações brasileiras, sendo o Brasil o maior produtor mundial. No sul da Bahia esta planta encontrou condições ideais para tornar a região a principal produtora de cacau do Brasil, chegando a responder por 95% da produção brasileira, com uma área de cultivo de mais de 700.000 hectares, o que representava 50% das exportações do estado da Bahia (TEIXEIRA et al., 2002). Embora a cultura tenha trazido muita riqueza e desenvolvimento para a região, vários problemas relativos à cacauicultura também trouxeram danos econômicos e sociais a partir do final da década de 1980. O agronegócio do cacau tem enfrentado uma crise sem precedentes desde 1989, quando foi detectado, no sul do estado da Bahia, a doença conhecida por vassoura de bruxa, provocada pelo fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa* (TEIXEIRA et al., 2002). A interação compatível *T. cacao* - *M. perniciosa* provoca um desequilíbrio hormonal na planta, induzindo multibrotações, anomalias nas flores e frutos, levando finalmente à necrose dos botões axilares e terminais, que pode em casos extremos provocar até 100% de perda na produção (FERREIRA, 1997).

A propagação clonal de genótipos superiores tem sido apontada como a melhor estratégia até então para uma rápida recomposição das áreas atingidas pela vassoura de bruxa, e conseqüentemente, recuperação da produção. Sabe-se hoje que a estreita base genética das plantações foi um dos fatores que contribuiu para que a vassoura de bruxa assumisse proporções desastrosas. Desta forma, esta recomposição deve ser conduzida de modo a ampliar a variabilidade genética das novas plantações (TEIXEIRA et al., 2002).

Os programas de melhoramento de cacaueiro já deram os primeiros resultados produzindo clones, que têm como fonte de resistência o clone Scavinia 6 (SCA 6) (PEREIRA, 2001). Estes clones apresentam diferentes graus de tolerância à

doença, além de alta produtividade. Estes são os clones comerciais TSH 1188, TSH 516, TSH 565, importados do programa de melhoramento desenvolvido em Trinidad; EET 397, procedente do Equador e CEPEC 42, desenvolvido pela CEPLAC (FERREIRA, 1997; PINTO; PIRES, 1998). Segundo Pereira (2001), clones destes 5 cultivares estão sendo distribuídos pela CEPLAC para renovação das plantações visando a enxertia e a produção de mudas por estaquia. Teixeira et al. (2002) afirma que para a manutenção do níveis de resistência à vassoura-de-bruxa alcançados como resultado dos programas de melhoramento, as novas variedades também precisam ser melhoradas geneticamente e propagadas clonalmente.

Segundo Dias (2001), a propagação vegetativa convencional tem merecido atenção especial do CEPEC (Centro Experimental de Pesquisas do Cacau). Com o apoio do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, DF) e de outros institutos de pesquisa como o FUNDECAU (Fundo de Defesa da lavoura do cacau – Ilhéus, BA) foi criada uma estrutura logística em Itabuna (BA) para a produção, em larga escala, de mudas clonais de cacau, a partir de estacas. A propagação via enxertia visando, sobretudo, a substituição de copa, já vem sendo conduzida. Da mesma forma, processos de propagação clonal utilizando o enraizamento de estacas foram desenvolvidos e estão sendo utilizados com sucesso na recomposição das lavouras cacaueiras (TEIXEIRA et al., 2002). A previsão é de que sejam entregues, gratuitamente aos cacauicultores, cerca de 7,2 milhões de mudas anualmente, quando a capacidade plena do viveiro for alcançada. Além disso, estima-se que cerca de 2,5 milhões de estacas na forma de garfo também sejam distribuídas anualmente. Este viveiro recebeu o nome de Biofábrica de Cacau (DIAS, 2001).

Dias (2001) percebeu que a manipulação dos dados de capacidade produtiva de mudas clonais produzidas na biofábrica seria aquém da real necessidade regional. Admitindo-se que a densidade convencional de plantio de 111 cacaueiros por hectare e a produção anual máxima de 10 milhões de mudas clonais (entre garfos e mudas de estacas) seriam necessários 48 anos para substituir-se 2/3 (433 mil hectares) da área atualmente cultivada com cacau. Assim, percebe-se a importância de se combinar tecnologias alternativas para viabilizar o processo de renovação da lavoura cacaueira. Nesse contexto, a micropropagação via embriogênese somática, representa uma alternativa importante e complementar à

multiplicação clonal convencional de genótipos. Por meio desta técnica, é possível alcançar altas taxas de propagação (TEIXEIRA et al., 2002).

1.2. Importância sócio-econômica e agroecológica da cacauicultura

O cacaueiro possui importância econômica mundial, pois de seus frutos se extraem as sementes, que após sofrerem fermentação transformam-se em amêndoas, o principal ingrediente da indústria mundial do chocolate, estimada em aproximadamente 58 bilhões de dólares por ano (VENTURIERI; VENTURIERI, 2004). Mais de 20 milhões de pessoas dependem diretamente da cacauicultura para seu sustento, sendo cerca de 90% da produção (principalmente da Costa do Marfim, Gana e Indonésia) exportada na forma de amêndoa ou produtos semi-manufaturados para a Europa e Estados Unidos (GESTEIRA et al., 2007).

As fazendas de cacau também geram benefícios silviculturais, agroecológicos e ambientais, pois a maioria dos sistemas de produção ocorre em sub-bosques (“cabruca”), em que o cacaueiro está implantado sob a proteção das árvores remanescentes de forma descontínua e circundado por vegetação natural, estabelecendo relações estáveis com os recursos naturais associados (LOBÃO, 2007). Esse sistema de produção auxilia na conservação de recursos hídricos, fragmentos e exemplares arbóreos da floresta original de inestimável valor para o conhecimento agronômico, florestal e ecológico (SETENTA et al., 2005).

1.3. Recursos genéticos

Esforços de longo prazo para o melhoramento genético do cacaueiro têm produzido limitado sucesso por muitas razões, incluindo a base genética estreita existente no germoplasma, o ciclo de vida longo da planta (3-6 anos para adquirir a maturidade sexual) e o elevado porte das árvores (maior demanda de recursos como terra e água) (MAXIMOVA et al., 2006). Adicionalmente, por ser cultivado num ambiente úmido e sombreado, favorável ao desenvolvimento de microrganismos, o cacaueiro é atacado por diversos patógenos oportunistas, de modo que as fontes de resistência não tiveram a oportunidade de co-evoluir com a doença.

Os recursos genéticos naturais propiciam a matéria-prima necessária para a criação de novas cultivares mais produtivas, mais adaptadas às regiões de cultivo e

mais resistentes a pragas e doenças de importância econômica. Eles representam o repositório de variabilidade genética potencialmente útil para os programas de melhoramento das espécies cultivadas (ALMEIDA; DIAS, 2001). Porém, para utilização deste vasto “armazém” genético, estudos de caracterização dos acessos devem ser realizados.

Um importante programa de melhoramento realizado em Trinidad, visando ampliar a receita do cacauicultor trouxe vários benefícios ao melhoramento cacauicultura. Entre 1930 e 1980 o programa selecionou vários cacaueiros que deviam apresentar alta produtividade, resistência a vassoura-de-bruxa e a *Ceratocystis fimbriata,* precocidade de produção e alta adaptabilidade (Freeman, 1969). Este programa resultou na obtenção dos clones mundialmente conhecidos TSH (“Trinidad Selection Hybrids” – híbridos de Amazônicos por Trinitários) e TSA (“Trinidad Selection Amazon” – seleções na população de Amazônicos). Estes clones TSH e TSA são precoces, vigorosos, dotados de sementes de coloração rósea e resistentes a vassoura-de-bruxa e *Ceratocistes.* (DIAS, 2001).

1.4. Genômica

Recentemente, expressivos avanços no campo da genômica têm aumentado em muito o atual nível de conhecimento dos aspectos funcionais e estruturais dos genomas vegetais. A genômica tem permitido integrar conhecimento básico de modo a facilitar o melhoramento genético de espécies de importância agronômica. As seqüências completas dos genomas de *Arabidopsis* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) e arroz (International Rice Genome Sequencing Project, 2005), bem como um enorme número de ESTs (*expressed sequence tags*) de plantas estão atualmente disponíveis. Outros projetos de sequenciamento dos genomas de culturas com importância agronômica estão atualmente sendo executados. A combinação desses novos conhecimentos gerados pela genômica com os métodos tradicionais e biotecnológicos de melhoramento é essencial para o desenvolvimento de variedades com características agronômicas superiores.

Apesar da importância da genômica, pouca atenção tem sido dada a pesquisas nessa área em cacaueiro (JONES et al., 2002; VERICA et al., 2004). Recentemente, Gesteira et al. (2007) relataram a produção e análise da primeira biblioteca de ESTs da interação *T. cacao–M. perniciosa*. O foco principal do trabalho

foi obter uma visão global e comparativa da interação suscetível e resistente, por meio da caracterização de transcritos em meristemas de duas diferentes variedades de cacau, uma suscetível (‘Catongo’) e outra resistente (‘TSH 1188’) à doença vassoura-de-bruxa. Neste trabalho, em que foram seqüenciados 6.884 clones de ambas as bibliotecas (suscetível e resistente), vários genes que desempenham um importante papel na defesa contra fitopatógenos foram identificados, incluindo PRs (proteínas relacionadas à patogênese), Avr9/Cf9, proteína de ligação a selênio, beta-1,3-glucanase, quitinase, citocromo P450 e transportadores ABC. As bibliotecas de ESTs geradas nesse estudo são uma valiosa ferramenta para o melhor entendimento dos eventos moleculares envolvidos na interação *T. cacao-M. perniciosa*, bem como para o desenvolvimento de estratégias de controle da vassoura de bruxa por meio de estudos funcionais de genes candidatos de resistência do cacaueiro.

2. Morfogênese *in vitro*

2.1. Aspectos gerais

As duas rotas morfogênicas levando a regeneração de plantas completas, pré-requisito para a aplicação da maioria das técnicas da biologia *in vitro* na genética e melhoramento de plantas, envolvem a embriogênese somática ou organogênese de brotos, seguido de organogênese de raiz. Ambas as rotas de desenvolvimento podem ocorrer diretamente no explante, sem a passagem por um estágio intermediário de calo, chamada de adventícia, ou indiretamente seguindo o estágio de calo desorganizado, chamado “*de novo*” (GAMBORG; PHILLIPS, 1995). Um limitado número de espécies vegetais são capazes de regenerar por ambas as rotas de embriogênese somática e organogênese, mas muitas plantas podem regenerar por uma das duas vias.

A embriogênese somática pode ser considerada como o melhor exemplo de totipotência das células vegetais (THORPE, 2000). Vários fatores da cultura *in vitro* podem ser manipulados visando otimizar a freqüência e a qualidade morfológica dos embriões somáticos, que são estruturas bipolar contendo ambos os ápices caulinar e radicular, e se desenvolvem de uma maneira análoga aos embriões zigóticos. Os fatores típicos que podem ser manipulados incluem o tipo e a concentração de

reguladores de crescimento, o tipo de explante, a composição do meio de cultura (fontes e concentrações de nitrogênio e açúcar), ambiente de cultura (luz, temperatura, ambiente gasoso e umidade) e potencial osmótico. Muitos desses fatores devem ser ajustados ou alterados completamente durante a regeneração de embriões somáticos (THORPE, 2000).

Os mesmos fatores de cultura descritos acima também devem ser manipulados para induzir e otimizar a organogênese *in vitro* (JOY; THORPE, 1999). Devido ao fato dos órgãos (brotos) serem unipolar, dois sinais distintos de indução (um para induzir brotos e outro para induzir raízes) são necessários para regenerar uma planta completa. Em contraste, embriões somáticos são induzidos por um único sinal de indução.

2.2. Componentes genéticos da morfogênese

Um dos avanços mais significativos nos últimos anos tem sido a descoberta de genes específicos envolvidos na regeneração *in vitro* de plantas. Esses genes estão sendo explorados para uso no aumento da eficiência de transformação e desenvolvimento de plantas transgênicas desprovidas de genes marcadores de seleção *in vitro* (PHILLIPS, 2004). Como o uso de fitohormônios é um fator primário envolvido na otimização da embriogênese somática e organogênese, receptores para cada uma das principais classes de fitohormônios têm sido identificados e seus genes correspondentes têm sido clonados.

2.2.1. Aspectos genéticos da embriogênese somática

A expressão transgênica do gene LEC2 (*leafy cotyledon*) é suficiente para desencadear a embriogênese somática (PHILLIPS, 2004). Outros genes também parecem estar envolvidos na transição vegetativa para embriogênica, incluindo *WUS* (*wuschel* ou *PGA6*, ativador do crescimento vegetal), *LEC1* (*leafy cotyledon*), LEC2, *SERK* (*somatic embryogenesis receptor kinase*) e PT1 (*primordial timing*) (PHILLIPS, 2004). SHR (*short root*) estabelece o tecido fundamental seguindo a primeira divisão assimétrica, CLV (*clavata*) e WUS interagem para determinar o destino da célula-tronco, e CLV e STM (*shoot meristemless*) regulam o desenvolvimento do meristema apical caulinar (FLETCHER, 2002; VON ARNOLD et al., 2002). LEC1, ABI3 (*abscisic*

acid-insensitive) e FUS3 (*fusca*) estão envolvidos na maturação do embrião somático (VON ARNOLD et al., 2002).

2.2.2. Aspectos genéticos da organogênese de brotos

CYCD3 está envolvido na aquisição de competência para regeneração de brotos (SUGIYAMA, 1999; FLETCHER, 2002), assim como SRD3 (*shoot redifferentiation*) (SUGIYAMA, 1999, 2000). A rediferenciação de brotos também envolve SRD1 and SRD2 (SUGIYAMA, 1999, 2000). A transição vegetativa para organogênese de brotos é promovida por ESR1 (*enhancer of shoot regeneration*) (ZUO et al., 2002b). Dois genes representando rotas potencialmente independentes envolvidas na transdução de sinal inicial para organogênese de brotos são o *CRE1* (*cytokinin receptor*) e o *CKI1* (*cytokinin independent*) (SUGIYAMA, 2000; ZUO et al., 2002b). A identidade das células-tronco do meristema apical caulinar é regulada por CLV e WUS (FLETCHER, 2002). STM e KN1 (*knotted*) estão envolvidos na função do meristema apical caulinar, de modo que a superexpressão desses genes leva a formação de meristemas caulinares ectópicos (SUGIYAMA, 1999; FLETCHER, 2002). Outros reguladores envolvidos na organização do meristema apical caulinar e formação de brotos laterais incluem SHO (*shoot organization*) e MGO (*mgoun*) (FLETCHER, 2002).

2.3. Morfogênese *in vitro* em cacaueiro

Desde 1977 até o presente momento, vários trabalhos já foram relatados buscando estudar a aplicação da técnica de embriogênese somática na propagação clonal de cacaueiro. Esses trabalhos buscam basicamente a propagação clonal *in vitro*, pois esta metodologia representa uma propagação mais rápida e com menor custo para plantas arbóreas tropicais (SANTOS, 2003). Desde então, diferentes protocolos de cultivo de meristemas ou botões axilares, calogênese, bem como a indução de embriogênese somática, tem sido estabelecidos.

Inicialmente, a formação de embriões somáticos de cacaueiro foi observada por Esan (1977) e Pence et al. (1979) em embriões zigóticos imaturos. Pence et al. (1979) observou que a capacidade regenerativa do explante estava relacionada à fase de desenvolvimento dos embriões. Nestes trabalhos, a germinação de

embriões somáticos em fase cotiledonar não teve sucesso. Litz (1986) utilizou explantes de folhas novas obtidas de estacas enraizadas e relatou a obtenção de embriões somáticos pela adição de reguladores de crescimento, como 2,4-D e BAP, em meio de cultura, mas os embriões morreram na fase inicial de desenvolvimento. Em 1988, embriões somáticos foram obtidos a partir de tecidos maduros, com os trabalhos publicados por Sondahl et al. (1993) e Figueira e Janick (1993), utilizando tecido nucelares como fonte de explantes. A obtenção de embriões somáticos e plantas completas foi relatada nos trabalhos de Lopez-Baez et al. (1993) e Alemanno et al. (1996), que utilizaram tecidos florais como fonte de explantes.

No final dos anos 1990, o uso de tiadizuron (TDZ), um herbicida que apresenta efeito de citocinina, incrementou em muito a capacidade embriogênica de diferentes genótipos de cacaueiro (LI et al., 1998). O uso deste regulador propiciou o desenvolvimento de protocolos para a embriogênese secundária e repetitiva para a espécie (TEIXEIRA et al., 2002; MAXIMOVA et al., 2002), além de trabalhos de regeneração a partir de tecidos maduros (TAN; FURTEK, 2003) e formas alternativas de micropropagação (TRAORE et al., 2003).

Em trabalho visando estudar a eficiência, variabilidade genotípica e a origem celular da embriogênese primária e secundária de cacaueiro, Maximova et al. (2002) observaram que em muitos genótipos, a produção de embriões secundários foi mais uniforme, desenvolvendo-se em pequenos períodos de tempo comparado com a embriogênese primária. Segundo os autores, uma limitação do protocolo desenvolvido para cacaueiro é que a produção de embriões se concentra nos primeiros 8 a 9 meses após iniciação da cultura. Assim, como na embriogênese primária, a eficiência da embriogênese secundária foi dependente do genótipo. Os resultados obtidos para Scavina-6 (SCA-6) indicaram que, além disso, a otimização da idade da cultura primária usada como fonte de segmentos cotiledonares para cada genótipo poderia melhorar a eficiência do método.

Tan e Furtek (2003) realizaram um trabalho onde a indução de embriogênese em cacau foi estudada avaliando-se fatores como estágio fisiológico, tipo de explante floral, composição do meio, fitormônios, além de 52 genótipos de cacau. Assim como no trabalho de Maximova et al. (2002), também foi observado que embriogênese somática em cacau foi afetada pelo genótipo e fonte de açúcar. Com os resultados obtidos, os autores afirmam que uma eficiente regeneração de plantas a partir de embriões somáticos fornece uma base para o melhoramento da cultura,

incluindo a hibridização somática e transformação genética. Todavia, para muitas culturas como cacaueiro, um fator limitante é a necessidade de um protocolo confiável para embriogênese somática e regeneração de um vasto número de genótipos.

Outro exemplo de estudo envolvendo fatores que afetam a embriogênese somática em cacau foi o trabalho de Traore e Guiltinan (2006), no qual foi analisado o efeito de cinco diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, maltose, sorbitol, e sacarose) e dois tipos de explantes (pétalas e estaminóides) na embriogênese somática. Os clones Forastero Laranja e PSUSca 6 e os Trinitários UF 613 e ICS 16 foram utilizados nesse trabalho. Um marcante efeito do genótipo e da composição do meio de cultivo na eficiência de embriogênese somática também foi observado nesse estudo.

A maioria dos trabalhos realizados até então aponta o cacaueiro como sendo uma planta recalcitrante à cultura de tecidos. Uma das maiores dificuldades para sua propagação *in vitro* reside no fato de o cacaueiro calejar com facilidade em meio de cultura, além de existir uma influência marcante do genótipo na capacidade embriogênica e variações na resposta *in vitro* entre os explantes florais de uma mesma planta, bem como variações sazonais observadas. Esforços vêm sendo realizados no sentido de se conhecer melhor os requerimentos para o desenvolvimento dos embriões somáticos de cacaueiro, durante o processo morfogênico dessas estruturas. Recentemente, um gene *SERK* de cacaueiro foi isolado e caracterizado (SANTOS et al., 2005). Estudos de expressão gênica demonstraram que este gene desempenha um importante papel durante o desenvolvimento de embriões e manutenção da embriogênese repetitiva.

3. Transformação genética

3.1. Aspectos gerais

Transformação genética é definida como sendo a introdução controlada de ácidos nucléicos em um genoma receptor, excluindo-se a introdução por fecundação (BRASILEIRO e DUSI, 1999). A transformação genética tem sido uma importante ferramenta para a análise da função e regulação de genes, bem como para o melhoramento de muitas culturas. Uma alta freqüência e eficiência de transformação

são muitas vezes parâmetros críticos para o uso da tecnologia de transferência de genes (LECHTENBERG et al., 2003).

Muitas metodologias de transformação genética vegetal foram desenvolvidas nas últimas décadas. Entretanto, a maioria das plantas transgênicas até agora obtidas foram produzidas pela transformação mediada por *Agrobacterium*, pela transferência direta de DNA para protoplastos e pela aceleração de partículas (ZANATTINI; PASQUALI, 2005). A aceleração de partículas é uma técnica altamente versátil e, geralmente, de alta reprodutibilidade, podendo ser aplicada à grande variedade de células e tecidos vegetais (FISK; DANDEKAR, 1993; FINER et al., 1996). Contudo, a freqüente fragmentação e recombinação do DNA introduzido, bem como a complexidade do padrão de integração e a inserção de múltiplas cópias do gene e/ou vetores, consistem nas desvantagens dessa técnica (SEMENS; SCHIEDER, 1996). Variações na estabilidade, integração e expressão do transgene introduzido, facilitando a obtenção de plantas transgênicas quiméricas são outras desvantagens que reduzem a utilização do método.

A eletroporação tem permitido a produção de plantas transgênicas, principalmente em cereais (DONN et al., 1990). Nesse sistema, que utiliza protoplastos como alvo para a transformação, a permeabilidade da membrana plasmática é aumentada por aplicação de pulsos elétricos, permitindo que o DNA exógeno penetre nas células. Porém, ainda existem sérios problemas quanto à eficiência de regeneração de plantas a partir de protoplastos, podendo ocorrer a redução da fertilidade nas plantas regeneradas (RHODES et al., 1989), além de existirem várias espécies ainda recalcitrantes (FISK; DANDEKAR, 1993).

A transformação genética-mediada por *Agrobacterium* tem sido uma técnica bastante utilizada devido à conveniência do método, mostrando-se mais efetivo com habilidade para introdução de grandes fragmentos de DNA (>100 kb), estabilidade ao passar o transgene para outras gerações, mínima ocorrência de rearranjamentos, reduzido silenciamento de genes associado com a integração do T-DNA em regiões eucromáticas e à alta probabilidade de integração de uma ou poucas cópias do gene, possibilitando a regeneração de plantas com baixo número de cópias, além do baixo custo (WALDEN; WINGENDER, 1995; BARKAT et al., 1997; GELVIN, 2003; SHOU et al., 2004; HANSEN; WRIGHT, 1999; SHIBATA; LIU, 2000; WU et al., 2003). Várias espécies têm sido transformadas por esse sistema (FISK;

DANDEKAR, 1993), embora as monocotiledôneas sejam pouco susceptíveis à infecção por *Agrobacterium*.

Agrobacterium é uma bactéria fitopatogênica do solo, tipo bacilo aeróbico, gram negativo, pertencente à família Rhizobiaceae que compreende, entre outros, os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Phyllobacterium*, que são bactérias fixadoras de nitrogênio (LIPP-NISSINEN, 1993). Dentro do gênero *Agrobacterium*, *A. tumefaciens* é conhecida como patógeno de plantas, causando uma doença conhecida como “galha da coroa” (VAN SLUY, 1999). A infecção ocorre devido a um ferimento no tecido, por onde a bactéria penetra, induzindo a formação do tumor. A indução de tumor é provocada pela presença de um grande plasmídeo denominado Ti (tumor-inducing), encontrado em linhagens virulentas de *A. tumefaciens* (TURGEON, 1982).

O plasmídeo Ti pode ser dividido em regiões, incluindo o (i) T-DNA (*transferred DNA*), que abriga os oncogenes (onc), (ii) a região de virulência (vir), que é indispensável para a transferência do T-DNA e as regiões que compreendem os genes de (iii) replicação e incompatibilidade (ori/inc), (iv) função de conjunção (tra) (CLARE; McCLURE, 1995) e (v) catabolismo de opinas (opc). A região-T ou T-DNA é a única porção do plasmídio transferida para a célula vegetal. Os limites do T-DNA são definidos por seqüências repetidas de 25 pares de bases, que constituem as bordas direita (RB-*Righ Border*) e esquerda (LB-*Left Border*), e que definem a porção do plasmídeo que é transferida para o genoma vegetal (VAN SLUY, 1999). O T-DNA contém genes envolvidos na biossíntese constitutiva de fitohormônios (auxinas e citocininas), que alteram o programa de desenvolvimento normal do tecido infectado, ocasionando a formação de tumor. Além disso, o T-DNA contém genes para a síntese de açúcares e aminoácidos não usuais, denominados genericamente de opinas (GRIERSON, 1994).

Diferentes linhagens de *Agrobacterium* induzem a produção de diferentes tipos de opinas (nopalina, octopina, leucinopina e succinamopina) nas células das plantas infectadas. As opinas produzidas são secretadas para os espaços intercelulares e catabolizadas pela *Agrobacterium* como fonte preferencial de carbono e nitrogênio. Assim, a modificação genética das células vegetais propicia um ambiente adequado para o crescimento da bactéria (DE BLOCK, 1993).

A região responsável pelo processo de transferência do T-DNA é denominada de região de virulência (vir). Essa região é ativada por compostos fenólicos, como

acetoseringona, liberados pelos tecidos vegetais lesados, que atraem a bactéria por quimiotaxia e induzem a expressão dos genes de virulência, iniciando o processo de transferência do T-DNA para a célula vegetal (STACHEL et al., 1985; VAN SLUY, 1999). A região de virulência contém os genes *vir* do plasmídeo, um conjunto de operons corregulados pelas mesmas proteínas. Estas unidades transcricionais denominadas virA, virB, virC, virD, virE e virG possuem um tamanho de aproximadamente 40 kb, estando localizadas adjacente à borda esquerda do T-DNA (HOOYKAA; BEIJERSBERGEN, 1994). Somente quatro locos *vir* são absolutamente essenciais para a formação do tumor (virA, virB, virG e virD), enquanto os outros afetam somente a eficiência de transferência (WEISING; KAHL, 1996). Além dos genes de virulência (*vir*), a *Agrobacterium* possui genes cromossomais (*chv*), envolvidos na quimiotaxia da bactéria até o local da lesão na planta e na ligação desta com a parede celular (SHENG; CITOVSKY, 1996).

O processo de transferência do T-DNA pode ser dividido em duas etapas: uma etapa bacteriana e uma etapa vegetal. A etapa bacteriana inclui eventos que levam à produção e exportação de um vetor funcional contendo a informação genética do T-DNA. A etapa vegetal inclui os eventos que ocorrem dentro da célula vegetal até o momento da integração do DNA bacteriano no genoma da planta (TINLAND, 1996). Após a indução da expressão dos genes *vir*, uma molécula de DNA linear de fita simples (fita-T) é produzida, sendo que as bordas repetidas (25 pb) podem ser usadas para iniciar e terminar a produção da fita-T (ZAMBRYSKI, 1992; HOOYKAA; BEIJERSBERGEN, 1994). A fita-T é transferida para o núcleo da célula vegetal como um complexo proteína-DNA (complexo-T) (WEISING; KAHL, 1996; ZUPAN; ZAMBRYSKI, 1997). Uma vez inserido no genoma da planta, o T-DNA permanece estável, sendo transmitido por meio das gerações mitóticas ou meióticas.

A tecnologia do DNA recombinante possibilita a substituição da seqüência original do T-DNA por seqüências, contendo genes de interesse, que serão transferidas para as células da planta susceptível ao ataque da *Agrobacterium*. Para isto, é necessário a obtenção de uma linhagem de *Agrobacterium* desarmada, onde os genes causadores de tumor são removidos, sendo substituídos pelos genes de interesse (BRASILEIRO; DUSI, 1999). O alto peso molecular e a complexidade do plasmídeo Ti dificultam sua manipulação direta, exigindo o desenvolvimento de vetores alternativos para a utilização da *Agrobacterium* como vetor para a

transformação de plantas (BRASILEIRO; DUSI, 1999). Os vetores utilizados para sistemas de transformação são vetores chamados desarmados, isto é, não possuem os oncogenes em seu plasmídeo, mas retêm os genes de virulência (*vir*), localizados no plasmídeo Ti e os genes do cromossomo bacteriano (*chv*, *pscA* e *att*) (KLEE et al., 1987). Estas construções possuem promotores de plantas e genes bacterianos que conferem resistência a drogas ou antibióticos, fazendo com que estes marcadores sejam eficientes para a seleção de células ou plantas transformadas.

Dentre os fatores que afetam a eficiência da transferência do T- DNA para o genoma vegetal em um protocolo de transformação genética incluem-se aqueles relacionados ao material vegetal (genótipo, idade, tipo de tecido, tamanho e posição dos explantes), virulência de *Agrobacterium* (estirpe, concentração da suspensão bacteriana e duração da fase de co-cultivo), condições do ambiente de cultura (luz e temperatura) e composição do meio de cultura (tipo e concentração de reguladores de crescimento, fonte de carbono, agente gelificante, compostos fenólicos e antibióticos) (van WORDRAGEN; DONS, 1992; De BLOCK, 1993; GELVIN, 2000; COSTA et al., 2002; OGAWA; MII, 2007). Mais recentemente, tem se verificado que a aplicação de pulsos de ultra-som (sonicação; SAAT) para ferir e modificar o tecido alvo aumenta a infecção por *Agrobacterium* (TRICK; FINER, 1997; SANTARÉM et al.,1998).

3.2. Transformação genética em cacaueiro

A embriogênese somática é atualmente a via de regeneração mais utilizada em trabalhos de transformação genética de cacaueiro, mas a baixa eficiência de obtenção de plantas transformadas empregando-se essa metodologia tem sido um fator limitante para maiores avanços (SANTOS, 2003). Existem relatos de transformação genética de cacaueiro pelos métodos de aceleração de partículas (PERRY et al., 2000; SANTOS et al., 2002) e *Agrobacterium* (SAIN et al, 1994; GUILTINAN et al., 1997; MAXIMOVA et al., 2003).

Desde a confirmação do cacaueiro como hospedeiro de *Agrobacterium* (PURDY e DICKSTYEIN, 1989), cinco relatos de transformação genética de cacaueiro mediada por *Agrobacterium* foram publicados. Sain et al. (1994) conseguiram transformar células de folhas de cacaueiro com *Agrobacterium*

tumefaciens, porém não obtiveram sucesso na regeneração de plantas. Guiltinan et al. (1997) conseguiram plantas transgênicas a partir do co-cultivo de embriões somáticos com a agrobactéria, patenteando o sistema *Agrobacterium* alguns anos depois (GUILTINAN et al., 2000). Um trabalho pioneiro com transformação de cacaueiro foi desenvolvido por Maximova et al. (2003), que desenvolveram um sistema de transformação por *A. tumefaciens*, utilizando segmentos cotiledonares de embriões somáticos primários, obtidos por sua vez a partir de estaminóides, como fonte de explantes para indução de embriogênese secundária. Plantas do genótipo SCA-6 foram transformadas com *GFP* por esse método e crescidas até a maturidade. Entretanto, a baixa eficiência de obtenção de plantas transgênicas maduras ainda requer que sejam efetuadas otimizações do protocolo desenvolvido, a fim de viabilizar a transformação genética de cacaueiro como uma metodologia rotineira a ser empregada nos laboratórios. Mayolo et al. (2003) transformaram embriões somáticos de cacau com os genes *GUS* e *GFP* e avaliaram o efeito dos antibióticos cefotaxima, moxalactam, amoxicilina e carbenicilina no potencial de controle de *Agrobacterium* e na embriogênese somática de cacaueiro. Os autores observaram que o antibiótico moxalactam foi efetivo em controlar o crescimento de *Agrobacterium* e ainda aumentou a eficiência da embriogênese somática de cacaueiro. Mais recentemente, Maximova et al. (2006) relatou a transformação genética de cacaueiro com o gene de uma endo-quitinase classe I (*TcChi1*), isolado da própria planta, visando reforçar a resistência da planta contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioiders.*

Os protocolos de Li et al. (1998) e de Maximova et al. (2002), de embriogênese somática primária e secundária de cacaueiro utilizando explantes florais, têm estabelecido a base regenerativa para o desenvolvimento do protocolo de transformação genética de cacaueiro por *Agrobacterium*. Entretanto, devido a baixa eficiência de transformação, otimizações da eficiência de transferência do T-DNA permanecem a serem feitas (MAXIMOVA et al., 2003).

4. Oxalato decarboxilase (OxDc) de *Flammulina velutipes*

A introdução de genes codificando enzimas capazes de degradar o ácido oxálico em plantas transgênicas tem sido bem sucedida em gerar plantas resistentes contra fungos fitopatogênicos (KESARWANI et al., 2000; DIAS et al., 2006). No entanto, o exato papel do ácido oxálico durante a infecção ainda não é bem compreendido. Durante os estágios iniciais do desenvolvimento da doença, o ácido oxálico pode atuar de maneira sinergística com enzimas pectinolíticas, quelando o cálcio dos pectatos de cálcio da parede celular do hospedeiro, levando a maceração dos tecidos, e reduzindo o pH do tecido infectado de modo a favorecer a atividade enzimática (LUMSDEN, 1979). Em outro estudo, foi demonstrado que ácido oxálico inibe a atividade da o-difenol oxidase em maçã, enzima envolvida na resposta de defesa (MAYER; HAREL, 1979; FERRAR e WALKER, 1993). Mais recentemente, Kesarwani et al. (2000) observaram que a resistência de plantas transgênicas de tomate e tabaco conferida por OxDc de *Flammulina velutipes* foi correlacionada com a expressão induzida de proteínas relacionadas à patogênese (PRs).

O ácido oxálico é catabolizado por duas principais rotas, oxidação e descarboxilação. A descarboxilação ocorre pela ativação de ácido oxálico em oxalil-CoA, pela atividade da oxalil-CoA decarboxilase, ou diretamente por sua quebra em CO_2 e ácido fórmico pela atividade da oxalato decarboxilase (OxDc). A oxidação tem sido detectada em plantas onde ácido oxálico é quebrado em CO_2 e H_2O_2.

Mehta e Datta (1991) relataram a clonagem de um gene de *Collybia velutipes* (sin. *Flammulina velutipes* sin.) codificando para a enzima oxalato decarboxilase (OxDc). Essa enzima apresenta diversas vantagens sobre outras enzimas de degradação de oxalato, incluindo a especificidade pelo substrato (oxalato), a quebra de oxalato em CO_2 e ácido fórmico (ácido orgânico não tóxico) numa simples reação e sem a necessidade de cofatores e a exibição de atividade em baixo pH, já que o oxalato está localizado nos vacúlolos, onde o pH é baixo. A expressão dessa enzima em tomate e tabaco resultou na resistência das plantas contra a infecção por *Sclerotinia sclerotium* (KESARWANI et al., 2000). A resistência dessas plantas foi correlacionada com a expressão induzida de proteínas relacionadas à patogênese (PRs), provavelmente devido aos produtos da quebra do oxalato atuarem como um sinal para a indução de genes de defesa.

OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi estabelecer um sistema eficiente de regeneração *in vitro*, via embriogênese somática, e de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para clones comerciais de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), para aplicação em estudos funcionais de genes candidatos de resistência ao fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença “vassoura de bruxa” do cacaueiro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito de alguns fatores que afetam a embriogênese somática primária e secundária em clones comerciais de cacaueiro (‘TSH 565’ e ‘TSH 1188’);
- Examinar o efeito de fatores afetando a eficiência de transferência gênica em cacaueiro, utilizando *GUSint* como gene repórter de transformação;
- Utilizar o gene candidato de resistência OxDC (oxalato decarboxilase), do fungo *Flamullina velluptes*, em trabalhos de transformação genética do clone ‘TSH 565’, visando a produção de plantas de cacaueiro transgênicas e futura avaliação da resistência ao fungo *M. perniciosa*.

CAPÍTULO 1

OTIMIZAÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA EM CLONES COMERCIAIS DE CACAUEIRO (‘TSH 565’ E ‘TSH 1188') PARA APLICAÇÃO EM TRABALHOS DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

RESUMO

No presente estudo, objetivou-se analisar alguns fatores que afetam a embriogênese somática primária e secundária em clones comerciais de cacaueiro (‘TSH 565’ e ‘TSH 1188’), de modo a produzir um protocolo otimizado de regeneração de embriões somáticos aplicável em trabalhos de transformação genética. Foram avaliados três tipos de agentes vedantes das placas de petri (Parafilme, filme de PVC e fita cirúrgica), o tipo e a concentração da fonte de carbono em meio de desenvolvimento embrionário (3% ou 4% de sacarose combinada ou não com 0,1% de glicose) e tipos (putrescina, espermidina e espermina) e concentrações (1, 100 e 1000 µM) de poliaminas na regeneração de embriões primários ou secundários. Observou-se que explantes cultivados em placas de petri seladas com fita cirúrgica produziram freqüências significativamente maiores de calos embriogênicos, embora não tenha sido observada diferença significativa quanto ao número médio de embriões por calo embriogênico entre os diferentes agentes vedantes. Em relação a fonte de carbono, verificou-se que a resposta foi genótipo-específica. Para ‘TSH 565’, a melhor combinação de açúcar em meio de desenvolvimento embrionário foi

aquela em que se utilizou 4% de sacarose no primeiro subcultivo (2 semanas), seguido de subcultivos subsequentes (a cada 2 semanas) em meio contendo 3% de sacarose, ambos os meios desprovidos de glicose. Já para ‘TSH 1188’, as melhores respostas foram obtidas em meio de desenvolvimento contendo 3% de sacarose e desprovido de glicose, ao longo dos subcultivos. A suplementação de poliaminas no meio de cultura aumentou significativamente a regeneração de embriões somáticos secundários. Explantes cultivados em meio contendo 1000 μM de espermina apresentaram uma freqüência 5x maior de calo embriogênico, produziram 2,53x mais embriões e 6,45x mais embriões leitosos do que explantes cultivados em meio desprovido de poliaminas. A combinação dos melhores tratamentos para cada fator analisado permitiu o estabelecimento de um protocolo otimizado para a produção de embriões somáticos em clones comerciais de cacaueiro, aplicável em trabalhos de transformação genética.

1. INTRODUÇÃO

Um sistema eficiente de regeneração "*de novo*" de plantas a partir da cultura de células e tecidos é reconhecido como o pré-requisito para a aplicação de muitas ferramentas da biologia *in vitro* na genética e melhoramento de plantas. A maioria dos protocolos de transformação genética de plantas depende dos procedimentos da cultura de tecidos para regenerar plantas completas a partir das células que receberam o transgene. Assim, a avaliação das respostas morfogênicas *in vitro* é fundamental para se determinar a fonte de explante mais apropriada, além da composição do meio de cultura e demais condições de incubação para a regeneração dos explantes.

A embriogênese somática é a via preferencial de regeneração *in vitro* de plantas de cacaueiro, que ainda é considerada uma planta recalcitrante à cultura de tecidos (SANTOS, 2003). Os primeiros relatos de obtenção de embriões somáticos de cacaueiro foram publicados por Esan (1977) e Pence et al. (1979), os quais descreveram um método usando embriões zigóticos imaturos como fonte de explantes, porém sem sucesso na germinação *in vitro*. Estudos posteriores de embriogênese somática em cacaueiro foram documentados utilizando outros tecidos como fonte de explantes, incluindo folhas novas (LITZ, 1986), órgãos florais como estaminóide e pétalas (LOPEZ-BAEZ, et al., 1993; ALEMANNO et al., 1996) e tecido nucelar (SÖNDAHL et al., 1993; FIGUEIRA; JANICK, 1993). Todavia, esses sistemas apresentaram limitado sucesso na produção de embriões somáticos, sendo aplicáveis a poucos genótipos e com baixa taxa de conversão em plântulas.

No final dos anos 1990, Li et al. (1998) relataram um método eficiente de embriogênese somática em cacaueiro, capaz de propagar uma ampla variedade de genótipos. Esse método combinou o emprego de tecidos florais como fonte de explantes e tiadizuron (TDZ), um herbicida que apresenta efeito de citocinina. O uso de TDZ ainda proporcionou posteriormente a melhoria da eficiência do método descrito por Li et al. (1998), por meio do desenvolvimento de um protocolo para a

embriogênese secundária e repetitiva empregando-se segmentos cotiledonares de embriões somáticos primários como fonte de explantes (MAXIMOVA et al., 2002). Essa nova metodologia aumentou em muito a taxa de multiplicação e reduziu o custo de produção de plantas ortotrópicas. Este sistema de regeneração tem sido importante não somente para a rápida multiplicação clonal, mas também para a obtenção de plantas de cacaueiro contendo genes de interesse por meio de transformação genética (MAXIMOVA et al., 2006).

Utilizando como base o sistema de regeneração desenvolvido por Maximova et al. (2002), o objetivo desse estudo foi otimizar os processos de embriogênese somática primária e secundária em clones comerciais de cacaueiro (‘TSH 565’ e ‘TSH 1188’), por meio da análise de alguns fatores que afetam as suas eficiências. Foram avaliados três tipos de agentes vedantes das placas de petri durante o cultivo *in vitro,* o tipo e concentração da fonte de carbono no meio de desenvolvimento de embriões primários, além do efeito de tipos e concentrações diferentes de poliaminas na indução de embriões secundários. A análise destes fatores permitiu o estabelecimento de um protocolo otimizado para a produção de embriões somáticos em clones comerciais de cacaueiro, aplicável em trabalhos de transformação genética.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Os clones de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) ‘TSH 565’ e ‘TSH 1188’ foram utilizados no presente estudo. Esses clones, que foram produzidos pelo programa de melhoramento de Trinidad, são mais precoces, vigorosos, resistentes ao patógeno *Moniliophthora perniciosa* (DIAS, 2001) e recomendados comercialmente para utilização no programa de revitalização da lavoura cacaueira no sul da Bahia (AHNET, 1997).

2.2. Coletas

As coletas de botões florais foram realizadas semanalmente no PROSEC (Setor de Produção de Sementes da CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Ilhéus, BA), entre 8:00 e 9:00 h. Na coleta, os botões foram previamente selecionados quanto ao tamanho, já que botões maiores e próximos da abertura facilitam a manipulação e apresentam melhores respostas ao cultivo *in vitro*. Os botões florais foram retirados das almofadas florais, com o auxílio de pinça, e colocados em tubos falcons acondicionados em caixas de isopor contendo gelo para o transporte até o laboratório (Figura 1).

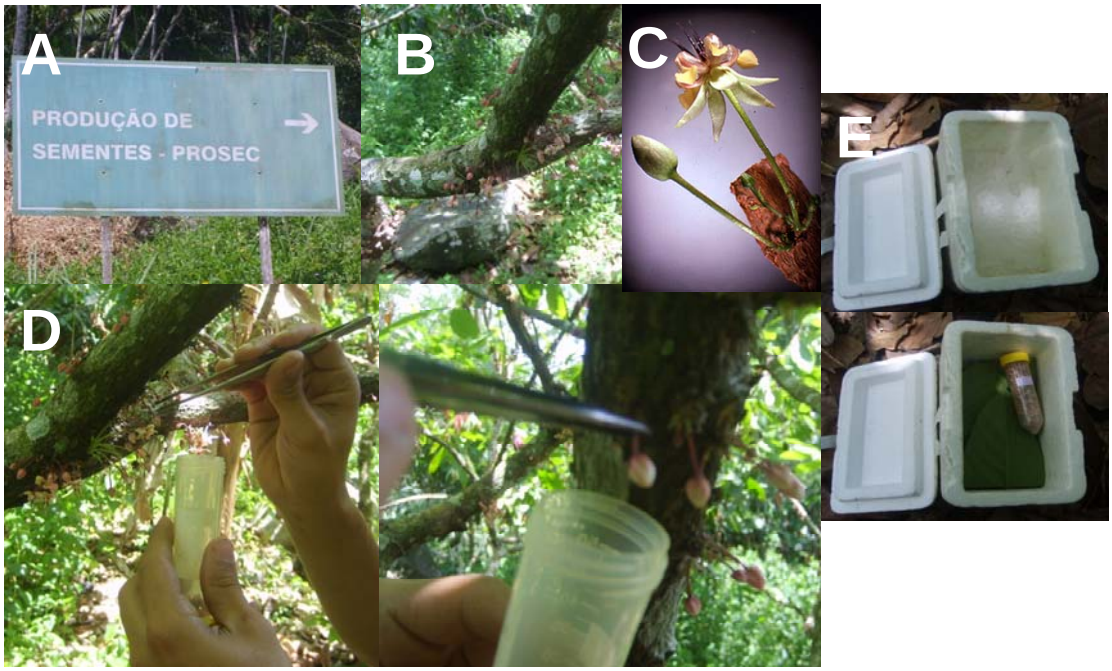


Figura 1 - **Coleta e seleção de botões florais:** A - Local de coleta (PROSEC), B – Caule com botões florais, C – Botão floral fechado e aberto, D – Seleção e coleta de botões, E – acondicionamento para transporte.

2.3. Desinfestação

Prévio a desinfestação no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UESC, os botões florais foram novamente selecionados quanto ao tamanho, soldadura das sépalas, deformidades ou lesões. O processo de desinfestação constou da imersão dos botões florais em álcool 70% (v/v) por 1 minuto e 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) e Tween-20 (2 gotas/100 mL) por 12 minutos. Em seguida, os botões foram lavados 5 vezes em água MilliQ estéril.

2.4. Fonte de explantes

As pétalas dos botões florais foram utilizadas como fonte de explantes para a indução de calos primário, secundário e embriões somáticos, devido apresentarem maior taxa de produção de embriões somáticos leitosos, os quais apresentam maior taxa de conversão em plântulas (Figura 2) (PETERS, comunicação pessoal Ceplac, 2000).

Figura 2.- Botão floral de cacaueiro aberto evidenciando os explantes: A - pétalas – setas em cor rosa; estaminóides – setas em cor branca; B - Pétalas excisadas para introdução *in vitro.*

2.5. Introdução de material *in vitro*

O processo de introdução de material *in vitro* foi realizado de acordo a metodologia descrita por Li et al. (1998). Brevemente, os botões florais foram abertos com um corte transversal feito na base do botão após a desinfestação (Figura 3), de forma que as sépalas, estaminóides e pétalas fossem seccionadas da base do botão.

Os cortes foram feitos na base, onde as pétalas se inserem no receptáculo floral. Para excisão das pétalas, que foi realizada em câmara de fluxo laminar, foram utilizados papel filtro estéril umedecido e pinça e bisturi previamente esterilizados por autoclavagem. Em seguida, as pétalas foram colocadas em placas de petri contendo 25 mL de meio de cultivo PCG, com a concavidade voltada para baixo.

Figura 3. Corte transversal no botão floral de cacau.

2.6. Embriogênese somática primária

Embriões somáticos primários foram produzidos como previamente descrito por Li et al. (1998), com algumas modificações. Inicialmente, os explantes petalares foram introduzidos *in vitro* em meio PCG (*Primary Callus Growth Medium*). O meio PCG constou dos sais basais e vitaminas de DKW (DRIVER; KUNIYUKI, 1984), 100 mg L^{-1} de inositol, 250 mg L^{-1} de glutamina, 20 g L^{-1} de glicose, 2 mg L^{-1} de 2,4-D, 0,005 mg L^{-1} de TDZ e 2 g L^{-1} de *phytagel* (Sigma Chemical Company, EUA), em pH 5,8. As culturas foram mantidas em meio PCG por 14 dias, à temperatura de 27 ± 2°C, no escuro, seguido da transferência para meio SCG-2 (*Secondary Callus Growth Medium*), onde permaneceram por mais 14 dias sob as mesmas condições de incubação. O meio SCG-2 constou dos sais de WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), vitaminas de Gamborg (GAMBORG, 1966), 20 g L^{-1} de glicose, 2 mg L^{-1} de 2,4-D, 0,05 mg L^{-1} de BAP e 2,2 g L^{-1} de *phytagel* (Sigma Chemical Company, EUA), em pH 5,8. As culturas foram depois transferidas para meio de indução de embriões ED4s/g (*Embryo Development Medium*), sendo mantidas por 14 dias nesse meio e

posteriormente subcultivadas a cada 14 dias em meio ED3s/g, sob as mesmas condições de incubação anteriores. Os meios ED4s/g (meio de desenvolvimento embrionário sem glicose e com 4% de sacarose) e ED3s/g (meio de desenvolvimento embrionário sem glicose e com 3% de sacarose) constaram dos sais basais e vitaminas de DKW, 40 g L^{-1} e 30 g L^{-1} de sacarose, respectivamente, 2 g L^{-1} de *phytagel* (Sigma Chemical Company, EUA), em pH 5,8. Aqueles embriões que atingiram o estágio maduro, aproximadamente 60 dias em meio ED, foram selecionados para a conversão em plântulas ou tiveram seus cotilédones utilizados como fonte de explantes para a indução de embriões secundários. A indução de novos embriões primários ocorreu ao longo de pelo menos 18 meses de cultivo.

2.7. Embriogênese somática secundária

Buscando induzir a regeneração de embriões somáticos secundários a partir de segmentos cotiledonares de embriões somáticos primários (MAXIMOVA et al., 2002), embriões primários leitosos maduros, com aproximadamente 60 dias de idade, foram usados como fonte de explantes. Os cotilédones foram excisados em segmentos com tamanho aproximado de 2 mm^2, em câmara de fluxo laminar e sobre papel filtro umedecido, com o auxilio de bisturi e pinça estéreis. Em seguida, os explantes foram colocados em 25 mL de meio SCG-2, onde permaneceram por um período de 14 dias sob as mesmas condições de cultivo descritas no item 2.6. para a embriogênese primária. Após esse período, em que ocorreu a indução de calos secundários em meio SCG-2, os explantes foram transferidos para meio de indução de embriões ED4s/g, seguido do ED3s/g, conforme metodologia descrita no item 2.6. A formação de embriões secundários ocorreu dentro de 2 a 3 meses após a iniciação das culturas. Os embriões secundários leitosos maduros e normais foram conduzidos para conversão em plântulas como descrito no item 2.8.

2.8. Conversão de embriões somáticos em plântulas

Embriões somáticos leitosos maduros (2 cm), com cotilédones distintos e eixos estendidos, foram selecionados para a conversão em plântulas. Os embriões maduros foram transferidos para placas de petri contendo 30 mL de meio ED3s/g, onde foram mantidos por um período de 14 dias a 27 ± 2°C e sob regime luminoso de 16:8 h luz:escuro (36 umoles.m^2.s^{-1} de irradiância). Após esse período, os embriões foram transferidos para o meio PEC (*Primary Embryo Conversion Medium*), onde permaneceram por 30 dias, sob as mesmas condições de incubação anteriores, até que as plântulas com 1-2 folhas se desenvolvessem. O meio PEC constou dos sais basais e vitaminas de DKW, 300 mg L^{-1} de KNO_3, solução de aminoácidos (TRAORE et al., 2003), 20 g L^{-1} de glicose e 2 g L^{-1} de *phytagel* (Sigma Chemical Company), em pH 5,8. As plântulas desenvolvidas foram então transferidas para frascos Magenta contendo 100 mL de meio RD (*Root Development and Maintenance Medium*) e mantidas sob as mesmas condições de incubação descritas para o meio PEC. O meio RD constou da metade dos sais basais e vitaminas de DKW, 300 mg L^{-1} de KNO_3, 10 g L^{-1} de glicose, 5 g L^{-1} de sacarose e 1,75 g L^{-1} de *phytagel* (Sigma Chemical Company, EUA), em pH 5,8. As culturas foram transferidas para novo meio RD a cada 2 meses, até apresentarem sistema radicular desenvolvido. As plântulas com sistema radicular desenvolvido foram aclimatizadas em frascos Magenta com água estéril. Os frascos foram vedados com parafilme e mantidos em casa de vegetação. Pequenos orifícios foram efetuados no parafilme a cada 3 dias, até a sua completa retirada. As plântulas aclimatizadas foram transferidas para vasos plásticos contendo substrato (Plantmax, Eucatex Agro®) e mantidas em casa-de-vegetação.

2.9. Experimentos de morfogênese *in vitro*

Com o objetivo de otimizar a embriogênese somática primária e secundária nos clones comerciais de cacaueiro ‘TSH 565’ e ‘TSH 1188’, alguns experimentos foram conduzidos conforme segue abaixo.

2.9.1. Avaliação da influência dos agentes vedantes na indução de embriões somáticos primários

Para este experimento, foram analisados os efeitos de três tipos de agentes vedantes das placas de petri (parafilme, filme de PVC e fita cirúrgica) na embriogênese somática primária dos clones de cacaueiro ‘TSH 1188’ e ‘TSH 565’ (Figura. 4). Para a montagem desse experimento, foram efetuados coleta, desinfestação, introdução de material *in vitro* e indução da embriogênese somática primária conforme as metodologias descritas nos itens 2.2, 2.3, 2.5 e 2.6. Os tratamentos foram estabelecidos quando os explantes foram colocados em meio PCG, e continuou por todo o tempo de cultivo nos meios SCG-2 e ED (ED4s/g e ED3s/g).

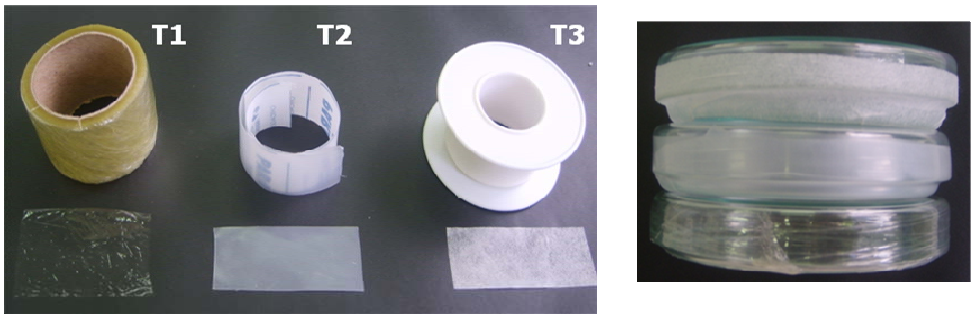


Figura 4 - Agentes vedantes da placas de petri: T1 – filme de PVC, T2 – parafilme e T3 – fita cirúrgica. Ao lado as placas com os vedantes.

2.9.2. Avaliação da influência do tipo e concentração da fonte de carbono na indução de embriões somáticos primários

Para estudar o efeito da fonte e concentração de carbono na eficiência de indução de embriões primários nos clones de cacaueiro ‘TSH 565’ e ‘TSH 1188’,

foram analisadas diferentes concentrações de sacarose, combinada ou não com glicose, nos meios de desenvolvimento embrionário (ED) (Tabela 1). Os tratamentos foram estabelecidos após a passagem dos explantes pelos meios PCG e SCG-2, conforme descrito no item 2.6.

Tabela 1- Composição dos tratamentos de fontes de carbono utilizadas em meio de desenvolvimento embrionário (ED)

Tratamentos		Meios: ED (1º subcultivo - 14 dias)	Meios: ED (cultivos subseqüentes)
Com Glicose (0,1%)	T1	4% sacarose	4% sacarose
	T2	4% sacarose	3% sacarose
	T3	3% sacarose	3% sacarose
Sem Glicose	T4	4% sacarose	4% sacarose
	T5	4% sacarose	3% sacarose
	T6	3% sacarose	3% sacarose

2.9.3. Avaliação da influência do tipo e concentração de poliaminas na indução de embriões somáticos secundários

Nesse experimento foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações (1, 100 e 1000 μM) das poliaminas espermina, espermidina e putrescina na eficiência de indução de embriões somáticos secundários do clone de cacaueiro ‘TSH 565’. Segmentos cotiledonares de embriões somáticos primários foram cultivados em meios SCG-2, ED4s/g e ED3s/g, conforme a metodologia descrita no item 2.7, suplementados com poliaminas.

2.10. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 3-5 repetições por tratamento. Cada repetição constou de uma placa de petri contendo 25 explantes. Os experimentos foram repetidos pelo menos 1 vez. Os experimentos foram avaliados após 60 dias de cultivo dos explantes em meio ED, com o auxílio de uma lupa (LEIKA EZ40 D). As variáveis analisadas foram freqüências de calo embriogênico e de calos com raiz, número médio de embriões por explante e número médio de embriões leitosos e translúcidos por explante. Os dados foram analisados pelo teste de teste de Bonferroni, com nivel de 5% de probabilidade.

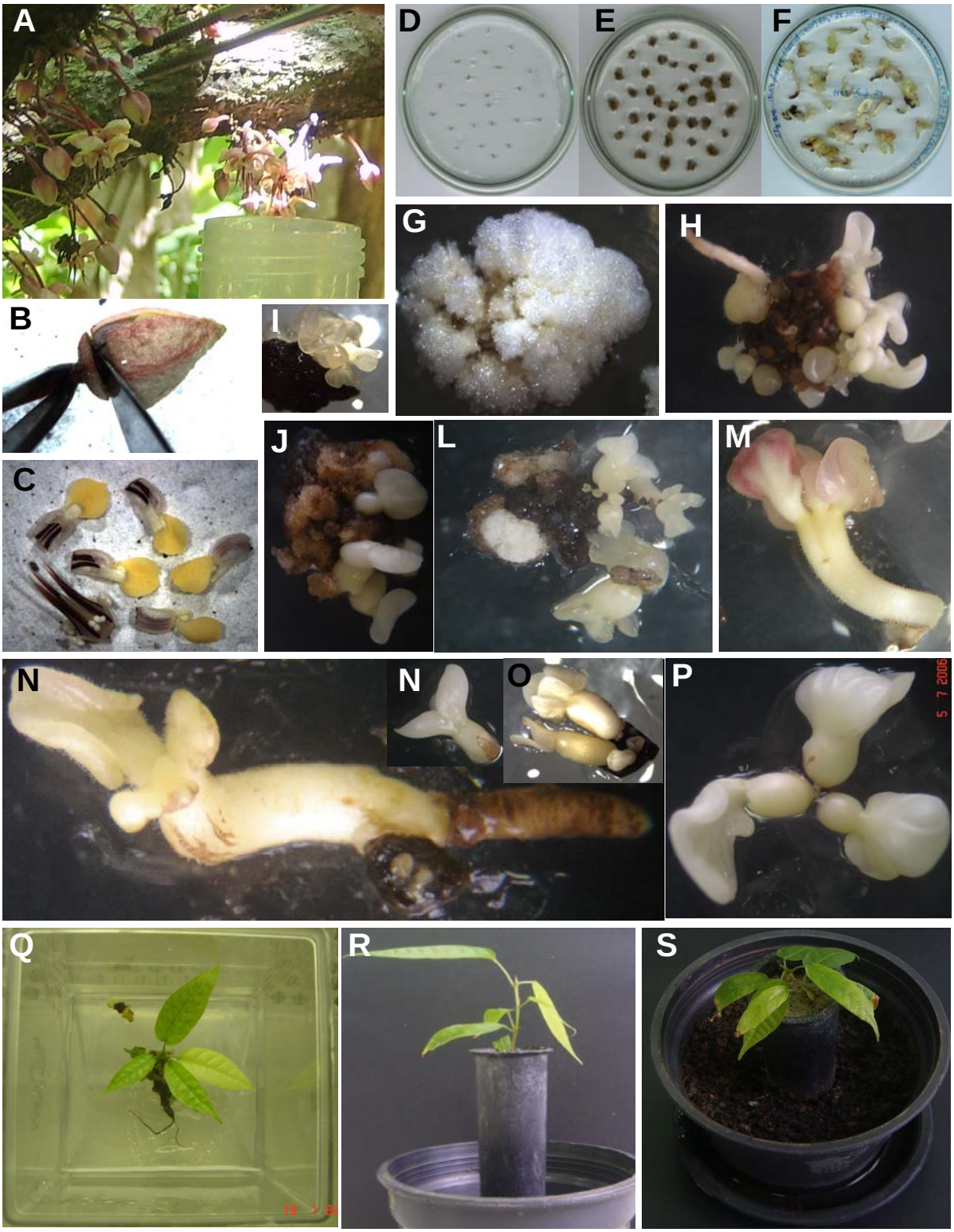
3. RESULTADOS

3.1. Caracterização da embriogênese somática em ‘TSH 1188’ e ‘TSH 565’

O cultivo e regeneração *in vitro* de genótipos de cacaueiro ‘TSH 1188’ e ‘TSH 565’ encontra-se ilustrada na Figura 1. Pétalas de botões florais foram utilizadas como fonte de explante (Figura 1C) para realização dos experimentos de morfogênese *in vitro.* Os explantes de ambos os clones de cacaueiro expandiram duas a três vezes o seu tamanho original em apenas uma semana de cultivo em meio PCG (Figura 1D). Seguindo esse período de expansão, a formação de calo sobre a superfície de todo o explante foi aparente no final do período de cultivo em meio SCG-2 (Figura 1E). O subcultivo subseqüente dos explantes em meio de indução de embriões (ED) levou a produção de dois tipos de calos morfologicamente distintos, ao final de 14 dias em meio ED4s/g. O primeiro tipo consistiu de células mais alongadas e de aparência esbranquiçada (Figura 1G). Embriões somáticos quase nunca se desenvolveram desses “clusters” de células. O segundo consistiu de células arredondadas e de aparência marrom clara a escura e friável sob a lupa (Figura 1H). Esses “clusters” de células foram freqüentemente associados com embriões somáticos. Protuberâncias pré-embriônicas emergiram da superfície dos calos embriogênicos, freqüentemente em “clusters”, ao final de 14 dias de cultivo em meio ED4s/g. Após duas semanas de cultivo dos calos em meio ED3s/g, ou aproximadamente 2 meses após a iniciação das culturas, a superfície de alguns calos apresentou-se coberta de embriões somáticos com diferentes morfologias e estágios de desenvolvimento (Figuras 1J). A iniciação de novos embriões somáticos primários foi observada por mais de 18 meses de cultura dos calos embriogênicos em meio ED3s/g. Embriões com diferentes estágios de desenvolvimento (globular, coração, torpedo e maduro) e coloração (leitosos e translúcidos) foram observados no mesmo explante (Figura 1L). Embriões primários maduros (Figuras 1M, 1N)

foram selecionados para serem convertidos em plântulas (Figuras 1Q, 1R e 1S), ou para serem usados como fonte de explantes para embriogênese secundária (Figuras 1N e 1P). Foi observado que os embriões maduros do clone ‘TSH 1188’ apresentaram maior taxa de conversão em plântulas do que os embriões do clone ‘TSH 565’ (dados não mostrados). Esse resultado pode estar associado à morfologia dos embriões, já que ‘TSH 1188’ apresentou maior freqüência de embriões com morfologia normal quando comparado a ‘TSH 565’. Com base no protocolo de embriogênese somática utilizado (MAXIMOVA et al., 2002), foi possível regenerar plantas completas dos clones ‘TSH 1188’ e ‘TSH 565’ em aproximadamente 8 meses após a iniciação das culturas (Figuras 1 R e S).

Figura 1 – Cultivo *in vitro* e regeneração de plantas via embriogênese somática dos genótipos de cacaueiro ‘TSH 1188’ e ‘TSH 565’, a partir de pétalas. A – Seleção e coleta de botões florais no campo; B – Excisão de explante do botão floral; C – pétalas e estaminóides após excisão; D – Pétalas introduzidas *in vitro* em meio PCG para calogênese primária; E – Calos secundários cultivados em meio SCG-2; F – Embriões somáticos maduros mantidos em meio $ED3_{s/g}$; G – Calo compacto; H – Calo embriogênico com a presença de embriões em diferentes fases de desenvolvimento e apresentando raiz; I – Embriões translúcidos; J – Calo embriogênico apresentando embriões leitosos com boa formação cotiledonar L – Calo embriogênico apresentando embriões leitosos e translúcidos; M – Embrião maduro do genótipo ‘TSH 1188’; N – Embriões maduros genótipo ‘TSH 565’; O – explante cotiledonar produzindo embrioões secundários leitosos sem formação de calo; P – Embriões leitosos; Q - Conversão de embriões em planta em magenta contendo meio RD; R – Plântula de cacau evidenciando 2 pares de folhas completas; R - Planta aclimatada do genótipo ‘TSH 1188’; S – Planta aclimatada do genótipo ‘TSH 565’.


A
D
E
F
G
H
B
I
J
L
M
C
N
N
O
P
5 7 2006
Q
R
S

3.2. Efeito de diferentes agentes vedantes das placas de petri na indução de embriões somáticos primários

Comparando-se o efeito de diferentes agentes vedantes das placas de cultura na embriogênese somática primária, foi observado que a fita cirúrgica *micropore tape* proporcionou a maior freqüência de obtenção de calos embriogênicos em ambos os genótipos avaliados (Figura 2), embora diferença estatística foi observada somente para o clone 'TSH 1188'. Quando se analisou o número médio de embriões por explante, verificou-se entretanto que não houve diferença significativa entre os diferentes agentes vedantes testados (Figura 3). Embora os dois genótipos testados apresentaram freqüências similares de calos embriogênicos entre os tratamentos (Figura 2), o clone 'TSH 565' produziu um número médio de embriões por explante significativamente maior do que aquele produzido pelo clone 'TSH 1188' (Figura 3).

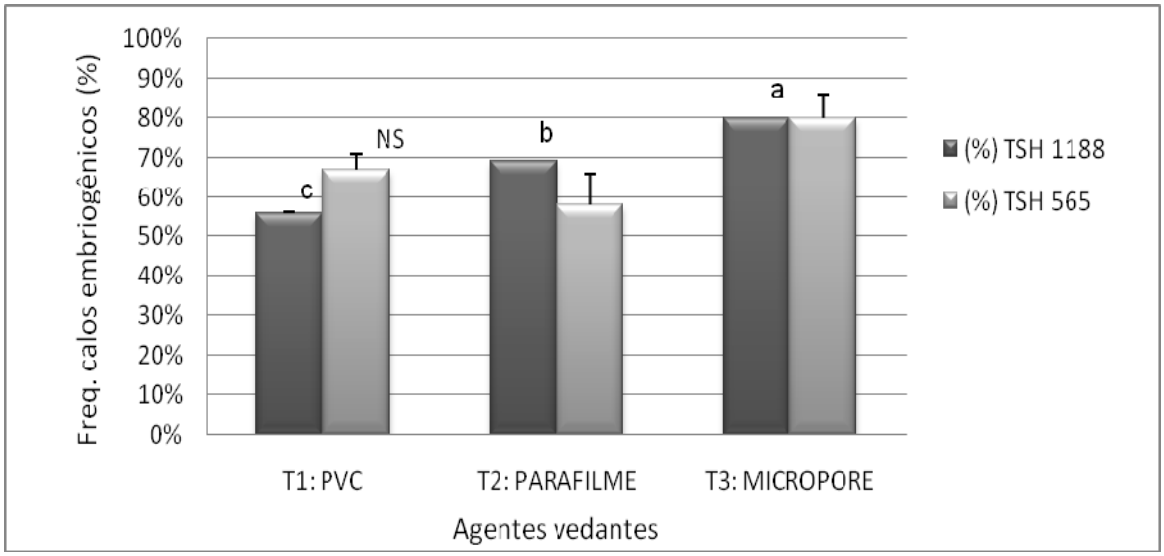


Figura 2 – Freqüência média de calos embriogênicos nos genótipos 'TSH 1188' e 'TSH 565' cultivados em placas de petri com três diferentes agentes vedantes. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, para cada genótipo, não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Bonferroni.

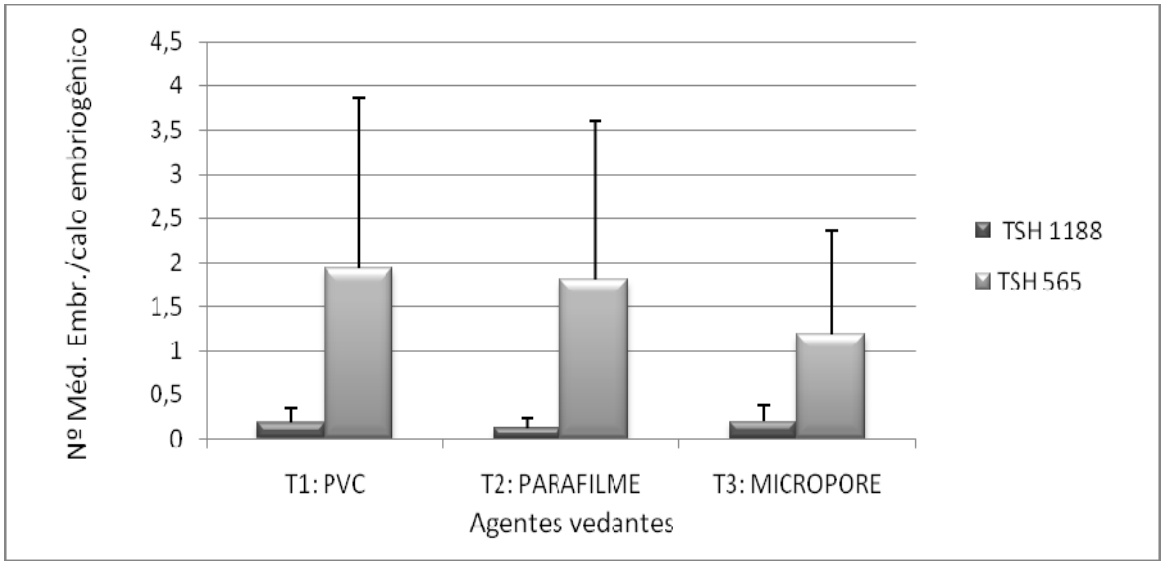


Figura 3 – Número médio de embriões por calo embriogênico nos genótipos ‘TSH1188’ e ‘TSH 565’ cultivados em placas de petri com três diferentes agentes vedantes.

3.3. Efeito da fonte e concentração de carbono em meio de indução de embriões somáticos primários (ED)

Os tratamentos T2 (49%) e T6 (49%) proporcionaram a maior freqüência de calos embriogênicos para o genótipo ‘TSH 565’, enquanto que para ‘TSH 1188’ a maior freqüência foi obtida no tratamento T1 (10%) (Figura 4). Entretanto, essa diferença não foi significativa pelo teste de Bonferroni ao nível de 5% de probabilidade. Uma observação importante foi que os explantes do clone ‘TSH 1188’ não produziram calos embriogênicos quando cultivados no tratamento T4.

Avaliando a freqüência de calos com raiz, uma característica indesejável para a indução de embriões somáticos, verificou-se que o tratamento T6 proporcionou a menor freqüência para o clone ‘TSH 565’ (3%), embora esse tratamento não tenha diferido significativamente dos tratamentos T1, T2, T3 e T5 (Figura 5). Para esse clone, o tratamento T4 produziu uma freqüência significativamente maior de calos com raiz comparada com os demais tratamentos. Para o clone ‘TSH 1188”, o tratamento T5 foi o que proporcionou a menor freqüência de calos com raíz (6%),

embora essa diferença não tenha sido significativa quando comparada com os demais tratamentos.

Em relação ao número médio de embriões por calo embriogênico, os calos de ‘TSH 565’ cultivados nos tratamentos T1, T2 e T5 produziram os maiores números de embriões (5,53, 5,55, 5,44, respectivamente), embora essa diferença não tenha sido significativa (Figura 6). Os tratamentos T2 e T6 proporcionaram os melhores resultados para o clone ‘TSH 1188’ (1,6).

Comparando-se a coloração dos embriões, aqueles de aspecto leitoso apresentam maiores taxas de conversão em plântulas quando comparados aos embriões de aspecto translúcido. Nesse sentido, a coloração dos explantes foi uma importante variável analisada ao longo dos experimentos de morfogênese *in vitro*. Os tratamentos T1 e T5 determinaram a produção de um número significativamente maior de embriões leitosos por calo embriogênico no clone ‘TSH 565’, quando comparado aos demais tratamentos (Figura 7). Para ‘TSH 1188’ os melhores tratamentos foram T2 e T6, embora as diferenças observadas não foram significativas quando comparadas com os demais tratamentos. Em relação a produção de embriões translúcidos, verificou-se que os tratamentos T2 e T6, para o clone ‘TSH 565’, e T5, para o clone ‘TSH 1188’, foram os que mais produziram embriões translúcidos, embora não tenha sido observada diferença estatística entre os tratamentos (Figura 8). Para o clone ‘TSH 1188’ foi observado ainda que os calos cultivados nos tratamentos T1 e T2 não produziram nenhum embrião translúcido.

Nesse conjunto de experimentos, também se observou uma maior capacidade embriogênica do clone ‘TSH 565’ em relação ao clone ‘TSH 1188’. O maior número médio de embriões por calo embriogênico para ‘TSH 565’, de 5,55, foi observado quando os explantes foram cultivados no tratamento T2. Porém, para ‘TSH 1188’ o maior número médio de embriões por calo embriogênico foi de 1,6, obtido quando os explantes foram também cultivados no tratamento T2.

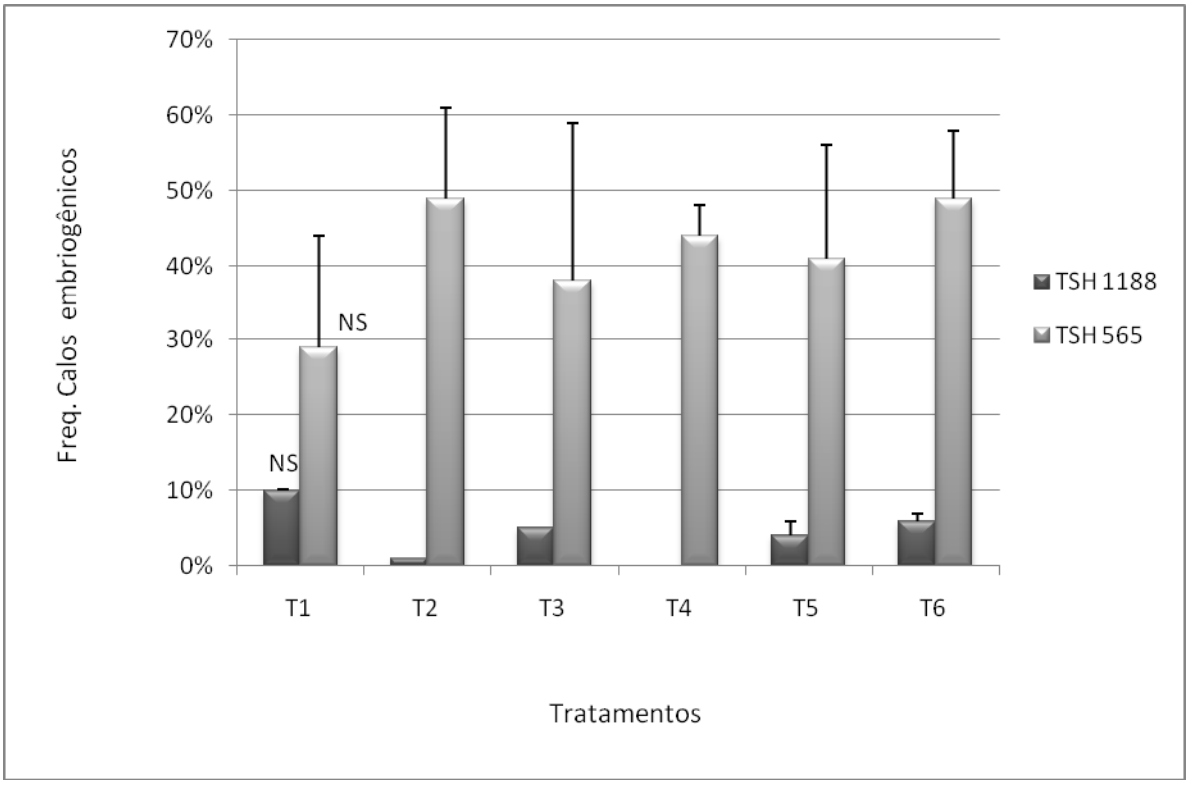


Figura 4 – Freqüência de calos embriogênicos nos genótipos ‘TSH 1188’ e ‘TSH 565’ em seis diferentes concentrações e combinações de fontes de carbono em meio de indução embrionária (ED). Tratamentos: T1 – ED4c/g→ED4c/g; T2 – ED4c/g→ED3c/g; T3 – ED3c/g→ED3c/g; T4 – ED4s/g→ED4s/g; T5 – ED4s/g→ED3s/g; T6 – ED3s/g→ED3s/g.

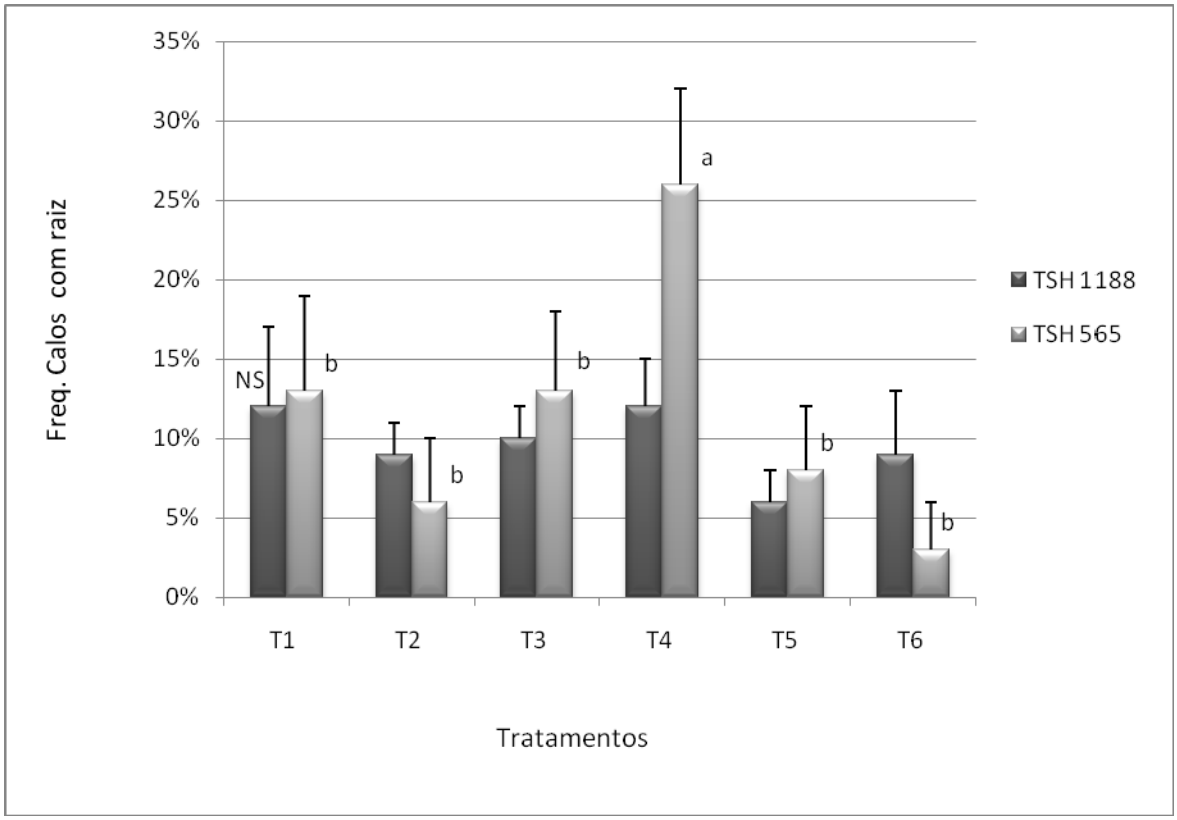


Figura 5 – Freqüência de calos com raiz nos genótipos ‘TSH 1188’ e ‘TSH 565’ em seis diferentes combinações e concentrações de fontes de carbono em meio de indução embrionária (ED). Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, para cada genótipo, não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Bonferroni. Tratamentos: T1 – ED4c/g→ED4c/g; T2 – ED4c/g→ED3c/g; T3 – ED3c/g→ED3c/g; T4 – ED4s/g→ED4s/g; T5 – ED4s/g→ED3s/g; T6 – ED3s/g→ED3s/g.

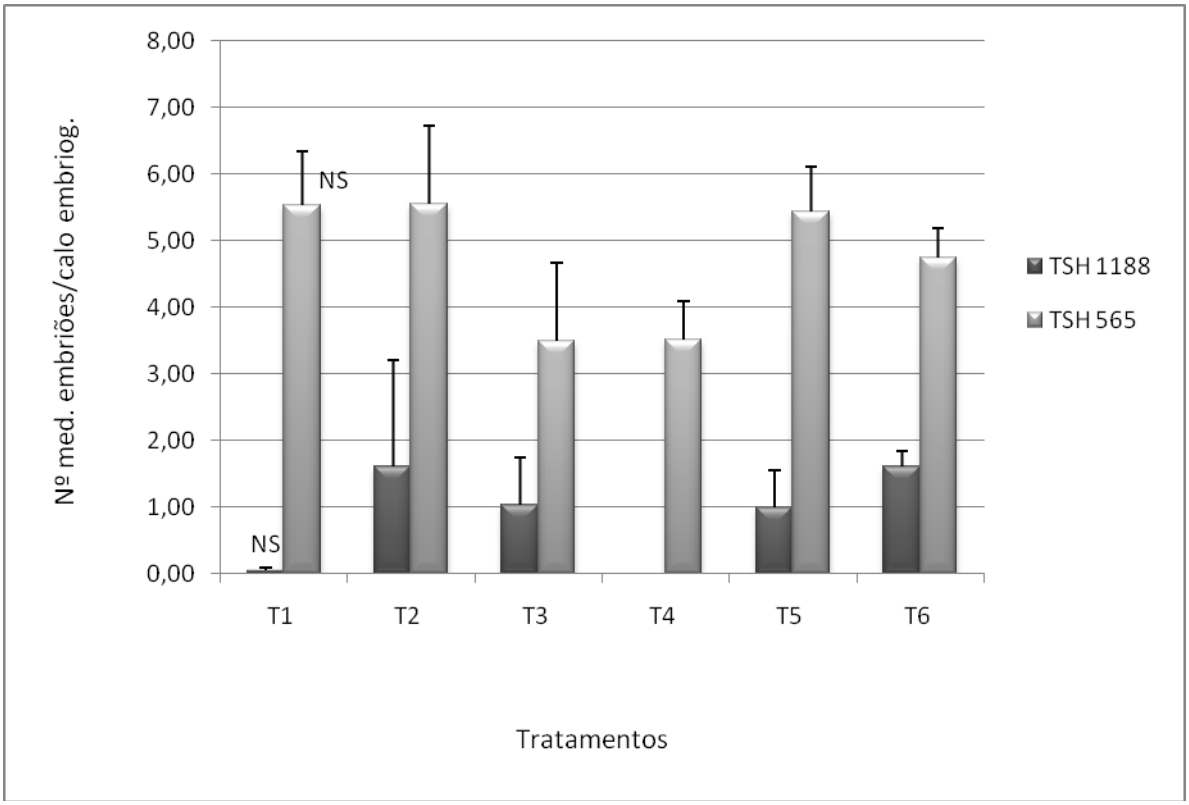


Figura 6 – Número médio de embriões por calo embriogênico nos genótipos 'TSH 1188' e 'TSH 565' em seis diferentes combinações e concentrações de fontes de carbono em meio de indução embrionária (ED). Tratamentos: T1 – ED4c/g→ED4c/g; T2 – ED4c/g→ED3c/g; T3 – ED3c/g→ED3c/g; T4 – ED4s/g→ED4s/g; T5 – ED4s/g→ED3s/g; T6 – ED3s/g→ED3s/g.

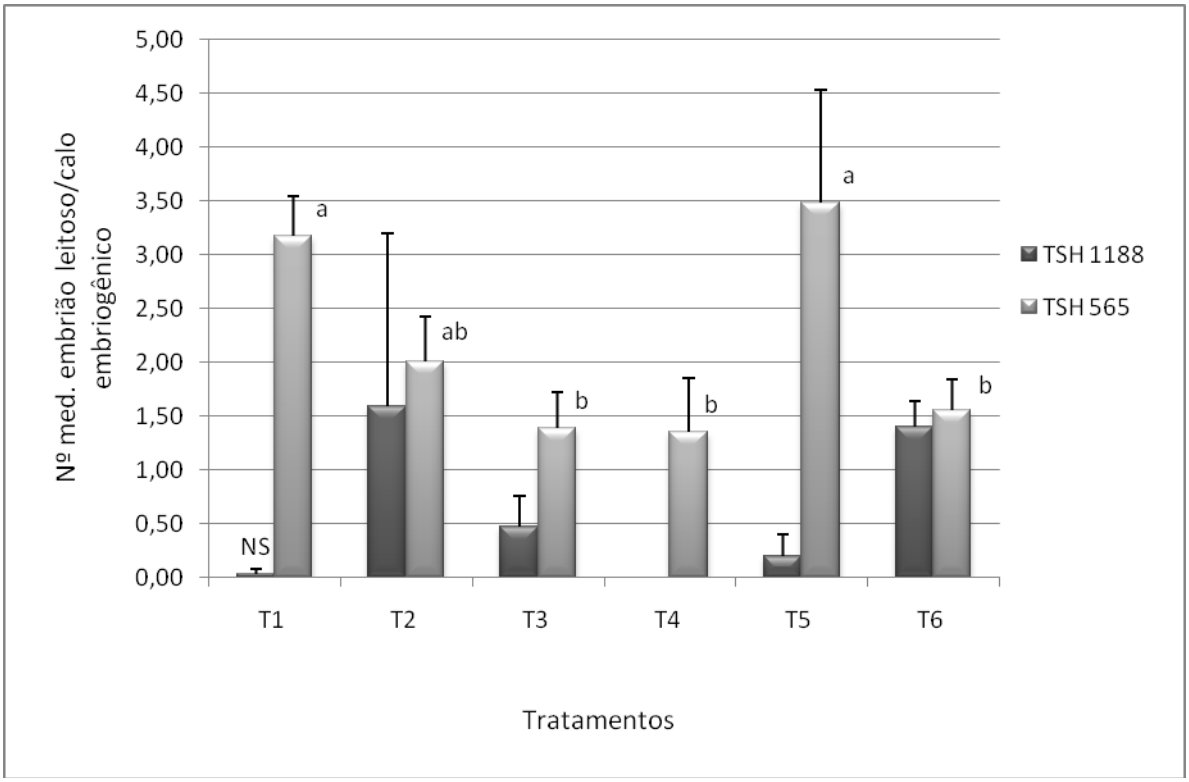


Figura 7 – Número médio de embriões leitosos por calo embriogênico nos genótipos ‘TSH 1188’ e ‘TSH 565’ cultivados em seis diferentes combinações e concentrações de fontes de carbonoem meio de indução embrionária (ED). Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, para cada genótipo, não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Bonferroni. Tratamentos: T1 – ED4c/g→ED4c/g; T2 – ED4c/g→ED3c/g; T3 – ED3c/g→ED3c/g; T4 – ED4s/g→ED4s/g; T5 – ED4s/g→ED3s/g; T6 – ED3s/g→ED3s/g.

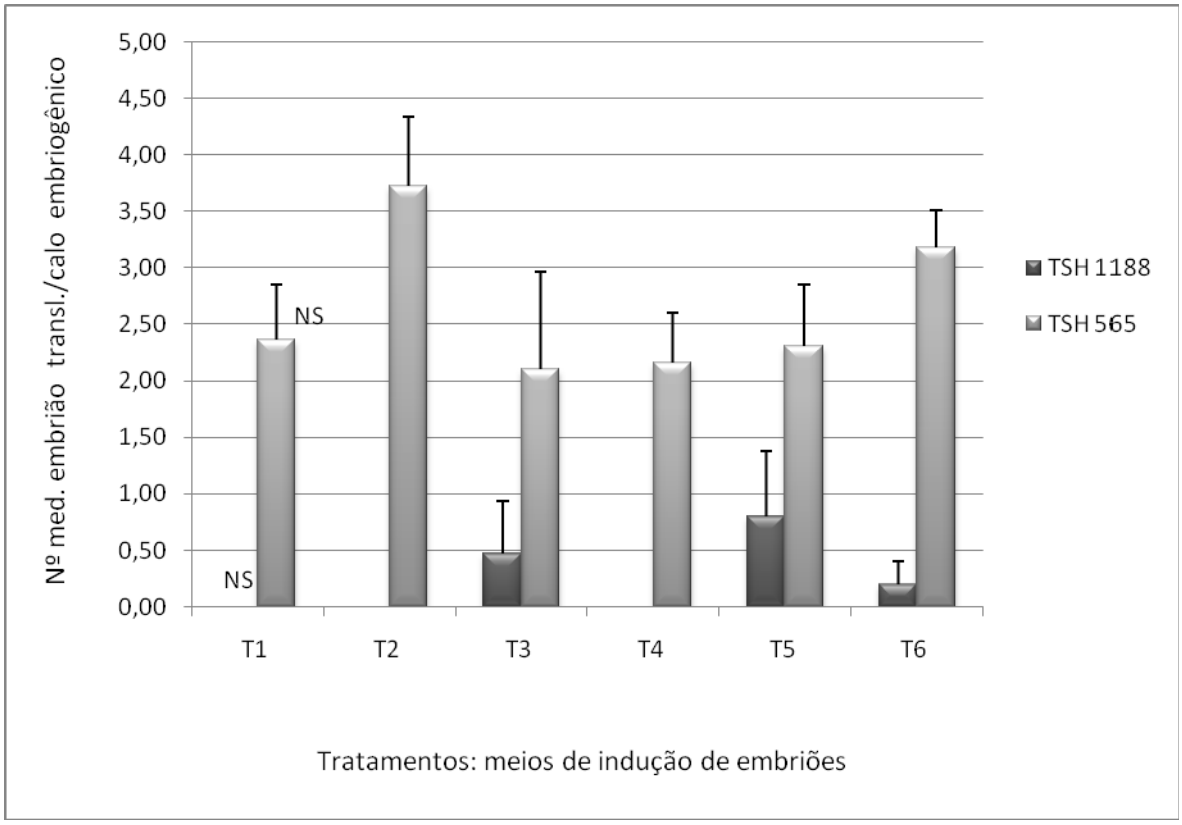


Figura 8 – Número médio de embriões translúcidos por calo embriogênico nos genótipos 'TSH 1188' e 'TSH 565' cultivados em seis diferentes combinações e concentrações de fontes de carbono em meio de indução embrionária. Tratamentos: T1 – ED4c/g→ED4c/g; T2 – ED4c/g→ED3c/g; T3 – ED3c/g→ED3c/g; T4 – ED4s/g→ED4s/g; T5 – ED4s/g→ED3s/g; T6 – ED3s/g→ED3s/g.

3.4. Efeito do tipo e concentração de poliaminas na indução de embriões somáticos secundários

Para esse conjunto de experimentos, o clone 'TSH 565' foi selecionado devido a sua maior capacidade embriogênica quando comparado ao clone 'TSH 1188'. Segmentos de cotilédones de embriões primários foram submetidos a regeneração de embriões secundários em meio contendo diferentes tipos e concentrações de poliaminas. Verificou-se que espermina, na concentração de 1000 μM, produziu resultados significativamente superiores quando comparado aos

demais tratamentos, para todas as variáveis analisadas (Figuras 9, 10 e 11). Quando comparado ao controle (ausência de poliaminas), explantes cultivados em meio contendo 1000 μM de espermina apresentaram uma freqüência 5x maior de calo embriogênico (Figura 9), produziram 2,53x mais embriões (Figura 10) e 6,45x mais embriões leitosos (Figura 11). No entanto, a freqüência de calo com raiz também foi 3,8x maior nesse tratamento quando comparado ao controle (Figura 9).

A menor freqüência de calo com raiz foi observada quando os explantes foram cultivados e meio contendo 1 μM de putrescina (Figura 9). Entretanto, esse tratamento teve um efeito negativo na freqüência de calo embriogênico e nos números médios de embriões totais (Figura 10) e embriões leitosos (Figura 11) por explante. Os resultados obtidos para essas variáveis foram significativamente menores do que o controle (ausência de poliaminas).

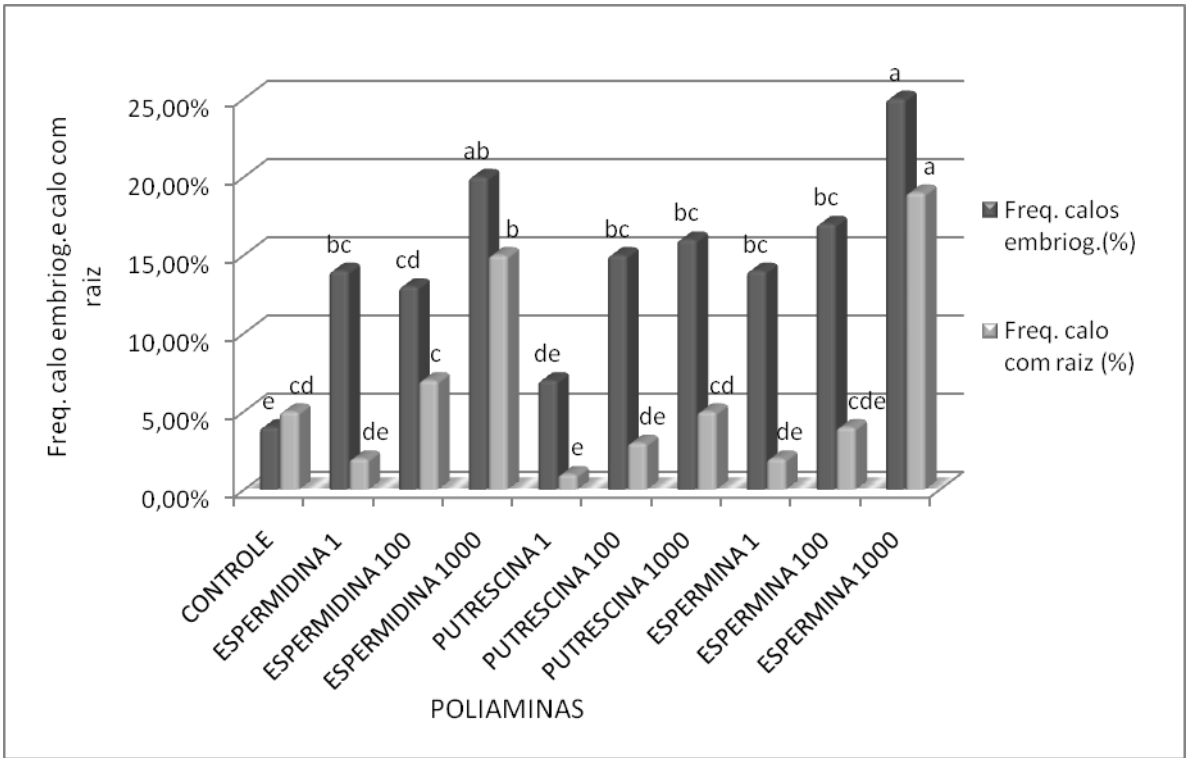


Figura 9 – Freqüência média de calos embriogênicos secundários e calos com raiz em ‘TSH 565’ regenerado em meio contendo diferentes tipos e concentrações de poliaminas. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, para cada variável, não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Bonferroni.

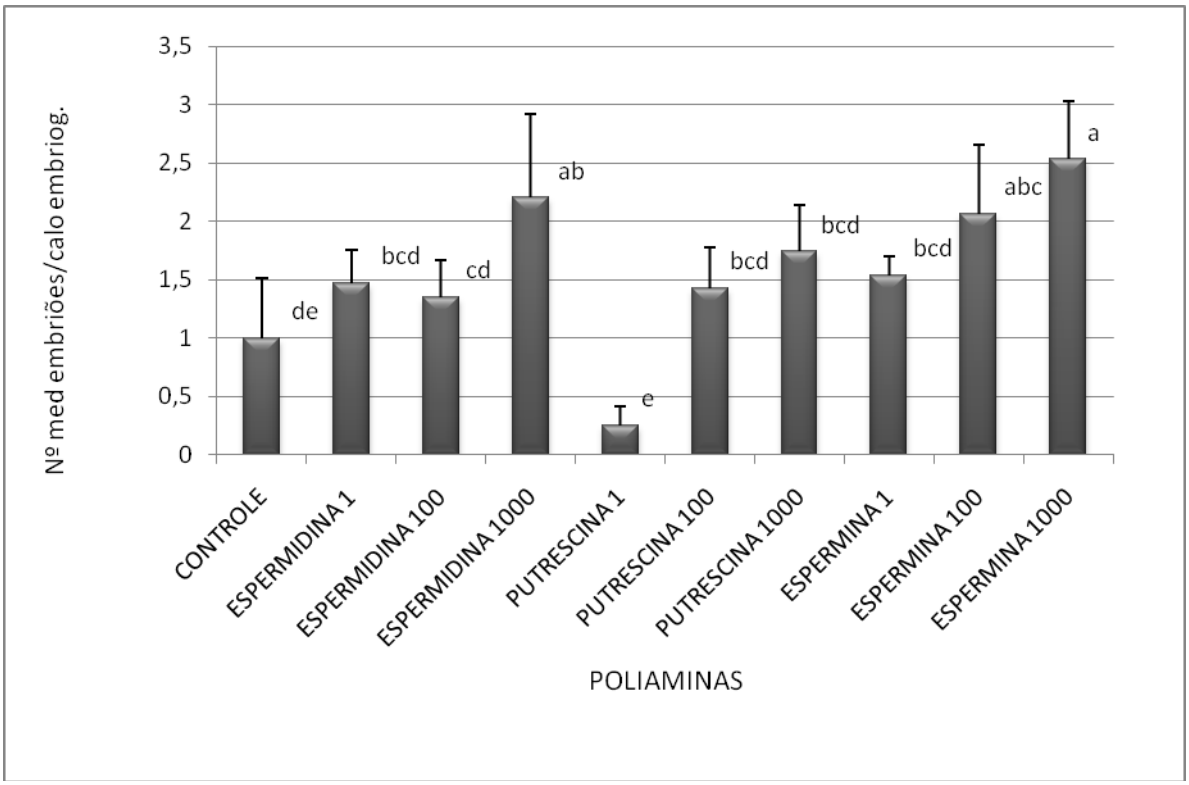


Figura 10 – Número médio de embriões por calo embriogênico secundário em ‘TSH 565’ regenerado em meio contendo diferentes tipos e concentrações de poliaminas. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Bonferroni.

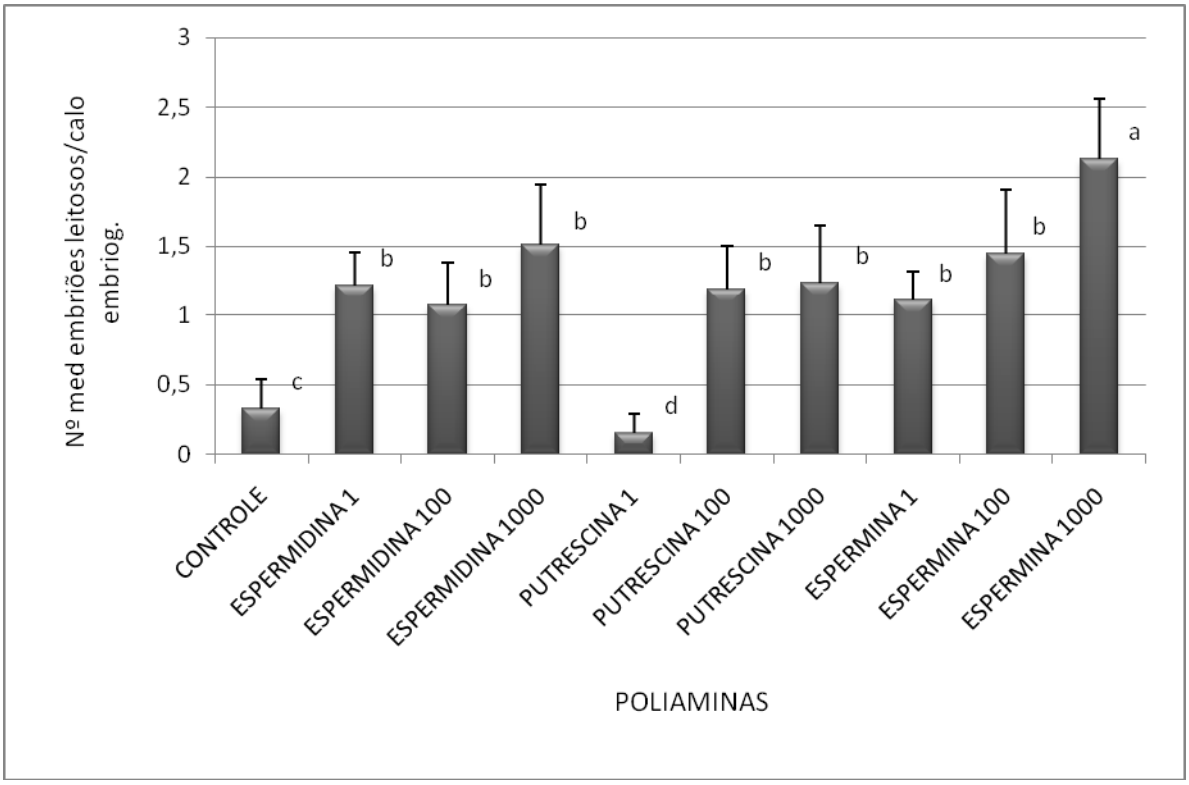


Figura 11 – Número médio de embriões leitosos por calo embriogênico secundário em ‘TSH 565’ regenerado em meio contendo diferentes tipos e concentrações de poliaminas. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Bonferroni.

4. DISCUSSÃO

4.1. Efeito de diferentes agentes vedantes das placas de petri na indução de embriões somáticos primários

A influência do ambiente gasoso na embriogênese somática de cacaueiro ainda não foi previamente investigada, embora seja conhecido que a produção e acumulação de compostos gasosos pelas culturas de tecidos, e modificações de suas concentrações, podem afetar drasticamente o crescimento e a morfogênese de muitas espécies vegetais em vários sistemas de cultivo *in vitro* (MARINO e BERARDI, 2004). Em particular, o dióxido de carbono (CO_2) é produzido por todos os tecidos vegetais cultivados *in vitro* através da respiração, de modo que esse composto pode acumular em elevados níveis dentro dos recipientes de cultura sob baixa intensidade luminosa e condições reduzidas de trocas gasosas com o ambiente externo, podendo ser detrimental ou benéfico para a regeneração e o crescimento das células (HOHE et al., 1999). O etileno é conhecido estar envolvido na senescência das plantas. Inibição do crescimento de calo, brotos e suspensões celulares e redução da produção de clorofila têm sido relatados após a acumulação de etileno nos recipientes de cultura (BIDDINGTON, 1992). Por outro lado, o papel do etileno no crescimento *in vitro* de tecidos organizados ainda é controverso e pouco compreendido, de modo que seus efeitos dependem principalmente da sua concentração ao redor dos tecidos cultivados, da espécie vegetal, sensibilidade do tecido, presença de outros reguladores de crescimento e fase de cultivo (BIONDI et al., 1998; KUMAR et al., 1998; BRAR et al., 1999). Etileno pode aumentar a regeneração de gemas e brotos adventícios em variáveis concentrações em diferentes sistemas de cultivo, algumas vezes demonstrando efeito sinergístico com CO_2. Em contraste, efeitos inibitórios no mesmo processo e necrose de explantes têm sido relatados após a acumulação de níveis excessivos de etileno ou ambos os

gases (KUMAR et al., 1987, 1998). No presente estudo verificou-se que apesar dos genótipos utilizados apresentarem diferentes respostas morfogênicas, a fita cirúrgica (*micropore tape*) beneficiou a indução de elevadas freqüências de calos embriogênicos quando comparado ao Parafilme e filme de PVC. Porém, não foram observadas diferenças significativas entre os três agentes vedantes testados quanto ao número médio de embriões por calo embriogênico produzidos por ambos os genótipos, embora Parafilme e filme de PVC tenham proporcionado resultados superiores quando comparados a fita cirúrgica para ´TSH 565´. A fita cirúrgica permite melhores trocas gasosas com o ambiente em relação aos demais tratamentos (Parafilme e filme de PVC), sendo utilizada na medicina para manutenção de ambiente aerado e asséptico em processos de cicatrização de ferimentos. Este tratamento aplicado a cultura de tecidos tem o potencial de reduzir drasticamente o acúmulo de CO_2 e etileno nos recipientes de cultura. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a sensibilidade dos explantes de cacaueiro ao microambiente gasoso, e que essa sensibilidade depende do genótipo e da fase de cultivo. Assim, o acúmulo de gases nos recipientes de cultura afeta negativamente o desenvolvimento de calo embriogênico em ambos os genótipos de cacaueiro testados, de modo que o selamento das placas com fita cirúrgica na fase de indução de calo embriogênico é fundamental para melhorar a eficiência do processo. Por outro lado, o acúmulo de gases nos recipientes de cultura, possivelmente etileno, pode ser benéfico durante a fase de indução de embriões, mas a resposta é genótipo-dependente.

4.2. Efeito da fonte e concentração de carbono em meio de indução de embriões somáticos primários (ED)

A fonte de carbono fornecida aos explantes exerce um papel fundamental no seu crescimento e morfogênese. As células, tecidos e plântulas cultivadas *in vitro* freqüentemente não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO_2 e, às vezes, não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese que sustente o crescimento. A sacarose é o carboidrato mais utilizado

em meios de cultura de plantas como fonte de carbono, sustentando as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies (CALDAS et al., 1998).

Vários trabalhos têm mostrado os efeitos da concentração e do tipo de carboidrato na embriogênese somática. A sacarose tem sido a fonte de carbono mais usada para a embriogênese somática, embora existam relatos de sua substituição ou combinação com outros mono e dissacarídeos (GUERRA et al., 1998). A concentração do carboidrato também influencia nos processos de iniciação e diferenciação de embriões somáticos, uma vez que o seu metabolismo em plantas é regulado por um grupo de genes cujas respostas são moduladas de acordo com a sua concentração.

A sacarose e maltose têm sido usadas como fontes de carbono em estudos de indução de calos embriogênicos em cacaueiro (PENCE, 1989). Para a regeneração de embriões somáticos primários, Li et al. (1998) cultivaram explantes florais de cacaueiro em meio ED contendo sacarose (3%) combinada com glicose (0,1%), observando um crescimento normal e sem sinais de reação hipersensitiva que normalmente resulta em senescência ou necrose do tecido.

No presente estudo, buscou-se estudar os efeitos da concentração de sacarose e de sua combinação com glicose na indução de embriões somáticos primários em explantes dos clones comerciais de cacaueiro ‘TSH 1188’ e ‘TSH 565’ cultivados em meio ED. A montagem desse experimento resultou da prévia observação de que explantes de ambos os genótipos de cacaueiro quando cultivados em meio ED contendo 3% de sacarose e 1% de glicose, conforme proposto por Li et al. (1998), produziam elevada freqüência de calos que seguiam a via morfogênica de formação de raiz. Também, tem sido relatado que explantes cotiledonares de ‘TSH 565’ cultivados em meio ED proposto por Li et al. (1998) produziram um dos menores números médios de embriões por explante, apenas 0,236, entre diversos genótipos de cacaueiro avaliados (MAXIMOVA et al., 2002). Comparando-se os efeitos das diferentes fontes e concentrações de carboidratos testadas em meio ED, verificou-se que a maioria das respostas foi genótipo-dependente. Para o genótipo ´TSH 1188´, verificou-se que T1 (ED4c/g – ED4c/g) proporcionou a maior freqüência de calo embriogênico, embora T2 (ED4c/g – ED3c/g) e T6 (ED3s/g – ED3s/g) tenham induzido a formação de maiores números médios de embriões totais e leitosos por calo embriogênico. Por outro lado, embora T2 (ED4c/g – ED3c/g) e T6 (ED3s/g – ED3s/g) tenham propiciado maiores

freqüências de calos embriogênicos no genótipo ´TSH 565´, os maiores números médios de embriões totais e leitosos para esse genótipo foram induzidos em T1 (ED4c/g – ED4c/g) e T5 (ED4s/g – ED3s/g). Independente do genótipo, entretanto, foi a observação de que T4 (ED4s/g – ED4s/g) induziu as maiores freqüências de calos com raiz. Em ´TSH 1188´, essa resposta foi ainda mais drástica, já que 100% dos calos cultivados em T4 não desenvolveram nenhuma competência embriogênica, mas sim competência rizogênica. Esses resultados obtidos demonstram que a fonte e concentração de carbono têm um papel fundamental no processo de indução de embriões em cacaueiro e que os requerimentos são específicos para cada genótipo. Em recente trabalho publicado por Traore e Guiltinan (2006), os quais avaliaram os efeitos de diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, maltose, sorbitol, e sacarose) na embriogênese somática em cacaueiro, usando pétalas e estaminóides como fonte de explantes, também foi observado que a resposta embriogênica em diferentes fontes de carbono foi genótipo-dependente, com sorbitol e maltose proporcionando as piores respostas.

Quanto a coloração dos embriões, dois tipos foram freqüentemente observados nos experimentos, um de cor branca a levemente amarelado, de aspecto branco leitoso, o qual chamamos de embrião leitoso (EL), e outro de cor amarela, de aspecto translúcido, chamado de embrião translúcido (ET). Teixeira et al. (2002) observaram que a taxa de conversão de ELs em plântulas é bem mais elevada (cerca de 60%) do que os ETs. (cerca de 0%). Buscando produzir mais embriões leitosos para os genótipos estudados, recomenda-se a utilização do T5 (ED4s/g – ED3s/g) para o genótipo ‘TSH 565’ e de T6 (ED3s/g – ED3s/g) para ‘TSH 1188’.

4.3. Efeito do tipo e concentração de poliaminas na indução de embriões somáticos secundários

O suprimento de poliaminas exógenas tem sido demonstrado induzir a embriogênese somática e regeneração em muitas espécies vegetais (GALSTON e

FLORES, 1991; MARTIN-TANGUY e CARRE, 1993; ADKINS et al., 1998; SARGENT et al., 1998; RAJESH et al., 2003). Entretanto, até o presente momento ainda não foi relatado nenhum trabalho investigando o efeito de poliaminas na embriogênese somática de cacaueiro.

Poliaminas compõem uma classe de compostos nitrogenados alifáticos, policatiônicos e de baixo peso molecular presentes em todas as células (BAIS e RAVISHANKAR, 2002). As poliaminas estão envolvidas em um amplo espectro de processos biológicos, incluindo divisão celular, síntese de proteínas, replicação do DNA e resposta de plantas a estresse abiótico. Uma de suas funções mais importantes, no entanto, é atuar de forma análoga a alguns reguladores de crescimento, promovendo o crescimento celular e a estabilidade do DNA. A biossíntese de poliaminas pelas células envolve a descarboxilação de arginina ou ornitina, levando a produção da primeira poliamina da via, a putrescina (Figura 12). As poliaminas espermidina e espermina são sintetizadas a partir da putrescina, por adições subseqüentes de grupos aminopropil doado por S-adenosilmetionina (SAM) descarboxilado (dSAM). Assim, as poliaminas e etileno são ambos derivados de um precursor comum e provavelmente competem pelo mesmo precursor, o SAM.

No presente trabalho foi observado que as poliaminas utilizadas em meio de indução de embriões somáticos de ‘TSH 565’ proporcionaram melhores respostas embriogênicas dos explantes quando comparadas ao controle (ausência de poliaminas). A única exceção a essa observação foi obtida quando os explantes foram cultivados em meio contendo 1 μM de putrescina, que produziu respostas inferiores ao controle. Observou-se também que os resultados benéficos obtidos foram proporcionais a concentração de cada uma das poliaminas utilizadas, ou seja, as poliaminas produziram melhores respostas em suas maiores concentrações. No entanto, espermina na concentração de 1000 μM proporcionou as melhores respostas embriogênicas em cacaueiro.

Bais et al. (2000) postularam que a adição exógena de putrescina e espermidina resulta num maior consumo de SAM para a conversão dessas poliaminas em espermina. Assim, a adição dessas duas poliaminas pode resultar numa menor disponibilidade de SAM para a biossíntese de etileno. Se esse mecanismo também operar em cacaueiro, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a maior capacidade embriogênica dos seus explantes depende da

interação do etileno com elevadas concentrações de poliaminas, no caso a espermina que não compete pelo precursor comum, o SAM.

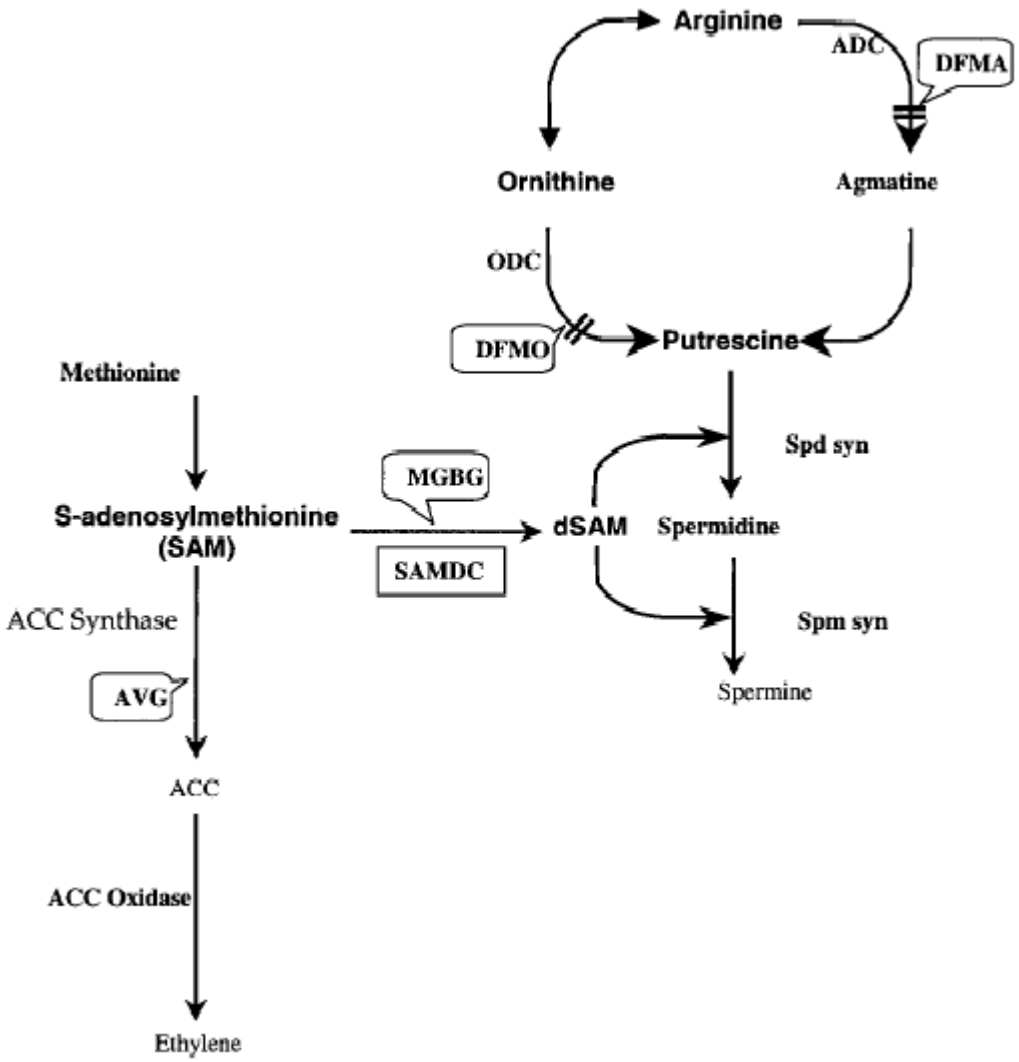


Figura 12 – Biossíntese de poliaminas e sua relação com o etileno. Enzimas: ADC- arginina decarboxilase; ODC- ornitina decarboxilase; SAMDC- S-adenosilmetionina decarboxilase; Spd syn- espermidina sintase; Spm syn- espermina sintase. Inibidores: DFMA- difluorometilarginina; DFMO- difluorometilornitina; MGBG- metilglioxal(bis)-guanilhidrazone. Adaptado de BAIS e RAVISHANKAR (2002)

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem extrair as seguintes conclusões:

- O genótipo ‘TSH 565’ apresenta maior capacidade de regeneração de embriões somáticos quando comparado a ‘TSH 1188’;
- As placas de petri devem ser seladas com fita cirúrgica (*micropore tape*) durante a fase de indução de calo, de modo a proporcionar a obtenção de maiores freqüências de calo embriogênico;
- As placas de petri podem ser seladas com qualquer um dos três tipos de agentes vedantes testados durante a fase de indução de embriões somáticos;
- A combinação dos meios ED4s/g–ED3s/g deve ser utilizada para o genótipo ‘TSH 565’ durante a fase de indução de embriões, de modo a obter um maior número médio de embriões leitosos por calo embriogênico;
- O meio ED3s/g deve ser usado para a indução de um maior número médio de embriões leitosos em ‘TSH 1188’;
- O meio ED4s/g não deve ser utilizado para a regeneração de embriões em ambos os genótipos testados, já que os calos produzidos desenvolvem competência rizogênica em vez de embriogênica;
- Com exceção de putrescina a 1 μM, as poliaminas apresentam um papel benéfico na regeneração de embriões somáticos de cacaueiro, produzindo melhores respostas embriogênicas em suas maiores concentrações;

- Os calos embriogênicos devem ser cultivados em meio ED suplementado com 1000 μM espermina, de modo a induzir a produção de elevado número de embriões leitosos por explante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS, S.W.; SAMOSIR, Y.M.; ERNAWATI, A.; GODWIN, I.D.; DREW, R.A. Control of ethylene and use of polyamines can optimise the conditions for somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.) and papaya (*Carica papaya* L.). **Acta Horticulturae (ISHS)**, v. 461, p. 459–466, 1998.

AHNERT, D. Witche's broom disease in Bahia. **Ingenic Newsletter**, v. 3, p. 17-18, 1997.

ALEMANNO, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 46, p. 187-194, 1996.

BAIS, H.P.; RAVISHANKAR, G.A. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 1-34, 2002.

BAIS, H.P.; SUDHA, G.; RAVISHANKAR, G.A. Putrescine and silver nitrate influences shoot multiplication, *in vitro* flowering and endogenous titres of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 19, p. 238–248, 2000.

BIDDINGTON, N.L. The influence of ethylene in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**, v. 11, p. 173–187, 1992.

BIONDI, S.; SCARAMAGLI, S.; CAPITANI, F.; MARINO, G.; ALTAMURA, M. M.; TORRIGIANI, P. Ethylene involvment in vegetative bud formation in tobacco thin layers. **Protoplasma**, v. 202, p. 134–144, 1998.

BRAR, M.S.; MOORE, M.J.; AL-KHAYRI, J.M.; MORELOCK, T.E.; ANDERSON, E.J. Ethylene inhibitors promote in vitro regeneration of cowpea (*Vigna unguiculata* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology–Plant**, v. 35, p. 222–225, 1999.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** v.1. Brasília: Embrapa-CBAB, 1998. p. 87-132.

DIAS, L.A.S. 2001. Contribuições do melhoramento. In: DIAS, L.A.S. (Ed.) **Melhoramento genético do cacaueiro**. Viçosa, MG: FUNAPE, UFG, 2001. p. 493-529.

DRIVER, J.A.; KUNIYUKI, A.H. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. **HortScience**, v. 19, p. 507-509, 1984.

ESAN, E.B. Tissue culture studies on cacao *(Theobroma cacao* L.). A supplementation of current research. In: **Proc. 5th Int. Cacao Res.** Conf. 1975. Ibadan: Cacao Rcs. Inst. Nigeria; p. 116-125, 1977.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J. Development of nucellar somatic embryos of *Theobroma cacao.* **Acta Horticulturae**, v. 336, p. 231-236, 1993.

GALSTON, A.W.; FLORES, H.E. Polyamines and plant morphogenesis. In: SLOCUM, R.D.; FLORES, H.E. (Eds.) **Biochemistry and physiology of polyamines in plants**. London: CRC Press, 1991.

GAMBORG, O.L. Aromatic metabolism in plants. II. Enzymes of the shikimate pathway in suspension cultures of plant cells. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 44, p. 791-799, 1966.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** v.2. Brasília: Embrapa-CBAB, 1999. p. 533-568.

HOHE, A.; WINKELMANN, T.; SCHWENKEL, H.G. CO_2 accumulation in bioreactor suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. and its effect on cell growth and regeneration of somatic embryos. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 863–867, 1999.

KUMAR, P.P.; LAKSHMANAN, P.; THORPE, T.A. Regulation of morphogenesis in plant-tissue culture by ethylene. **In Vitro Cellular and Developmental Biology–Plant**, v. 34, p. 94–103, 1998.

KUMAR, P.P.; REID, D.M.; THORPE, T.A. The role of ethylene and carbon dioxide in differentiation of shoot buds in excised cotyledons of *Pinus radiata in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 69, p. 244–252, 1987.

laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of International Plant Propagation Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.

LI, Z.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.N.; GUILTINAN, M.J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. **In vitro Cellular and Developmental Biology–Plant**, v. 34, p. 293-299, 1998.

LITZ, R.E. Tissue culture studies with *Theobroma cacao*. In: DIMICK, P.S. (Ed.) **Cacao biotechnology symposium**. Department of Food Science, College of

Agriculture, The Pennsylvania State University, University Park, PA, p. 111–120, 1986.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain

LOPEZ-BAEZ, O.; BOLLON, H.; ESKES, A.; PETIARD, V.. Embryogènese somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. á partir de pièces florales. **C. R. Acad. Sci.: Sciences de la Vie**, v. 316, p. 579-584, 1993.

MARINO, G.; BERARDI, G. Different sealing materials for Petri dishes strongly affect shoot regeneration and development from leaf explants of quince 'BA 29'. **In Vitro Cellular and Developmental Biology–Plant**, v. 40, p. 384-388, 2004.

MARTIN-TANGUY, J.; CARRE, M. Polyamines in grapevine microcuttings cultivated *in vitro* – effects of amines and inhibitors of polyamine biosynthesis on polyamine levels and microcutting growth and development. **Plant Growth Regulation**, v. 13, p. 269–280, 1993.

MAXIMOVA , S.N.; MARELLI, J-P.; PISHAK, A.Y.S.; VERICA, J.A.; GUILTINAN, M.J. Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. **Planta**, v. 224, p. 740-749, 2006.

MAXIMOVA, S.N.; ALEMANNO, L.; YOUNG, A.; FERRIERE, N.; GUILTINAN, M.J. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 38, p. 252-259, 2002.

PENCE, V.C.; TLASEGAWA, P.M.; JANICK, J. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 104, p. 145-148, 1979.

RAJESH, M.K.; RADHA, E.; KARUN, A.; PARTHASARATHY, V.A. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm – the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 41-47, 2003.

SANTOS, M.O. **Embriogênese somática repetitiva, clonagem e expressão do gene *serk* de *Theobroma cacao* e análise da expressão de *serk* em plantas transgênicas de alface**. Brasília: UnB, Tese de Doutorado, 2003.

SARGENT, H.R.; GODWIN, I.D.; ADKINS, S.W. The effect of exogenous polyamines on somatic embryogenesis and plant regeneration from *Sorghum bicolor* and *Saccharum* spp. **Acta Horticulturae (ISHS)**, v. 461, p. 451–458, 1998.

SONDAHL, M.R.; LIU, S.; BELLATO, C.M.; BRAGIN, A. Cacao somatic embryogenesis. **Acta Horticulturae**, v. 336, p. 245-248, 1993.

TEIXEIRA, J.B., MARBACH, P.A.S; SANTOS, M.O. Otimização da metodologia da embriogênese somática visando a propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.). Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Documentos no. 79**, 2002.

TRAORE A.; GUILTINAN, M.J. Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. **Hortscience,** v. 41, p. 753- 758, 2006.

TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.N.; GUILTINAN, M.J. Micropropagation of *Theobroma cacao* L. using somatic embryo-derived plants **In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant**, v. 39, p. 332–337, 2003.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DOS FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* EM CLONES COMERCIAIS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.)

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi examinar o efeito de alguns fatores na eficiência de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* em cacaueiro, bem como avaliar o efeito, na morfogênese *in vitro*, de antibióticos empregados no sistema de transformação. Foram avaliadas diferentes concentrações do antibiótico higromicina (0, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0 $mg.L^{-1}$), para seleção dos embriões transformados, e dos antibióticos cefotaxima (250 e 500 $mg.L^{-1}$), timentin (150 e 300 $mg.L^{-1}$) e meropenem (6,25 e 12,5 $mg.L^{-1}$), para o controle de *Agrobacterium*, na embriogênese somática secundária dos clones de cacaueiro 'TSH 565' e 'TSH 1188'. Também foram avaliados os efeitos da sonicação (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 segundos), tempo de incubação dos explantes em *Agrobacterium* (0, 5, 10, 15, 20 ou 30 minutos), concentração de *Agrobacterium* (0, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 e 1,0, em OD_{600}) e concentração de acetosseringona (0, 25, 50, 100 ou 200 µM) ou suspensão de células de tabaco (*feeder-layer*) em meio de co-cultivo na eficiência de transferência do gene *GUSint*. Embora o antibiótico higromicina tenha reduzido drasticamente a regeneração de embriões somáticos na maioria das concentrações testadas, verificou-se que concentrações de até 15 $mg.L^{-1}$ não foram suficientes em

inibir completamente a embriogênese somática nos dois genótipos avaliados. Em relação aos antibióticos empregados no controle de *Agrobacterium*, observou-se que todos tiveram um efeito negativo na embriogênese somática de 'TSH 565' quando comparado ao controle (ausência de antibiótico), independente da concentração testada. Timentin, a 150 $mg.L^{-1}$, e meropenem, a 6,25 $mg.L^{-1}$, causaram os menores efeitos negativos dentre os tratamentos avaliados. Dentre os fatores afetando a eficiência de transferência gênica, verificou-se que as melhores freqüências de transformação foram obtidas em explantes sonicados por 150 segundos e incubados por 20 minutos em solução de *Agrobacterium*, na concentração de OD_{600}=1,0. A suplementação de acetosseringona ou células de tabaco no meio de co-cultivo não afetou a eficiência de transformação. A combinação dos melhores tratamentos para cada fator avaliado permitiu o estabelecimento de um protocolo otimizado de transformação genética para clones comerciais de cacaueiro, aplicável em estudos funcionais de genes candidatos de resistência à vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*).

1. INTRODUÇÃO

Agrobacterium tumefaciens tem sido um vetor efetivo para a transformação genética de diversas espécies vegetais, incluindo cereais, devido ao seu amplo espectro de hospedeiros. Apesar disso, a transformação-mediada por *Agrobacterium* de muitas plantas, particularmente de espécies lenhosas como o cacaueiro, permanece ineficiente.

Recentemente, um sistema promissor de transformação genética foi desenvolvido para o cacaueiro (MAXIMOVA et al., 2003). Esse sistema envolve o co-cultivo de segmentos de cotilédones de embriões somáticos primários (derivados de explantes florais) com *Agrobacterium*, seguido da regeneração de embriões somáticos secundários. Apesar do sistema de regeneração de embriões somáticos secundários produzir mais embriões por explantes do que o sistema de embriogênese primária, além dos embriões apresentarem maior conformidade morfológica e percentagem de conversão em plântulas (MAXIMOVA et al., 2002), a produção de embriões transgênicos foi relativamente baixa (0,6-1,5% dos explantes iniciais).

A otimização de protocolos de transformação genética requer o estudo dos diversos fatores que afetam a sua eficiência, de modo a estabelecer os melhores parâmetros para a transformação. Dentre os fatores que afetam a eficiência de um protocolo de transformação genética incluem-se aqueles relacionados ao material vegetal (genótipo, tipo, tamanho e posição dos explantes), virulência de *Agrobacterium* (estirpe, concentração da suspensão bacteriana, temperatura e duração da fase de co-cultivo) e composição do meio de cultura (tipo e concentração de reguladores de crescimento, fonte de carbono, agente gelificante, compostos fenólicos e antibióticos) (COSTA et al., 2002).

Para a otimização de um protocolo de transformação genética, é importante a utilização de genes repórteres, como *GFP* (*green fluorescent protein*) ou *GUS* (β-glucuronidase). Esses genes permitem a rápida detecção e avaliação dos eventos

de transformação, facilitando a identificação dos melhores parâmetros para a transferência gênica. Em cacau, ambos os genes têm sido utilizados como repórteres de transformação genética (PERRY et al., 2000; SANTOS et al., 2002; MAXIMOVA et al., 2003; MAXIMOVA, et al., 2006).

O objetivo desse estudo foi determinar o efeito de alguns fatores na eficiência de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de clones comerciais de cacaueiro (‘TSH 565’ e ‘TSH 1188’), utilizando como referência o sistema de transformação desenvolvido por Maximova et al. (2003). Esse estudo permitiu otimizar um protocolo de transformação genética de clones comerciais de cacaueiro para uso em estudos funcionais de genes candidatos de resistência à vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Os clones de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) ‘TSH 565’ e ‘TSH 1188’ foram utilizados no presente estudo.

2.2. Cultivo do material *in vitro*

O processo de cultivo do material *in vitro* foi conduzido conforme descrito nos itens 2.5, 2.6 e 2.7 do Capítulo 1.

2.3. Tipo de explante utilizado

Cotilédones de embriões somáticos primários maduros e leitosos, com cerca de 60 dias de idade ou mais, foram utilizados como fonte de explantes para realização dos experimentos.

2.4. Transformação genética com *Agrobacterium tumefaciens*

Para realização do procedimento de transformação, colônias isoladas da cepa EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o vetor pCAMBIA 1301 (Figura 1), foram retiradas de estrias feitas em placa e colocadas para crescer. Estas

colônias foram utilizadas para inocular 50 mL de meio YEP, contendo 50 mg L^{-1} de rifampicina e 50 mg L^{-1} de canamicina. As culturas foram crescidas à temperatura de 28°C, com agitação orbital de aproximadamente 220 rpm. Após 16 horas, as culturas com densidade ótica (OD_{600}) entre 0,9 a 1,1 foram centrifugadas a 3.500 rpm, por 10 minutos, à temperatura de 4°C e ressuspendidas em meio MI (MAXIMOVA et al., 2003) líquido até atingir uma concentração de OD_{600} = 0,5. Após a ressuspensão da bactéria, adicionou-se 100 μM de acetosseringona (Sigma Chemical Company, EUA). A bactéria permaneceu no escuro, à temperatura de 25°C, por 2 a 3 horas até o uso em transformação.

Os cotilédones de embriões somáticos primários leitosos foram seccionados em segmentos de aproximadamente 4 mm^2, com auxílio de pinça e bisturi, em câmara de fluxo laminar, e mantidos em água MiliQ autoclavada até incubação com a suspensão bacteriana. Os explantes foram incubados em solução de *Agrobacterium* (3 x 10^8 células mL^{-1}) por 12 minutos, a 25°C, sob agitação de 50 rpm no escuro. Durante esse período, os explantes foram sonicados a uma freqüência de 20 KHz e a uma amplitude de 80%, por 100 segundos (Sigma Ultrasonic Processor, EUA). Após essa etapa, a solução de *Agrobacterium* foi removida e os explantes foram colocados em papel filtro estéril para remoção do excesso de agrobactéria. Em seguida, os explantes foram colocados em 25 mL de meio SCG-2 (MAXIMOVA et al., 2003) sólido, suplementado com 100 μM de acetosseringona, para o co-cultivo com *Agrobacterium* por 72 h, à 25°C, no escuro. Após esse período, procedeu-se a realização do teste histoquímico de *GUS.*

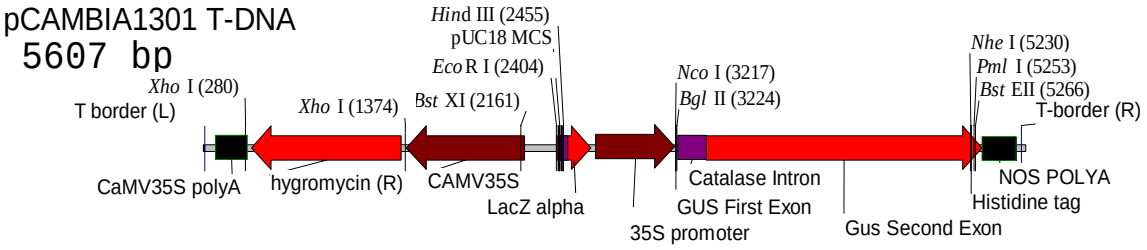


Figura 1- Vetor utilizado para a transformação genética de segmentos cotiledonares de cacaueiro.

2.5. Experimentos de otimização do protocolo de transformação genética

2.5.1. Efeito do antibiótico higromicina

A fim de se determinar a concentração mais adequada do antibiótico higromicina para a seleção dos embriões somáticos transformados, segmentos cotiledonares de 4 mm^2 foram excisados de embriões primários leitosos em câmara de fluxo laminar, sobre papel filtro estéril umedecido, com auxílio de pinça e estilete. Em seguida, os explantes cotiledonares foram colocados em placas de petri contendo 25 mL de meio SCG-2 sólido (vide item 2.6, Capítulo 1), suplementado com higromicina nas concentrações de 0, 5, 7,5, 10 e 15 mg L^{-1}. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a 25 $\pm$ 2 ^{o}C, no escuro, durante todo o período de cultivo. Após 14 dias de cultivo em meio SCG-2, os explantes foram transferidos para meio ED4s/g (vide item 2.6, Capítulo 1), contendo as mesmas concentrações do antibiótico higromicina, permanecendo por mais 14 dias até a transferência para o meio $ED3_{s/g}$. As culturas foram subcultivadas em meio ED3s/g suplementado com diferentes concentrações de higromicina a cada 14 dias e, ao final do terceiro subcultivo, procedeu-se a avaliação do experimento.

2.5.2. Efeito de antibióticos utilizados no controle de *Agrobacterium*

O efeito dos antibióticos cefotaxima (250 e 500 mg L^{-1}), timentin (150 e 300 mg L^{-1}) e meroperem (6,25 e 12,5 mg L^{-1}) na embriogênese somática secundária foi avaliado seguindo a metodologia descrita no item 2.7 do Capítulo 1.

2.5.3. Efeito da sonicação dos explantes

Buscando avaliar o efeito da duração da sonicação na eficiência de transformação genética, segmentos cotiledonares de 4 mm^2 foram excisados de embriões primários leitosos em câmara de fluxo laminar, sobre papel filtro estéril umedecido, com auxílio de pinça e estilete. Em seguida, os explantes cotiledonares foram colocados em microtubos de 1,5 mL contendo água estéril, até o momento da incubação em solução de *Agrobacterium*. A água foi posteriormente aspirada e substituída por 1 mL da suspensão de *Agrobacterium* (meio MI + *Agrobacterium* + 100 μM de acetosseringona) na concentração de 0,5 (OD_{600}). A mistura foi em seguida sonicada por 0, 50, 100, 150, 200, 250 ou 300 segundos, a uma freqüência de 20 KHz e 80% de amplitude (Sigma Ultrasonic Processor, EUA), seguido da incubação em *Agrobacterium* por 12 minutos, sob suave agitação a 25ºC. Após a incubação em *Agrobacterium*, os explantes foram transferidos para placas de petri contento o meio de pré-cultura SCG-2, suplementado com 100 μM de acetosseringona, nas quais permaneceram por 3 dias em período de co-cultivo, nas mesmas condições descritas no item 2.4. Após esse período, os explantes foram submetidos ao teste histoquímico de GUS conforme descrito no item 2.6.

2.5.4. Efeito do tempo de incubação dos explantes em *Agrobacterium*

Segmentos cotiledonares de 4 mm^2 foram incubados em solução de *Agrobacterium* (OD_{600}= 0,5) por 0, 5, 10, 15, 20 ou 30 minutos, seguido do co-cultivo e teste histoquímico de GUS como descrito nos itens 2.4 e 2.6.

2.5.5. Efeito da concentração de *Agrobacterium*

Segmentos cotiledonares de 4 mm^2 foram incubados por 12 minutos em solução de *Agrobacterium* nas seguintes concentrações a OD_{600}: 0, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8

ou 1,0. O co-cultivo e o teste histoquímico de GUS foi realizado conforme descrito nos itens 2.4 e 2.6.

2.5.6. Efeito da concentração de acetosseringona no meio de co-cultivo

Após a incubação em solução de *Agrobacterium* (OD_{600} = 0,5), por 12 minutos, os explantes foram colocados em placas de petri contento o meio de co-cultivo SCG-2, suplementado com 0, 25, 50, 100 ou 200 µM de acetosseringona ou contendo suspensão de células de tabaco (*feeder-layer*), permanecendo por 3 dias sob as mesmas condições descritas no item 2.4 até o ensaio histoquímico de *GUS* (item 2.6).

2.6. Ensaio histoquímico de GUS

Após 3 dias de co-cultivo, os explantes foram submetidos ao teste histoquímico de *GUS* (JEFFERSON et al., 1987). Os explantes foram incubados por 72 horas, a 28°C, em tampão de reação X-GLUC (5-bromo-4-chloro-3-indolil-b-D-glucuronideo). Após esse período, o tampão de reação foi removido e substituído por álcool a 70%.

2.7. Avaliação dos experimentos

As variáveis freqüência de calo embriogênico, número médio de embriões por explante e número médio de embriões leitosos por explante, foram avaliadas nos experimentos com os antibióticos higromicina, cefotaxima, meropenem e timentin. Para os experimentos de transformação genética, as variáveis analisadas foram freqüência de explantes GUS+ e o número médio de pontos azuis/explante. Uma lupa LEIKA EZ40 D com câmera fotográfica digital acoplada foi utilizada na avaliação dos experimentos.

2.8. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os experimentos foram realizados com 3-5 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa de petri com 20 explantes. Para análise estatística dos experimentos foi utilizado o teste de Bonferroni, com nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

Para recuperar embriões somáticos de cacaueiro transformados, fatores inerentes ao procedimento de transformação que afetam a eficiência de regeneração de embriões somáticos leitosos secundários foram estudados. Discos cotiledonares de embriões somáticos primários dos genótipos ‘TSH 565’ e ‘TSH 1188’ foram cultivados em meio SCG-2, ED4s/g e ED3s/g, conforme metodologia descrita no item 2.7 do Capítulo 1, suplementados com o antibiótico higromicina nas concentrações de 0, 5, 7,5, 10 e 15 $mg.L^{-1}$, a fim de obter a curva de morte/letalidade que os explantes cotiledonares apresentam em meio seletivo (Figuras 1 e 2). Antibióticos utilizados no controle do crescimento de *Agrobacterium* após o procedimento de transformação e a fase de co-cultivo também foram avaliados quanto seus efeitos na embriogênese somática secundária em ‘TSH 565’. Os antibióticos timentin (150 $mg.L^{-1}$ e 300 $mg.L^{-1}$), cefotaxima (250 $mg.L^{-1}$ e 500 $mg.L^{-1}$) e meropenem (6,25 e 12,5 $mg.L^{-1}$) foram analisados quanto a indução de calos embriogênicos, número médio de embriões por explante e tipo de embrião produzido (leitoso ou translúcido) (Figura 3). A avaliação de fatores que interferem na transferência do T-DNA da bactéria para a célula hospedeira também foi efetuada. Experimentos de transformação testando-se a sonicação de explantes embrionários durante a incubação com a suspensão bacteriana, a concentração da bactéria em suspensão no meio de indução (MI), o tempo de incubação em suspensão bacteriana e o efeito de acetosseringona em meio de co-cultivo foram realizados utilizando discos cotiledonares de embriões primários leitosos do genótipo ‘TSH 565’ (Figura 4).

Figura 1 – Cultivo *in vitro* de segmentos cotiledonares de embriões somáticos primários do genótipo ‘TSH 565’ em meio seletivo de regeneração de embriões somáticos secundários (SCG-2→ED4s/g→ED3s/g) contendo higromicina em 5 diferentes concentrações. A – ED3s/g + 0 $mg.L^{-1}$ de higromicina; B – ED3s/g + 5 $mg.L^{-1}$ de higromicina; C – ED3s/g + 7,5 $mg.L^{-1}$ de higromicina; D – ED3s/g + 10 $mg.L^{-1}$ de higromicina; E – ED3s/g + 15 $mg.L^{-1}$ de higromicina.

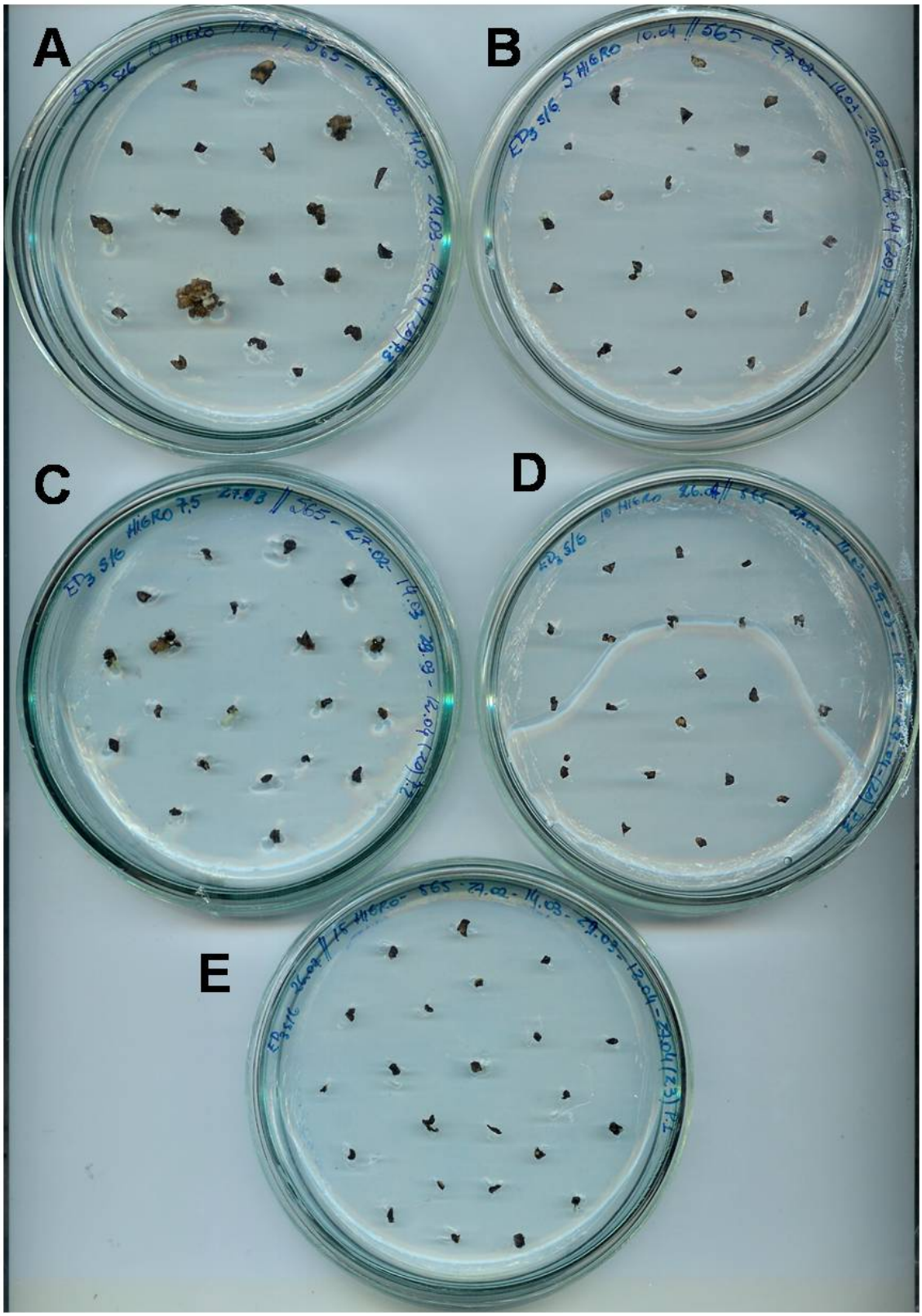

A
B
C
D
E

Figura 2 – Cultivo *in vitro* de discos cotiledonares de embriões somáticos primários do genótipo ‘TSH 1188’ em meio seletivo de regeneração de embriões somáticos secundários (SCG-2→ED4s/g→ED3s/g) contendo higromicina em 5 diferentes concentrações. A – ED3s/g + 0 $mg.L^{-1}$ de higromicina; B – ED3s/g + 5 $mg.L^{-1}$ de higromicina; C – ED3s/g + 7,5 $mg.L^{-1}$ de higromicina; D – ED3s/g + 10 $mg.L^{-1}$ de higromicina; E – ED3s/g + 15 $mg.L^{-1}$ de higromicina.

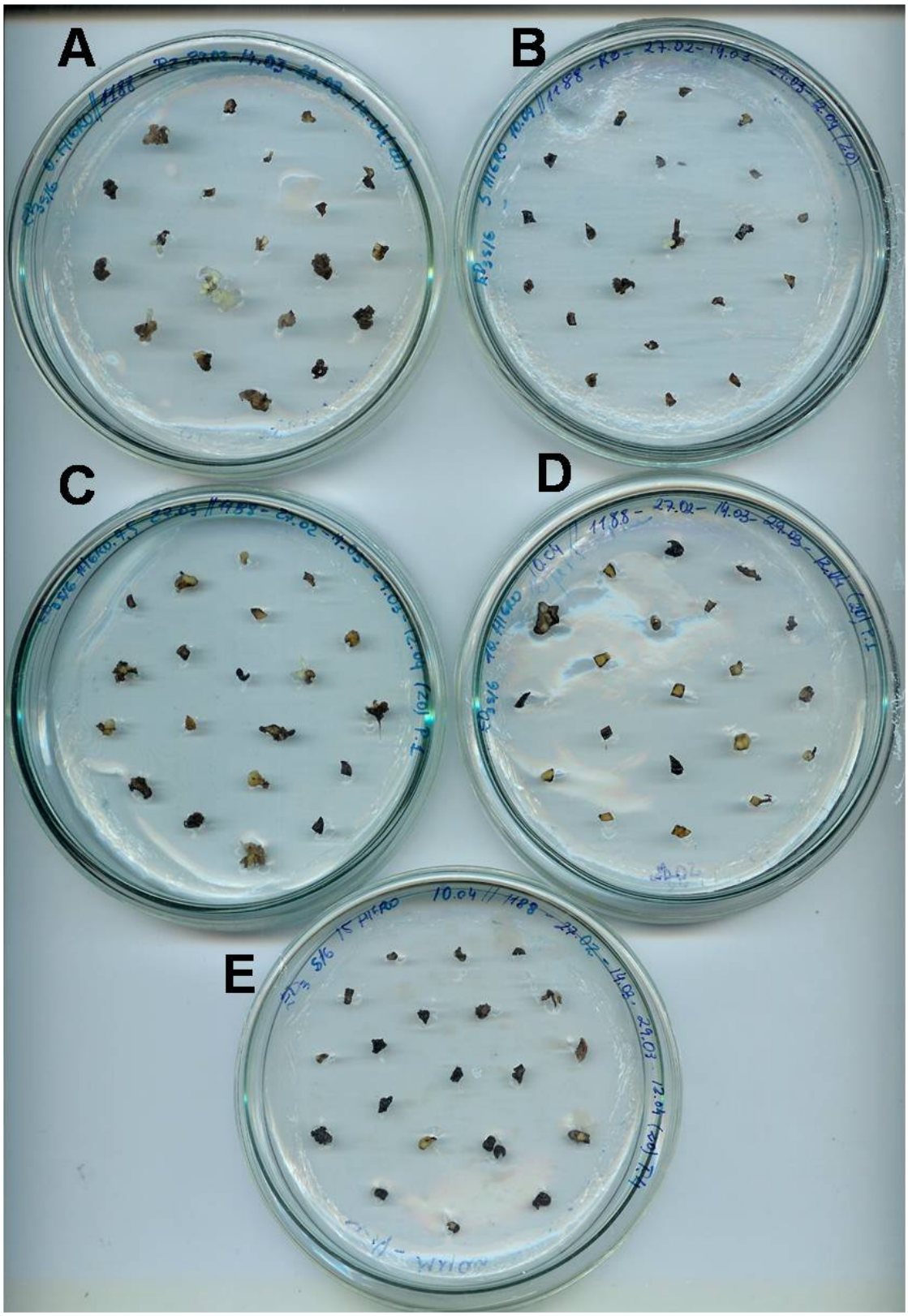

A
B
C
D
E

Figura 3 – Cultivo *in vitro* de discos cotiledonares de embriões somáticos primários do genótipo ‘TSH 565’ em meio de regeneração de embriões somáticos secundários (SCG-2→ED4s/g→ED3s/g) contendo antibióticos utilizados no controle de *Agrobacterium* após o co-cultivo. Os antibióticos foram avaliados em duas diferentes concentrações: A - timentin 150 $mg.L^{-1}$, B - timentin 300 $mg.L^{-}$, C - cefotaxima 250 $mg.L^{-1}$, D - cefotaxima 500 $mg.L^{-1}$, E - meropenem 6,25 $mg.L^{-1}$; meropenem 6,25 $mg.L^{-1}$.

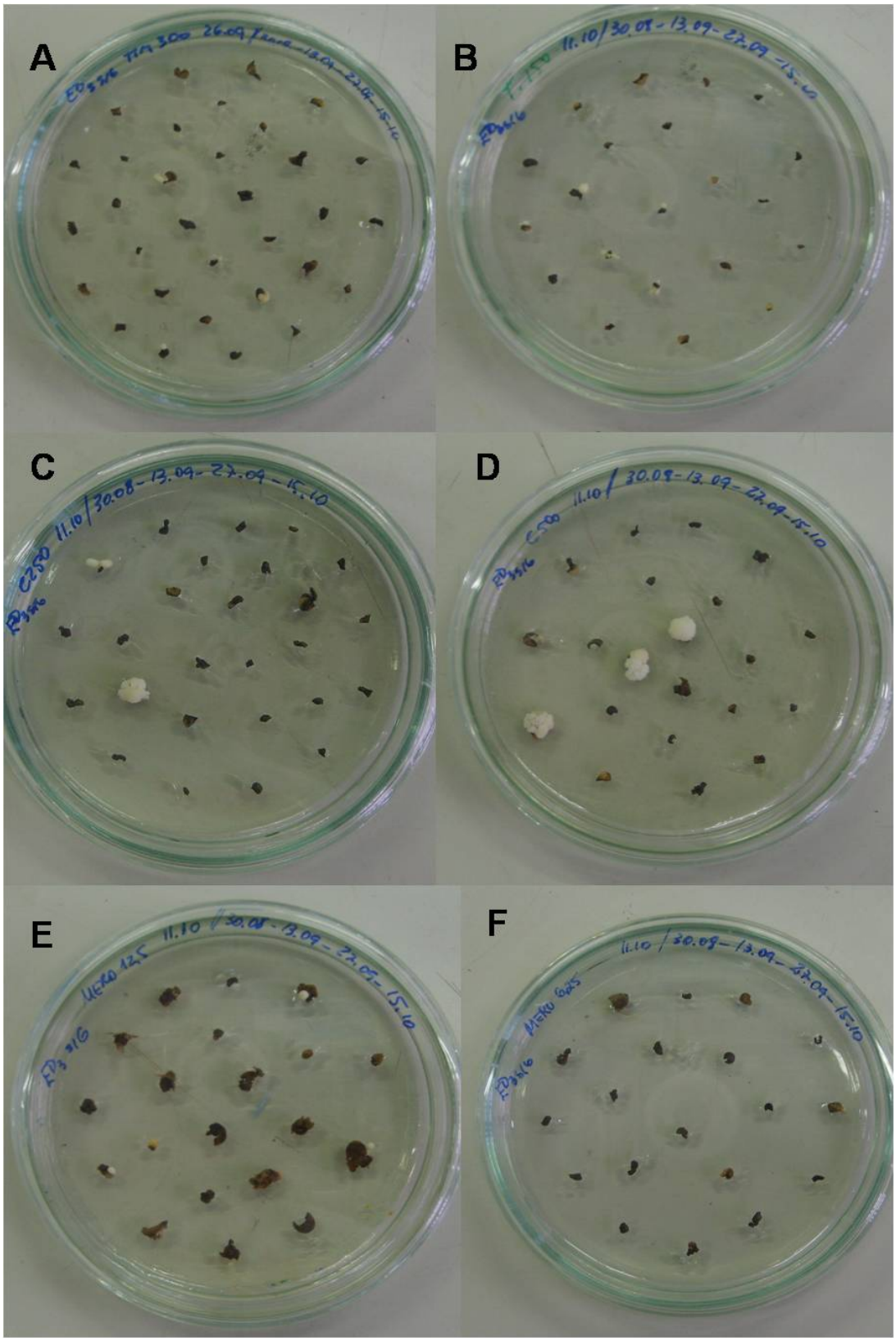
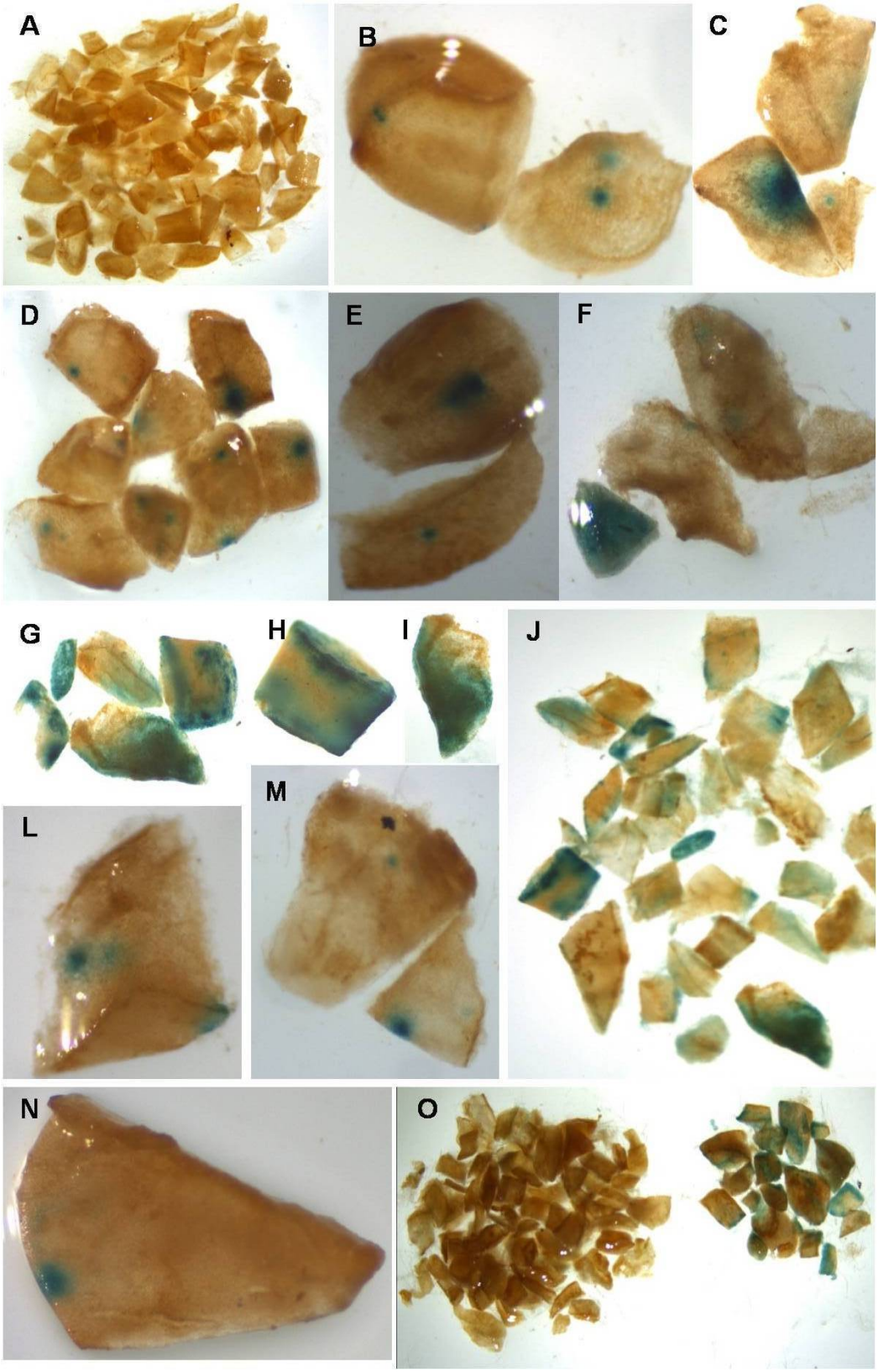

A
B
C
D
E
F

Figura 4 – Cotilédones de embriões somáticos de cacau evidenciando a expressão do gene *GUSint*. A – Controle; B – 5 minutos de tempo de incubação em *Agrobacterium*; C – 20 minutos de tempo de incubação em *Agrobacterium*; D – concentração de *Agrobacterium* de 1,0 (OD_{600}); E - concentração de *Agrobacterium* de 0,5 (OD_{600}); F – concentração de *Agrobacterium* de 0,8 (OD_{600}; G, H, I, J – 25 µM acetosseringona em meio de co-cultivo (SCG-2); L, N – 100 segundos de sonicação; M – 250 segundos de sonicação; O – explantes não transformados e explantes transformados co-cultivados com *Agrobacterium* em meio SCG-2 suplementado com células de tabaco (*feeder-layer*).


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
L
M
N
O

3.1. Efeito do antibiótico higromicina na regeneração de embriões somáticos secundários

O antibiótico higromicina na concentração de 10 mg L^{-1} inibiu quase que completamente a formação de calos no genótipo 'TSH 565' (5%) (Figura 1). Para o genótipo 'TSH 1188', entretanto, inibição similar (5%) foi obtida somente em meio de cultura contendo 15 mg L^{-1} de higromicina. As concentrações de 10 e 15 mg L^{-1} também inibiram drasticamente a freqüência de calos embriogênicos (Figura 2) e o número médio de embriões por explante (Figura 3), em ambos os genótipos avaliados. Entretanto, higromicina na concentração mais elevada testada, de 15 mg L^{-1}, não foi suficiente em eliminar completamente a produção de embriões em explantes cotiledonares de ambos os genótipos avaliados.

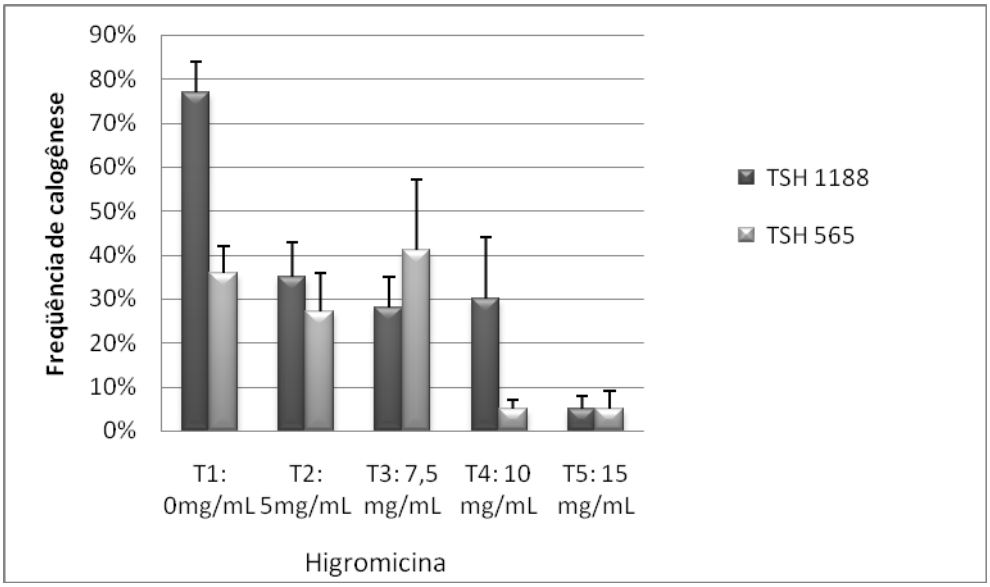


Figura 1 – Freqüência média de calogênese em explantes cotiledonares dos genótipos 'TSH 1188' e 'TSH 565' cultivados em meio de regeneração contendo diferentes concentrações do antibiótico higromicina.

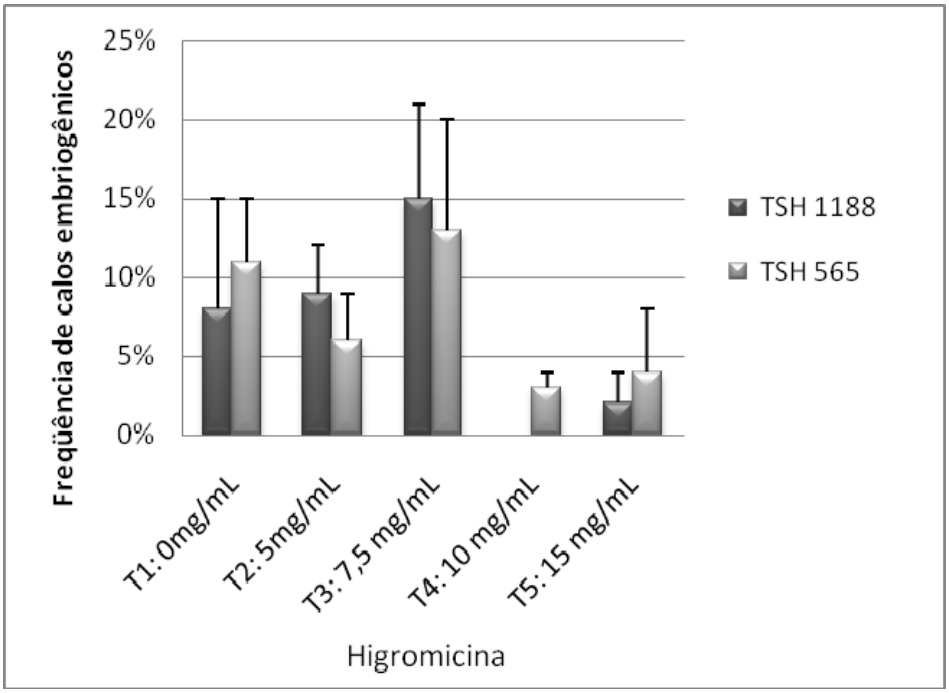


Figura 2 – Freqüência média de calos embriogênicos em explantes cotiledonares de ‘TSH 1188’ e ‘TSH 565’ cultivados em meio de regeneração contendo diferentes concentrações do antibiótico higromicina.

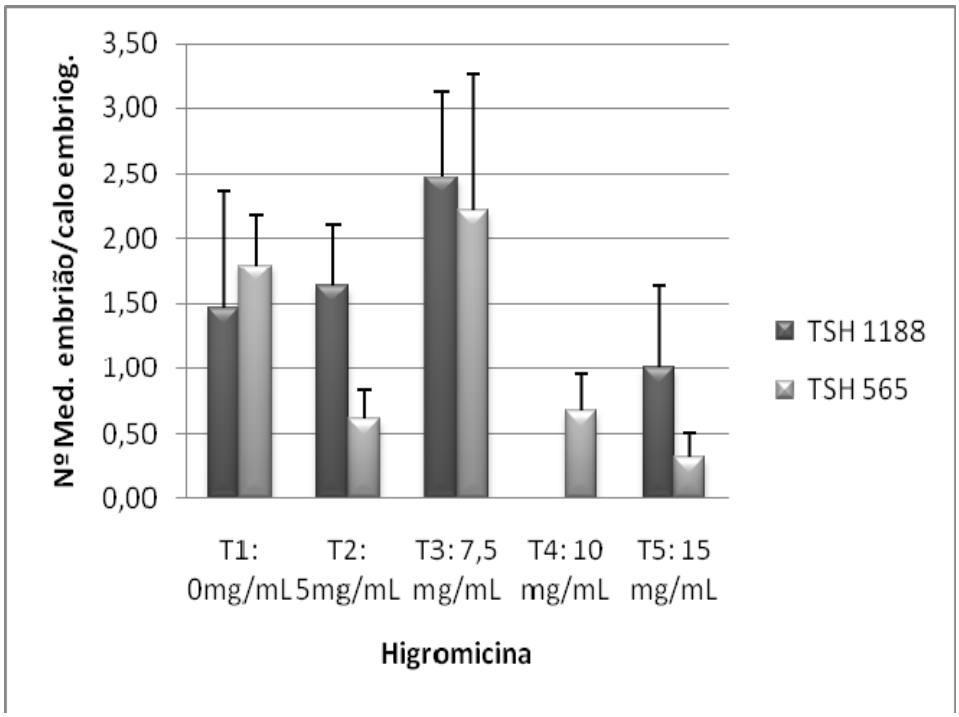


Figura 3 – Número médio de embriões por calo embriogênico em explantes cotiledonares de ‘TSH 1188’ e ‘TSH 565’ cultivados em meio de regeneração contendo diferentes concentrações do antibiótico higromicina.

3.2. Efeito de antibióticos para o controle de *Agrobacterium* na regeneração de embriões somáticos secundários

O clone ‘TSH 565’ foi selecionado para a avaliação dos efeitos dos antibióticos usados no controle de *Agrobacterium* na embriogênese somática secundária. De um modo geral, os antibióticos empregados no controle de *Agrobacterium* avaliados tiveram um efeito negativo na capacidade regenerativa dos explantes, independente da concentração utilizada. Comparado ao controle (sem antibióticos), os antibióticos cefotaxima, timentin e meropenem reduziram significativamente a freqüência de calos embriogênicos (Figura 4), o número médio de embriões por explante (Figura 5) e o número médio de embriões leitosos por explante (Figura 6). Além disso, o antibiótico meropenem aumentou significativamente a freqüência de calos com raiz, independente da concentração utilizada (Figura 4).

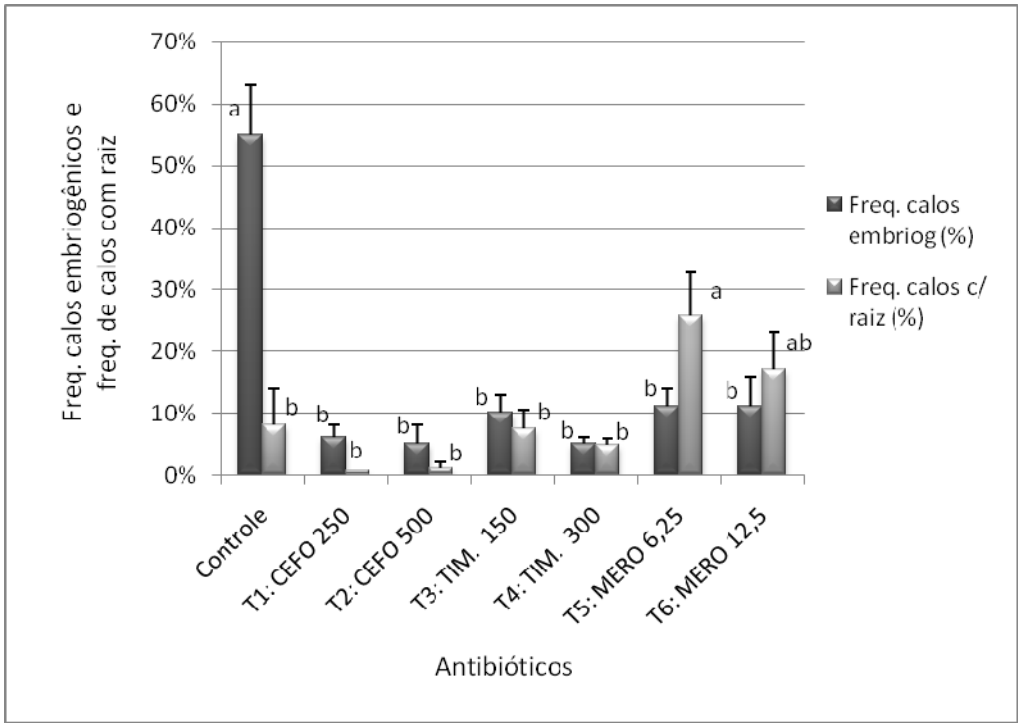


Figura 4 – Freqüências média de calos embriogênicos e calos com raiz em explantes cotiledonares de ‘TSH 565’ cultivados em meio de regeneração contendo diferentes concentrações de antibióticos. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, para cada variável, não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Bonferroni.

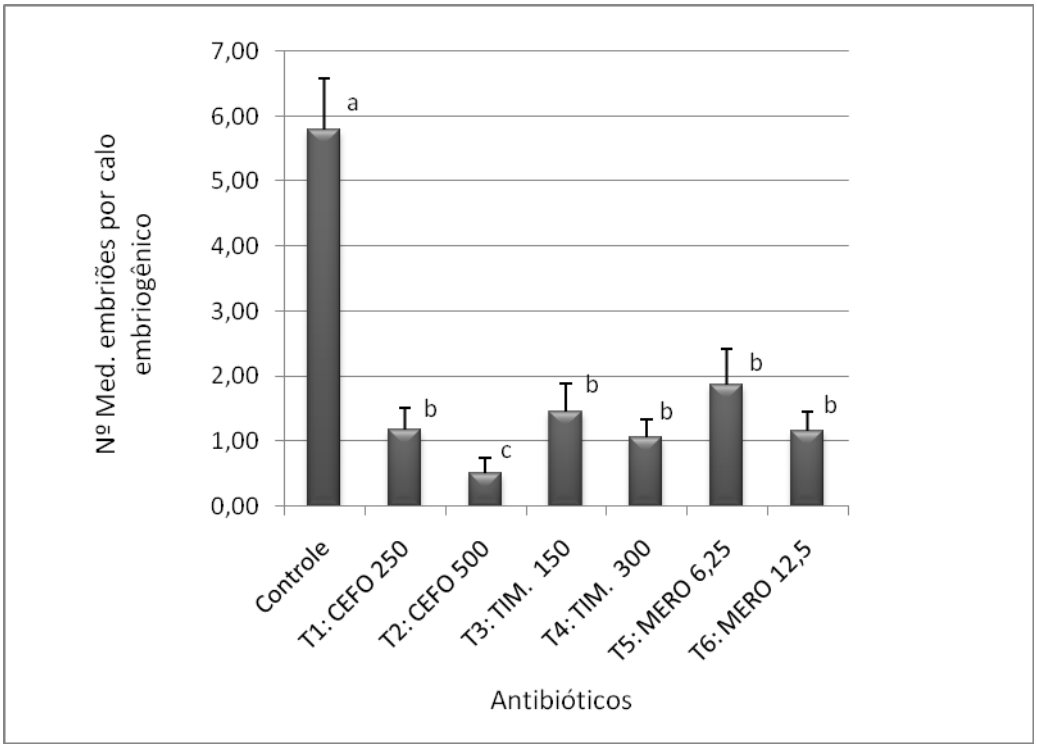


Figura 5 – Número médio de embriões por calo embriogênico em explantes cotiledonares de 'TSH 565' cultivados em meio de regeneração contendo diferentes concentrações de antibióticos. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Bonferroni.

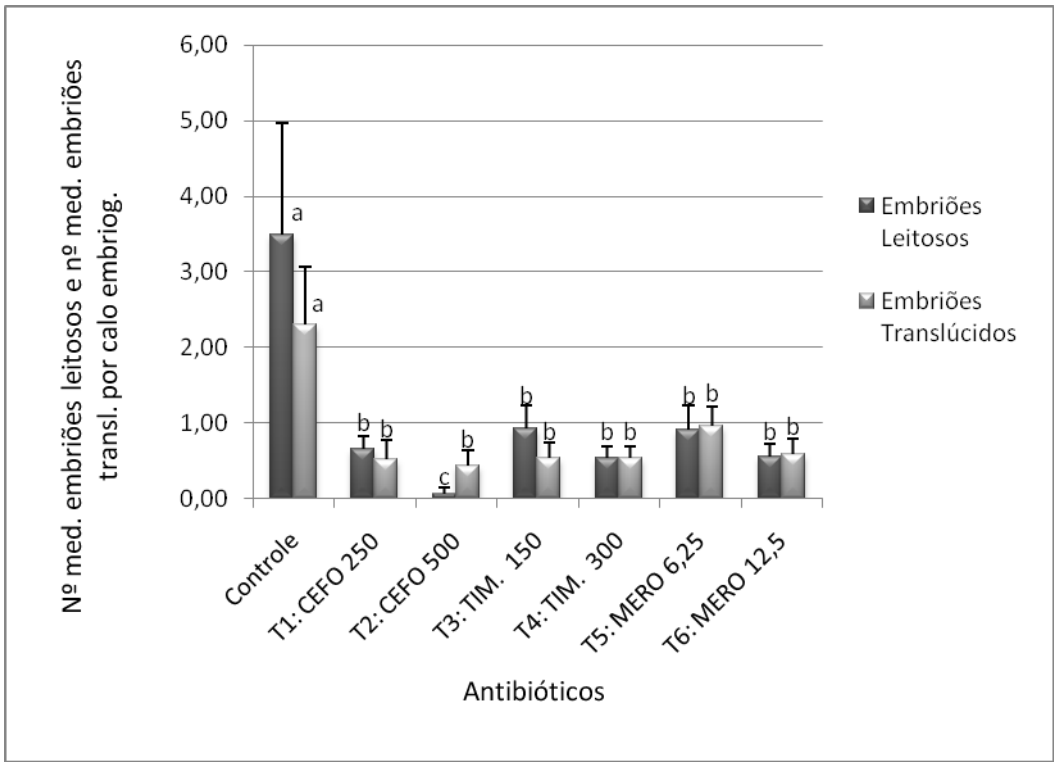


Figura 6 – Números médios de embriões leitosos e translúcidos por calo embriogênico em explantes cotiledonares de 'TSH 565' cultivados em meio de regeneração contendo diferentes concentrações de antibióticos. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, para cada variável, não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Bonferroni.

3.3. Efeito da sonicação dos explantes na eficiência de transformação

O tratamento de sonicação dos explantes cotiledonares de 'TSH 565' que determinou a maior freqüência de explantes GUS+ foi o de 150 segundos (2%), embora as diferenças observadas não tenham sido significativas (Figura 7). O maiores números médios de pontos azuis por explante foram obtidos nos tratamentos de sonicação dos explantes em água por 100 segundos (sonicação sem agro) ou sonicação em presença de *Agrobacterium* por 150 ou 250 segundos (ambos 0,63) (Figura 8).

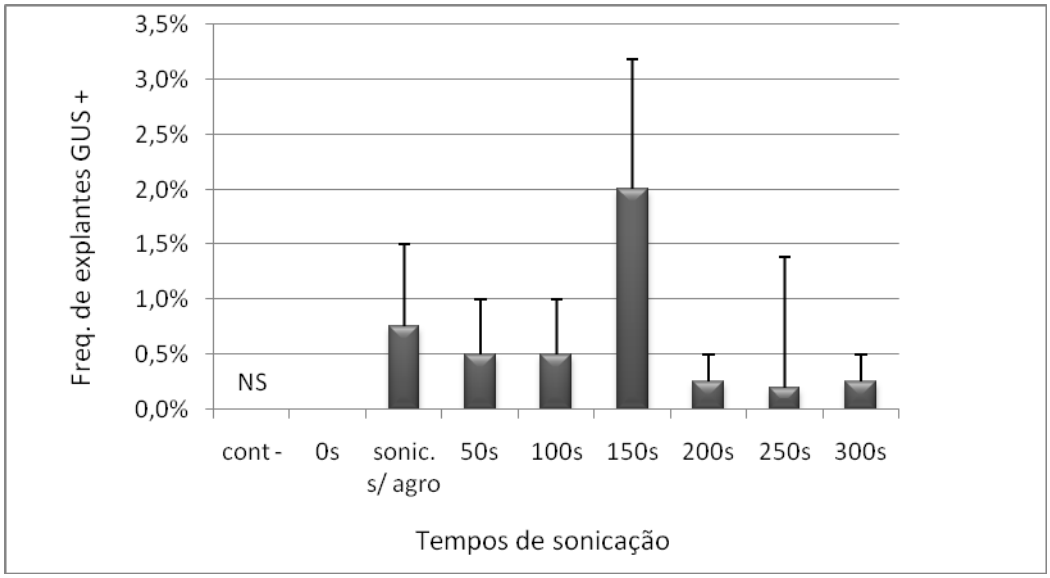


Figura 7- Efeito de diferentes tempos de sonicação na freqüência de explantes GUS+ em 'TSH 565'.

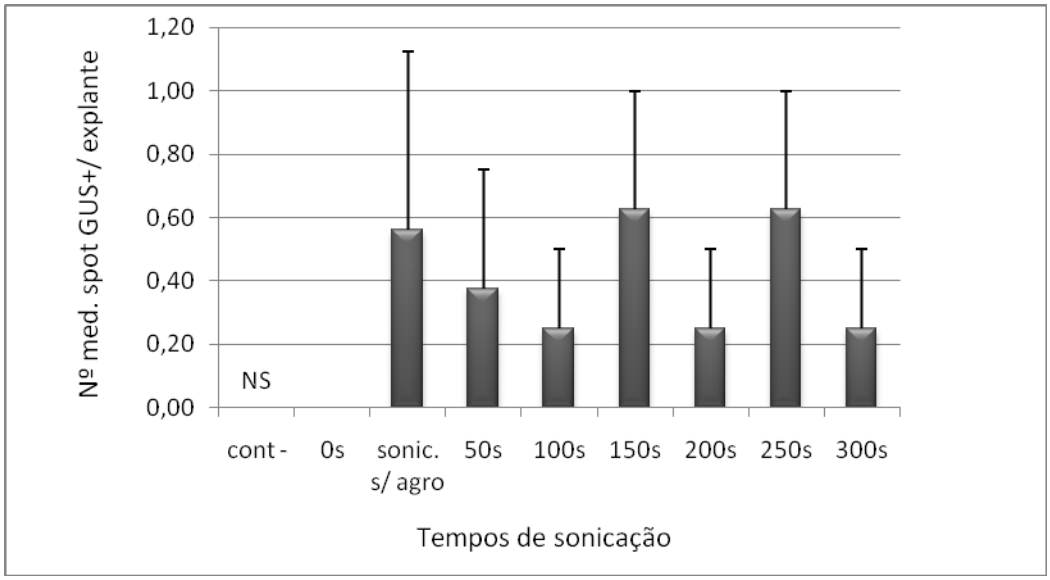


Figura 8 – Efeito de diferentes tempos de sonicação no número médio de pontos azuis por explante em 'TSH 565'.

3.4. Efeito do tempo de incubação dos explantes em *Agrobacterium*

Os explantes cotiledonares de ‘TSH 565’ incubados por 20 minutos em solução de *Agrobacterium* apresentaram a maior freqüência de explantes GUS+ (1,33%), embora essa diferença não tenha sido significativa entre os tratamentos (Figura 9). Em relação ao número médio de pontos azuis por explantes, os tratamentos de 5 minutos e 20 minutos de incubação se destacaram em relação aos demais tratamentos (Figura 10).

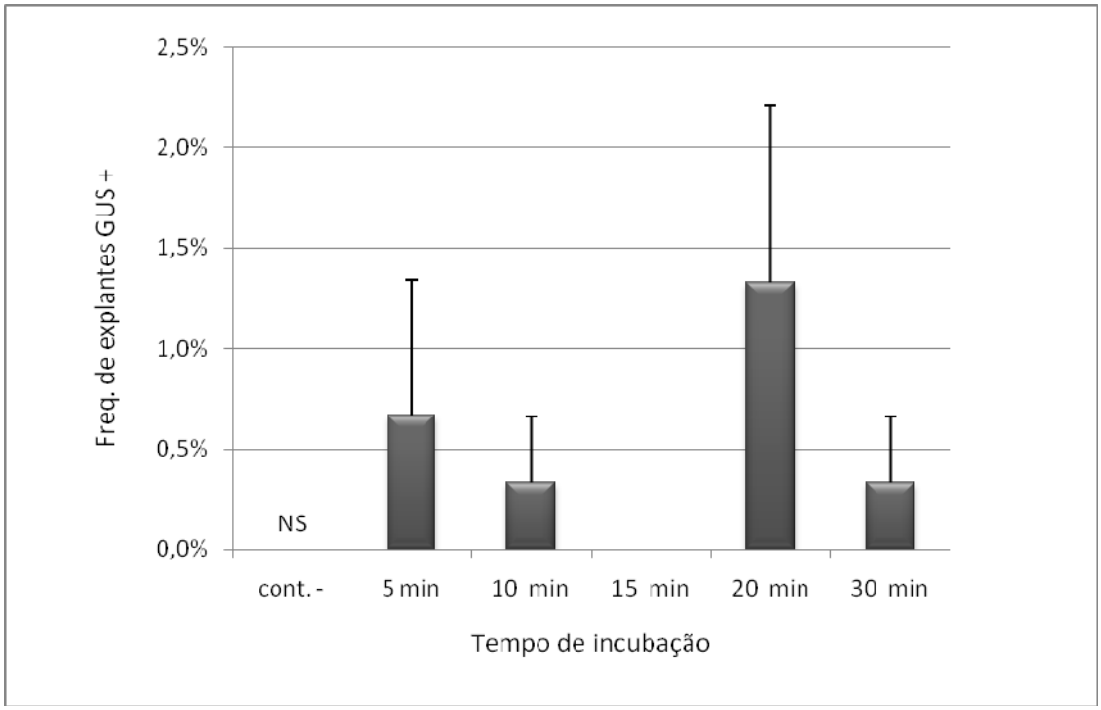


Figura 9 – Efeito do tempo de incubação dos explantes em solução de *Agrobacterium* na freqüência de explantes GUS+ em ‘TSH 565’.

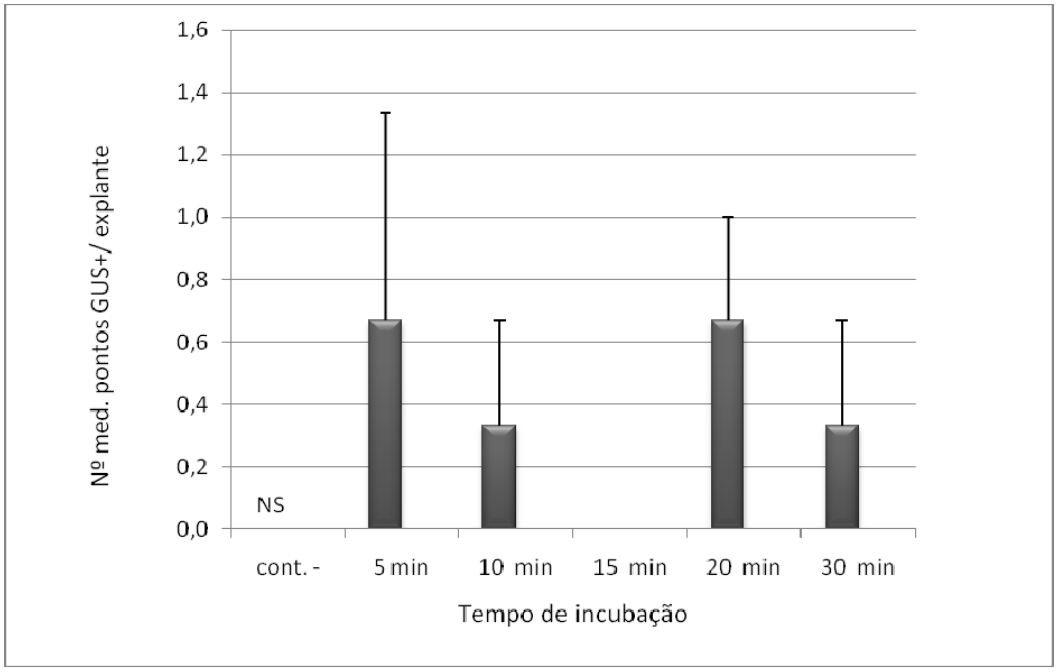


Figura 10 – Efeito do tempo de incubação dos explantes em solução de *Agrobacterium* no número médio de pontos azuis por explante em 'TSH 565'.

3.5. Efeito da concentração de *Agrobacterium*

A concentração de *Agrobacterium* de 1,0, (O.D.$_{600}$) proporcionou a maior freqüência de explantes GUS+ (Figura 11) e número médio de pontos azuis por explante (Figura 12), embora a diferença tenha sido significativa somente para a primeira variável. A OD_{600} de 0,8 também proporcionou um número médio de pontos azuis por explante similar aquele obtido em OD_{600} de 1,0 (Figura 12).

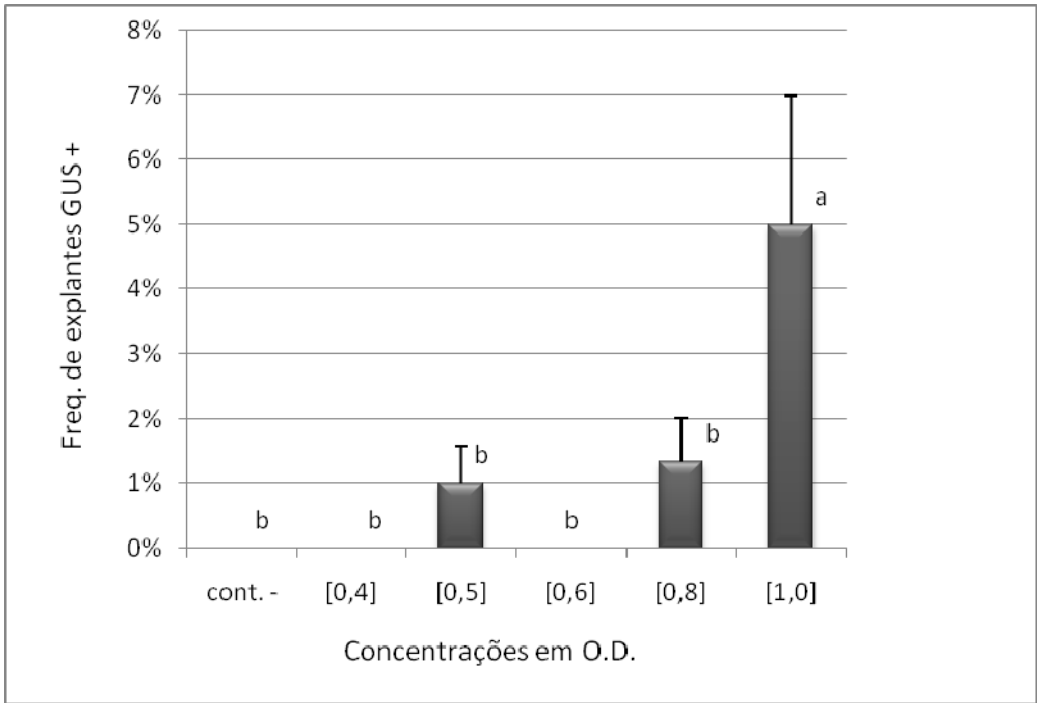


Figura 11 – Efeito da concentração de *Agrobacterium* na freqüência de explantes GUS+ em 'TSH 565'.

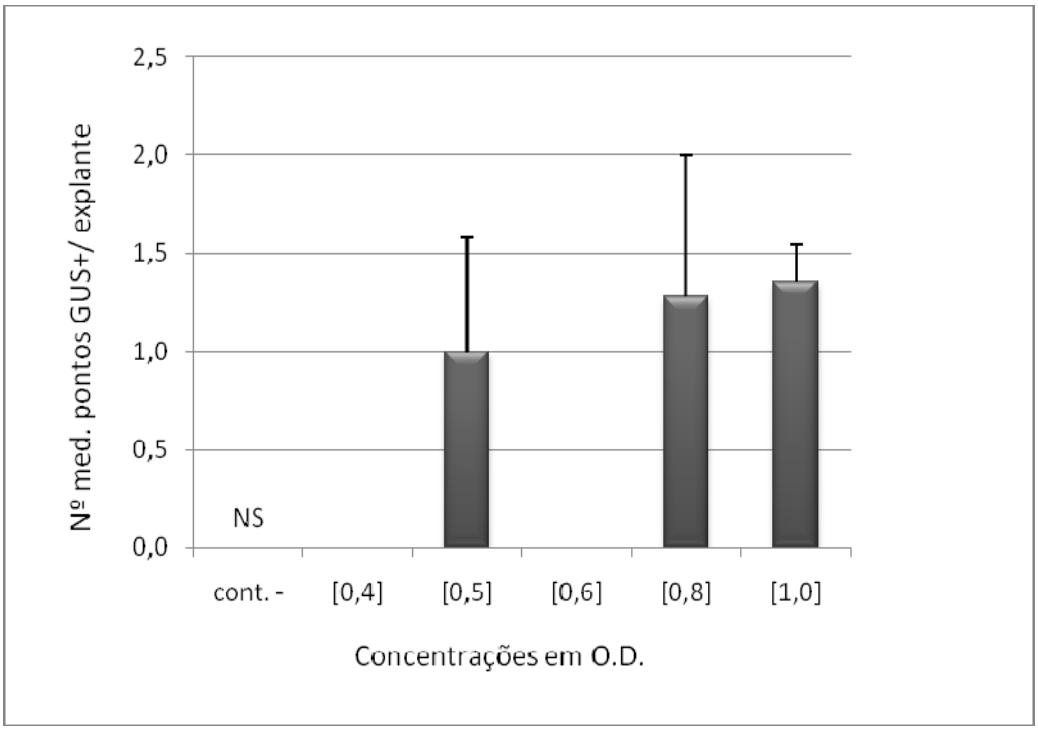


Figura 12 – Efeito da concentração de *Agrobacterium* no número médio de pontos azuis por explante em‘TSH 565’.

3.6. Efeito da concentração de acetosseringona no meio de co-cultivo

Freqüência similares de explantes GUS+ para ‘TSH 565’ foram obtidas entre as diversas concentrações de acetosseringona testadas em meio de co-cultivo, bem como na presença de suspensão de células de tabaco. Não se observou diferença na freqüência de transformação entre esses tratamentos e o controle (ausência de acetosseringona e células de tabaco).

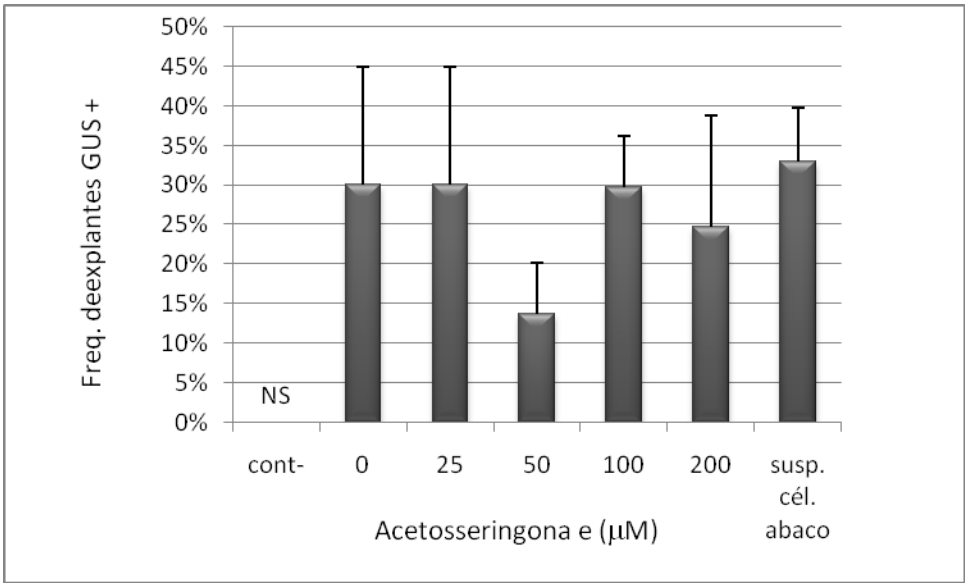


Figura 13 – Efeito da concentração de acetosseringona e células de tabaco adicionadas ao meio de co-cultivo na freqüência de explantes GUS+ em ‘TSH 565’.

4. DISCUSSÃO

4.1. Efeito do antibiótico higromicina

Dentre os mecanismos utilizados para seleção de células transformadas está o uso de genes marcadores de seleção *in vitro*. Estes genes geralmente codificam para uma proteína com atividade enzimática, ou para um produto que irá conferir às células transformadas da planta, resistência a um determinado substrato, permitindo distinguir células transformadas e não transformadas. Estes genes são utilizados para que o produto de sua expressão permita que apenas as células transformadas cresçam. O gene (*hpt*), que codifica para a enzima higromicina fosfotransferase (HPT), foi isolado de *Escherichia coli* e confere resistência ao antibiótico higromicina, sendo muito utilizado para seleção de plantas transformadas em várias espécies. O antibiótico higromicina B é um antibiótico aminociclitol produzido por *Streptomyces hygroscopicus* e inibe a síntese de proteínas em procariotos e eucariotos, interferindo na translocação e reconhecimento do aminoacyl- tDNA, causando má leitura do mRNA (ZHENG et al., 1991).

A introdução de genes marcadores de seleção como a higromicina, junto com o gene de interesse são fundamentais para a recuperação de plantas transgênicas expressando o gene de interesse, pois a regeneração destas plantas ocorre em meio de regeneração do tecido contendo o antibiótico que fatalmente eliminará as células do tecido que não foram transformadas. Porém, ainda é comum o aparecimento de plantas quiméricas ou ‘escapes’ em alguns eventos de transformação. Segundo Brasileiro (1998), uma planta quimérica é formada por células transformadas e células não transformadas, e seu aparecimento pode ocorrer em virtude de uma seleção tardia ou inadequada, permitindo que uma célula transformada e uma célula não transformada dêem origem ao mesmo broto. “Escapes” são plantas não transformadas que, apesar de não expressarem o gene marcador de seleção, conseguem regenerar na presença do agente de seleção. Portanto, a determinação das melhores condições para se proceder a seleção de plantas transformadas é muito importante para o sucesso da aplicação das técnica de transformação genética. Assim, a determinação das concentrações de

antibióticos marcadores de seleção que consigam eliminar com eficiência todas as células não transformadas no tecido sem causar prejuízo às células transformadas é imprescindível para aumentar a eficiência na obtenção de plantas transgênicas.

Neste trabalho cinco diferentes concentrações do antibiótico higromicina foram testadas para avaliar a sua letalidade na embriogênese somática secundária dos genótipos 'TSH 1188' e 'TSH 565'. Observou-se que a formação de calos foi afetada pela presença de higromicina e que muitos dos explantes apresentaram um escurecimento característico de oxidação do tecido sem mostrar nenhum aumento de massa celular. A concentração de 10 $mg.L^{-1}$ causou os maiores efeitos inibitórios nos explantes cotiledonares quanto a produção de embriões em ambos genótipos avaliados. Para o 'TSH 1188' o tratamento com 10 $mg.L^{-1}$ de higromicina inibiu completamente a indução de calos embriogênicos e a conseqüente produção de embriões. Porém, surpreendentemente, na concentração de 15 $mg.L^{-1}$ calos embriogênicos e poucos embriões foram encontrados. Semelhantemente, o 'TSH 565' seguiu a mesma tendência, mas sem apresentar a inibição total no tratamento com higromicina a 10 $mg.L^{-1}$. Assim, concentrações de higromicina acima de 15 $mg.L^{-1}$ devem ser testadas visando identificar aquela em que ocorra a inibição completa da produção de embriões somáticos em ambos os genótipos de cacaueiro.

4.2. Efeito de antibióticos para o controle de *Agrobacterium* na regeneração de embriões somáticos secundários

Nos últimos anos, muitas plantas transgênicas foram obtidas usando a transformação genética mediada por *Agrobacterium*. Na aplicação deste método indireto de transformação, a supressão e a eliminação da bactéria são necessários para minimizar o risco da bactéria interferir no crescimento e regeneração de tecidos vegetais potencialmente transformados, e também para reduzir o risco de liberação da agrobactéria geneticamente modificada no ambiente (OGAWA; MII, 2005; OGAWA; MII, 2007).

Para o controle da *Agrobacterium* em meio seletivo de regeneração, muitos antibióticos β-lactam têm sido utilizados, sendo os mais comuns carbenicilina e cefotaxima. Esta classe de antibióticos age inibindo a síntese da parede celular por

interferir mais específicamente na biossíntese de peptídeoglicano, um componente da parede celular de procariontes (GHUYSEN, 1997; DEMAIN; ELANDER, 1999; ASBEL; LEVISON, 2000). Trabalhos avaliando o efeito de carbenicilina e cefotaxima no crescimento da célula vegetal, organogênese e embriogênese têm sido relatados (NAUERBY et al., 1997), assim como também para outras classes de antibióticos (POLLOCK et al. 1983; YOUNG et al. 1984; OKKELS; PEDERSEN 1988). Apesar desses relatos, a toxicidade de antibióticos β-lactams para tecidos vegetais, assim como para *A. tumefaciens* tem sido raramente estudado.

Para o estabelecimento de um protocolo de transformação genética eficiente para uma determinada espécie, faz-se necessário determinar os efeitos dos antibióticos utilizados para controle de *Agrobacterium* na resposta morfogênica *in vitro*. O presente estudo avaliou o efeito de concentrações diferentes de três antibióticos da classe dos β-lactam (cefotaxima, timentin e meropenem) na embriogênese somática secundária de cacaueiro. Observou-se que todos os tratamentos com os antibióticos testados, independente da concentração utilizada, reduziram drasticamente a regeneração de embriões somáticos secundários, ficando evidente o efeito fitotóxico destes antibióticos em explantes de cacaueiro. Muitos dos explantes cotiledonares não apresentaram nenhum sinal de calejamento, enquanto alguns produziram calos compactos (brancos) e outros produziram embriões diretamente do explantes, ou seja, sem a formação de calos. Entre os tratamentos foi observado também que as diferentes concentrações testadas podem inibir ou favorecer o surgimento de um determinado tipo de embrião (leitoso ou translúcido). Objetivando obter uma maior produção de calos embriogênicos e embriões leitosos (devido a apresentarem maior taxa de conversão) os tratamentos T3 (timentin 150 $mg.L^{-1}$), T5 (meropenem 6,25 $mg.L^{-1}$) e T6 (meropenem 12,5 $mg.L^{-1}$) apresentaram os melhores resultados dentre os tratamentos avaliados. Embora diferenças estatísticas não tenham sido observadas, o antibiótico meropenem, em ambas as concentrações, foi o que apresentou os melhores resultados quanto a freqüência de calo embriogênico e número médio de embriões por calo embriogênico. No entanto, este antibiótico também induziu a maior freqüência de calos com raiz observada entre os tratamentos. Também foi observado para este antibiótico que a produção de embriões leitosos foi quase equivalente à produção de embriões translúcidos, embora 6,25 $mg.L^{-1}$ favoreceu um ligeiro aumento na quantidade de embriões translúcidos em relação aos embriões leitosos. Ogawa e Mii (2007) relataram que a

atividade antibacteriana e a fitotoxidade do meropenem afetaram minimamente as condições de transformação conseguindo controlar o supercrescimento de *Agrobacterium* com 25 $mg.L^{-1}$, e alcançando altas freqüências de transformação em tabaco, tomate e arroz.

O timentin na concentração de 150 $mg.L^{-1}$ apresentou uma maior relação E.L./E.T. para o genótipo 'TSH 565' de cacau. Este antibiótico é uma mistura de ticarcilina, um derivado da penicilina, e ácido clavulânico, com atividade contra muitas bactérias gram negativas (como *Agrobacterium*) possuindo atividade β-lactamase (NEU, 1985). Timentin tem sido preferencialmente utilizado em trabalhos de transformação genética de tomate e tabaco por apresentar um efeito positivo na regeneração de brotos de explantes de discos foliares e na regeneração de cotilédones (NAUERBY et al., 1997; COSTA et al., 2000).

No presente estudo, a cefotaxima foi o antibiótico que causou mais prejuízos à embriogênese somática do cacaueiro, especialmente na concentração de 500 mg L^{-1}. Esse resultado reforça os relatos encontrados na literatura quanto a sua inibição à regeneração de diversas espécies vegetais quando em concentrações acima de 500 $mg.L^{-1}$ (NAUERBY et al., 1997). Entretanto, também há relatos de efeitos positivos de seu uso na morfogênese *in vitro*, dependendo da concentração utilizada (FEYISSA et al., 2007).

Os antibióticos timentin e meropenem, quando utilizados em menores concentrações (150 $mg.L^{-1}$ e 6,25 $mg.L^{-1}$, respectivamente), apesar de afetarem a resposta morfogênica de cacau, mostraram uma maior tendência em produzir embriões somáticos secundários leitosos, sendo assim recomendados para utilização em trabalhos de transformação genética do genótipo 'TSH 565'.

4.3. Efeito da sonicação dos explantes, acetosseringona, concentração de *Agrobacterium* e tempo de incubação na eficiência de transformação

O ferimento parece ser um componente importante na transformação mediada por *Agrobacterium*. A injúria do tecido facilita a infecção pela bactéria, além de produzir indutores do processo de transferência de T-DNA (STACHEL et al., 1985). Recentemente, foi proposto o uso de pulsos de ultra-som para ferir e

modificar tecidos alvo, visando o aumento da infecção por *Agrobacterium*. A técnica denominada de SAAT (transformação mediada por *Agrobacterium* e ultra-som; TRICK; FINER, 1997) tem incrementado a eficiência na transferência de genes. Joersbo e Brunstedt (1990) relataram a introdução de DNA exógeno em protoplastos de *Nicotiana tabacum* e *Beta vulgaris* através da aplicação de pulsos de ultra-som a 20 kHz e 0,5-1,5 watts/cm2 de potência acústica. Para *Beta vulgaris,* foi observado que a freqüência de expressão transiente do gene introduzido foi maior utilizando ultra-som do que a obtida com eletroporação. Os mesmos autores relataram ainda o uso de tecido foliar de caupi, embriões imaturos de *Zea mays,* sementes de *Triticum aestivum e Picea glauca* como explantes iniciais para a aplicação de pulsos de ultra-som (55KHz). Os pulsos de ultra-som variaram de 2 a 100 segundos, dependendo da espécie testada. Em todos os tecidos testados, o tratamento com SAAT aumentou os níveis de expressão transitória do gene *GUS*. Na maioria dos tecidos inoculados com *Agrobacterium* e sem SAAT, a expressão transitória do gene *GUS* foi muito baixa ou nula. Aplicando-se pulsos de ultra-som, a expressão aumentou de 100 a 1400 vezes, dependendo da espécie.

Considerando que cacaueiro é uma planta recalcitrante à cultura de tecidos, alternativas têm sido buscadas para aumentar a infecção dos tecidos cotiledonares de cacau com *Agrobacterium*, aplicando-se a técnica de SAAT (MAXIMOVA et al., 2003). Os resultados obtidos no presente estudo também reforçam ser imprescindível a aplicação da técnica de sonicação para os explantes de cotilédones de embriões somáticos de cacaueiro, visto que sem a aplicação de pulsos de ultra-som nenhum nível de expressão de GUS foi detectado. Os resultados obtidos demonstraram um aumento de 5% na eficiência de transformação em relação ao controle (não sonicado) quando os explantes foram sonicados por 150 segundos em presença de *Agrobacterium*. Também foi observado que a sonicação dos explantes (100 segundos) antes do contato com a agrobacteria determinou um número médio de 2,4 vezes mais pontos azuis do que explantes sonicados por 100 segundos em presença da bactéria.

Substâncias que se comportam semelhantemente a compostos fenólicos naturais podem ser utilizadas visando potencializar a sinalização da presença de tecido em condição de ser infectado por *Agrobacterium*. A utilização de acetosseringona tem incrementado a eficiência de transformação mediada por *Agrobacterium* para muitas culturas, incluindo plantas recalcitrantes, como a grande

maioria de monocotiledôneas. No presente estudo, avaliou-se o efeito de concentrações de acetosseringona, que variaram de 0 a 200 µM, ou suspensão de células de tabaco (*feeder-layers*) em meio de co-cultivo, na eficiência de transformação de cacaueiro. Foi observado que a presença de acetosseringona não se mostrou um fator essencial para a transformação de cacau. Tingay (1997) e Fang et al. (2002) também não observaram diferenças na eficiência de transformação de cevada quando os explantes foram cultivados em diferentes concentrações de acetosseringona. Por outro lado, efeitos positivos na eficiência de transformação devido a presença de acetosseringona em meio de co-cultivo têm sido relatado para arroz (HIEI et al., 1994), milho (ISHIDA et al., 1996) e trigo (CHENG et al., 1997; WU et al., 2003).

Vários trabalhos têm relatado a relação entre a densidade da *Agrobacterium* utilizada e o tempo de incubação dos explantes em *Agrobacterium* (BARIK et al., 2005; SANTARÉM, 2000). No presente estudo, observou-se que o tempo de incubação de 20 minutos determinou a maior freqüência de explantes expressando o gene *GUS*. Em cacaueiro, o período de 10 minutos de incubação dos explantes em *Agrobacterium* tem sido tradicionalmente utilizado nos experimentos de transformação (MAXIMOVA et al., 2003; 2006). Os resultados obtidos demonstram que o tempo de incubação dos explantes em *Agrobacterium* é um importante fator afetando a eficiência de transformação.

O número de células de *Agrobacterium* no inoculo também é considerado ser um fator crítico para a eficiência de transformação (COSTA et al., 2002). Um número excessivo de bactéria pode estressar as células vegetais e afetar o potencial de regeneração, enquanto baixas concentrações reduzem a eficiência de transferência do T-DNA. No presente estudo, observou-se que a concentração de 1,0 (OD_{600}) produziu as maiores freqüências de transformação. Para cacaueiro, a concentração de 0,5 (OD_{420}) tem sido utilizada nos trabalhos de transformação (MAXIMOVA et al., 2003; 2006).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem extrair as seguintes conclusões:

- Concentrações de higromicina acima de 15 mg L^{-1} devem ser utilizadas em meio seletivo de regeneração de embriões somáticos a fim de selecionar aqueles transformados;
- Os antibióticos timentin e meropenem, nas concentrações de 150 e 6,25 mg L^{-1}, respectivamente, devem ser utilizados em meio seletivo de regeneração de embriões, visando minimizar o efeito negativo dos antibióticos empregados no controle de *Agrobacterium*;
- A sonicação dos explantes em *Agrobacterium* por 150 segundos, a 20 kHz, é recomendada para o aumento da freqüência de transformação;
- Os explantes de 'TSH 565' devem ser incubados em solução de *Agrobacterium*, em OD_{600} de 1,0 ($5x10^8$ cels.mL^{-1}), por 20 minutos, a fim de se obter maiores freqüências de transformação;
- A presença de acetosseringona ou células de tabaco em meio de co-cultivo não afeta a eficiência de transformação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASBEL, L.E.; LEVISON, M.E. Cephalosporins, carbapenems, and monobactams. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 14, p. 435–447, 2000.

BARIK, D.P.; MOHAPATRA, U.; CHAND, P.K. Transgenic grasspea (*Lathyrus sativus* L.): factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 523-531, 2005.

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 (DF): Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), 1998. p. 111-125.

CHENG, M.; FRY, J.E.; PANG, S.; ZHOU, H.; HIRONAKA, C.M.; DUNCAN, D.R.; CONNER, T.; WAN, Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, v. 115, p. 971–980, 1997.

COSTA, M.G.C.; NOGUEIRA, F.T.S.; FIGUEIRA, M.L.; OTONI, W.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CECON, P.R. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 327-332, 2000.

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

DEMAIN, A.L.; ELANDER, R.P. The β-lactam antibiotics: past, present, and future. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 5–19, 1999.

FANG, Y.D.; AKULA, C.; ALTPETER, F. *Agrobacterium*-mediated barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using green fluorescent protein as a visual marker and sequence analysis of the T-DNA::barley genomic DNA junctions. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 1131–1138, 2002.

FEYISSA, T.; ZHU, L.-H.; NEGASH, L.; WELANDER, M. Regeneration and genetic transformation of *Hagenia abyssinica* (Bruce) J.F. Gmel. (Rosaceae) with *rolB* gene. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 88, p. 277-288, 2007.

GHUYSEN, J-M. Penicillin-binding proteins. Wall peptidoglycan assembly and resistance to penicillin: facts, doubts and hopes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 8, p. 45–60, 1997.

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

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

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

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

MAXIMOVA , S.N.; MARELLI, J-P.; PISHAK, A.Y.S.; VERICA, J.A.; GUILTINAN, M.J. Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. **Planta**, v. 224, p. 740-749, 2006.

MAXIMOVA, S.N.; ALEMANNO, L.; YOUNG, A.; FERRIERE, N.; GUILTINAN, M.J. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 38, p. 252-259, 2002.

MAXIMOVA, S.N.; MILLER, C.; MAYOLO, G. A. de; GUILTINAN, M.J. Stable transformation of *Theobroma cacao* L. and influence of matrix attachment regions on *GFP* expression. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 872–883, 2003.

NAUERBY, B.; BILLING, K.; WYNDAELE, R. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, v. 123, p. 169–177, 1997.

OGAWA, Y.; MII, M. Evaluation of 12 β-lactam antibiotics for *Agrobacterium*-mediated transformation through in planta antibacterial activities and phytotoxicities. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 736-743, 2005.

OGAWA, Y.Y.; MII, M. Meropenem and moxalactam: novel b-lactam antibiotics for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Science,** v. 172, p. 564–57, 2007.

OKKELS, F.T.; PEDERSEN, M.G. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. **Acta Horticulturae**, v. 225, p. 199–207, 1988.

PERRY, M.D.; POWER, J.B.; LOWE, K.C.; DAVEY, M.R. Biolistic transformation of cacao (*Theobroma cacao* L.). **Tropical Agriculture**, v. 77, p. 64-66, 2000.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D.G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell culture. **Plant Cell Reports**, v. 2, p. 36–39, 1983.

SANTARÉM, E.R. Ultrassom e Agrobacterium (SAAT): uma nova abordagem na transformação de plantas. **ABCTP Notícias**, n. 33, 1999.

SANTOS, M.O.; BARROS, E.V.S.A; TINOCO, M.L.P.; BRASILEIRO, A.C.M.; ARAGÃO, F.J.L. Repetitive somatic embryogenesis in cacao and optimisation of gene expression by particle bombardment. **Plant Biotechnology**, v. 4, p. 71-76, 2002 .

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

TINGAY, S.; McELROY, D.; KALLA, R.; FIEG, S.; WANG, M.; THORNTON, S.; BRETTELL, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation, **Plant Journal**, v. 11, p. 1369–1376, 1997.

TRICK, H.N.; FINER, J.J. SAAT: Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. **Transgenic Research**, v.6, p.329-337, 1997.

WU, H.; SPARKS, C.; AMOAH, B.; JONES, H.D. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 659–668, 2003.

YOUNG, P.M.; HUTCHINS, A.S.; CANFIELD, M.L. Use of antibiotics to control bacteria in shoot cultures of woody plants. **Plant Science Letters**, v. 34, p. 203–209, 1984.

ZHENG, Z.; HAYASHIMOTO, A.; LI, Z.; MURAI, N. Hygromycin resistance gene cassetes for vector construction and selection of transformed Rice protoplasts. **Plant Physiology**, v. 97, p. 832-835, 1991.

CAPÍTULO 3

TRANSFORMACAO GENÉTICA DO CLONE COMERCIAL DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.) 'TSH 565' COM O GENE OXALATO DECARBOXILASE (OXDC)

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi utilizar o gene candidato de resistência OxDC (oxalato decarboxilase), do fungo *Flamullina velluptes*, em trabalhos de transformação genética do clone 'TSH 565', visando a produção de plantas de cacaueiro transgênicas e futura avaliação da resistência ao fungo *M. perniciosa*. Para esse conjunto de experimentos, cerca de 300 explantes cotiledonares de 'TSH 565' foram co-cultivados com a linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101, contendo o vetor pCAMBIA OxDC, conforme metodologia descrita nos Capítulo 1 e 2. Aproximadamente 554 embriões somáticos potencialmente transformados foram obtidos no presente trabalho. Muitos desses embriões foram de morfologia anormal, dificultando a sua conversão em plântulas, provavelmente devido à presença de antibióticos no meio de cultura ou a efeitos colaterais causados pelo transgene. Uma amostragem de 10 embriões, por PCR, revelou que nenhum conteve o transgene, provavelmente devido a baixa pressão de seleção com o antibiótico higromicina

imposta nos experimentos. Uma amostragem maior de embriões será efetuada num futuro próximo visando identificar, por PCR, e micropropagar aqueles embriões transformados, de modo a se obter plantas completas de cacaueiro expressando o gene OxDc para futura avaliação da resistência contra *M. perniciosa*.

1. INTRODUÇÃO

Culturas de importância agronômica têm sido prejudicadas pela ação de fungos nas fases de pré e pós-colheita, afetando muitas vezes severamente a produtividade e causando perdas e grandes prejuízos econômicos. A patogenicidade apresentada pelos fungos tem sido associada à produção de ácido oxálico (BATEMAN; BEER, 1965; MAGRO et al., 1984; GODOY *et al*., 1990). Estudos prévios forneceram evidencias do envolvimento do ácido oxálico no mecanismo de patogenicidade fúngica, mas o exato papel deste ácido durante a infecção fúngica ainda não é bem compreendido. No entanto, várias enzimas celulolíticas e pectinolíticas secretadas por fungos durante a invasão e infecção do tecido vegetal tem máxima atividade em baixo pH, aumentando a atividade enzimática devido ao decréscimo do pH do apoplasto (BATEMAN; BEER, 1965; LUMSDEN, 1976). O oxalacetato pode também quelar o cálcio, comprometendo a função de resposta de defesa dependente de cálcio e causando o enfraquecimento da parede celular (BATEMAN; BEER, 1965; MARCIANO et al., 1983; FERRAR; WALKER, 1993). Além disso, o oxalato suprime a biossíntese oxidativa, desativando mais rapidamente as respostas de resistência em células vegetais (CESSNA et al., 2000).

A introdução de um gene que possa degradar especificamente o ácido oxálico em plantas pode apresentar algumas vantagens, como reduzir o estresse nutricional e conferir resistência a patógenos fúngicos (KESARWANI et al., 2000**).** A enzima oxalato oxidase catalisa a oxidação dependente de oxigênio de oxalato, gerando CO_2 e peróxido do hidrogênio (KOTSIRA; CLONIS, 1997). Já a oxalato dercaboxilase quebra o oxalato, gerando formato e CO_2 (REINHARDt *et al* ., 2003).

Em cacaueiro, foi demonstrado que ‘Catongo’, variedade de cacaueiro susceptível a *Monioliophthora perniciosa*, acumulou grandes quantidades de cristais de oxalato de cálcio em seus tecidos após a interação com o fungo, o que não foi observado no clone resistente ‘TSH 1188’ (CEITA et al., 2007). Esses resultados observados criam perspectivas de que a redução de oxalato em tecidos de cacau tem o potencial de perturbar a interação compatível entre *T. cacao* e *M. perniciosa*, podendo levar a resistência das plantas ao fungo.

Vários relatos demonstram que plantas expressando genes que degradam o oxalato têm aumentado a resistência ao fungo necrotrófico *Sclerotinia minor*. Em alface, tabaco e tomate também foram demonstrados que a susceptibilidade a fungos patogênicos foi abolida pela eliminação de oxalato de cálcio em plantas transgênicas superexpressando o gene oxalato decarboxilase de fungo (KESARWANI et al., 2000).

Baseado nas informações descritas acima, o objetivo desse trabalho foi utilizar o gene candidato de resistência OxDC (oxalato decarboxilase), do fungo *Flamullina velluptes*, em trabalhos de transformação genética do clone ‘TSH 565’, visando a produção de plantas de cacaueiro transgênicas e futura avaliação da resistência ao fungo *M. perniciosa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

O clone de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) ‘TSH 565’ foi empregado no presente estudo.

2.2. Cultivo do material *in vitro*

O processo de cultivo do material *in vitro* foi conduzido conforme descrito nos itens 2.5, 2.6 e 2.7 do Capítulo 1.

2.3. Tipo de explante utilizado para procedimento de transformação

Cotilédones de embriões somáticos primários maduros e leitosos, com cerca de 60 dias de idade ou mais, foram utilizados como fonte de explantes para realização do experimento de transformação.

2.4. Transformação genética com *Agrobacterium tumefaciens*

Para realização do procedimento de transformação, colônias isoladas da cepa EHA 101 de *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o vetor pCAMBIA OxDC (DIAS et al., 2006), foram retiradas de estrias feitas em placa e colocadas para crescer. Estas

colônias foram utilizadas para inocular 50 mL de meio YEP, contendo 50 mg L^{-1} de canamicina. As culturas foram crescidas à temperatura de 28°C, com agitação orbital de aproximadamente 220 rpm. Após 16 horas, as culturas com densidade ótica (OD_{600}) entre 0,9 a 1,1 foram centrifugadas a 3.500 rpm, por 10 minutos, à temperatura de 4°C e ressuspendidas em meio MI (MAXIMOVA et al., 2003) líquido até atingir uma concentração de OD_{600} = 0,5. Após a ressuspensão da bactéria, adicionou-se 100 μM de acetosseringona (Sigma Chemical Company, EUA). Os cotilédones de embriões somáticos primários leitosos foram seccionados em segmentos de aproximadamente 4 mm^2, com auxílio de pinça e bisturi, em câmara de fluxo laminar, e mantidos em água MiliQ autoclavada até incubação com a suspensão bacteriana. Os explantes foram incubados em solução de *Agrobacterium* (3 x 10^8 células mL^{-1}) por 12 minutos, a 25°C, sob agitação de 50 rpm no escuro. Após essa etapa, a solução de *Agrobacterium* foi removida e os explantes foram colocados em papel filtro estéril para remoção do excesso de agrobactéria. Em seguida, os explantes foram colocados em 25 mL de meio SCG-2 (MAXIMOVA et al., 2003) sólido, suplementado com 100 μM de acetosseringona, para o co-cultivo com *Agrobacterium* por 72 h, à 25°C, no escuro. As placas de petri foram vedadas com a fita cirúrgica (*micropore tape*). Após esse período, os explantes foram transferidos para meio seletivo SCG-2, suplementado com 500 $mg.L^{-1}$ de cefotaxima e 10 $mg.L^{-1}$ de higromicina, onde permaneceram por 14 dias, a 25 ± 2 °C, em condição de escuro. Os calos secundários foram posteriormente transferidos para o meio seletivo ED4s/g, suplementado com os agentes seletivos nas mesmas concentrações descrita acima, onde permaneceram por mais 14 dias sob as mesmas condições de incubação anteriores, sendo depois subcultivados a cada 14 dias em meio seletivo ED3s/g, sob as mesmas condições de incubação anteriores.

3. RESULTADOS

Para os experimentos de transformação do clone ‘TSH 565’ com o gene OxDc, os procedimentos de introdução e cultivo *in vitro* de material vegetal foram realizados conforme descrito nos itens 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 do Capítulo 1. Explantes cotiledonares de embriões somáticos primários foram transformados e regenerados via embriogênese secundária, como descrito no item 2.7 do Capítulo 1.

Após a inoculação de cerca de 300 explantes cotiledonares com *A. tumefaciens* contendo o gene OxDc, observou-se que os explantes que passaram pelo processo de transformação apresentaram uma maior freqüência de calo embriogênico (Figura 1) e número médio de embriões por explante (Figura 2) do que explantes não inoculados (controle). Entretanto, verificou-se que muitos embriões somáticos produzidos após a transformação dos explantes apresentaram morfologia anormal (embriões com um único cotilédone, ou somente com raiz, ou somente eixo embrionário) (Figuras 3 e 4). Na fase de conversão dos embriões em plântulas, verificou-se que muitos embriões que eram considerados normais também apresentaram um escurecimento avermelhado sob as condições de iluminação, que em alguns casos evoluiu por todo o embrião, conferindo a este um aspecto de oxidado ao final de 3 semanas. Embriões controle, que não passaram pelo processo de transformação foram facilmente regenerados em plântulas (Figura 5), porém nenhum embrião putativo transformado foi convertido em plântula.

Para caracterizar a natureza transgênica dos embriões putativos transformados, foi feita uma amostragem de dez embriões, dentre os 554 embriões produzidos após a transformação, para a realização de PCR, empregando-se um par de *primers* específicos para o gene *hptII*. Essa amostragem inicial não confirmou a presença do gene *hptII* em nenhum dos embriões avaliados. Novos ensaios de PCR serão feitos no futuro visando identificar e micropropagar aqueles embriões que forem identificados como transgênicos, de modo a se obter plantas completas de cacaueiro expressando o gene OxDc.

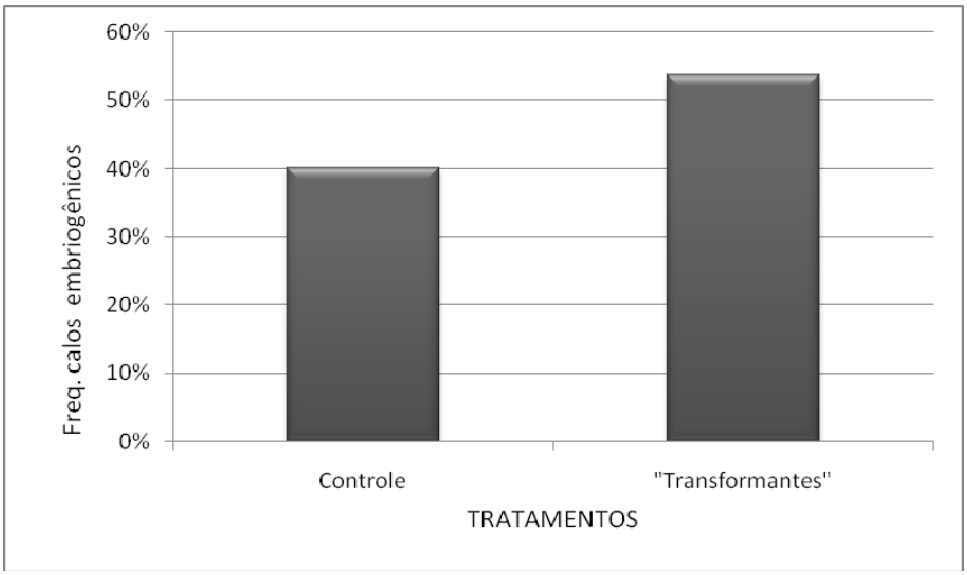


Figura 1 – Freqüência de calos embriogênicos obtidos em embriogênse secundária após transformação.

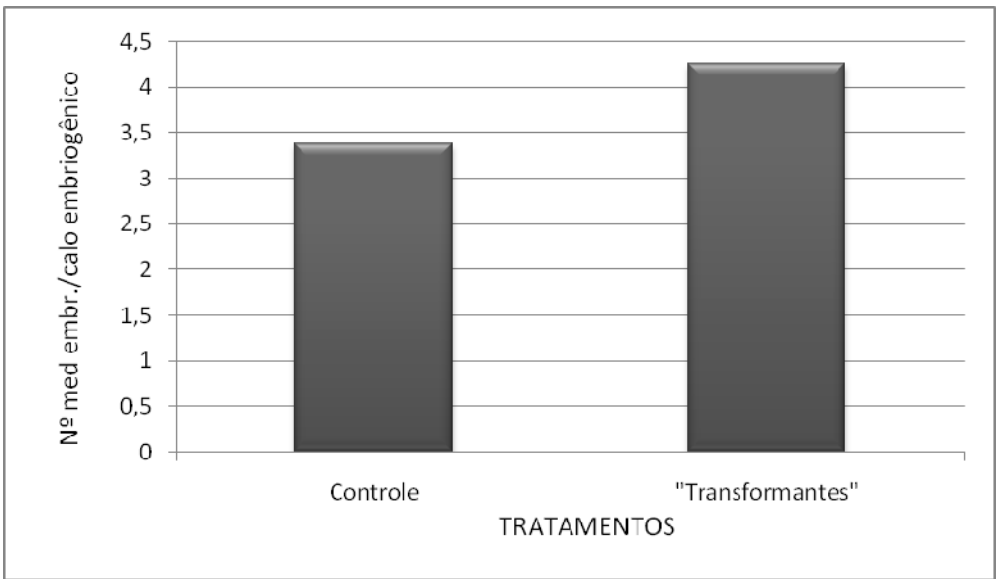


Figura 2. – Número médio de embriões por calo embriogênico obtidos em embriogênse secundária após transformação.

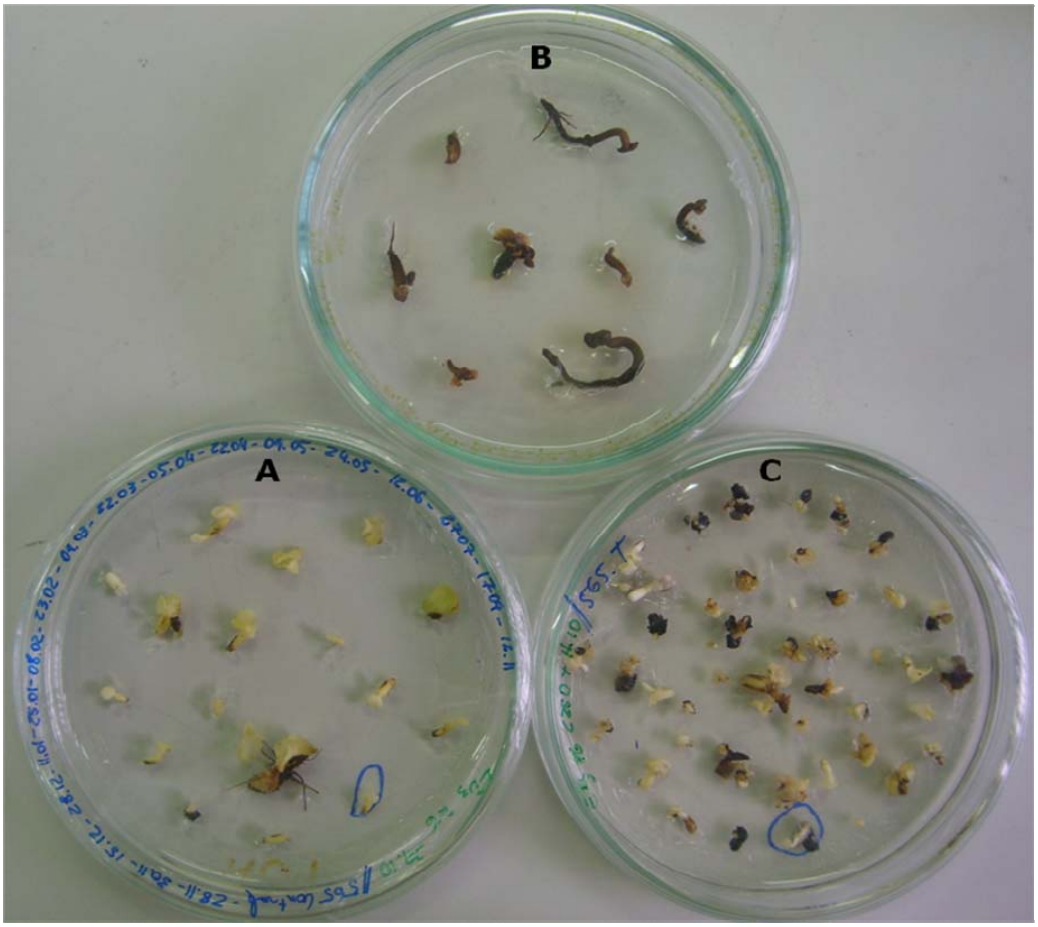


Figura 3 - Embriogênese somática secundária de explantes inoculados e co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens*. A – embriões controle, B – embriões transformados com aparência de oxidados, na fase de conversão, C – embriões somáticos putativos transformantes.

Figura 4 - Embriogênese somática secundária de explantes co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* contendo o gene OxDc. A – Controle, B, C, D – transformantes putativos, E, F G – embriões controle normais maduros, H – calo compacto branco, I, J, L – embriões transformantes putativos anormais apresentando escurecimento, M – calo embriogênico produzindo apenas cotilédone transformado putativo.

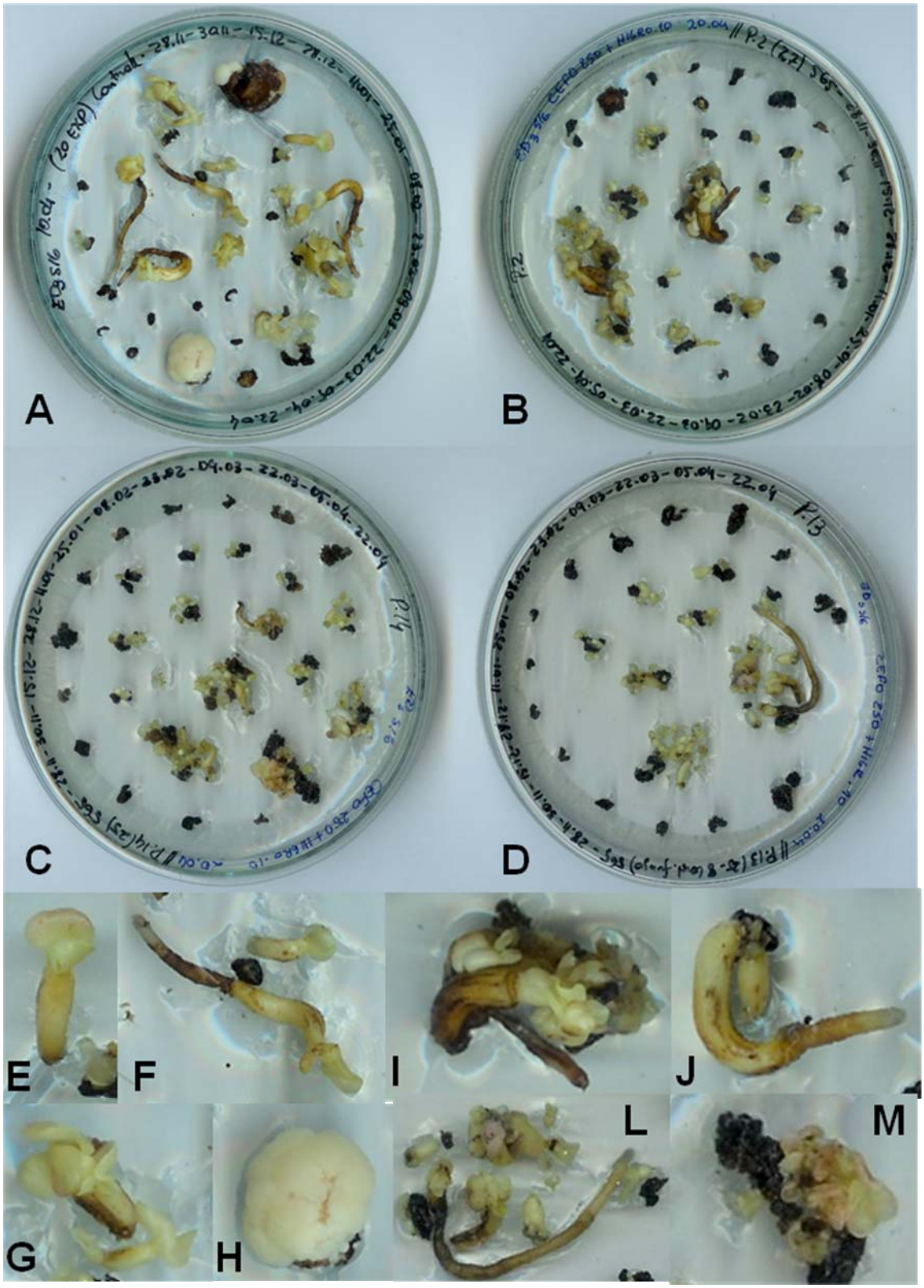

A
B
C
D
E
F
I
J
G
H
L
M

Figura 5 – Planta ‘TSH 565’ originada de embrião somático secundário controle do experimento de transformação.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a possibilidade de transformação genética de embriões somáticos de cacaueiro com o gene OxDc, embora ainda não tenha sido determinada a natureza transgênica dos embriões. Embora o processo de transformação genética induziu uma maior freqüência e número médio de embriões por explante do que o controle, muitos embriões produzidos foram anormais. As anormalidades podem ter sido causadas pela presença de antibióticos (cefotaxima e higromicina) no meio de cultura, conforme observado e discutido no Capítulo 2, ou devido a efeitos colaterais de expressão do transgene. A elevada produção de embriões anormais após o processo de transformação também tem sido relatada por Maximova et al. (2003), que induziram os embriões transformados à embriogênese terciária, de modo a aumentar o sucesso de obtenção de plantas completas de cacaueiro contendo genes de interesse.

Uma prévia amostragem por PCR de 10 embriões somáticos, dentre os 554 produzidos, revelou que a princípio que nenhum contém o gene OxDc. Em parte, a pressão seletiva de 10 $mg.L^{-1}$ do antibiótico higromicina usado nos experimentos de transformação pode ser responsável por esse resultado. Observou-se que concentrações de 10$mg.L^{-1}$ de higromicina não foram suficientes em eliminar completamente a regeneração de embriões em ‘TSH 565’, conforme observado e discutido no Capítulo 2. Entretanto, como a amostragem efetuada inicialmente foi muito baixa, apenas 1,8% do total de embriões produzidos, novos ensaios de PCR serão feitos num futuro próximo visando identificar e micropropagar aqueles embriões transformados, de modo a se obter plantas completas de cacaueiro expressando o gene OxDc para futura avaliação da resistência contra *M. perniciosa*.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem extrair as seguintes conclusões:

- O protocolo de transformação genética utilizado para transformação de ´TSH 565' com o gene OxDc foi eficiente em produzir um elevado número de embriões somáticos potencialmente transformados;
- A presença de antibióticos no meio de cultura e/ou efeitos colaterais da expressão de OxDc pode(m) ter sido responsáveis pela elevada freqüência de embriões anormais obtidos;
- A baixa pressão de seleção com o antibiótico higromicina pode ter sido responsável pela regeneração de embriões "escapes", não confirmados como transformados por PCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATEMAN, D.F.; BEER, S.V. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v. 55, p. 204–211, 1965.

CEITA, G.O.; MACEDO, J.N.A.; SANTOS, T.B.; ALEMANNO, L.; GESTEIRA, A.S.; MICHELI, F.; MARIANO, A.C.; GRAMACHO, K.P.; SILVA, D.C.; MEINHARDT, L.; MAZZAFERA, P.; PEREIRA, G.A.G.; CASCARDO, J.C.M. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Science**, v. 173, p. 106-117, 2007.

CESSNA, S.G.; SEARS, V.E; DICKMAN, M.B.; LOW, P.S. Oxalic acid, a pathogenicityfactor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **Plant Cell**, v. 12, p. 2191–2199, 2000.

FERRAR, P.H.; WALKER, J.R.L. o-Diphenol oxidase inhibition—an additional role for oxalic acid in the phytopathogenic arsenal of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii*. **Physiological and Molecular Plant Patholology**, v. 43, p. 415–422, 1993.

GODOY, G.; STEADMAN, J.R.; DICKMAN, M.B.; DAM, R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of Sclerotinia sclerotiorum on *Phaseolus vulgaris*. **Physiological and Molecular Plant Patholology**, v. 37, p. 179–191, 1990.

KESARWANI, M.; AZAM, M.; NATARAJAN, K.; MEHTA, A.; DATTA, A. Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*. Molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 7230–7238, 2000.

KOTSIRA, V.P.; CLONIS, Y.D. Oxalate oxidase from barley roots: purification to homogeneity and study of some molecular, catalytic, and binding properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 340, p. 239-249, 1997.

LUMSDEN, R. D. Pectolytic enzymes of *Sclerotinia sclerotiorum* and their localization in infected bean. **Canadian Journal of Botany**, v. 54, p. 2630-2641, 1976.

MARCIANO, P.; DI LENNA, P.; MAGRO, P. Polygalacturonase isoenzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum in vivo* and *in vitro*. **Physiological Plant Patholology**, v. 20, p. 201-212, 1982.

REINHARDT, L.A.; SVEDRUZIC, D.; CHANG, C.H.; CLELAND, W.W.; RICHARDS, N.G.J. Heavy atom isotope effects on the reaction catalyzed by the oxalate decarboxylase from *Bacillus subtilis*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 1244– 52, 2003.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos no presente estudo permitem extrair as seguintes conclusões:

- Um sistema eficiente de regeneração *in vitro*, via embriogênese somática, estabelecido para os clones comerciais de cacaueiro 'TSH 565' e 'TSH 1188' inclui o cultivo dos explantes em placas de petri seladas com fita cirúrgica (*micropore tape*), durante a fase de indução de calo, seguido do subcultivo dos calos embriogênicos nos meios ED4s/g–ED3s/g ('TSH 565') ou ED3s/g ('TSH 1188') durante a fase de indução de embriões, devendo os meios de cultura serem suplementados com 1000 μM espermina;

- Um sistema eficiente de transformação genética estabelecido para os clones comerciais de cacaueiro 'TSH 565' e 'TSH 1188 inclui a sonicação (20 kHz) dos explantes em *Agrobacterium*, por 150 segundos, seguido da incubação dos explantes por 20 minutos em solução de *Agrobacterium*, à concentração de 1,0 (OD_{600}), e posterior cultivo dos explantes em meio seletivo contendo pelo menos 15 $mg.L^{-1}$ de higromicina e 150 $mg.L^{-1}$ de timentin ou 6,25 mg L^{-1} de meropenem;

- O sistema de transformação genética empregado para 'TSH 565' permitiu a obtenção de várias centenas de embriões somáticos supostamente transformados com o gene OxDc, os quais serão caracterizados quanto a sua natureza transgênica e as plantas produzidas avaliadas quanto a resistência ao fungo *M. perniciosa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMANNO, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 46, p. 187-194, 1996.

ALMEIDA, C.M.V.C; DIAS, L.A.S. Recursos genéticos. In: DIAS, L.A.S. (Ed.) **Melhoramento genético do cacaueiro.** Viçosa, MG: FUNAPE, UFG, 2001. p. 163-216.

BARKAT; A.; CARELS, N.; BERNARDI, G. The distribution of genes in the genome of *Gramineae* **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 94, p. 6857–6861, 1997.

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.

BRASILEIRO, A.C.M; DUSI, D.M. de A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa, CNPH, 1999. v. 2, p. 679-735.

CLARE, B. G.; McCLURE, N. C. *Agrobacterium*. In: SINGH, U. S.; SINGH, R. P.; KOHMOTO, K. (Eds.) **Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. London: Pergamon, 1995. v. 1: p. 221-236.

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

DE BLOCK, M. The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implications for plant breeding. **Euphytica**, v. 4, p. 1-14, 1993.

DE BLOCK, M. The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implications for plant breeding. **Euphytica**, v. 71, p. 1-14, 1993.

DIAS, L.A.S. 2001. Contribuições do melhoramento. In: DIAS, L.A.S. (Ed.) **Melhoramento genético do cacaueiro**. Viçosa, MG: FUNAPE, UFG, 2001. p. 493-529.

DIAS, B. B. A.; CUNHA, W. G.; MORAIS, L. S.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L.; CAPDEVILLE, G.; ARAGÃO, F. J. L. Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* **Plant Pathology**, v. 55, p**.** 187–193, 2006.

DONN, G., NILGES, M.; MOROCZ, S. Stable transformation of maize with a chimaeric modified phosphinothricin acyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogens*, In: NIJKAMP, H.J.J.; VAN DER PLAS, L.H.W.; AARTRIJK, J. (Eds.) **Progress in Plant Cellular and Molecular Biology**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1990. p 53.

ESAN, E.B. Tissue culture studies on cacao *(Theobroma cacao* L.). A supplementation of current research. In: **Proc. 5th Int. Cacao Res.** Conf. 1975. Ibadan: Cacao Rcs. Inst. Nigeria; p. 116-125, 1977.

FERRAR, P.H.; WALKER, J.R.L. O-Diphenol oxidase inhibition: an additional role of oxalic acid in the phytopathogenic arsenal of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.43, p. 415–442, 1993.

FERREIRA, L.T. Cacau: clones tecnológicos, a salvação da lavoura do cacau. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, p. 20 - 24, 1997.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J. Development of nucellar somatic embryos of *Theobroma cacao.* **Acta Horticulturae**, v. 336, p. 231-236, 1993.

FINER, J.J.; FINER, K.R.; SANTARÉM, E.R. Physical methods for plant cell transformation. In: MEYERS, R.A. (Ed.) **Encyclopedia of molecular micology and molecular medicine.** Weinheim: VCH, 1996. p. 458-465.

FISK, H.J.; DANDEKAR, A.M. The introduction and expression of transgenes in plants. **Scientia Horticulture**, v. 55, p. 5-36, 1993.

FLETCHER, J.C. Coordination of cell proliferation and cell fate decisions in the angiosperm shoot apical meristem. **BioEssays**, v. 24, p. 27–37, 2002.

GAMBORG, O.L.; PHILLIPS, G.C. **Plant cell, tissue and organ culture – fundamental methods**. Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1995.

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

GELVIN, S.B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the ‘‘Gene-Jockeying’’ tool. **Microbiology and Molecular Biology Review**s, v. 67, p. 16-37, 2003.

GESTEIRA, A.S.; MICHELI, F.; CARELS, N.; SILVA, ALINE C. da; GRAMACHO, K.P.; SCHUSTER, I.; MACEDO, J.N.; PEREIRA, G.A.G.; CASCARDO, J.C.M. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*. **Annals of Botany**, v. 100, p. 129-140, 2007.

GRIERSON, D. (Ed.). **Plant genetic engeneering**. London: Blackie Academic & Professional, 1994. v. 1, 267p.

GUILTINAN, M.J.; LI, Z.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S. Method and tissue culture media. ***US Patent* 6150587**, 2000.

GUILTINAN, M.J.; LI, Z.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.; PISHAK, S. High efficiency somatic embryogenesis of cacao. **Ingenic Newsletter**, p. 7-8, 1997.

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

HOOYKAA, P. J. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens.* **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 157-179, 1994.

JONES, P.G.; ALLAWAY, D.; GILMOUR, D.M.; HARRIS, C.; RANKIN, D.; RETZEL, E.R., JONES, C.A. Gene discovery and microarray analysis of cacao (*Theobroma cacao* L.) varieties. **Planta**, v. 216, p. 255–264, 2002.

JOY, R. W.; THORPE, T. A. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry and molecular biology. In: SOH, W.-Y.; BHOJWANI, S.S. (Eds.) **Morphogenesis in plant tissue cultures.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 171–214.

KESARWANI, M.; AZAM, M.; NATARAJAN, K.; MEHTA, A.; DATTA, A. Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*. Molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. **Journal of Biological Chemistry***,* v. 275, p. 7230–7238, 2000.

KLEE, H. J.; HORSCH, R. B.; ROGGERS, S. G. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 467-486, 1987.

LECHTENBERG, B.; SCHUBERT, D.; FORSBACH, A.; GILS, M.; SCHMIDT, R. Neither inverted repeat T-DNA configurations nor arrangements of tandemly repeated transgenes are sufficient to trigger transgene silencing. **Plant Journal,** v. 34, p. 507–517, 2003.

LI, Z.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.N.; GUILTINAN, M.J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. **In vitro Cellular and Developmental Biology–Plant**, v. 34, p. 293-299, 1998.

LIPP-NISSINEN, K. Molecular and cellular mechanisms of *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Ciência e Cultura**, v. 45, p. 104-111, 1993.

LITZ, R.E. Tissue culture studies with *Theobroma cacao*. In: DIMICK, P.S. (Ed.) **Cacao biotechnology symposium**. Department of Food Science, College of Agriculture, The Pennsylvania State University, University Park, PA, p. 111–120, 1986.

LOBÃO, D.E.V.P. **Agroecossistema cacaueiro da bahia: cacau-cabruca e fragmentos florestais na conservação de espécies arbóreas**. Jaboticabal: UNESP. Tese de Doutorado, 2007.

LOPEZ-BAEZ, O.; BOLLON, H.; ESKES, A.; PETIARD, V.. Embryogènese somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. á partir de pièces florales. **C. R. Acad. Sci.: Sciences de la Vie**, v. 316, p. 579-584, 1993.

LUMSDEN, R.D. Histology and physiology of pathogenesis in plant disease caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, p. 890–896, 1979.

MAXIMOVA , S.N.; MARELLI, J-P.; PISHAK, A.Y.S.; VERICA, J.A.; GUILTINAN, M.J. Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. **Planta**, v. 224, p. 740-749, 2006.

MAXIMOVA, S.N.; ALEMANNO, L.; YOUNG, A.; FERRIERE, N.; GUILTINAN, M.J. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 38, p. 252-259, 2002.

MAXIMOVA, S.N.; MILLER, C.; MAYOLO, G. A. de; GUILTINAN, M.J. Stable transformation of *Theobroma cacao* L. and influence of matrix attachment regions on *GFP* expression. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 872–883, 2003.

MAYER, A.M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, v. 18, p. 193–215, 1979.

MAYOLO, G.A.; MAXIMOVA, S.N.; PISHAK, S.; GUILTINAN, M.J. Moxalactam as a counter-selection antibiotic for *Agrobacterium*-mediated transformation and its

positive effects on *Theobroma cacao* somatic embryogenesis. **Plant Science**, v. 164, p. 607-615, 2003.

MEHTA, A.; DATTA, A. Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*: purification, chatracterization, and cDNA cloning. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 23548–23553, 1991.

NIEMENAK, N.; SAARE-SURMINSKI, K.; ROHSIUS, C.; NDOUMOU, D.O.; LIEBEREI, R. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 667-676, 2008.

OGAWA, Y.Y.; MII, M. Meropenem and moxalactam: novel b-lactam antibiotics for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Science,** v. 172, p. 564–57, 2007.

PENCE, V.C.; TLASEGAWA, P.M.; JANICK, J. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 104, p. 145-148, 1979.

PEREIRA. A.B. Melhoramento clonal. In: DIAS, L.A.S. (Ed.) **Melhoramento genético do cacaueiro**. Viçosa, MG: FUNAPE, UFG, 2001. p. 361-384.

PERRY, M.D.; POWER, J.B.; LOWE, K.C.; DAVEY, M.R. Biolistic transformation of cacao (*Theobroma cacao* L.). **Tropical Agriculture**, v. 77, p. 64-66, 2000.

PHILLIPS, G.C. *In vitro* morphogenesis in plants – recent advances. **In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant**, v. 40, p. 342–345, 2004.

PINTO, L.R.M.; PIRES, J.L. Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC. **Boletim Técnico no. 181**, 1998.

PURDY, L.H.; DICKSTEIN, E.R. *Theobroma cacao*, a host for *Agrobacterium* tumefaciens. **Plant Disease**, v. 73, p. 638-639, 1989.

RHODES, C.A.; PIERCE, D.A.; METTLER, I. J. et al*.* Genetically transformed maize plants from protoplasts. **Science**, v. 240, p. 204-207, 1989.

SAIN, S.L.; ODURO, K.K.; FURTEK, D.B. Genetic transformation of cocoa leaf cells using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Tissue and Organ Cult**, v. 37, p. 342–351, 1994.

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

SANTOS, M.O. **Embriogênese somática repetitiva, clonagem e expressão do gene *serk* de *Theobroma cacao* e análise da expressão de *serk* em plantas transgênicas de alface**. Brasília: UnB, Tese de Doutorado, 2003.

SANTOS, M.O.; BARROS, E.V.S.A; TINOCO, M.L.P.; BRASILEIRO, A.C.M.; ARAGÃO, F.J.L. Repetitive somatic embryogenesis in cacao and optimisation of gene expression by particle bombardment. **Plant Biotechnology**, v. 4, p. 71-76, 2002.

SANTOS, M.O.; ROMANO, E.; YOTOKO, K.S.C.; TINOCO, M.L.P.; DIAS, B.B.A.; ARAGÃO, F.J.L. Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Science**, v. 168, p. 723-729, 2005.

SETENTA, W.C.; LOBÃO, D.E.; SANTOS, E.S.; VALLE, R.R. **Avaliação do sistema cacau-cabruca e de um fragmento de Mata Atlântica. 40 Anos do curso de economia: memória**. Ilhéus: Editus, UESC, p. 605-628, 2005.

SHENG, J.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1699-1710, 1996.

SHIBATA, D.; LIU, Y.-G. Technical focus-*Agrobacterium*-mediated plant transformation with large DNA fragments. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 354-357, 2000.

SHOU, H.; FRAME, B.R.; WHITHAM, S.A.; WANG, K. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium* mediated transformation. **Molecular Breeding**, v. 13, p. 201–208, 2004.

SIEMENS, J.; SCHIEDER, O. Transgenic plants: genetic transformation-recent developments and the state of art. **Plant Tissue Culture and Biotechnology,** v.2, p.66-75, 1996.

SONDAHL, M.R.; LIU, S.; BELLATO, C.M.; BRAGIN, A. Cacao somatic embryogenesis. **Acta Horticulturae**, v. 336, p. 245-248, 1993.

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

SUGIYAMA, M. Organogenesis i*n vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p.61–64, 1999.

SUGIYAMA, M. Genetic analysis of plant morphogenesis *in vitro*. **International Review of Cytology**, v. 196, p. 67–84, 2000.

TAN, C.L.; FURTEK, D.B. Development of an *in vitro* regeneration system for Theobroma cacao from mature tissues. **Plant Science**, v. 164, p. 407–412, 2003.

TEIXEIRA, J.B., MARBACH, P.A.S; SANTOS, M.O. Otimização da metodologia da embriogênese somática visando a propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.). Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Documentos no. 79**, 2002.

THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 408, p. 796-815, 2000.

THE RICE GENOME INITIATIVE. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v. 436, p. 793–799, 2005.

THORPE, T.A. Somatic embryogenesis: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. **Plant Cell Tissue and Organ Culture,** v. 27, p. 245-258, 2000.

TINLAND, B. The integration of T-DNA into plant genomes. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 178-184, 1996.

TRAORE A.; GUILTINAN, M.J. Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. **Hortscience,** v. 41, p. 753- 758, 2006.

TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.N.; GUILTINAN, M.J. Micropropagation of *Theobroma cacao* L. using somatic embryo-derived plants **In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant**, v. 39, p. 332–337, 2003.

TRICK, H.N.; FINER, J.J. SAAT: Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. **Transgenic Research**, v.6, p.329-337, 1997.

TURGEON, R. Teratomas and secondary tumors. In: KAHL, G.; SCHELL, J. S. (Ed) **Molecular biology of plant tumors**. New York: Academic Press, 1982. p. 391-414.

VAN SLUY, M. A. *Agrobacterium*: um vetor natural para transformação em plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa; SPI; CNPH, 1999. p. 737-759.

VAN WORDRAGEN, M.F.; DONS, H.J.M. *Agrobacterium* tumefaciens mediated transformation of recalcitrant crops. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 10, p. 12-36, 1992.

VENTURIERI, G.A.; VENTURIERI, G.C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazonica,** v. 34, p. 507–511, 2004.

VERICA, J.A.; MAXIMOVA, S.N.; STREM, M.D.; CARLSON, J.E.; BAILEY, B.A.; GUILTINAN, M.J. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 404–413, 2004.

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

WALDEN, R., WINGENDER, R. Gene-transfer and plant regeneration techniques. **Tibtech**, v. 13, p. 324-331, 1995.

WEISING, K.; KAHL, G. Natural genetic engineering of plant cells: the molecular biology of crown gall and hairy root disease. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 12, p. 327-351, 1996.

WU, H.; SPARKS, C.; AMOAH, B.; JONES, H.D. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 659–668, 2003.

ZAMBRYSKI, P.C. Chronicles from the Agrobacterium-plant cell DNA transfer story. **Annual Review of Plant Physiology and Plant molecular Biology**, v. 43, p. 46-490, 1992.

ZANETTINI, M.H.B. ; PASQUALI, G. Plantas transgênicas. In: MIR L. (Ed.) **Genômica**. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p. 721-736.

ZUO, J.; NIU, Q.-W.; IKEDA, Y.; CHUA, N.-H. Marker-free transformation: increasing transformation frequency by the use of regeneration-promoting genes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 173–180, 2002.

ZUPAN, J.; ZAMBRYSKI, P.C. The *Agrobacterium* DNA transfer complex. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, p. 279-295, 1997.