

CULTURA DE TECIDOS E TRANSFORMAÇÃO
GÊNÉTICA DA PALMA FORRAGEIRA
Opuntia ficus - indica (L.) Mill.

RÓMULO MARINO LLAMOCA ZÁRATE

N.Cham. T 574.192 Z39c

Autor: Zárate, Rómulo Marino Llamoc

Título: Cultura de tecidos e transforma



1275534

Ac. 44686

BCT

FORTALEZA -- CEARÁ

1999

**CULTURA DE TECIDOS E TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA DA PALMA FORRAGEIRA**

Opuntia ficus-indica (L.) Mill.

Disponível

RÓMULO MARINO LLAMOCA ZÁRATE

Tese apresentada à Coordenação do
Curso de Pós-graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Ceará, para a
obtenção do título de Doutor em
Bioquímica, área de concentração:
Bioquímica vegetal.

FORTALEZA – CEARÁ

1999

ii

UFC/BU/BCT

04/04/2000



R1275534
C619701
T574.192

Cultura de tecidos e
transformação genética

Z39c

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- Z39c Zárte, Rómulo Marino Llamoca.
Cultura de tecidos e transformação genética da palma forrageira *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill / Rómulo Marino Llamoca Zárte. – 1999.
118 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 1999.
Orientação: Prof. Dr. Francisco A. P. Campos.
1. Bioquímica. I. Título.

CDD 572

**CULTURA DE TECIDOS E TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA DA PALMA FORRAGEIRA**
Opuntia ficus-indica (L.) Mill.

Disponível



RÓMULO MARINO LLAMOCA ZÁRATE
Bacharel em Ciências - Zootecnia

ORIENTADOR : Prof. Francisco A. P. Campos

FORTALEZA – CEARÁ

1999

Esta tese foi apresentada, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta Tese será permitido desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Rómulo Marino Llamoca Zárte

TESE APROVADA EM: 10 de dezembro de 1999

Dr. Francisco A. P. Campos
Dept^o de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientador

Dra. Birgit Arnholdt-Schmitt
Dept^o de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

Dr. José Xavier-Filho
Centro de Biociências e Biotecnologia
Universidade Estadual Norte Fluminense
Conselheiro

Dr. José Tarquínio Prisco
Dept^o de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

Dr. Jörg Landsmann
Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie
und Biologische Sicherheit
Biologische Bundesanstalt für Land-und
Forstwirtschaft, Braunschweig
Conselheiro

À Eliete e Raquel

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar meus agradecimentos à todas as pessoas e instituições que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, e em especial:

Ao Professor Francisco de Assis de Paiva Campos pela orientação, confiança e apoio na realização deste trabalho,

Ao Doutor Jörg Landsmann pela cooperação, sugestões e apoio na execução da fase experimental deste trabalho.

Aos professores José Xavier Filho e Maria da Guia Silva Lima pelos ensinamentos e incentivos na realização deste trabalho.

A colega Larissa Menezes, pela imprescindível ajuda no início da parte prática deste trabalho e especialmente por compartilhar às técnicas de cultura de tecidos da palma forrageira

Ao Petrônio Souza, João Luis Pinheiro Bastos, Luis Aguiar Ponte, Cláudia Rodriguez, Gundi Püster, Brigit Effinghausen-Büssing, Gerhild. Jüthner, Sofia Valenzuela, pela ajuda, atenção e amizade recebidas no período de experimentação deste trabalho.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), através do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela utilização de suas diferentes instalações que contribuíram na realização deste trabalho.

Ao Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und Biologische Sicherheit der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft Braunschweig (BBA), pela colaboração na realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por intermédio do programa de demanda social, pela concessão de bolsa de estudos.

Como Ao convênio de cooperação CAPES/Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD), por intermédio do programa Doutorado Cooperativo, pela concessão de bolsa de estudos.

LISTA DE ABREVIATURAS

À Família Buch (Braunschweig, Alemanha), pela grande amizade e agradável convivência durante a realização da parte experimental deste trabalho.

RESUMO

À Família Lima de Paula (Fortaleza, CE), pela grande amizade e agradável convivência durante a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Conteúdo	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	xi
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xiii
<u>ABREVIATURAS</u>	xvi
<u>RESUMO</u>	xviii
<u>ABSTRACT</u>	xix
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	01
1.1 - <u>Biologia, Utilização e Importância da Palma Forrageira</u>	02
1.2 - <u>Cultura de tecidos da palma forrageira</u>	05
1.3 - <u>Transformação Genética</u>	06
2 - <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	13
2.1 - <u>Material Vegetal</u>	13
2.2 - <u>Microorganismos, Plasmídeos e Iniciadores para PCR</u>	13
2.3 - <u>Reagentes e Enzimas</u>	13
2.4 - <u>Meios de Cultura para Bactérias</u>	18
2.5 - <u>Soluções Estoque de Antibióticos</u>	18
2.6 - <u>Cultura e Conservação de Bactérias</u>	19
2.7 - <u>Preparação e Transformação de Células Competentes de <i>Escherichia coli</i></u>	19
2.8 - <u>Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i></u>	19
2.9 - <u>Isolamento de Plasmídeos</u>	19
2.10 - <u>Cultura de Tecidos da Palma Forrageira</u>	20
2.10.1 - <u>Micropropagação pela Proliferação de Gemas Axilares</u>	20
2.10.2 - <u>Regeneração da Palma Forrageira pelo Cultivo de Meristemas Apicais Caulinares</u>	22
2.10.3 - <u>Indução e Estabelecimento de Calos Friáveis</u>	23
2.10.4 - <u>Estabelecimento de Suspensões Celulares</u>	24
2.10.5 - <u>Isolamento e Cultura de Protoplastos</u>	24

2.10.6 - Embriogênese Somática.....	26
2.11 - <u>Transformação Genética</u>	26
2.11.1 - Transformação por Bombardeamento com Micropartículas.....	26
2.11.1.1 - Isolamento de Plasmídeos.....	27
2.11.1.2 - Preparação das Partículas de Tungstênio.....	28
2.11.1.3 - Recobrimento das Partículas de Tungstênio com DNA.....	28
2.11.1.4 - Disparos com o PDS 1000-He.....	29
2.11.1.5 - Seleção e Cultivo de Células Transformadas.....	29
2.12 - <u>Extração do DNA de Calos da Palma Forrageira</u>	30
2.13 - <u>Extração de Proteínas de Calos da Palma Forrageira</u>	31
2.14 - <u>Dosagem de Proteínas</u>	31
2.15 - <u>Estimação Espectrofotométrica da Atividade da β-glucuronidase (GUS)</u>	31
2.16 - <u>Ensaio Histoquímico da Atividade da β-glucuronidase (GUS)</u>	32
2.17 - <u>Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)</u>	32
2.18 - <u>Teste de Sensibilidade à Canamicina</u>	33
2.19 - <u>Determinação da Viabilidade das Células em Suspensão e de Protoplastos..</u>	33
2.20 - <u>Determinação da Regeneração da Parede Celular nas Cultura de Protoplastos..</u>	35
3 - <u>RESULTADOS</u>	36
3.1 - <u>Cultura de Tecidos da Palma Forrageira</u>	36
3.1.1 - Micropropagação por Proliferação de Gemas Axilares.....	36
3.1.1.1 - Indução do Desenvolvimento das Gemas Axilares.....	36
3.1.1.2 - Regeneração da Palma Forrageira por Cultura de Meristemas Apicais Caulinares.....	43
3.1.2 - Indução e Estabelecimento de Calos Friáveis.....	46
3.1.3 - Estabelecimento de Suspensão Celular.....	50
3.1.4 - Isolamento e Cultura de Protoplastos.....	55
3.1.5 - Embriogênese Somática.....	58
3.2 - <u>Transformação Genética</u>	64
3.2.1 - Susceptibilidade de Células da Palma Forrageira à Canamicina.....	64
3.2.2 - Expressão Gênica em Meristemas Caulinares e Segmentos de Cladódios.....	64
3.2.3 - Transformação Integrativa de Células de Calos da Palma Forrageira.....	66

4 - <u>DISCUSSÃO</u>	73
4.1 - <u>Cultura de Tecidos da Palma Forrageira</u>	73
4.2 - <u>Transformação Genética da Palma Forrageira</u>	79
5 - <u>CONCLUSÕES</u>	83
6 - <u>APÊNDICE</u>	84
7 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	86

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 – Acelerador de partículas PDS – 1000/He.....	11
FIGURA 2 - Mapa de restrição do plasmídio pNG.....	14
FIGURA 3 - Mapa de restrição do plasmídio pFF19G.....	15
FIGURA 4 - Mapa de restrição do plasmídio pPARGUSH.....	16
FIGURA 5 – Estágios de desenvolvimento na micropropagação da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.....	41
FIGURA 6 – Regeneração de plantas da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante, a partir do cultivo de meristemas apicais caulinares isolados.	44
FIGURA 7 – Calos friáveis obtidos a partir de explantes cotiledonarios da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.	52
FIGURA 8 – Avaliação do crescimento de calos friáveis obtidos a partir de explantes cotiledonários da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.	53
FIGURA 9 – Suspensão celular da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.	54
FIGURA 10 - Avaliação do crescimento de suspensão celular da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.....	57

FIGURA 11 – Protoplastos isolados da suspensão celular da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.....	60
FIGURA 12 – Regeneração da parede celular em protoplastos da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.....	61
FIGURA 13 – Formação de estruturas nodulares nos cotilédones da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.	63
FIGURA 14 – Expressão transiente do gene <i>uidA</i> (teste histoquímico GUS) no meristema apical caulinar e segmento de cladódio da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.....	67
FIGURA 15 – Análise histoquímica da expressão do gene <i>uidA</i> (teste histoquímico GUS) nos calos friáveis da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante, após o bombardeamento com o pPARGUSH.	69
FIGURA 16 – PCR do DNA de calos friáveis transformados da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante com o <i>primer gus</i> , <i>npIII</i> e <i>tet</i>	72

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 – Relação de reagentes e enzimas utilizados e suas procedências.....	17
TABELA 2 - Combinações de reguladores de crescimento nos meios de indução, crescimento, proliferação e enraizamento de plantas da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.....	21
TABELA 3 - Mistura de reação para PCR.....	34
TABELA 4 – Condições de amplificação para PCR.....	34
TABELA 5 - Efeito de BA, IAA e GA ₃ na indução do desenvolvimento de gemas axilares de cladódios jovens da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.....	37
TABELA 6 - Efeito de BA e IAA, no crescimento (cm) de brotos da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.	39
TABELA 7 - Efeito de BA, IAA e GA ₃ , no crescimento das gemas axilares de explantes secundários da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante. ...	40
TABELA 8 - Efeito de IAA no enraizamento de brotos da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.....	42
TABELA 9 – Efeito de BA, IAA e GA ₃ , no desenvolvimento de meristemas apicais caulinares da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.....	45

TABELA 10 – Efeito de 2,4-D na indução de calos em explantes cotiledonários da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.....	47
TABELA 11 - Efeito de 2,4-D e cinetina na indução de calos, a partir de calos primários da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.	48
TABELA 12 - Efeito de 2,4-D, cinetina e picloram, na indução de calos a partir de calos secundários da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.....	49
TABELA 13 - Efeito de 2,4-D, cinetina, picloram na indução de calos friáveis a partir de calos terciários da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.....	51
TABELA 14 - Efeito da concentração do inóculo (VCE: volume do meio) no crescimento da suspensão celular da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.....	56
TABELA 15 - Efeito da molaridade do meio para isolamento de protoplastos da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.....	59
TABELA 16 – Efeito de cinetina e 2,4-D na indução de estruturas nodulares em cotilédones da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.	62
TABELA 17 – Efeito da concentração de canamicina (mg/L) na morte de calos friáveis da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante.	65
TABELA 18 – Frequência da expressão transiente do gene <i>uidA</i> em meristemas apicais caulinares da palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i>) cv. Gigante após o bombardeamento com partículas de tungstênio.....	68

TABELA 19 – Determinação espectrofotométrica da expressão do gene *uidA* em calos friáveis da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante, bombardeados com o plasmídeo pPARGUSH

70

ABA	Ácido abscísico	mg/L
ANA	Ácido nucleico	mg/L
Bar	Barbital	mg/L
BAP	6-Benzilaminopurina	mg/L
BSA	Albumina de soro bovino	mg/L
2,4-D	2,4-Dicloroacético	mg/L
DNA	Desoxirribonucleico	mg/L
Eco RI	Enzima de restrição	U
Eco RV	Enzima de restrição	U
EDTA	Etileno diamina tetraacetato	mg/L
GA ₃	Giberelina A ₃	mg/L
GUS	β-galactosidase	U
g/L	Gramas por litro	
Hind III	Enzima de restrição	U
IAA	Ácido indolacético	mg/L
IBA	Ácido indolbutírico	mg/L
Kapton	Plástico de poliamida	mg/L
Km	6,6-Dimetil-3-indolil-2-piridilmetil-4-metil-piridina	mg/L
kPa	Kilopascal	
MES	2-(N-morfolino) etano sulfônico	mg/L
min	Minuto	
ml	Mililitro	
mg/L	Miligramas por litro	
M ₀	Material de partida	
MOPN	Medio de cultivo	
MUC	Mucoílago	
PCR	Polimerase Chain Reaction	
pNP	4-Nitrofenol	

ABREVIATURAS

ABA	-	Ácido abscísico
ANA	-	Ácido naftalenoacético
Bam HI	-	Enzima de restrição de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
BAP	-	6-Benzilaminopurina
BSA	-	Albumina de soro bovino
2,4-D	-	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
Eco RI	-	Enzima de restrição de <i>Escherichia coli</i> RY 13
Eco RV	-	Enzima de restrição de <i>Escherichia coli</i> J62plg74
EDTA	-	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
GA ₃	-	Ácido giberélico
GUS	-	β-Glucuronidase
g/L	-	Grama por litro
Hind III	-	Enzima de restrição de <i>Haemophilus influenza</i> Rd
IAA	-	Ácido indolacético
IBA	-	Ácido 3-indolbutírico
Kapton	-	Membrana de plástico de alta resistência, espessura 50 um.
Km/h	-	Kilometro por hora
kPa	-	Kilopascal
MÊS	-	Ácido 2 (N-morfolino) etanossulfônico
mm	-	Milímetro
mM	-	Milimol
mg/L	-	Miligramas por litro
MS completo	-	Meio descritas por MURASHIGE & SKOOG (1962)
MOPS	-	Ácido 3- (N-morfolino) propano-sulfônico
MUG	-	4-Metilumbeliferil-β-D-glucuronídeo
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase
pNP	-	p-Nitrofenol

PP	-	Protoplastos
SDS	-	Dodecil sulfato de sódio
TE	-	Tris-EDTA
tet	-	Tetraciclina
tris	-	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	-	Unidade
μM	-	Micromolar
μm	-	Micrômetro
VCE	-	Volume de células empacotadas
X-gluc	-	5-Bromo 4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo

RESUMO

A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) é amplamente cultivada no Nordeste do Brasil, sendo utilizada como forragem para o gado. Um dos fatores que limitam sua ampla utilização, é o baixo nível de proteínas em seus cladódios. As pesquisas aqui relatadas, foram concebidas como parte de um projeto de longo prazo, qual seja o de melhorar a qualidade nutricional da palma forrageira para ruminantes, através da utilização de técnicas de transferência de genes. Estas pesquisas tiveram como objetivo, estabelecer protocolos para o cultivo *in vitro* desta espécie, bem como para sua transformação genética utilizando a técnica de microbombardeamento de partículas. Assim é que os seguintes protocolos foram estabelecidos: (1) Protocolo para propagação em massa através da proliferação de gemas axilares; (2) protocolo para regeneração de plantas a partir do cultivo de meristemas apicais caulinares isolados; (3) protocolo para a indução e estabelecimento de cultura de calos e suspensões celulares e (4) protocolo para o isolamento e cultura de protoplastos. Os estudos para a obtenção de embriões somáticos a partir de explantes cotiledonários, mostraram a formação de estruturas pré-embriônicas, que no entanto não se diferenciaram em embriões maduros. Foram ainda estabelecidos protocolos para a transformação genética pelo microbombardeamento de partículas de meristemas apicais caulinares isolados, cladódios jovens e calos friáveis. No caso dos calos friáveis, a transformação integrativa foi demonstrada tanto por critérios genéticos (amplificação por PCR dos genes *uidA*, *nptII* e *tet*), como por critérios fenotípicos (atividade glucuronidásica e resistência à canamicina nos calos transformados). A determinação da atividade glucuronidásica em linhagens selecionadas de calos transformados, demonstrou que a enzima β -glucuronidase representa 0,3% da proteína solúvel e estes valores são comparáveis àqueles obtidos em sistemas modelos tais como fumo e milho. Este fato demonstra que as células da palma forrageira são capazes de suportar a expressão em altos níveis de um transgene. Portanto, a obtenção de variedades transgênicas expressando altos níveis de uma proteína de boa qualidade nutricional é um objetivo factível, desde que protocolos para a regeneração estejam disponíveis. Os resultados dos experimentos de transformação genética aqui relatados, se constituem no primeiro exemplo da expressão de um transgene em um membro das *Cactaceae*.

ABSTRACT

The prickly-pear (*Opuntia ficus-indica*) "palma forrageira" is widely used in the Brazilian North-East as a forage crop. One of the main constraint in the wide utilisation of the "palma forrageira" as a forage crop, is the low level of proteins in its phylloclads. The long term goal of the research here described, is to improve the nutritional quality of the prickly-pear to farm animals, by gene transfer techniques. The main focus of this research was to establish protocols for the in vitro cultivation of this species, as well as to establish protocol for its transformation through particle bombardment. We have established the following protocols: (1) protocol for micropropagation through axillary bud proliferation; (2) protocol for whole plant regeneration from the shoot apical meristem; (3) protocol for induction and establishment of callus culture and cell suspension and (4) protocol for protoplasts isolation and cultivation. The studies towards the induction of somatic embryogenesis in cotyledonary explants achieved only partial success, as although pre-embryogenic structures were obtained, these were unable to give rise to mature embryos. Protocols for the transformation of isolated shoot apical meristems, young phylloclads and friable callus through particle bombardment were established. Integrative transformation of friable callus was demonstrated through genetic (amplification by PCR of the *uidA*, *nptII* and *tet* genes) and phenotypic (GUS activity and kanamycin resistance in the transformed calli) criteria. The analysis of GUS activity in selected lines of transformed calli, demonstrated that the enzyme β -glucuronidase represents 0.3% of the total soluble protein; this value is comparable to that obtained in model system such as maize and tobacco. The results described demonstrate that the cells of the prickly-pear are capable of withstanding the expression at high levels of a transgene and that the goal and that the production of transgenic varieties of the prickly-pear that express high levels of a gene for a protein of good nutritional quality is within reach, provided that protocols for plant regeneration are available. This is the first report on the expression of a transgene in the Cactaceae.

1 - INTRODUÇÃO

A palma forrageira é de importância nas zonas áridas e semi-áridas do mundo, sendo encontrada na África (África do Sul, Tunísia, Marrocos, Argélia, Egito), Américas (México, Chile, Peru, Bolívia, Nordeste do Brasil, Nordeste da Argentina, Colômbia, EEUU), Europa (Itália, Espanha, Portugal, Turquia, e Grécia) e também na Austrália. Nestes diferentes locais seus produtos servem para vários propósitos, tais como forragem para alimentação animal (FELKER, 1995), biomassa para produção de energia (GARCIA DE CORTAZAR & VARNERO, 1995), frutos e cladódios para consumo humano (CANTWELL, 1995), como hospedeiro para o cultivo da cochonilha usada na produção do carmin (FLORES-FLORES & TEKELBURG, 1995) e muitos outros produtos (SÁENZ-HERNÁNDEZ, 1995).

O emprego da palma forrageira para a alimentação do gado é conhecido desde há muito tempo. Esta cactácea, originada do México (HOFFMANN, 1995) foi introduzida no Ceará na segunda metade do século XIX (DOMINGUES, 1963). No Nordeste brasileiro, a palma forrageira é uma cultura que ocupa hoje cerca de mais de 400.000 hectares (SANTOS *et al.*, 1997) e é um alimento succulento de grande importância, sendo largamente empregada como forragem na alimentação de bovinos, ovinos e caprinos (FARIAS *et al.*, 1984). Sua importância é mais acentuada nos períodos de estiagem prolongada, pois ela além de se constituir num alimento verde, supre ainda grande parte das necessidades de água dos animais. Ela é uma planta que desafia em grande parte as adversidades de um clima seco e cálido e prospera em meios arenosos, pedregosos, áridos e de escassa fertilidade (BRAGA, 1976; VIETMEYER, 1986). A palma forrageira possui notáveis qualidades de rusticidade e resistência que lhe permitem vegetar sob estas condições desfavoráveis e proporcionar ao gado um alimento que lhe satisfaz a fome e, ao mesmo tempo, mitiga-lhe a sede.

A Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) e a Universidade Federal Rural de Pernambuco têm sido pioneiras nos estudos sobre esta cultura, especialmente na seleção de variedades melhor adaptadas à região, na determinação de técnicas de manejo e no estudo do valor nutricional de dietas para gado, tendo a palma forrageira como base (SANTOS *et al.*, 1997). O Professor Obed Jeronimo Viana, da Universidade Federal do Ceará, deu importantes contribuições não só para a disseminação da cultura no Estado, como também para o desenvolvimento de técnicas de manejo e propagação das variedades cultivadas.

1.1 - Biologia, Utilização e Importância da Palma Forrageira

A palma forrageira, *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., pertence à sub-família *Opuntioideae*, família *Cactaceae*. É uma planta suculenta arborescente de até 5 m de altura, com juntas achatadas elípticas chamadas de cladódios, os quais possuem aréolas dispostas em séries espiraladas (SCHEINVAR, 1995).

Alguns aspectos ecofisiológicos, anatômicos, taxonômicos e bioquímicos relacionados com a adaptação da palma forrageira às condições áridas e semi-áridas têm sido estudados. Na epiderme, o número de estômatos por mm^2 é entre 10-30 nas *Opuntia* spp. quando comparado com 100-300 em folhas de plantas C_3 e C_4 (NOBEL, 1995). Nessas espécies (plantas CAM) a epiderme é coberta por uma camada protetora de cutícula que tem geralmente 10-50 μm de espessura, quando tipicamente é de 0,2 – 2 μm de espessura em folhas de plantas C_3 e C_4 (NOBEL, 1995). As células do clorênquima contêm vacúolos capazes de ocupar 90% ou mais do volume das células; nestes vacúolos o balanço entre cátions e ânions é alcançado através da síntese de uma grande quantidade de ácidos orgânicos (ácido málico) e outros compostos (OLIVARAS & AGUIAR, 1996; MEYER & POPP, 1997; CHEFFINGS *et al.*, 1997).

A suculência da palma forrageira está relacionada com um alto nível de compartimentalização morfológica e à presença de mucilagem nos cladódios. Estes variam de 1 a 5 cm de espessura e possuem diferentes níveis anatômicos. O clorênquima apresenta 15 – 40 camadas de células que representam de 2 – 5 mm de espessura do cladódio. Estas células

são vacuoladas, possuem atividade fotossintética e armazenam água. Durante a seca, a água é preferencialmente perdida do parênquima permanecendo água estocada no clorênquima, possibilitando assim uma contínua atividade fotossintética. (GOLDSTEIN *et al.*, 1991; WANG *et al.*, 1997).

A mucilagem produzida pela células mucilaginosas é particularmente comum nas *Opuntia* spp., onde estudos químicos demonstraram que ela é um polissacarídeo complexo, contendo arabinose, galactose, xilose, ramnose e ácido galacturônico (McGARVIE & PAROLIS, 1981). As moléculas de água presentes nas células mucilaginosas se ligam aos resíduos de açúcar das moléculas de mucilagem (hidrofilicas), favorecendo o estado de hidratação do cladódio (TRACHTENBERG & FAHN, 1981).

A palma forrageira apresenta o metabolismo ácido crassuláceo (CAM), cuja principal característica é a separação temporal e controle diferencial das duas maiores enzimas de carboxilação, a carboxilase do fosfoenol piruvato (PEPC) e carboxilase-oxigenase da ribulose bifosfato (Rubisco). A seqüência temporal do metabolismo CAM pode ser dividida em 4 fases, tomando-se como base o comportamento estomatal (BORLAND & GRIFFITHS, 1997; CUSHMAN & BOHNERT, 1997). Na **fase I**, durante a noite, os estômatos permanecem abertos e a PEPC catalisa a fixação do CO₂ atmosférico em PEP, resultando na síntese de ácido málico e sua posterior acumulação no vacúolo; esta fase é acompanhada de uma diminuição no estoque de carboidratos. No final do período noturno, o incremento em ácido málico observado no vacúolo e no citosol inibe, paulatinamente, a atividade da PEPC e a fixação do CO₂ atmosférico, via PEPC, torna-se cada vez mais lenta. A **fase II**, que se inicia no alvorecer, pode ser considerada como de transição: gradual fechamento dos estômatos, diminuição da atividade da PEPC e início do aparecimento da atividade da Rubisco, resultando em produtos da fotossíntese típicos de plantas C₃ e C₄. Durante o dia (**fase III**) os estômatos permanecem fechados, o ácido málico acumulado durante à noite sofre descarboxilação e o CO₂ produzido é refixado em ribulose-1,5-bifosfato em uma reação catalisada pela Rubisco, ou seja: via ciclo de Calvin. Os produtos desta fixação são os mesmos das plantas C₃ e durante esta fase observa-se aumento no estoque de carboidratos. No final do dia (início da noite), os teores internos de CO₂ declinam e os estômatos começam a se abrir,

gradualmente, iniciando-se um novo período de transição, que é a **fase IV**, caracterizada por: gradual abertura dos estômatos, declínio na atividade da Rubisco, incremento na atividade da PEPC e produtos da fotossíntese semelhantes àqueles típicos de plantas C₃ e C₄. O ciclo fecha-se quando os estômatos estão abertos e a fixação do CO₂ atmosférico deixa de se fazer via ciclo de Calvin e passa a ser feita via PEP/PEPC.

A multiplicação da palma forrageira pode ser sexual ou assexual; quando sexual (por sementes), apresenta problemas tais como baixa taxa de germinação das sementes, segregação genética, longa fase juvenil e crescimento lento das plântulas. A unidade de propagação assexual é o cladódio maduro, onde estão as aréolas que contêm tecidos meristemáticos capazes de produzir brotos, flores ou raízes (MONDRAGÓN-JACOBO & PIMIENTA-BARRIOS, 1995). A propagação clonal é usada tradicionalmente quando se deseja uma plantação em larga escala. O problema prático é a obtenção de grande quantidade de propágulos que garantam uma plantação uniforme. A propagação clonal da palma forrageira poderia ser facilitada pela disponibilidade de técnicas de cultura de tecidos, que garantissem o suprimento do número necessário de propágulos, geneticamente homogêneos.

Estudos realizados sobre a composição química da palma forrageira cv. Gigante mostram que os cladódios possuem em média 93 % de água, 0,7 % de matéria seca, 5,3 % de proteína bruta da matéria seca, 11 % de fibra bruta da matéria seca, 75 % da digestibilidade *in vitro* da matéria seca, 2,78 % de cálcio da matéria seca, 0,13 % de fósforo da matéria seca, 2,11 % de potássio da matéria seca e 29,5 % de carboidratos solúveis da matéria seca (SANTOS *et al.*, 1997).

Um dos fatores limitantes na utilização da palma forrageira é o baixo consumo de matéria seca pelo animal, devido à elevada quantidade de água que possui. O baixo teor de proteína é outro fator limitante do uso exclusivo da palma como forragem, daí porque a palma deve ser suplementada com outros alimentos que sejam ricos em proteínas, a fim de aumentar tanto o teor nutricional da dieta, como o consumo de matéria seca pelo animal (FARIAS *et al.*, 1984; SANTOS *et al.* 1997).

1.2 - Cultura de tecidos da palma forrageira

A morfogênese é consequência dos processos integrados de divisão e diferenciação celulares. Tais processos dependem de certos sinais, endógenos e exógenos e outros, que agindo direta ou indiretamente ao nível genético, desencadeiam processos específicos de expressão gênica, e como consequência, alterações bioquímicas e metabólicas diversas. As células vegetais têm a potencialidade de regenerar novas plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados. Esta potencialidade pode ser explorada através de diversas técnicas de cultura de tecidos, tais como cultura de protoplastos, cultura de meristemas, embriogênese somática, organogênese direta e indireta, etc. Estas técnicas estão sendo utilizadas rotineiramente para a regeneração de espécies de importância econômica, inclusive de plantas cultivadas no Nordeste brasileiro, tais como: feijão-de-corda (BRAR *et al.*, 1999), sorgo (ZHONG *et al.*, 1998), algodão (MORRE *et al.*, 1998) e mandioca (LI *et al.*, 1998).

O número de cactáceas para as quais existem métodos de cultivo *in vitro* é ainda muito limitado (CLAYTON *et al.*, 1990; FAY & GRATTON, 1992). Os únicos exemplos de regeneração, via organogênese, a partir de calos é o trabalho de OLIVEIRA *et al.* (1995) com *Cereus peruvianus*. Os únicos exemplos de regeneração de plantas via embriogênese somática são os trabalhos de INFANTE (1992) com *Medioccactus coccineus* e STUPPY & NAGL (1992) com *Ariocarpus retusus*.

Algumas espécies do gênero *Opuntia* foram micropropagadas através da proliferação de gemas axilares. *Opuntia amyclaea* foi propagada em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) contendo 5 % de sacarose, 0,8 % de agar e suplementada, quando para indução de brotos, com BA a 2,2 mg/L e com IBA a 10 mg/L, quando para indução de raízes (ESCOBAR *et al.*, 1986); *Opuntia basilaris* foi propagada em meio MS contendo 5 % de sacarose, 0,8 % de agar, suplementado com BAP a 5,0 mg/L, quando para indução de brotos e com ANA a 10 mg/L, quando para enraizamento (MAUSETH, 1979).

O controle hormonal da organogênese em cactáceas tem sido muito pouco estudado. Neste sentido, os únicos trabalhos disponíveis na literatura, são aqueles publicados por MAUSETH (1976, 1979) e MAUSETH & HALPERIN (1975), que estudaram os efeitos de

alguns reguladores de crescimento no desenvolvimento de meristemas apicais caulinares de *Opuntia polyacantha*, aplicando posteriormente as informações obtidas para obter a micropropagação desta espécie.

Em relação a palma forrageira, o único exemplo encontrado sobre a aplicação de técnicas de cultura de tecidos, foi o trabalho de MOHAMED-YASSEEN *et al.* (1995), que descreve um método para propagação em massa de um cultivar americano da palma forrageira, via proliferação de gemas axilares. Estes autores determinaram que a indução do crescimento e desenvolvimento das gemas axilares era melhor promovida pela adição ao meio de cultura de BA a 2,0 mg/L e ANA a 0,1 mg/L, respectivamente. O enraizamento foi melhor promovido pela adição ao meio de cultura de IBA a 2,0 mg/L.

1.3 - Transformação Genética

Até meados dos anos oitenta, o único método confiável para a obtenção de plantas transgênicas era aquele baseado na utilização de *Agrobacterium tumefaciens*. O fato de que nem todas as espécies de plantas eram infectadas por esta bactéria, motivou o desenvolvimento de pesquisas visando ampliar a faixa de hospedeiros desta bactéria. Além disso, passou-se a pesquisar métodos alternativos de transformação genética, que fossem aplicáveis indiscriminadamente a todas as espécies vegetais. Atualmente, a disponibilidade de uma ampla gama de métodos de transformação genética, tem propiciado um aumento extremamente rápido do número de espécies para as quais a integração estável de um gene estrangeiro tem sido demonstrada.

O sucesso no desenvolvimento de métodos de transformação genética de plantas, realçou a necessidade da realização de estudos que permitissem ao pesquisador um controle estrito sobre a magnitude do padrão de expressão espacial e temporal do transgene. Atualmente várias seqüências reguladoras (promotores) que conferem diferentes modelos de expressão, estão bem caracterizadas e estão disponíveis para serem utilizadas em estudos de expressão gênica em sistemas homólogos ou heterólogos.

Os genes chamados coletivamente de genes marcadores de seleção, ou simplesmente genes marcadores, que conferem às células transformadas a capacidade de sobreviverem na presença de substâncias químicas tóxicas, permitindo assim distinguir células transformadas das não transformadas, são de importância fundamental na biotecnologia de plantas (SCHROTT, 1995). Nos períodos iniciais da engenharia genética de plantas, as únicas categorias de genes marcadores disponíveis eram aqueles que conferiam resistência a antibióticos. Todavia, preocupações relacionadas com a possibilidade de que a presença de tais genes em plantas transgênicas pudesse favorecer a disseminação destes genes entre a flora intestinal normal dos organismos que se utilizam destes alimentos, levou à criação de uma nova geração de genes marcadores, alguns dos quais têm produtos gênicos que conferem resistência a herbicidas (DRÖGE *et al.*, 1992). Preocupações desta natureza levaram ainda ao desenvolvimento de tecnologias que permitem a inativação destes genes ou mesmo sua eliminação em plantas transgênicas (YODER & GOLSBROUG, 1994). Atualmente, uma grande variedade de genes marcadores está disponível, sendo os genes *nptII*, *hpt* e *bar* os mais utilizados. O gene *nptII* codifica para a fosfotransferase da neomicina, a qual detoxifica compostos aminoglicosídicos, como o antibiótico canamicina (KLEE *et al.*, 1987). O gene *hpt* codifica para a enzima fosfotransferase da higromicina, a qual detoxifica o antibiótico higromicina B (WILMINK & DONS, 1993). O gene *bar* codifica para a enzima acetiltransferase da fosfinotricina (PAT) que confere resistência a fosfinotricina (herbicida sistêmico); a fosfinotricina inibe a síntese da glutamina, provocando acúmulo de amônia, desta forma matando a célula (DRÖGE *et al.*, 1992).

Uma outra categoria de genes muito útil na biotecnologia de plantas é a dos chamados genes marcadores repórteres, ou simplesmente genes repórteres. Ao contrário dos genes marcadores de seleção, os genes repórteres não conferem resistência a agentes químicos que inibem o desenvolvimento da planta. Sua utilidade reside no fato de o próprio produto destes genes ou então produtos da ação enzimática de seu produto gênico, permitirem avaliar fatores bióticos e abióticos que são relevantes para determinar o padrão espacial e temporal de expressão gênica que é conferida por um dado promotor. Atualmente, o gene *uidA* que codifica para a enzima β -glucuronidase (GUS), por sua simplicidade, flexibilidade e sensibilidade, é amplamente utilizado como gene repórter (JEFFERSON *et al.*, 1987). O

produto da ação da GUS sobre seus substratos (4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo ou simplesmente X-gluc, p-nitrofenil β -D-glucuronídeo e 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo ou simplesmente MUG) podem ser determinados histoquimicamente (X-gluc), fotometricamente (p-nitrofenil β -D-glucuronídeo) ou fluorimetricamente (MUG). A hidrólise de X-gluc pela GUS resulta num produto intermediário incolor e este intermediário sofre depois uma dimerização oxidativa, resultando na formação de cristais azuis que são visíveis sob o microscópio óptico (GUIVARCH *et al.*, 1996). A hidrólise do p-nitrofenil β -D-glucuronídeo pela GUS resulta na formação de p-nitrofenol (pNP), um produto amarelado que pode ser quantificado fotometricamente (JEFFERSON *et al.*, 1986). A hidrólise do MUG pela GUS resulta na formação de ácido glucurônico e 4-metilumbeliferona (4-MU) que apresenta fluorescência em pH alcalino (JEFFERSON *et al.*, 1987).

No passado, o gene que codifica para a enzima acetiltransferase do cloranfenicol (gene *CAT*) era amplamente utilizado como gene repórter. Contudo, a demonstração da presença de atividade *CAT* endógena em plantas, fez com que este gene perdesse a preferência dos cientistas, sendo substituído pelo gene *uidA*. Atualmente, uma nova geração de genes repórteres está sendo desenvolvida. Um dos exemplos é o gene que codifica para a GFP (do inglês *green fluorescent protein*), isolado do organismo marinho *Aequorea victoria* (BEETHAM *et al.*, 1999). A GFP é uma molécula repórter que pode ser utilizada para monitorar *in vivo* tanto a expressão gênica, quanto a localização da proteína. A GFP fluoresce quando exposta a luz ultravioleta ou a luz azul, diferentemente de outros repórteres bioluminescentes que requerem proteínas adicionais, substratos ou cofatores para emitir luz. A fluorescência da GFP é estável, independente de espécie, e pode ser monitorada não-invasivamente em células vivas (SULLIVAN & KAY, 1998).

Os métodos de transformação genética nos vegetais podem ser diretos ou indiretos. No método indireto, o sistema de transferência *Agrobacterium tumefaciens/planta* se dá pela capacidade desta bactéria de transferir ao cromossoma da célula vegetal a região do T-DNA contida no seu plasmídeo Ti (do inglês *tumor inducing*). O T-DNA é delimitado por seqüências repetidas de 25 pb (extremidade esquerda e direita), as quais são reconhecidas por enzimas de restrição, codificadas a partir de outros genes presentes no plasmídeo Ti, na região

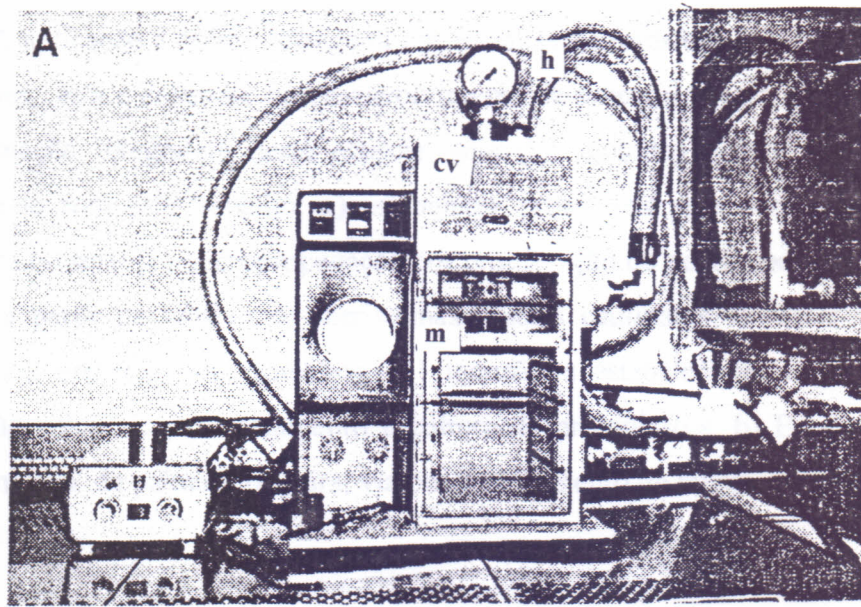
vir (virulência). A indução dos genes da região *vir* é causada pela presença de compostos fenólicos e monossacarídeos liberados pelas células da planta em resposta a um ferimento (KORTE, 1997). Nos experimentos de transformação, as cepas de *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas apresentam um T-DNA “desarmado”, onde os genes oncogênicos ou originais são deletados e substituídos por genes de interesse (DE BLOCK, 1993). Dessa forma, todo o material genético contido entre as bordas esquerda e direita será transferido para a célula vegetal e integrado no seu genoma. Um dos fatores que limitam a ampla aplicabilidade deste método é o fato de que algumas espécies de plantas serem recalcitrantes à transformação por *Agrobacterium tumefaciens* (DE CLEENE & DE LEY, 1976; PORTER, 1991; HANDEL *et al.*, 1997).

Os métodos diretos de transformação freqüentemente utilizados são a eletroporação, a microinjeção e o bombardeamento de partículas. A **eletroporação**, utiliza um campo elétrico de alta voltagem por curtos períodos de tempo, permitindo permeabilizar (reversivelmente) a membrana celular, induzindo a entrada do plasmídeo vetor nos protoplastos (WU & SHIMAMOTO, 1995). Em alguns casos a transformação por eletroporação é facilitada se os protoplastos foram submetidos a tratamento químico prévio com agentes químicos, tais como: polietileno glicol (PEG), polivinil álcool (PVA) ou DEAE – dextran. Estes compostos aumentam a permeabilidade da membrana plasmática do protoplasto, facilitando a transferência de DNA exógeno. O uso de **lipossomas** (DNA encapsulado em vesículas de lipídio) é uma alternativa para evitar a degradação do DNA por nucleases (CABOCHE, 1990). Estas vesículas são utilizadas na transformação direta de protoplastos após um tratamento com PEG ou outros polímeros. O inconveniente deste método é a baixa freqüência de transformação. A utilização dessas técnicas de transformação, pressupõe a disponibilidade de métodos eficientes para a obtenção de protoplastos viáveis e, idealmente, de métodos para a regeneração de plantas a partir destes protoplastos.

A **microinjeção** é um método físico que permite a introdução de DNA ou de qualquer tipo de molécula em células vegetais isoladas. Ela consiste na introdução do DNA através de micropipeta, diretamente no núcleo ou citoplasma de um protoplasto isolado (NEUHAUS & SPANGENBERG, 1990). Esta técnica é onerosa e requer equipamento especial.

O **bombardeamento de partículas** é um método de transformação direta que está alcançando grande popularidade, especialmente por se constituir numa alternativa ao problema associado com a recalcitrância de algumas espécies de plantas de serem infectadas por *A. tumefaciens* (KLEIN *et al.*, 1987). Este método consiste na utilização de microprojéteis (0,2 a 4 μm de diâmetro) cobertos com moléculas de DNA e que são acelerados a altas velocidades (superiores a 1.500 Km/h). Tem-se demonstrado que as partículas (de ouro ou tungstênio) atravessam a parede e a membrana celulares de maneira não letal, alojando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Posteriormente, o DNA é dissociado das partículas pela ação do líquido celular e integrado no genoma nuclear do organismo receptor. A aceleração das partículas requer membrana carreadora e pode ser gerada por explosão química (SANFORD *et al.*, 1987), por descarga de hélio a alta pressão (SANFORD *et al.*, 1991;) ou por aceleração elétrica (McCABE *et al.*, 1988). Em outros casos as micropartículas, sem membrana carreadora, são diretamente aceleradas em forma de aspersão (SAUTTER *et al.*, 1991; FINER *et al.*, 1992; MAHN 1996).

O sistema de propulsão do gás hélio a alta pressão **PDS 1000-He** (Figura 1) é um dos sistemas comerciais mais utilizados atualmente na transformação de plantas através do bombardeamento de partículas. Neste sistema, uma câmara de alta pressão de gás hélio é pressurizada e o regulador de gás é ajustado para a pressão desejada. Para liberar a onda de choque, uma válvula solenóide elétrica é ativada, fazendo com que uma agulha seja energizada e deslocada contra a(s) membrana(s) de ruptura (deve ser utilizada uma membrana para cada 300 psi de pressão de gás hélio, onde um psi = 6898 kPa). Uma vez liberada a onda de choque, a agulha que possui um disco de borracha em sua base é deslocada, ocorrendo a vedação da câmara de alta pressão, permitindo uma precisa liberação do gás requerido. A membrana carreadora é uma outra membrana de Kapton, que deve ser montada no suporte de membrana. A onda de choque expandida carrega a membrana carreadora contendo as micropartículas cobertas com DNA na direção da tela de retenção. A tela retém a membrana carreadora, permitindo que as micropartículas continuem na direção do material a ser bombardeado, o qual deve estar colocado em condições de vácuo parcial, para reduzir a força aerodinâmica exercida sobre as micropartículas durante seu deslocamento, minimizando a desaceleração (RECH & ARAGÃO, 1998).



B

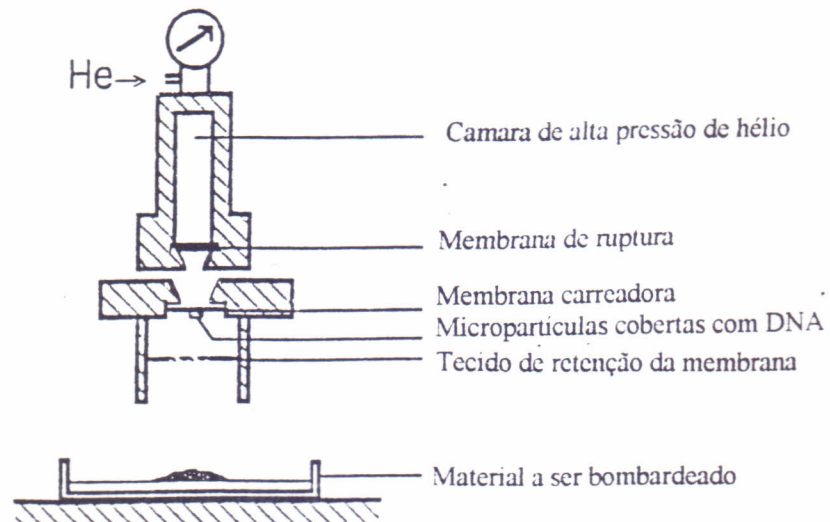


FIGURA 1 – A) Acelerador de partículas PDS – 1000/He: cv – câmara de vácuo; m – suporte do macrocarreador; h – entrada de hélio. B) Esquema do acelerador de partículas.

A aplicação à palma forrageira das técnicas de transformação genética e expressão de transgenes, está a depender do desenvolvimento de protocolos para o cultivo *in vitro* e para a transformação integrativa desta espécie, seja por métodos diretos ou indiretos. Portanto, pretende-se com este trabalho: **a)** estabelecer protocolos para o cultivo *in vitro* da palma forrageira ou seja: (1) micropropagação por proliferação de gemas axilares; (2) regeneração de plantas a partir do cultivo de meristemas apicais caulinares isolados; (3) regeneração de plantas via embriogênese somática; (4) indução e estabelecimento de cultura de calos e suspensão celular e (5) isolamento e cultura de protoplastos. **b)** Estabelecer protocolos de transformação da palma forrageira, via bombardeamento de micro-partículas.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material Vegetal

Todos os explantes da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. cv. Gigante) utilizados nestes estudos foram obtidos a partir de segmentos de cladódios coletados em uma plantação comercial no município de Madalena, Ceará ou a partir de plântulas obtidas pela germinação de sementes colhidas de frutos maduros, na mesma localidade.

2.2 - Microorganismos, Plasmídeos e Iniciadores para PCR

As cêpas de *Escherichia coli* utilizadas neste estudo foram JM109 (YANISCH-PERRON *et al.*, 1985) e RK2013 (FIGURSKE & HELINSKI 1979), enquanto que a de *Agrobacterium tumefaciens* foi a LBA4404 (HOEKEMA *et al.*, 1983).

Os plasmídeos usados neste estudo foram pNG, pFF19G (MAHN 1996) e pPARGUSH (LANDSMANN *et al.*, 1988) e os seus mapas de restrição constam das Figuras 2, 3 e 4.

Os iniciadores (*primers*) para a amplificação por PCR dos genes *gus*, *npIII* e *tet*, foram sintetizados pela empresa MWG-BIOTECH GmbH. (Ebersberg, Alemanha).

2.3 - Reagentes e Enzimas

O nome e a procedência dos reagentes e enzimas mais importantes utilizados neste trabalho constam da Tabela 1.

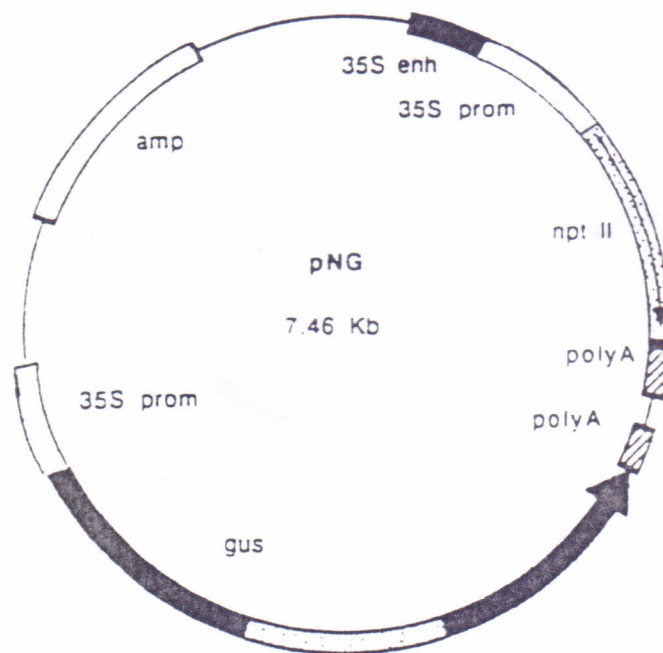


FIGURA 2 - Mapa de restrição do plasmídeo pNG, que contém os genes *uidA* (*gus*) com *intron* e *nptII*, ambos sob controle do promotor 35S do CaMV (35S Prom), amp = resistência à ampicilina.

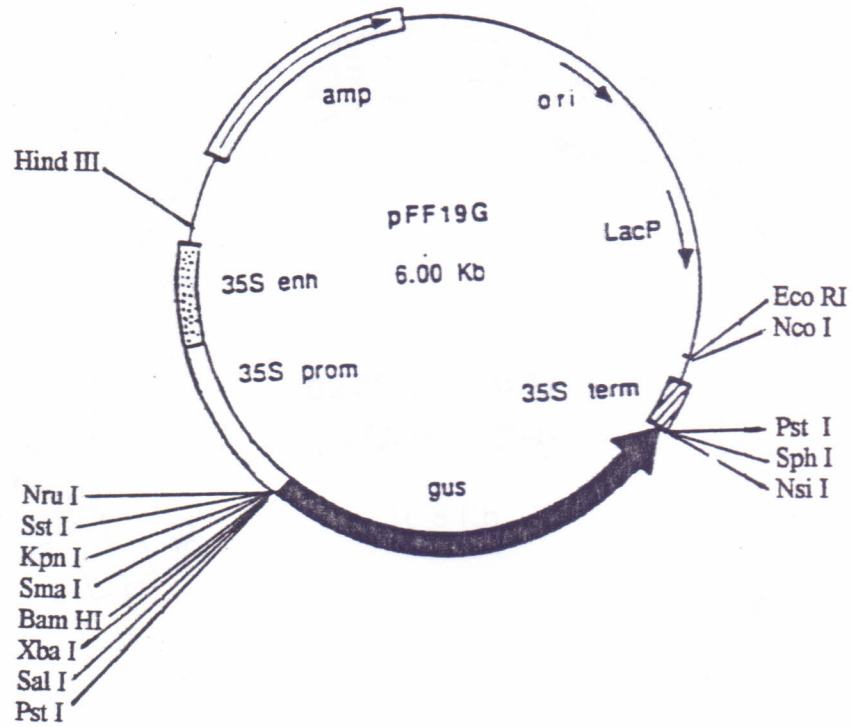


FIGURA 3 - Mapa de restrição do plasmídeo pFF19G, que contém o gene *uidA* (*gus*) sob o controle do promotor 35S do CaMV, amp = resistência à ampicilina.

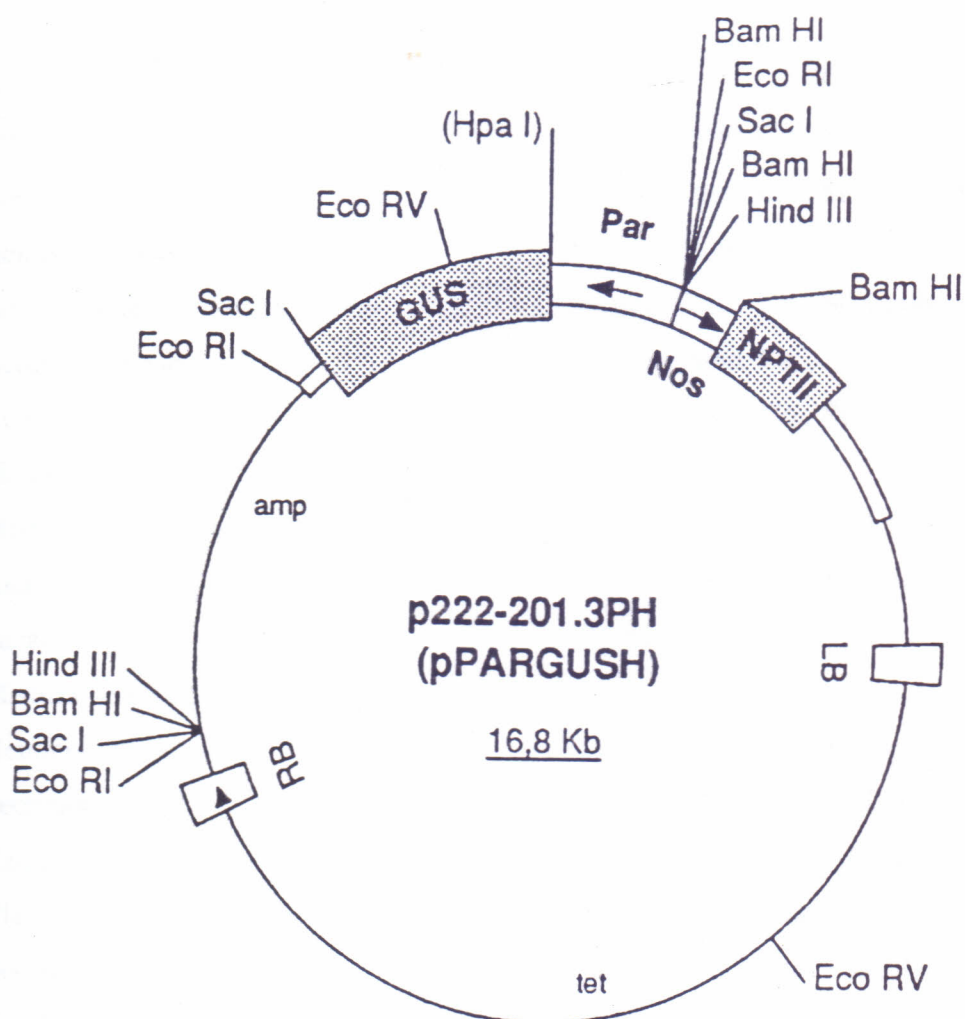


FIGURA 4 - Mapa de restrição do plasmídeo pPARGUSH, que contém o gene *uidA (gus)* sob o controle do promotor *Par* e o gene *nptII* sob o controle do promotor *Nos*. RB e LB são as extremidades direita e esquerda respectivamente do T-DNA, *amp* = resistência à ampicilina, *tet* = resistência à tetraciclina.

TABELA 1 – Relação de reagentes e enzimas utilizados e suas procedência

REAGENTES	PROCEDÊNCIA
Cinetina	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA
Benzil adenina	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA
Ácido indolacético	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA
Ácido abscísico	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA
Ácido giberélico	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA
Picloran	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA
Mistura basal de sais MS	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA
Ágar	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA
Sacarose	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA
Mistura de vitaminas MS	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA
Hemicelulase	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA
Pectinase	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA
Canamicina	Serva, Heidelberg, Alemanha
Claforam (Cefatoxina)	Hoechst, Frankfurt, Alemanha
Eco RI	Boehringer, Mannheim, Alemanha
Eco RV	Boehringer, Mannheim, Alemanha
Hind III	Boehringer, Mannheim, Alemanha
Bam HI	Boehringer, Mannheim, Alemanha
Tetraciclina	Boehringer, Mannheim, Alemanha
Rifampicina	Boehringer, Mannheim, Alemanha
Ampicilina	Boehringer, Mannheim, Alemanha
4-Nitrofenil- β -D-glucuronídeo	Boehringer, Mannheim, Alemanha
Reagente de Bradford	Bio Rad, Munique, Alemanha
5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-glucuronidase	Biomol. Hamburgo, Alemanha

2.4 - Meios de Cultura para Bactérias

Meio LB: NaCl a 10 g/L; bacto-triptona a 10 g/L; extrato de levedura a 5 g/L. O pH do meio foi ajustado para pH 7,0 com NaOH a 5N. O meio semi-sólido foi preparado pela adição de 1,5% de ágar.

Meio Extrato de Levedura/Manitol: extrato de levedura a 1,0 g/L; KH_2PO_4 a 0,5 g/L; CaCl_2 a 0,2 g/L; MgSO_4 a 0,2 g/L; NaCl a 0,2 g/L; FeCl_3 a 0,01 g/L; Manitol a 10 g/L; ágar a 15,0 g/L.

Na preparação de todos os meios foi utilizada água destilada e a esterilização foi feita em autoclave (CV-EL 10 - 12 litros, Kelomat, Áustria ou AV-75, PHOENIX, Araraquara, São Paulo) a 121 °C por 20 minutos. Os antibióticos necessários foram adicionados ao meio quando a temperatura deste, após resfriamento, atingia valores em torno de 45 °C.

2.5 - Soluções Estoque de Antibióticos

Tetraciclina: 10 g/L em etanol a 50 %.

Rifampicina: 50 g/L em metanol a 100 %.

Ampicilina: 10 g/L em água destilada.

Canamicina: 25 g/L em água destilada.

A esterilização das soluções diluídas era feita por filtração (filtro Millex-GS 0,22 μm , Milipore Inc., Bedford, MA, USA).

2.6 - Cultura e Conservação de Bactérias

As culturas bacterianas foram iniciadas em meio LB (líquido ou semi-sólido). Para *Agrobacterium tumefaciens* a incubação foi feita a 28 °C por 48 horas, no escuro e para *Escherichia coli*, a 37 °C por 12 a 14 horas, no escuro. Para conservação a curto prazo (1-30 dias), as culturas bacterianas em meio semi-sólido eram armazenadas a 4 °C.

2.7 - Preparação e Transformação de Células Competentes de *Escherichia coli*

A preparação de células competentes de *Escherichia coli* (JM 109) em CaCl₂, e a posterior transformação destas células foram feitas segundo o método descrito por SAMBROOK *et al.* (1989).

2.8 - Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação de células de *A. tumefaciens* foi feita através da técnica de conjugação triparental. O protocolo seguido foi o descrito por VAN DER HOEVEN (1992). A linhagem receptora de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada foi a LBA4404 e as linhagens de *Escherichia coli*, doadora e de transferência, foram a JM109 e a RK 2013, respectivamente.

2.9 - Isolamento de Plasmídeos

O isolamento de plasmídeos de *Escherichia coli* foi realizado de acordo com o protocolo descrito por SAMBROOK *et al.* (1989), enquanto que para os plasmídeos de *Agrobacterium tumefaciens* usou-se o protocolo descrito por VAN DER HOEVEN (1992). A integridade dos plasmídeos foi verificada por análise de restrição (SAMBROOK *et al.*, 1989).

2.10 - Cultura de Tecidos da Palma Forrageira

Os cladódios retirados das plantas maduras foram seccionados transversalmente em duas metades e postos à sombra por aproximadamente dez dias, após o que foram plantados em recipientes de plástico (20 litros) cheios de areia lavada, umedecida com a solução de sais do meio de cultura MS. Os cladódios jovens (5 a 8 cm) obtidos destes explantes foram utilizados para os experimentos de micropropagação. A utilização destes cladódios era precedida de tratamento por 10 minutos em hipoclorito de sódio a 1,5 % (v/v), e de 3 lavagens em água destilada estéril.

Sementes obtidas de frutos maduros foram embebidas em água por aproximadamente 21 dias, escarificadas manualmente (cortes no tegumento) e semeadas em recipientes de isopor (30 x 20 x 3 cm) cheios de areia lavada, umedecida com a solução de sais do meio de cultura MS. Após alcançarem cerca de 1,0 cm as plântulas obtidas a partir destas sementes foram lavadas em água corrente, transferidas para frascos de vidro de 250 ml contendo hipoclorito de sódio a 1,5% (v/v) e aí deixadas por 10 minutos e em seguida lavadas três vezes com água destilada estéril. Os ápices caulinares e cotilédones destas plântulas foram utilizadas como explantes em diversas etapas deste trabalho.

2.10.1 - Micropropagação pela Proliferação de Gemas Axilares

Os meios para **indução, crescimento, proliferação e enraizamento** consistiam do meio MS completo (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 5% de sacarose, regulador(es) de crescimento (Tabela 2) e solidificado com 0,8% de agar. Todos os meios foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. A incubação dos explantes foi feita em câmara de germinação (Rumed, Modelo 1200, Rubarth Aparelhos, Hannover, Alemanha ou do tipo B.O.D., modelo MA 403, Marconi, Piracicaba, São Paulo) mantida a 28 ± 2 °C, com 16 horas de fotoperíodo.

TABELA 2 – Diferentes concentrações de reguladores de crescimento nos meios de indução, crescimento, proliferação e enraizamento de plantas da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante.

Reguladores do Crescimento	Concentração no meio de cultura (mg/L)			
	Indução	Crescimento	Proliferação	Enraizamento
BAP	0,5	0,5	0,5	-
	1,0	1,0	1,0	-
	2,0	-	-	-
IAA	0,0	0,0	0,0	0,0
	0,10	0,1	0,25	5,0
	0,25	0,25	0,5	10,0
	0,5	0,5	-	15,0
	-	1,0	-	-
GA ₃	0,0	-	0,0	-
	0,05	-	0,05	-
	-	-	0,1	-

Após a excisão, sob condições assépticas, as aréolas de cladódios jovens foram transferidas para placas de Petri (15 x 90 mm), contendo 30 ml do **meio de indução de brotos** (Tabela 2). Após 3 ou 4 semanas, quando os brotos mediam aproximadamente 1cm, estes foram transferidos para frascos de vidro (65 x 90 mm) contendo 20 ml do **meio de crescimento** (Tabela 2), onde permaneceram de 3 a 4 semanas. Após este período, os brotos mediam de 3 a 4 cm. Estes brotos foram utilizados como explantes para proliferação das gemas axilares. Destes explantes, foram retirados o ápice caulinar e a base, os quais foram seccionados longitudinalmente em duas metades iguais, que por sua vez foram seccionadas transversalmente em três partes de igual tamanho. Estes explantes secundários foram transferidos para placas de Petri (15 x 90 mm) contendo 30 ml do **meio de proliferação** (Tabela 2). Após 3 ou 4 semanas, quando os brotos mediam cerca de 1,0 cm, foram transferidos para frascos de vidro (65 x 90 mm) contendo 20 ml do **meio de crescimento**. Estes brotos foram utilizados como explantes para mais um ciclo de propagação ou, alternativamente, transferidos para frascos de vidro (65 x 90 mm), contendo 20 ml do **meio de enraizamento** (Tabela 2), onde permaneceram por aproximadamente um mês. As plantas enraizadas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente para eliminar o excesso de meio e transferidas para copos de plástico (70 x 80 mm) contendo areia lavada umedecida com solução de sais do meio MS, cobertas com frascos de vidro (65 x 90 mm) e mantidas por 15 a 20 dias na câmara de crescimento (28 ± 2 °C, com 16 horas de fotoperíodo). Após este período, os frascos de vidro foram retirados e as plantas transferidas para casa de vegetação.

2.10.2 - Regeneração da Palma Forrageira pelo Cultivo de Meristemas Apicais Caulinares

Meristemas apicais (0,5 a 0,8 mm) desprovidos de primórdios foliares visíveis foram isolados a partir de ápices caulinares de plântulas com aproximadamente 21 dias após a semeadura. A retirada dos meristemas foi realizada sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar (HB 2448, Heraus Instr., Hannover, Alemanha ou HLFS 12, Veco Ind. e Com., Campinas, São Paulo), utilizando-se lupa com aumento de 16x (Stemi 2000-C, Zeiss DRC, Oberkochen, Alemanha). Após o isolamento, os meristemas foram imediatamente transferidos

para placas de Petri (15 x 90 mm) contendo 30 ml do **meio de indução** do desenvolvimento de meristemas. Este consistiu de meio MS completo, suplementado com sacarose 5% e diferentes concentrações e combinações de BA (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L), IAA (0,0; 0,25 e 0,5 mg/L) e GA₃ (0,0; 0,1 e 0,5, mg/L) e solidificado com ágar a 0,8 %. Os explantes foram incubados a 28 ± 2 °C e 16 horas de fotoperíodo. Após alcançarem aproximadamente 1,0 cm (2 a 3 semanas) os brotos foram transferidos para meio de crescimento e subsequentemente para meio de enraizamento, tal como descrito no item anterior (2.10.1). Alternativamente, os explantes retirados do meio de crescimento foram utilizados para um ou mais ciclos de multiplicação, conforme descrito no item anterior. A aclimação das plantas também foi feita da mesma maneira descrita anteriormente (2.10.1).

2.10.3 - Indução e Estabelecimento de Calos Friáveis

Cotilédones de plantas germinadas sob as condições descritas no item 2.10, foram seccionados e transferidos, separadamente, para placas de Petri (15 x 90 mm) contendo 30 ml do **meio de indução de calos friáveis** e incubados a 28 ± 2 °C e escuro. Este meio consistia do meio MS completo, suplementado com sacarose a 3% e diferentes concentrações de 2,4-D (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10 mg/L) e solidificado com ágar a 0,8 %. Após 4 semanas, os calos foram separados dos explantes e aqueles de aparência friável e esbranquiçados foram selecionados e transferidos para meio MS suplementado com sacarose a 3% e diferentes combinações e concentrações de 2,4-D (0,5; 2,5 e 4,0 mg/L) e cinetina (0,2 e 0,5 mg/L) e sub-cultivados a cada 15 dias. Em cada etapa de sub-cultivo eram selecionados os calos de aparência friável, os quais foram transferidos para meio MS completo, suplementado com sacarose a 3,0 % e diferentes combinações e concentrações de 2,4-D (0,5 mg/L), cinetina (0,2 mg/L) e picloram (0,05; 0,10; 0,25 e 0,5 mg/L). Os calos de aparência mais friável foram selecionados e transferidos para meio MS completo, suplementado com sacarose a 3,0 %, diferentes combinações e concentrações de 2,4-D (0,5 mg/L), cinetina (0,2 mg/L) e picloram (0,25 e 0,5 mg/L), bem como caseína hidrolisada a 400 mg/L. O procedimento de sub-cultivo foi repetido até que se obtivessem populações de calos homogêneas em termos de friabilidade.

O crescimento dos calos friáveis foi avaliado através de medidas do diâmetro e do incremento de peso fresco.

2.10.4 - Estabelecimento de Suspensões Celulares

Calos friáveis (35 a 40g) foram transferidos para Erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml do meio líquido de indução de calos friáveis (item 2.9.3) e transferidos para um agitador orbital (KS250 IKA Labortechnik, Hannover, Alemanha ou MA-375, Marconi, Piracicaba, São Paulo) a 150 rpm, assim permanecendo por 24 horas. Encerrado este período, a suspensão foi peneirada em tela de aço inoxidável (malha de 1,0 mm) e o material não retido foi deixado em repouso por aproximadamente 45 minutos, após o que o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo os agregados celulares foi ressuspenso em inóculos de 1:5, 1:10 e 1:25 (v/v) no meio líquido de indução de calos friáveis em Erlenmeyers de 250 ml. As suspensões foram colocadas em um agitador orbital a 150 rpm e incubadas no escuro a 28 ± 2 °C (agitador orbital KS250 IKA Labortechnik, Hannover, Alemanha ou MA-375, Marconi, Piracicaba, São Paulo). Após 3 semanas foram novamente filtradas (malhas de 60 mesh) e as células livres e pequenos agregados celulares foram deixados sedimentar em tubos Falcon de 50 ml por 30 minutos. O crescimento das suspensões celulares foi determinado através de medidas do peso fresco e do volume de células empacotadas (VCE). A viabilidade das células foi determinada através de coramento com azul de Evans (GAFF & OKONGÓ-OGOLA, 1971). Após seu estabelecimento, as suspensões celulares foram sub-cultivadas durante a fase logarítmica de crescimento.

2.10.5 - Isolamento e Cultura de Protoplastos

Para estabelecer o protocolo para isolamento e cultura de protoplastos, experimentos preliminares foram elaborados com a finalidade de avaliar os efeitos do tempo de incubação na solução enzimática e da osmolaridade desta solução na densidade e viabilidade dos protoplastos obtidos. Para tal, alíquotas de 5,0 ml da suspensão celular, na fase logarítmica de

crescimento, foram transferidas para Erlenmeyers de 50 ml, contendo 10 ml da solução enzimática (celulase a 1,0%, pectinase a 0,5%), preparada em solução de glicina a 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 e 0,9 M em cloreto de cálcio a 0,1 mM. As misturas de reação foram incubadas a 28 °C e a cada duas horas, alíquotas foram retiradas de cada um dos frascos e examinadas ao microscópio óptico (LABOVAL 4, Zeiss DRC, Oberkochen, Alemanha) para avaliar o grau de hidrólise das paredes celulares e a viabilidade dos protoplastos liberados.

Após encerrado o período de digestão (10 horas), adicionou-se à mistura de reação 5 ml de uma solução de glicina de concentração igual àquela da solução enzimática e esta mistura de reação foi filtrada em tecido de nylon (malha de 110 µm), coletando-se o filtrado em tubos Falcon de 12 ml. Os tubos foram centrifugados a 800 rpm por 8 minutos (Centrifuga Sigma 302 K, rotor 11105, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Os sobrenadantes foram descartados e o material no fundo do tubo foi lavado três vezes, a 600 rpm por 5 minutos, com 12 ml de uma solução de glicina de concentração igual àquela usada para preparar a solução enzimática. Após a última lavagem, o material no fundo do tubo foi ressuspenso em solução de sacarose (0,6; 0,7; 0,8 e 0,9 M). Após centrifugação a 600 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante (aproximadamente 1 ml) contendo os protoplastos, foi transferido com uma pipeta Pasteur para tubos Falcon de 12 ml e a este foi adicionado 1 ml da solução de manitol (preparada em cloreto de cálcio a 0,1 mM) de concentração igual a da solução enzimática. Os protoplastos permaneceram nestas soluções até a determinação de sua densidade, após o que foram transferidos para **meio de cultura de protoplastos** (meio MS completo, suplementado com glicose a 0,7 M, MES a 5 mM, cinetina a 0,2 mg/L, picloram a 0,25 mg/L, 2,4-D a 0,5 mg/L e caseína hidrolisada a 200 mg/L).

A quantificação dos protoplastos isolados foi feita através do uso de hemacitômetro com 0,2 mm de profundidade de campo e de um microscópio óptico invertido. Após estas determinações, alíquotas contendo 500 mil protoplastos por mililitro foram transferidas para placas de Petri (15 x 50 mm) contendo 2,5 ml do meio de cultura de protoplastos (meio MS completo, suplementado com glicose a 0,7 M, MES a 5 mM, cinetina a 0,2 mg/L, picloram a 0,25 mg/L, 2,4-D a 0,5 mg/L e caseína hidrolisada a 200 mg/L) e incubadas no escuro a 28±°C. Após 4 ou cinco dias, foram acrescentados 2,5 ml de meio fresco. Após a regeneração

da parede celular, o meio contendo os protoplastos foi transferido para placas de Petri (15 x 50 mm) contendo o mesmo meio acrescido de agar 0,8%, para a formação de microcalos. A determinação da viabilidade dos protoplastos foi feita através da utilização do corante azul de Evans (GAFF & OKONG'O-OGOLA, 1971) e a regeneração da parede celular foi visualizada pelo uso do corante Calcofluor white (GAHAN, 1984).

2.10.6 - Embriogênese Somática

Cotilédones de plântulas (1,0 cm de comprimento) germinadas sob as condições descritas no item 2.10, foram seccionados longitudinalmente em duas metades e estas transferidas para placas de Petri, com o lado do corte em contacto com o **meio de indução de embriões somáticos**. Este meio consiste do meio MS completo, suplementado com sacarose a 5,0 %, diferentes concentrações e combinações de cinetina (0,2 e 0,5 mg/L) e 2,4-D (0,5; 2,5 e 4,0 mg/L) e solidificado com ágar a 0,8%. Após três semanas de cultivo, os calos e estruturas pseudo-embriogênicas foram separados dos explantes e transferidos para três tipos de meio: meio de indução de embriões somáticos, meio de indução de embriões somáticos sem o suplemento de reguladores de crescimento e meio MS completo, suplementado com sacarose a 5,0 % e ABA a 0,13; 0,26 e 3,17 mg/L. Semanalmente a diferenciação dos explantes em embriões somáticos foi acompanhada.

2.11 - Transformação Genética

2.11.1 - Transformação por Bombardeamento com Micropartículas

Em todos os experimentos a serem descritos sob este tópico, o instrumento utilizado para transformação foi o sistema PDS 1000-He (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Alemanha). Os explantes bombardeados foram meristemas apicais caulinares, calos friáveis e segmentos de cladódios.

2.11.1.1 - Isolamento de Plasmídeos

O isolamento de plasmídeos foi feito de acordo com as instruções constantes do kit para isolamento de plasmídeos da QIAGEN (Hilden, Alemanha). Bactérias contendo o plasmídeo relevante (pNG, pFF19G ou pPARGUSH) e cultivadas em meio LB, foram coletadas por centrifugação a 4.200 rpm por 10 min e temperatura de 4°C (centrifuga Sigma 302-K, rotor 11105, Sigma Chem. Co.) e ressuspensas em 4 ml de tampão P1 (RNase a 100 mg/ml em Tris-HCl a 50mM, EDTA 10 mM, pH 8,0) e em seguida foram adicionados 4,0 ml da solução P2 (NaOH a 0,2 N e SDS a 1%). A mistura foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 4,0 ml do tampão P3 (acetato de potássio a 2,55 M, pH 4,8) e a mistura agitada vigorosamente e incubada em banho de gelo por 15 minutos. Decorrido este tempo a mistura foi centrifugada a 16.000 rpm por 30 minutos e temperatura de 4°C (centrifuga Sorvall, RC-5B, rotor SS34, Du Pont Inst., Alemanha). O sobrenadante foi aplicado na coluna Qiagen-Tip 100, previamente equilibrada com 4 ml de tampão QBT (NaCl a 750 mM, MOPS a 50 mM, etanol a 15%, triton a 0,15%, pH 7,0). Em seguida, a coluna foi lavada duas vezes com 10 ml de tampão QC (NaCl a 1M, MOPS a 50 mM, etanol a 15% e pH 7,0) e o DNA ligado a coluna foi eluído pela aplicação de 5 ml de tampão QF (NaCl a 1,25M, Tris-HCl a 50 mM, etanol a 15%, pH 8,5). O DNA foi precipitado pela adição de 3,5 ml de isopropanol a temperatura ambiente e imediatamente centrifugado a 13.000 rpm por 30 minutos a 4°C (centrifuga Sorvall, RC-5B, rotor SS34, Du Pont Inst., Alemanha). O DNA foi então lavado com 5 ml de etanol 70% e centrifugado (Centrifuga Sorvall, RC-5B, rotor SS34, Du Pont Inst., Alemanha) a 13.000 rpm por 30 minutos a 4°C, sendo então o sobrenadante descartado e o precipitado seco por 5 a 15 minutos, a temperatura ambiente quando então acrescentou-se 40 ml de tampão TE (Tris-HCl a 10 mM, EDTA a 1 mM e pH 8,0). A determinação da concentração de DNA nesta solução foi feita pela medida da absorbância da solução a 260 nm (espectrofotometro Beckmann, UV-DU 50, München, Alemanha). Os plasmídeos preparados desta maneira foram armazenados a -20 °C até sua utilização.

2.11.1.2 - Preparação das Partículas de Tungstênio

Na preparação das partículas de tungstênio, o protocolo utilizado foi o descrito por MAHN (1996) que, por sua vez, constitui-se numa modificação do protocolo proposto, originalmente, por SANFORD *et al.* (1991). As partículas de tungstênio (30 mg) com 1,3 μm de diâmetro (partículas M20, BIO-RAD, München, Alemanha), foram transferidas para tubos Eppendorf (1,5 ml) estéreis contendo 1 ml de etanol a 70%, agitadas vigorosamente por 20 segundos e deixadas em repouso por 10 minutos. Os tubos foram então centrifugados (Centrifuga Sigma 302 K, rotor 11105, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 4.000 rpm por 30 segundos e o sobrenadante desprezado. Em seguida, 500 μl de água desionizada estéril foram adicionados e o tubo agitado vigorosamente por 10 segundos. Esta mistura foi deixada em repouso por 10 minutos e centrifugada a 4.000 rpm por 30 segundos. O sobrenadante foi desprezado e as partículas ressuspensas em 500 μl de glicerina a 50% e guardadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem utilizadas.

2.11.1.3 - Recobrimento das Partículas de Tungstênio com DNA

As partículas de tungstênio recobertas com o DNA de interesse foram sempre preparadas em quantidade suficiente para a execução de um único disparo/experimento. As partículas preparadas (9 μl), de acordo com a metodologia descrita no item 2.11.1.2, foram transferidas para tubo Eppendorf (1,5 ml) estéril, adicionando-se em seguida 0,9 μg de DNA, seguido de agitação e repouso em banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 9 μl de CaCl_2 a 2,5M e 3,6 μl de espermidina a 0,1M. A mistura foi agitada e deixada em repouso em banho de gelo por 10 minutos, após o que 18,2 μl de etanol a 70% foram adicionados e a mistura centrifugada a 1.500 rpm por 5 segundos (centrifuga Sigma 302 K, rotor 11105, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 180 μl de etanol a 100% e centrifugado a 1500 rpm por 5 segundos e o sobrenadante foi mais uma vez descartado. O precipitado foi ressuspensão em 64 μl de etanol a 100% com a ajuda de um sonicador (Sonoplus HD 60, Bandelin Electronic, Berlin, Alemanha) por 2 segundos e logo em seguida 5 μl desta suspensão (422 μg de

partículas) foram distribuídos na região central da membrana carreadora, previamente posicionada no suporte da membrana. Os discos contendo as membranas recobertas com as partículas de tungstênio foram deixados para secar por 30 minutos em dessecador contendo sílica-gel.

2.11.1.4 - Disparos com o PDS 1000-He

Os alvos para os disparos foram meristemas apicais isolados, seções de cladódios jovens e calos friáveis. Os diferentes tipos de explantes eram colocados em placa de Petri (15 x 90 mm) sobre papel de filtro umedecido com o meio de cultura apropriado para cada explante. Todos estes meios tiveram suas concentrações de manitol ajustadas para 0.6 M. Após permanência de 4 horas nos meios respectivos, os explantes foram bombardeados com dois disparos a uma pressão de tiro (gás Hélio) de 1200 psi, a uma distância entre a tela de retenção e o material a ser bombardeado de 70 mm e a um vácuo de 27 polegadas de Hg. Após os disparos os explantes foram transferidos para seus respectivos meios, onde permaneceram por 24 horas, quando então estes tecidos foram avaliados.

2.11.1.5 - Seleção e Cultivo de Células Transformadas

Nos experimentos de transformação integrativa de células de calos da palma forrageira, após os disparos e a permanência dos calos por 24 horas em meio de indução de calos friáveis, estes foram transferidos para o mesmo meio suplementado com canamicina 100 mg/L. Após 21 a 27 dias neste meio, os calos formados foram avaliados quanto à atividade específica da β -glucuronidase. Os calos com atividade específica da β -glucuronidase maior que 10 nmol pNP.mg proteína⁻¹.minuto⁻¹ foram subcultivados em meio seletivo. Após 21 a 27 dias novamente a atividade específica da β -glucuronidase nos calos foi determinada e foram selecionados para sub-cultivo em meio seletivo aqueles calos onde a atividade específica da β -glucuronidase era maior que 30 nmol pNP.mg proteína⁻¹.minuto⁻¹. Após 21 a 27 dias a atividade específica da β -glucuronidase nos calos foi novamente determinada e foram

selecionados para sub-cultivo aqueles calos em que a atividade específica da β -glucuronidase era maior que $100 \text{ nmol pNP.mg prote\u00edna}^{-1}.\text{minuto}^{-1}$.

2.12 - Extra\u00e7\u00e3o do DNA de Calos da Palma Forrageira

O protocolo utilizado para extra\u00e7\u00e3o de DNA de calos fri\u00e1veis da palma forrageira foi baseado naquele descrito por DELLAPORTA *et al.* (1983). A um almofariz contendo 300 mg de calos fri\u00e1veis foram adicionados 300 μl da solu\u00e7\u00e3o 1 (Tris-HCl a 100 mM, EDTA a 50 mM, NaCl a 500 mM, β -mercaptoetanol a 10 mM, pH 8,0) e estes foram macerados com a ajuda de um pistilo, sendo em seguida a mistura transferida para um tubo Eppendorf (2,0 ml) e deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida adicionou-se 20 μl da solu\u00e7\u00e3o 2 (SDS a 20%), sendo a mistura imediatamente incubada a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. Decorrido este tempo adicionou-se 100 μl da solu\u00e7\u00e3o 3 (acetato de pot\u00e1ssio a 5M) e a mistura foi agitada vigorosamente e incubada em gelo por 20 minutos, seguindo-se centrifuga\u00e7\u00e3o a 14.000 rpm por 10 minutos (centrifuga 5415C, rotor F-45-18-11, Eppendorf, Alemanha). A fase superior foi transferida para novos tubos Eppendorf (2,0 ml) e a estes foram adicionados 800 μl de isopropanol ou etanol absoluto a 4 $^{\circ}\text{C}$ e esta mistura foi incubada a -20 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Em seguida a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 20 minutos. O precipitado foi ressuspens\u00e3o em 1,0 ml de etanol 70% frio (0 $^{\circ}\text{C}$) e centrifugado a 14.000 rpm por 3 minutos. O precipitado produzido foi ressuspens\u00e3o em 300 μl de tamp\u00e3o TE e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo Eppendorf (2,0 ml) e a este foram adicionados 33 μl de acetato de s\u00f3dio a 3M e 900 μl de etanol a 99%, frio (0 $^{\circ}\text{C}$) e esta mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos. O precipitado foi secado a temperatura ambiente por 1 hora e posteriormente dissolvido em 100 μl de tamp\u00e3o TE. A concentra\u00e7\u00e3o de DNA nesta solu\u00e7\u00e3o foi estimada pela medida da absorv\u00eancia a 260 nm. Este material foi armazenado a -20 $^{\circ}\text{C}$ at\u00e9 sua utiliza\u00e7\u00e3o.

2.13 - Extração de Proteínas de Calos da Palma Forrageira

Aproximadamente 500 mg de calos friáveis foram transferidos para tubos Eppendorf (1,5 ml) contendo 100 µl do tampão de extração (KH₂PO₄ a 50 mM, EDTA a 1 mM, Triton X-100 a 0,1%, β-mercaptoetanol a 10 mM, pH 7,0) e alguns grãos de areia de quartzo. Os calos foram em seguida macerados com o auxílio de um pistilo por aproximadamente 1 minuto e a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm, a 4 °C por 5 minutos (centrifuga 5415C, rotor F-45-18-11, Eppendorf, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo Eppendorf (1,5 ml) e utilizado para determinação de proteínas e, no caso dos calos transformados, para determinação da atividade da GUS.

2.14 - Dosagem de Proteínas

O método utilizado para avaliação da concentração de proteínas foi aquele desenvolvido por BRADFORD (1976). A um tubo Eppendorf (1,5 ml), contendo 2 µl do extrato obtido tal como descrito no item anterior, adicionou-se água desionizada até completar um volume total da mistura de 800µl. A esta mistura foram adicionados 200 µl da solução de coomassie brilliant blue G-250, seguindo-se agitação vigorosa, repouso de 5 a 60 minutos e medida de absorbância da solução a 595 nm. A concentração de proteínas nos extratos foi estimada em relação a uma curva padrão de albumina sérica bovina. Esta curva padrão foi elaborada com valores das absorvâncias (595 nm) de 0 µg, 1 µg, 5 µg, 10 µg, 15 µg e 20 µg de BSA.

2.15 - Estimação Espectrofotométrica da Atividade da β-glucuronidase (GUS)

O protocolo utilizado para a determinação espectrofotométrica da atividade β-glucuronidase (GUS) foi, essencialmente, o descrito por JEFFERSON *et al.* (1986). Extratos preparados tal como descrito no item 2.13, contendo 35 µg de proteína, foram colocados em triplicata em tubos Eppendorf (1,5 ml) e o volume completado para 1,0 ml com o tampão de

reação (p-nitrofenil- β -glucuronídeo a 1 mM em tampão de extração (item 2.13)), em seguida a mistura foi agitada manualmente e incubada a 37 °C por tempo que variava de 0 a 60 minutos. A reação era parada pela adição de 400 μ l do tampão de parada (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol a 1 M). Os valores de absorbância a 595 nm foram utilizados para estimar a atividade glucuronidásica.

2.16 - Ensaio Histoquímico da Atividade da β -glucuronidase (GUS)

O protocolo utilizado para o ensaio histoquímico da atividade da β -glucuronidase (GUS), foi essencialmente aquele descrito por JEFFERSON (1987). Este é um ensaio qualitativo, baseado na clivagem do substrato 5-bromo 4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo (X-gluc) pela β -glucuronidase. Na presença de oxigênio o produto da reação forma dímeros, resultando na formação de um precipitado insolúvel de cor azul. O ensaio é desenvolvido adicionando-se em um frasco apropriado uma quantidade de tampão de reação (X-gluc a 1 mM, Na₂HPO₄ a 115 mM, K₃[Fe(CN)₆] a 50 mM, K₄[Fe(CN)₆] a 50 mM, Triton X-100 a 0,1 N, Na₂EDTA a 0,5 mM, pH 7,0) suficiente para cobrir o tecido em análise. Esta mistura é incubada no escuro a 37 °C por 24 horas. Decorrido este tempo o tampão de reação é descartado e o tecido é tratado com etanol a 70% para extração de clorofila e observado sob microscópio estereoscópio.

2.17 - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

O protocolo utilizado para ensaio da PCR foi essencialmente aquele descrito por DIEFFENBACH & DVEKSLER (1995). Os iniciadores (*primers*), utilizados nas diversas reações de amplificação foram: (a) gene *uidA*: 5'-AAC GGC AAG AAA AAG CAG TC -3' e 5'-GAG CGT CGC AGA ACA TTA CA -3'; gene *nptII*: 5'-GGT GCC CTG AAT GAA CTG-3' e 5'-TAG CCA ACG CTA TGT CCT -3'; gene *tet*: 5'-CGT GTT GCT AGG ATG GTT GT -3' e 5'-CTT TGG GTC ATT TTC GGC GA-3'. As reações de amplificação foram realizadas

num termociclador (PCR Thermal-Cycler TC-480, Perkin Elmer Cetus), utilizando-se ciclos de temperatura de 94, 53 e 72 °C, de acordo com as seguintes etapas:

1. Preparação da mistura de reação. Cada mistura de reação tinha a composição descrita na Tabela 3.
2. A mistura de reação era preparada em tubos Eppendorf de 500 µl. Após a adição de todos os componentes, a mistura era centrifugada a 14.000 rpm (centrifuga 5415C, rotor F-45-18-11, Eppendorf, Alemanha) por 3 a 4 segundos e 45 µl foram transferido para um novo tubo Eppendorf de 500 µl, ao qual era adicionado 5 µl de solução contendo o DNA a ser amplificado. Esta mistura era em seguida submetida a 35 ciclos de amplificação sob as condições descritas na Tabela 4.
3. Após o encerramento dos ciclos de amplificação, à mistura de reação adicionou-se 10 µl de uma solução de azul de bromofenol a 0,3% em tampão fosfato a 10mM, glicerina a 50%, pH 7,0. Esta mistura foi submetida à eletroforese ou, alternativamente, armazenada a -20 °C até ser utilizada.

2.18 - Teste de Sensibilidade à Canamicina

A eficácia do antibiótico canamicina em desempenhar o papel de marcador de seleção foi avaliada. Esta avaliação foi feita transferindo-se calos friáveis na fase logarítmica de crescimento para placas de Petri contendo 30 ml do **meio de indução de calos friáveis** (item 2.10.3), suplementado com diferentes níveis de canamicina: 0, 25, 50 e 100 mg/L. Estes calos foram mantidos por quatro semanas neste meio e a cada 7 dias o desenvolvimento dos calos era avaliado através da medida de diâmetro.

2.19 - Determinação da Viabilidade das Células em Suspensão e de Protoplastos

O método utilizado para avaliar a viabilidade das células da palma forrageira nas suspensões celulares foi essencialmente aquele descrito por GAFF & OKONG'O-OGOLA (1971). Este teste se baseia na perda da permeabilidade seletiva da membrana plasmática de células mortas: a membrana plasmática de células vivas é impermeável ao



R 1275534

TABELA 3 - Mistura de reação para PCR.

Reagentes	Conc. Estoque	Vol. para uma amostra	Concentração final
10X tampão PCR	10X	5 μ l	1X
MgCl ₂	25 mM	6 μ l	3 mM
Nucleotídeos	1,25 mM	8 μ l	0,2 mM
Primer 1	10 μ M	1 μ l	0,2 mM
Primer 2	10 μ M	1 μ l	0,2 mM
H2O desionizada estéril	-	23,75 μ l	-
Taq polimerase	10 U/ μ l	0,25 μ l	5 U/100 μ l

TABELA 4 – Condições de amplificação para PCR

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min.)
Pré-ciclo	94	3
Ciclo*: Desnaturação	94	1
Anelamento	53	1 ½
Alongamento	72	1 ½
Ciclo final	72	5

*35 ciclos de amplificação

corante azul de Evans. Assim, quando examinadas ao microscópio apenas células mortas adquirem coloração azul após contacto com solução de azul de Evans.

Para o teste de viabilidade, uma alíquota de 50 μ l da suspensão celular ou de protoplastos é colocada em um tubo Ependorf (1,5 ml), sendo então adicionado uma alíquota de 50 μ l da solução de azul de Evans a 0,1%, deixando-se então a mistura em repouso por 5 minutos. Decorrido este tempo uma alíquota é retirada e transferida para um hematocítmetro (0,2 mm de profundidade) e observada num microscópio óptico.

2.20 - Determinação da Regeneração da Parede Celular nas Cultura de Protoplastos

A regeneração da parede celular pelos protoplastos em cultura foi verificada através do uso do corante fluorescente Calcofluor white (GAHAN, 1984). Este corante tem forte afinidade pela celulose presente na parede celular e é excitado pela luz ultravioleta. A determinação é feita incubando-se uma alíquota de 50 μ l da suspensão de protoplastos em uma lâmina de microscópio e adicionando-se em seguida uma alíquota de 50 μ l da solução de Calcofluor white a 0,1%. Após a colocação da lamínula sobre a amostra, a lâmina é observada em microscópio de fluorescência (Olympus BX 60, Câmara Olympus PM-20, Japon)

3 - RESULTADOS

3.1 - Cultura de Tecidos da Palma Forrageira

3.1.1 - Micropropagação por Proliferação de Gemas Axilares

3.1.1.1 - Indução do Desenvolvimento das Gemas Axilares

O efeito da suplementação ao meio de cultura de reguladores de crescimento (BA, IAA e GA₃), isoladamente ou em combinação, sobre a indução do desenvolvimento de gemas axilares presentes nas aréolas de cladódios jovens da palma forrageira foi estudado. Após a excisão das aréolas, estas foram transferidas para placas de Petri contendo meio MS completo, mais a combinação relevante de reguladores de crescimento. Após dez dias de cultura, a frequência de indução do desenvolvimento das gemas foi avaliada. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 5. Os dados apresentados indicam que a melhor combinação do reguladores de crescimento para a indução do desenvolvimento de gemas axilares da palma forrageira foi BA a 2,0 mg/L e IAA a 0,25 mg/L. Esta combinação de reguladores do crescimento propicia 74,5 % de indução do crescimento dos brotos, bem superior às outras combinações testadas. Após 4 ou 5 semanas no meio com BA a 2,0 mg/L e IAA a 0,25 mg/L, meio este agora denominado **meio de indução**, os brotos chegam a alcançar 2,5 cm de comprimento. Durante este período, ocorre uma intensa suberização na base dos explantes e a conseqüente diminuição da taxa de crescimento dos brotos.

TABELA 5 - Efeito de BA, IAA e GA₃ na indução do desenvolvimento de gemas axilares de cladódios jovens da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. Todos os experimentos foram repetidos três vezes. A avaliação da indução do crescimento dos brotos foi realizada após 10 dias de iniciada a cultura.

Regulador do crescimento (mg/L)			Número de explantes	Indução do desenvolvimento de gemas axilares (%) (Média ± S.D)
BA	IAA	GA ₃		
0,0	0,0	0,0	75	0,0
0,5	-	-	200	1,1 ± 0,7
1,0	-	-	200	1,3 ± 0,4
2,0	-	-	200	30,9 ± 2,6
0,5	0,1	-	200	4,0 ± 1,1
0,5	0,25	-	200	4,5 ± 1,5
0,5	0,5	-	200	11,3 ± 2,1
0,5	-	0,05	200	0,0
1,0	0,1	-	200	41,8 ± 2,9
1,0	0,25	-	200	16,6 ± 0,7
1,0	0,5	-	200	3,5 ± 0,3
1,0	-	0,05	200	0,0
2,0	0,1	-	200	20,0 ± 3,2
2,0	0,25	-	200	74,5 ± 3,7
2,0	0,5	-	200	47,3 ± 2,8
2,0	-	0,05	200	10,4 ± 1,5

Para propiciar a volta do crescimento dos brotos, estes tiveram o tecido suberizado removido e foram transferidos para um outro meio de crescimento, composto de meio MS completo, suplementado com sacarose a 5% e diferentes combinações de BA e IAA. Como mostrado na Tabela 6, a adição de BA a 0,5 mg/L e IAA a 0,25 mg/L ao meio, resultou numa taxa de crescimento dos brotos significativamente maior que a das outras combinações testadas. Após 4 semanas neste meio, denominado a partir de agora **meio de crescimento**, os brotos tinham em média 3,8 cm de comprimento. A partir deste estágio, estes brotos eram utilizados como fonte de explante para mais um ciclo de micro-propagação ou, alternativamente, eram postos em meio de enraizamento.

No caso de serem utilizados como fonte de explantes para mais um ciclo de propagação, os brotos eram seccionados tal como descrito em 2.10.1. Estes explantes secundários foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS completo, suplementado com sacarose a 5% e diferentes combinações de BA e IAA. Após 15 dias neste meio, o número de gemas que tiveram crescimento induzido foi determinado. Como mostrado na Tabela 7, 69,9% das gemas cultivadas no meio suplementado com BA a 1,0 mg/L, agora denominado **meio de proliferação**, tiveram seu desenvolvimento induzido. Após 4-5 semanas neste meio os brotos tinham em média 2,5 cm de comprimento. Este resultado foi muito superior aos obtidos com outras combinações de reguladores de crescimento. É interessante observar que a adição de IAA ao meio resultou numa diminuição na frequência de indução de crescimento das gemas e em um grande aumento na proliferação de calos na base dos explantes. Os brotos que cresceram no meio de proliferação foram transferidos para meio de enraizamento ou, alternativamente, utilizados para mais um ciclo de propagação, tal como descrito acima. Na figura 5 estão mostrados os estágios de desenvolvimento acima descritos.

Nos experimentos de enraizamento, foi observado que este só era obtido quando os brotos mediam acima de 1,0 cm. Para o enraizamento dos brotos, estes foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio MS completo, suplementado com sacarose a 5% e diferentes concentrações de IAA. Como mostrado na Tabela 8, o meio suplementado com IAA a 5,0 mg/L, denominado agora de **meio de enraizamento**, propiciou a formação de um número maior de raízes que as outras concentrações testadas. Nos meios contendo IAA a 10 mg/L ou

TABELA 6 - Efeito de BA e IAA, no crescimento de brotos da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. Todos os experimentos foram repetidos três vezes. A avaliação do crescimento dos brotos foi feita 28 dias, após iniciada a cultura.

Regulador do crescimento (mg/L)		Numero de explantes	Crescimento de brotos (cm) (Média ± S.D.)
BA	IAA		
0,0	0,0	50	0,8 ± 0,1
0,5	0,0	75	1,7 ± 0,2
0,5	0,1	75	2,3 ± 0,1
0,5	0,25	75	3,8 ± 0,2
0,5	0,5	75	2,4 ± 0,3
0,5	1,0	75	3,1 ± 0,3
1,0	0,0	75	1,9 ± 0,2
1,0	0,1	75	2,8 ± 0,3
1,0	0,25	75	3,0 ± 0,4
1,0	0,5	75	2,4 ± 0,3
1,0	1,0	75	2,4 ± 0,1

TABELA 7 - Efeito de BA, IAA e GA₃, no crescimento das gemas axilares de explantes secundários da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. Todos os experimentos foram repetidos três vezes. A avaliação da indução do crescimento das gemas axilares, de explantes secundários, foi realizada após 15 dias de iniciada a cultura.

Regulador do crescimento (mg/L)			Número de explantes	Indução do crescimento das gemas axilares (%) (Media ± S.D)
BA	IAA	GA ₃		
0,0	0,0	0,0	100	0,0
0,5	0,0	0,0	370	29,5 ± 2,4
0,5	0,25	0,0	370	37,2 ± 3,0
0,5	0,5	0,0	370	20,1 ± 3,3
0,5	0,0	0,05	370	10,8 ± 2,7
0,5	0,0	0,1	370	6,5 ± 3,1
1,0	0,0	0,0	370	69,9 ± 2,8
1,0	0,25	0,0	370	39,5 ± 3,7
1,0	0,5	0,0	370	30,9 ± 4,1
1,0	0,0	0,05	370	39,7 ± 3,4
1,0	0,0	0,1	370	15,3 ± 3,6

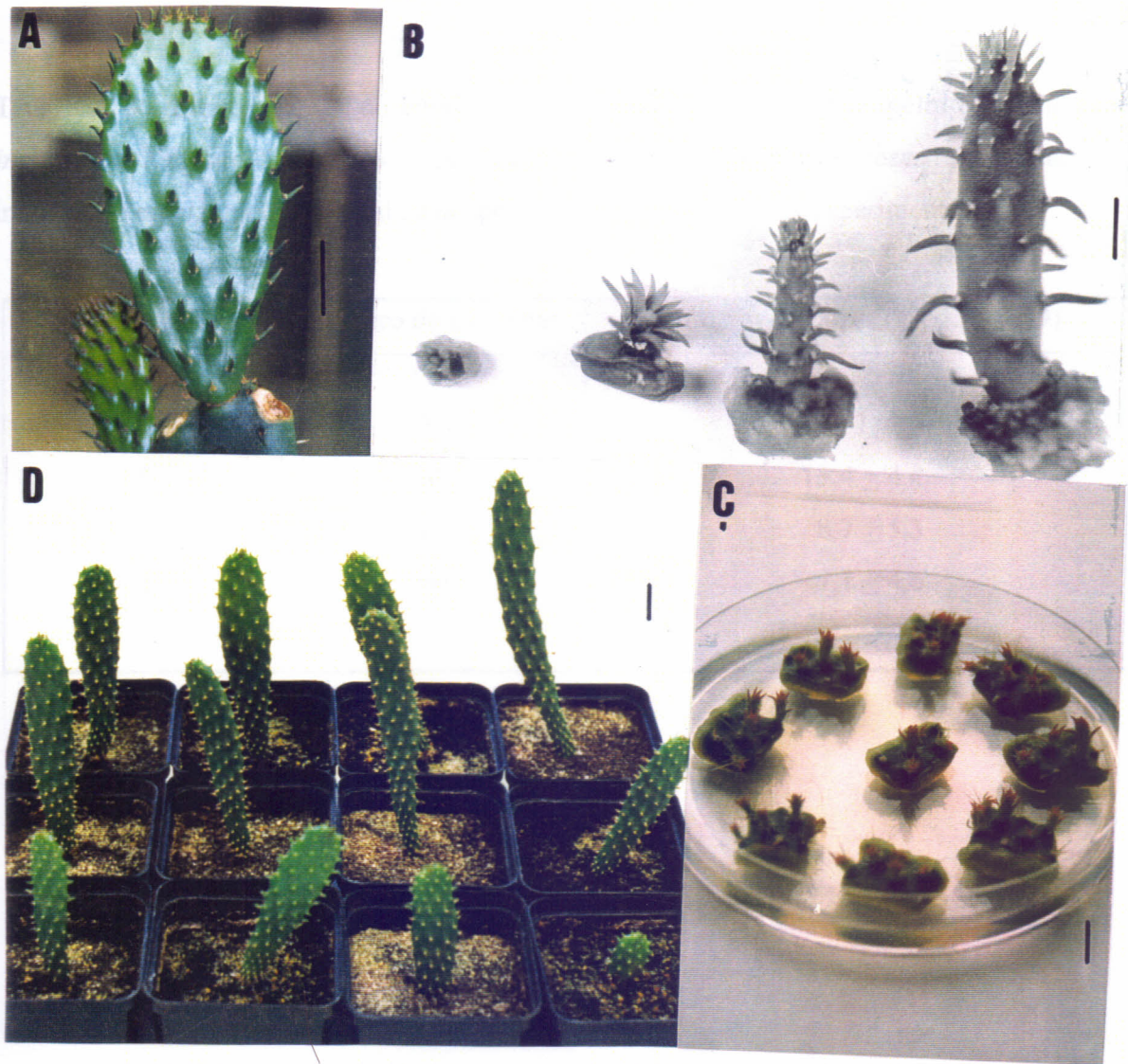


FIGURA 5 – Estágios de desenvolvimento na micropropagação da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. (A) Cladódio jovem utilizado como fonte de explantes; (B) crescimento dos brotos; (C) explantes mostrando desenvolvimento e proliferação de gemas axilares; (D) plantas em casa de vegetação (cada barra representa 1 cm).

TABELA 8 - Efeito de IAA no enraizamento de brotos da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. Todos os experimentos foram repetidos três vezes. A avaliação da indução do enraizamento foi realizada após 15 dias de iniciados os experimentos.

IAA (mg/L)	Numero de explantes	Número de raízes (Media \pm S.D)
0	30	1
5	60	13,4 \pm 4,4
10	60	8,7 \pm 5,3
15	60	7,1 \pm 4,6

IAA a 15 mg/L, foi observado não apenas uma diminuição no número médio de raízes formadas, como também uma drástica redução na taxa de crescimento dos brotos.

Após alcançarem pelo menos 4,0 cm, as plantas cultivadas no meio de enraizamento foram retiradas dos tubos de ensaio, lavadas cuidadosamente para a retirada do excesso de meio e transferidas para copos de plástico contendo areia lavada umedecida com meio MS completo, cobertos com frascos de vidro transparente e deixadas na câmara de crescimento para aclimatação. Decorrido este período os frascos de vidro foram retirados e as plantas transferidas para casa de vegetação (Figura 5), onde em todos os casos se observou uma sobrevivência de, pelo menos, 90%. Não foram observadas diferenças fenotípicas entre as plantas assim obtidas.

3.1.1.2 - Regeneração da Palma Forrageira por Cultura de Meristemas Apicais Caulinares

O isolamento de meristemas apicais caulinares da palma forrageira foi feito de acordo com o procedimento descrito em 2.10.2. Plântulas obtidas pela germinação de sementes (Figura 6A) foram utilizadas para a obtenção dos meristemas. Após seu isolamento, os meristemas foram transferidos para meio MS completo, suplementado com sacarose a 5%, ágar a 0,8 % e diferentes combinações de reguladores do crescimento. Os resultados mostrados na Tabela 9, indicam que os meios suplementados com BA a 0,1 mg/L, BA a 0,5 mg/L e BA a 0,1 mg/L mais GA₃ a 0,5 mg/L, produziram os melhores resultados quanto ao desenvolvimento e crescimento dos meristemas. Apesar de não ter havido diferença, na indução do desenvolvimento de meristemas apicais entre esses três tratamentos, os brotos crescidos no meio com BA e GA₃, foram mais vigorosos. Por tanto o meio contendo BA a 0,1 mg/L e GA a 0,5 mg/L foi escolhido como o meio mais apropriado para induzir o desenvolvimento dos meristemas e passou a ser chamado de **meio de indução de meristemas apicais**. É importante ainda salientar que a adição de IAA ao meio, mesmo em concentrações baixas, resultou não apenas numa baixa taxa de desenvolvimento dos meristemas, como

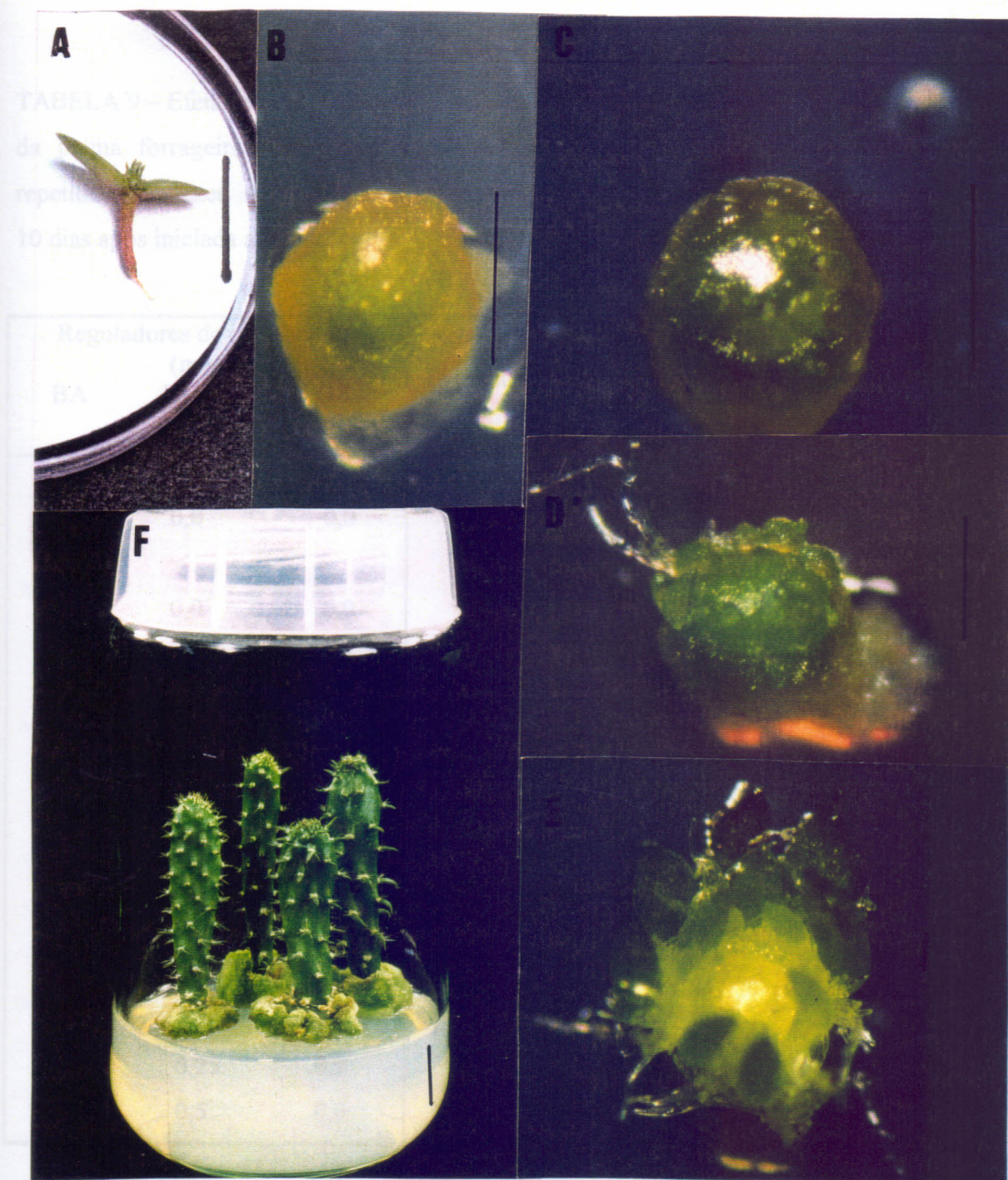


FIGURA 6 – Regeneração de plantas da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante, a partir do cultivo de meristemas apicais caulinares. (A) Planta jovem utilizada como fonte de explante, mostrando com uma seta o apice caulinar (barra representa 1 cm); (B) meristema após isolado (barra representa 0,5 mm); (C) meristema após 2 (D) 4 e (E) 10 dias de cultivo no meio de indução do desenvolvimento de meristemas apicais (barra representa 0,5 mm); (F) plântulas após 28 dias de cultivo em meio de crescimento de brotos (cada barra representa 1 cm).

TABELA 9 – Efeito de BA, IAA e GA₃, no desenvolvimento de meristemas apicais caulinares da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. Todos os experimentos foram repetidos três vezes. A avaliação do crescimento e desenvolvimento dos meristemas foi feita 10 dias após iniciada a cultura.

Reguladores de crescimento (mg/L)			Número de Explantos	Indução do desenvolvimento de meristemas apicais (%) (media ± S.D)
BA	IAA	GA ₃		
0,0	0,0	0,0	75	0,0
0,1	0,0	0,0	75	75,7 ± 0,2
0,5	0,0	0,0	75	84,1 ± 0,1
1,0	0,0	0,0	75	45,8 ± 0,2
2,0	0,0	0,0	75	48,7 ± 0,4
0,1	0,0	0,1	75	62,4 ± 1,2
0,1	0,0	0,5	75	87,3 ± 0,7
0,5	0,0	0,1	75	48,6 ± 2,3
0,5	0,0	0,5	75	57,3 ± 2,1
0,5	0,25	0,0	75	64,5 ± 2,6
0,5	0,5	0,0	75	60,3 ± 2,4

também levou a proliferação massiva de calos, os quais freqüentemente encobriram todo o meristema. Após 20 dias no meio de indução de meristemas, a taxa de crescimento dos brotos teve uma diminuição sensível, o que pode ser atribuído a uma intensa suberização na base dos brotos e também a uma necessidade de auxina exógena. Na Figura 6 estão mostrados meristemas após 2, 4 e 10 dias de cultivo no meio de indução, bem como, plântulas obtidas após 28 dias de cultivo em meio de crescimento (item 3.1.1.1).

A partir deste estágio, 28 dias em meio de crescimento, as plântulas obtidos eram transferidos para meio de enraizamento ou eram utilizados para micropropagação. Em ambos os casos, os procedimentos utilizados foram essencialmente aqueles descritos para micropropagação por proliferação de gemas axilares (item 3.1.1.1), e os resultados obtidos eram indistinguíveis deste.

3.1.2 - Indução e Estabelecimento de Calos Friáveis

Para os experimentos de indução de calos, foram utilizados cotilédones de plântulas de palma forrageira, seguindo o procedimento descrito em Materiais e Métodos (2.10.3.). A indução de calos a partir dos explantes foi testada em meio MS completo, suplementado com sacarose a 3,0 % e diferentes concentrações de 2,4-D (Tabela 10). Nos meios contendo 2,4-D, nas concentrações 0,5, 1,0 e 2,5 mg/L, foi observado a formação de calos, sendo que os calos de melhor aparência foram aqueles obtidos no meio suplementado com 2,4-D a uma concentração de 0,5 mg/L. Estes calos primários foram transferidos para meio MS completo, suplementado com sacarose a 3,0% e diferentes combinações de 2,4-D e cinetina. Após esta transferência foram selecionados os calos de melhor desenvolvimento provenientes do meio suplementado com 2,4-D a 0,5 mg/L e cinetina a 0,2 mg/L (Tabela 11). Estes calos secundários foram transferidos para meio MS completo, suplementado com sacarose a 3,0% e diferentes combinações 2,4-D, cinetina e picloram. Calos de bom desenvolvimento e aparência friáveis foram obtidos com mais freqüência no meio suplementado com 2,4-D a 0,5 mg/L, cinetina a 0,2 mg/L e picloram a 0,25 mg/L (Tabela 12). Estes calos terciários foram transferidos para meio MS completo, suplementado com sacarose a 3,0 %, caseína hidrolisada

TABELA 10 – Efeito de 2,4-D na indução de calos em explantes cotiledonários da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. Todos os experimentos foram repetidos três vezes. A avaliação dos calos formados foi feita 14 dias após iniciada a cultura.

2,4-D (mg/L)	Número de explantes	Calos formados (%) (Média \pm S.D.)			
		√	+	\pm	-
0,5	30	0	57,6 \pm 4*	0	42,0 \pm 4
1,0	30	0	40,0 \pm 7	10,0 \pm 5,3	50,0 \pm 12,3
2,5	30	0	0	66,6 \pm 5,2	33,3 \pm 1,1
5,0	30	0	0	0	100
10,0	30	0	0	0	100

√ Calos friáveis

+ Calos de aparência grumosa e não-friáveis

\pm Calos compactos, facilmente oxidáveis

- Não formaram calos ou total oxidação do explante

* Calos primários transferidos para novo meio, para obtenção de calos friáveis (Tabela 11)

TABELA 11 - Efeito de 2,4-D e cinetina, na indução de calos, a partir de calos primários da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. Todos os experimentos foram repetidos três vezes. A avaliação na formação dos calos formados foi realizada após 14 dias de iniciada a cultura

Regulador do crescimento (mg/L)		Número de explantes	Calos formados (%) (Média \pm S.D.)			
2,4-D	Cinetina		√	+	±	-
0,5	0,2	30	0	67,6 \pm 6,6*	26,6 \pm 7,2	5,3 \pm 3,1
2,5	0,2	30	0	7,6 \pm 4,1	32,0 \pm 9,3	60 \pm 11,6
4,0	0,2	30	0	0	24,3 \pm 6,8	75,3 \pm 6,8
0,5	0,5	30	0	28,6 \pm 10,9	51 \pm 8,3	20,0 \pm 7,2
2,5	0,5	30	0	29,5 \pm 7,2	24,3 \pm 4,1	45,6 \pm 11
4,0	0,5	30	0	0	52,2 \pm 4,2	47,6 \pm 4,1

√ Calos friáveis

+ Calos de aparência grumosa e não friáveis

± Calos compactos, facilmente oxidáveis

- Não formaram calos ou total oxidação do explante

*Calos secundários transferidos para novo meio, para obtenção de calos friáveis (Tabela 12).

TABELA 12 - Efeito de 2,4-D, cinetina e picloram, na indução de calos a partir de calos secundários da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. Todos os experimentos foram repetidos três vezes. A avaliação dos calos formados foi realizada após 21 dias de iniciada a cultura

Regulador do crescimento (mg/L)			Número de explantes	Calos formados (%) (Média ± S.D.)			
2,4-D	cinetina	Picloram		√	+	±	-
0,5	0,2	0,05	60	0	20,0 ± 3,3	36,7 ± 5,4	43,3 ± 7,2
0,5	0,2	0,10	60	0	13,3 ± 2,7	41,1 ± 6,8	45,6 ± 5,7
0,5	0,2	0,25	60	0	32,2 ± 4,2*	45,6 ± 3,1	22,2 ± 1,6
0,5	0,2	0,5	60	0	22,2 ± 4,2	50,0 ± 2,7	27,8 ± 5,7

√ Calos friáveis

+ Calos de aparência grumosa e não friáveis

± Calos compactos, facilmente oxidáveis

- Não formaram calos ou total oxidação do explante

*Calos terciários transferidos para novo meio, para obtenção de calos friáveis (Tabela 13) .

e diferentes combinações de 2,4-D, cinetina e picloram (Tabela 13). Calos de desenvolvimento rápido e altamente friáveis foram obtidos no meio contendo caseína hidrolisada a 400 mg/L, 2,4-D a 0,5 mg/L, cinetina a 0,2 mg/L e picloram a 0,25 mg/L. Este meio foi denominada de **meio para calos friáveis (MCF)**.

Para testar se o meio MCF era capaz de induzir calos friáveis em explantes primários da palma forrageira, explantes de cotilédones foram transferidos para este meio e após 16 semanas calos friáveis foram obtidos a partir de todos os explantes. Logo após 7 a 10 dias de cultivo os calos puderam ser observados. Os calos de coloração branco-amarelados foram isolados dos explantes e sub-cultivados no mesmo meio MCF fresco. Após 10 semanas de subcultivo dois tipos de calos foram observados: calos friáveis de crescimento rápido (Figura 7) e calos duros de crescimento lento. Unicamente os calos friáveis foram propagados. O crescimento dos calos foi avaliado pela medida do diâmetro e do peso fresco. Durante um período de 28 dias o diâmetro dos calos aumentou em média 4,5 vezes e o peso fresco aumentou aproximadamente 10 vezes (Figura 8). Análise estatística dos dados de diâmetro e peso fresco mostraram uma alta correlação entre estes dados ($R^2= 0,95$, $P<0,01$). O melhor crescimento dos calos friáveis foi observado na fase linear de crescimento (de 14 a 21 dias de cultivo). Após 3 dias de cultivo os calos friáveis, com coloração branco-amarelada, adquirem coloração amarronzada e morrem, sugerindo assim que a cada 21 dias os calos devem ser sub-cultivados.

3.1.3 - Estabelecimento de Suspensão Celular

Os experimentos para obtenção de suspensão celular da palma forrageira foram realizados com calos friáveis com 21 dias de sub-cultivo e o meio utilizado foi o MCF líquido. Quando transferidos para este meio e submetidos a agitação os calos rapidamente se desintegraram em células individuais e agregados de células. Após três sub-cultivos, uma suspensão celular composta unicamente de células esféricas e pequenos agregados de células (Figura 9) foi obtida. O efeito do tamanho do inóculo no crescimento

TABELA 13 - Efeito de 2,4-D, cinetina, picloram na indução de calos friáveis a partir de calos terciários da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. Todos os experimentos foram repetidos três vezes. A avaliação dos calos formados foi realizada após 21 dias de iniciada a cultura

Regulador do crescimento (mg/L)			Número de explantes	Calos formados (%) (Média \pm S.D.)			
2,4-D	Cinetina	Picloran		√	+	±	-
0,5	0,2	0,5	80	0	0	0	0
0,5	0,2	0,25	80	22,1 \pm 2,6	77,9 \pm 2,6	0	0

√ Calos friáveis

+ Calos de aparência grumosa e não friáveis

± Calos compactos, facilmente oxidáveis

- Não formaram calos ou total oxidação do explante

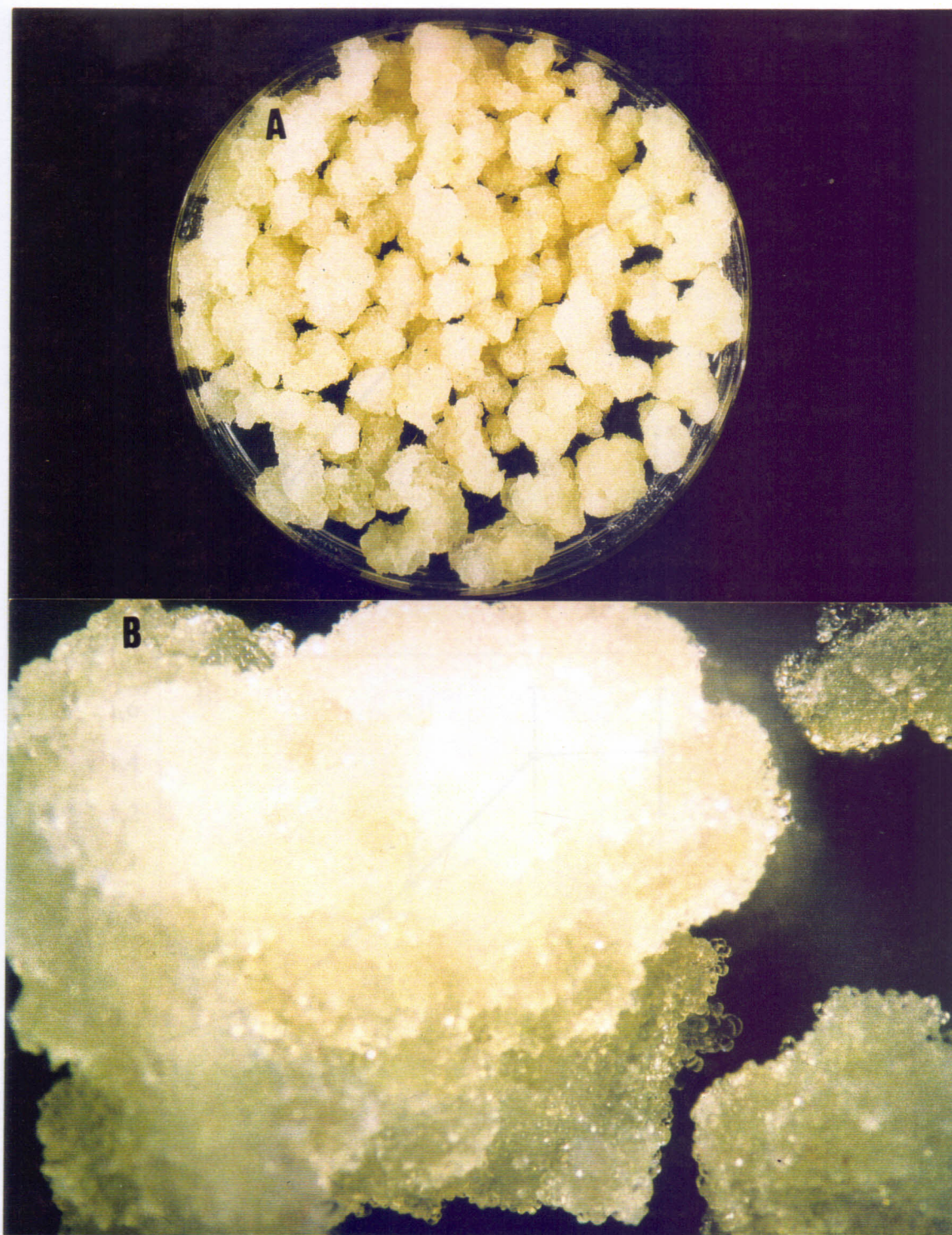


FIGURA 7 – Calos friáveis obtidos a partir de explantes cotiledonários da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. Calos friáveis após 28 dias de incubação em meio MCF (A); detalhe de um calo friável (B) (aumento 10 x 3,2).

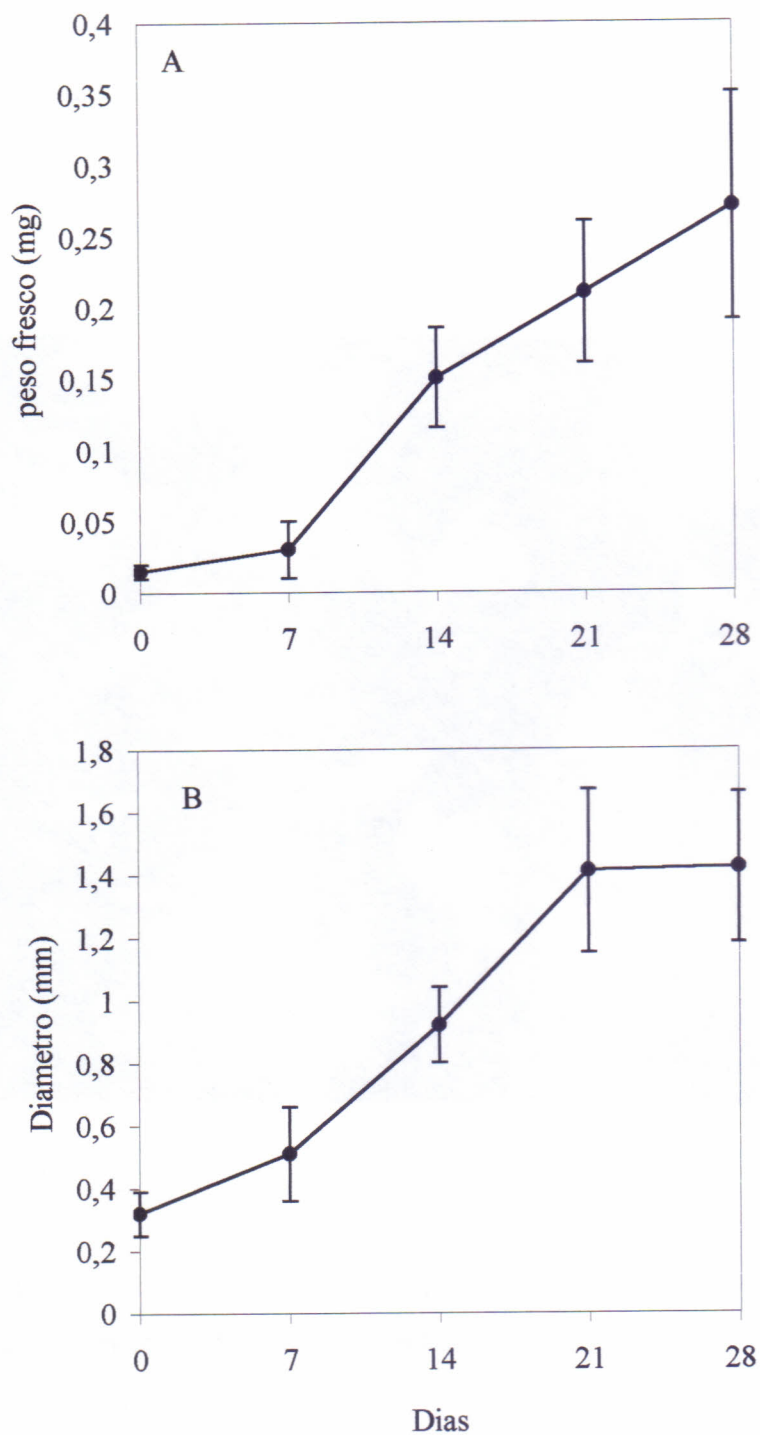


FIGURA 8 – Avaliação do crescimento de calos friáveis obtidos a partir de explantes cotiledonários da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante, cultivados em meio MCF. O crescimento dos calos foi avaliado através de medidas de peso fresco (A) e diâmetro (B).

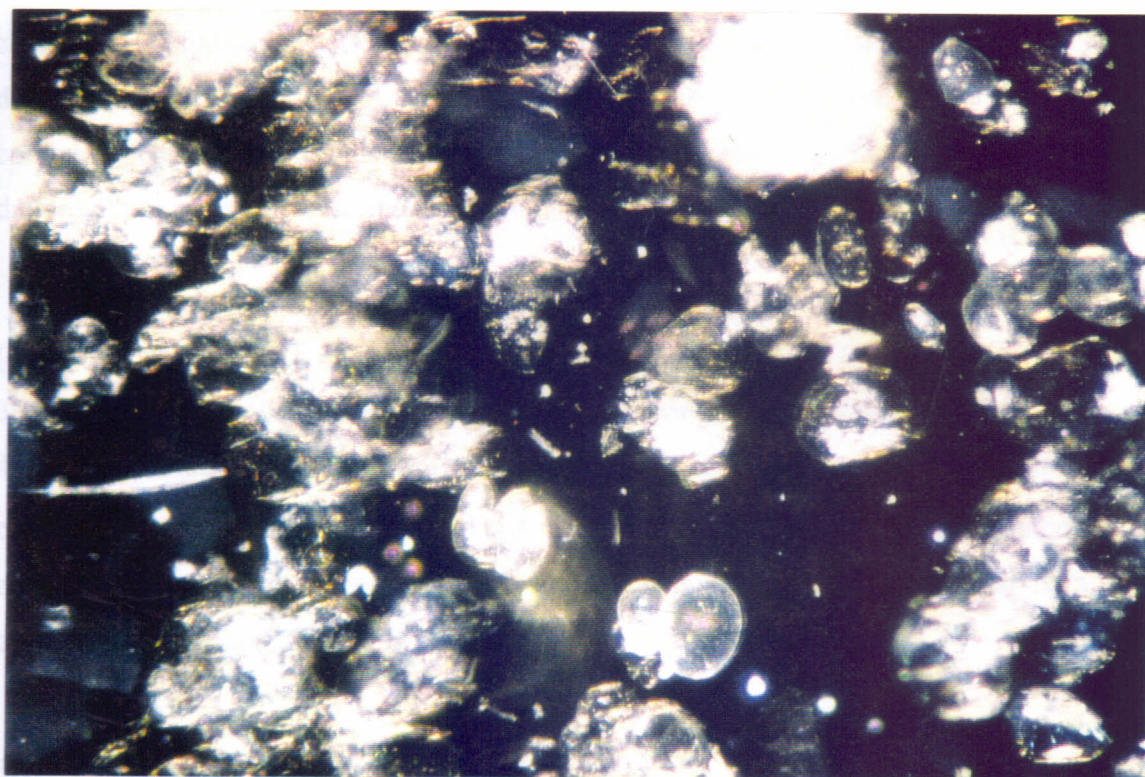


FIGURA 9 – Suspensão celular da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante, incubada no meio MCF líquido (aumento 10 x 40).

da suspensão celular foi examinado (Tabela 14 e Figura 10) e foi concluído que uma diluição de 1 volume da suspensão de células para 25 volume do meio MCF líquido (1:25) é a que melhor promove o crescimento da suspensão.

Uma fase de latência de 2 dias foi observada, precedendo o início da fase de crescimento exponencial que, por sua vez, foi sucedida por uma fase estacionária após o 7º dia de cultivo (Figura 10). A viabilidade das células na suspensão celular foi avaliada por coramento com azul de Evans (item 2.19), sendo observada uma viabilidade de 60%, no início da fase exponencial de crescimento.

O peso fresco da suspensão celular, após 4 dias de sub-cultivo, aumentou 10,8 vezes (de 32 g/L para 348 g/L) e o volume de células empacotadas (VCE) aumentou 9,7 vezes (de 36 ml/L para 350 ml/L). Estes resultados sugerem que os sub-cultivos devem ser feitos entre o 4º e o 5º dia de iniciada a cultura. A análise estatística destas variáveis, mostrou uma alta correlação entre elas ($R^2 = 1$, $P < 0,01$). A concentração de sacarose no meio, determinada por refratometria, decresceu rapidamente e após 5 dias de sub-cultivo diminuiu para 50% da concentração original (Figura 10).

3.1.4 - Isolamento e Cultura de Protoplastos

Experimentos iniciais nos quais se variava o tempo de incubação da solução enzimática com a suspensão celular, mostraram que o tempo de dez horas de incubação foi o que produziu, não apenas um número maior de protoplastos, mas também protoplastos com alto grau de viabilidade. Em seguida, o efeito da molaridade dos diferentes meios utilizados para a obtenção dos protoplastos foi avaliada. Um experimento típico compreendia fazer a digestão da suspensão celular em solução enzimática na qual as enzimas eram dissolvidas em solução de glicina (preparada em CaCl_2 a 0,1 mM) a 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, e 0,9 M. Decorridas dez horas de digestão cada uma das misturas de reação era centrifugada e o precipitado contendo protoplastos, células intactas e restos celulares, era lavado em solução de glicina de molaridade igual ao do meio de digestão e este processo repetido mais duas vezes. O precipitado de cada um dos tratamentos foi ressuspensão em

TABELA 14 - Efeito do tamanho do inóculo (VCE: volume do meio) no crescimento da suspensão celular da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante.

Inóculo* (VCE/ml do meio)	Crescimento da suspensão celular, VCE (ml/ dia) (Média \pm S.D.)							
	Início	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
1:5	10	10,7 $\pm 0,2$	11,4 $\pm 0,3$	12,3 $\pm 0,2$	30,8 $\pm 2,6$	35,5 $\pm 1,3$	46 $\pm 1,5$	47,3 $\pm 1,6$
1:10	5	5,3 $\pm 0,1$	5,7 $\pm 0,1$	6,4 $\pm 0,2$	11,8 $\pm 1,1$	14,3 $\pm 0,9$	24,3 $\pm 1,5$	31,2 $\pm 2,1$
1:25	2	2,2 $\pm 0,1$	2,6 $\pm 0,2$	7,7 $\pm 1,1$	17,7 $\pm 1,9$	28,2 $\pm 1,4$	31,7 $\pm 2,1$	34 $\pm 2,1$

VCE: volume de células empacotadas

*1:5, 10 ml de VCE/ 50 ml do meio;

1:10, 5 ml de VCE/ 50 ml do meio;

1:25, 2 ml de VCE/ 50 ml de meio.

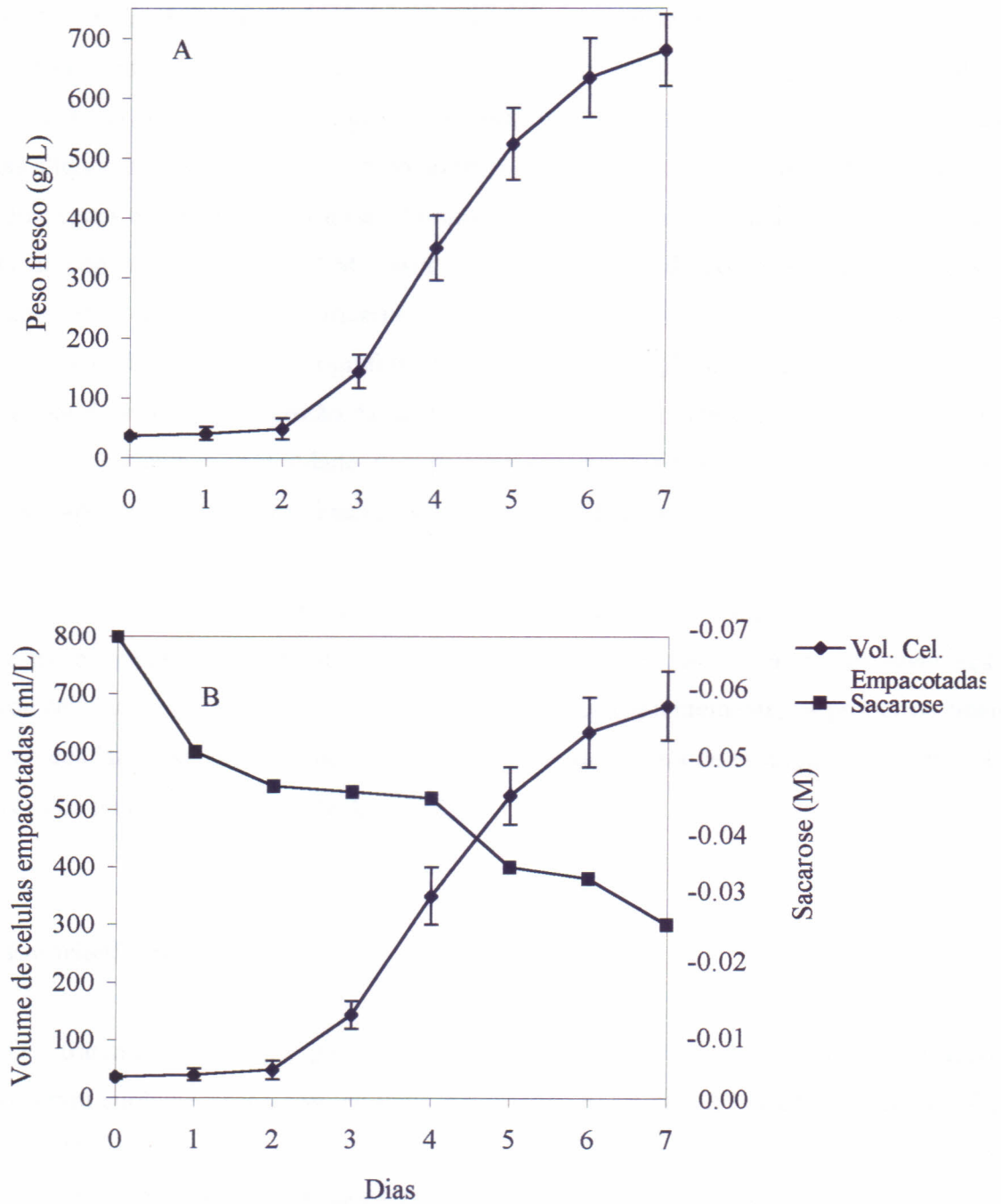


FIGURA 10 - Crescimento de suspensão celular da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante, através de medidas de peso fresco (A) e volume de células empacotadas ou concentração de sacarose (B).

sacarose de molaridade igual a do meio de digestão respectivo e os protoplastos do sobrenadante foram transferidos para novos tubos contendo uma solução de manitol de molaridade igual a do meio de digestão respectivo. De cada um dos tratamentos foram retiradas alíquotas para a determinação do número de protoplastos por mililitro da solução. Os resultados destes experimentos (Tabela 15) mostraram que quando as enzimas são dissolvidas em solução contendo glicina a 0,7 M e esta molaridade é mantida nos meios subsequentes, o rendimento em protoplastos é significativamente maior que nas outras concentrações testadas. Na Figura 11 estão mostradas fotografias obtidas pela observação em microscópio óptico de uma alíquota da mistura de digestão da suspensão celular, submetida a dez horas de digestão. Esta Figura evidencia a viabilidade dos protoplastos produzidos. Uma fotografia de um protoplasto após processo de purificação está mostrada na Figura 11.

Os protoplastos no meio com manitol foram transferidos para meio de cultura de protoplastos e incubados a 28°C no escuro. Após 4 dias neste meio observou-se regeneração da parede celular em alguns protoplastos (Figura 12) e subseqüentemente, os primeiros sinais de divisão celular. Após oito dias de incubação no meio de cultura de protoplastos a formação de microcalos pôde ser observada (Figuras 12).

3.1.5 - Embriogênese Somática

Dos tratamentos utilizados para a indução de embriogênese somática, aqueles nos quais os meios eram suplementados com cinetina a 0,2 mg/L e 2,4-D a 2,5 mg/L e cinetina a 0,2 mg/L e 2,4-D a 4,0 mg/L foram os únicos que levaram a formação de estruturas nodulares, potencialmente embriogênicas (Tabela 16 e Figura 13). Algumas das estruturas nodulares formadas nos explantes cultivados no meio suplementado com cinetina a 0,2 mg/L e 2,4-D a 4,0 mg/L eventualmente diferenciaram-se em raízes (Figura 13), mesmo antes de serem transferidos para novos meios.

As estruturas nodulares obtidas, facilmente se desprendem dos explantes. Estas estruturas foram transferidas para meios que normalmente permitiriam a diferenciação destas

TABELA 15 - Efeito da molaridade do meio para isolamento de protoplastos da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. O meio continha enzimas de digestão da parede celular (celulase a 1% e pectinase a 0,5%) dissolvidas em solução de diferentes concentrações de glicina. Todos os experimentos foram repetidos três vezes. A avaliação do número de protoplastos (PP/ml) foi realizada após 10 horas de digestão enzimática.

Meio de digestão (M)	Número de protoplastos (PP/ ml)
0,3	-
0,4	$0,15 \times 10^5 \pm 0,02$
0,5	$0,53 \times 10^5 \pm 0,03$
0,6	$1,87 \times 10^5 \pm 0,10$
0,7	$5,00 \times 10^5 \pm 0,60$
0,8	$2,90 \times 10^5 \pm 0,90$
0,9	$2,10 \times 10^5 \pm 0,20$

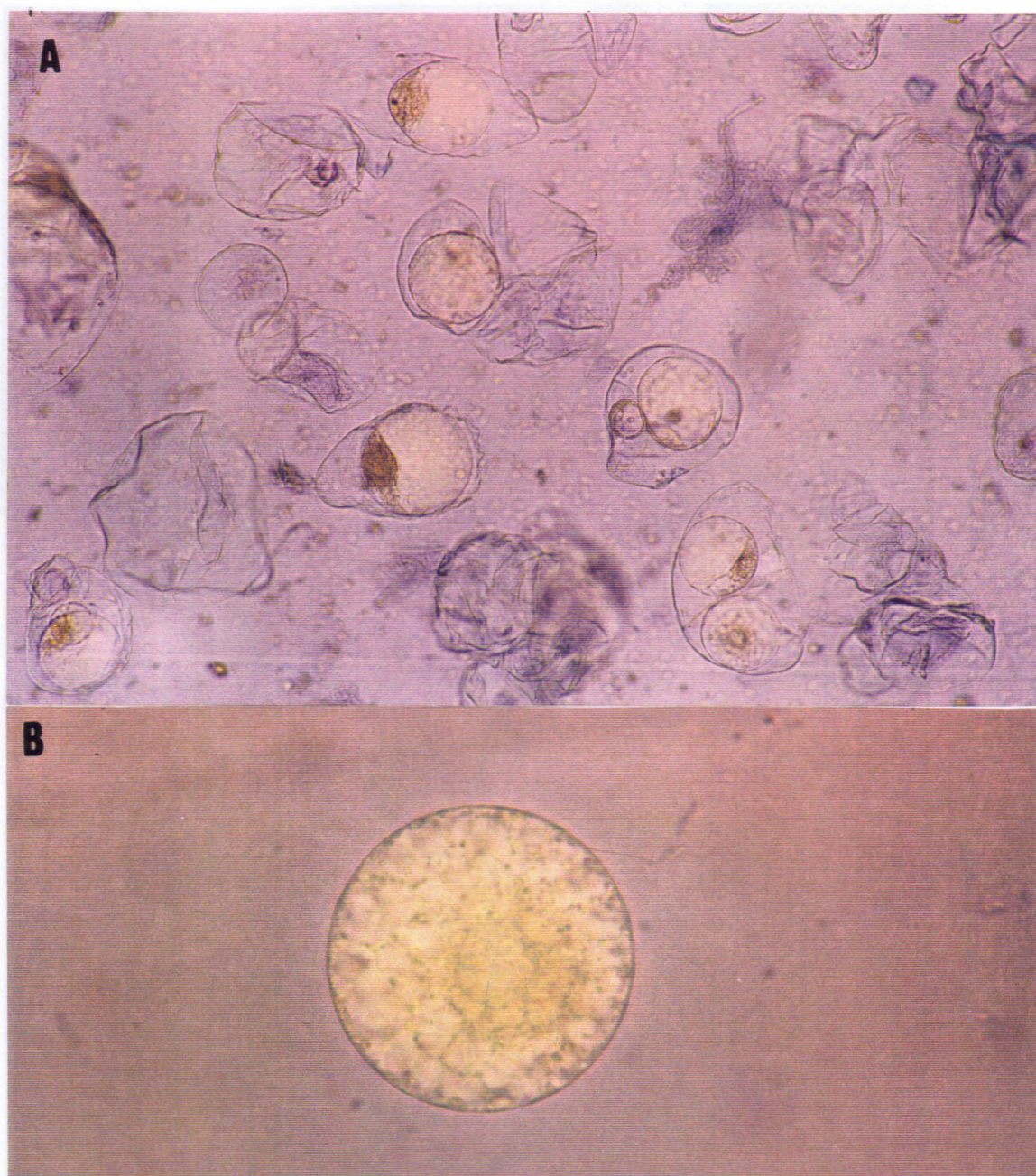


FIGURA 11 – Protoplastos isolados da suspensão celular da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. Após 10 horas de digestão da parede celular em solução enzimática (celulase a 1% e pectinase a 0,5%, dissolvidas em glicina a 0,7 M). Viabilidade dos protoplastos (azul de Evans a 1 %) após 10 horas de incubação (A) (aumento 10 x 20) e protoplasto purificado em solução de sacarose a 0,7 M (B) (aumento 10 x 40).

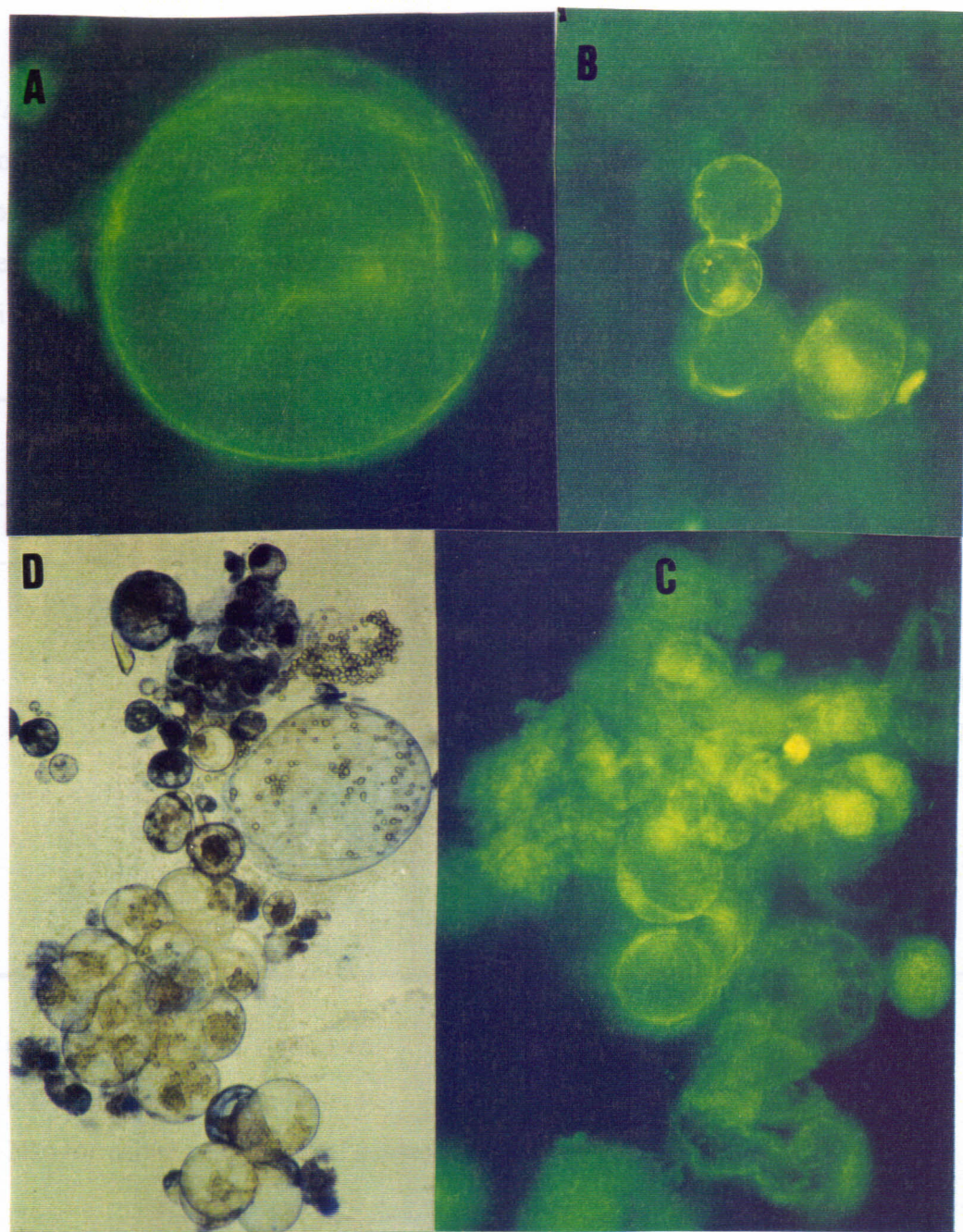


FIGURA 12 – Regeneração da parede celular em protoplastos da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. Após 4 dias de incubação em meio de cultura para protoplastos (A) (aumento 10 x 40). Após 5 dias observa-se os primeiros sinais de divisão celular (Calcofluor White a 1 %) (B) (aumento 10 x 20). Após 8 dias observa-se a formação de microcalos em Calcofluor White a 1 % (C) e em azul de Evans a 1 % (D) (aumento 10 x 20).

TABELA 16 – Efeito de cinetina e 2,4-D na indução de calos com estruturas nodulares em cotilédones da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. Todos os experimentos foram repetidos três vezes, e tiveram igual número de explantes por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra minúscula no sentido das colunas, não são significativamente diferentes, de acordo com o Teste de Tukey a 5 %.

Regulador do crescimento (mg/L)		Numero de explantes	Calos formados (%) (Média ± S.D.)		
Cinetina	2,4-D		√	+	-
0,2	0,5	40	-	-	100
0,2	2,5	40	-	19,2 ± 5,1	80,87±5,1
0,2	4,0	40	-	9,2 ± 3,1	90,8±3,1
0,5	0,5	40	-	-	100
0,5	2,5	40	-	-	100
0,5	4,0	40	-	-	100

√ Calos com embriões somáticos

+ Calos com estruturas nodulares

- Não formaram calos ou total oxidação do explante

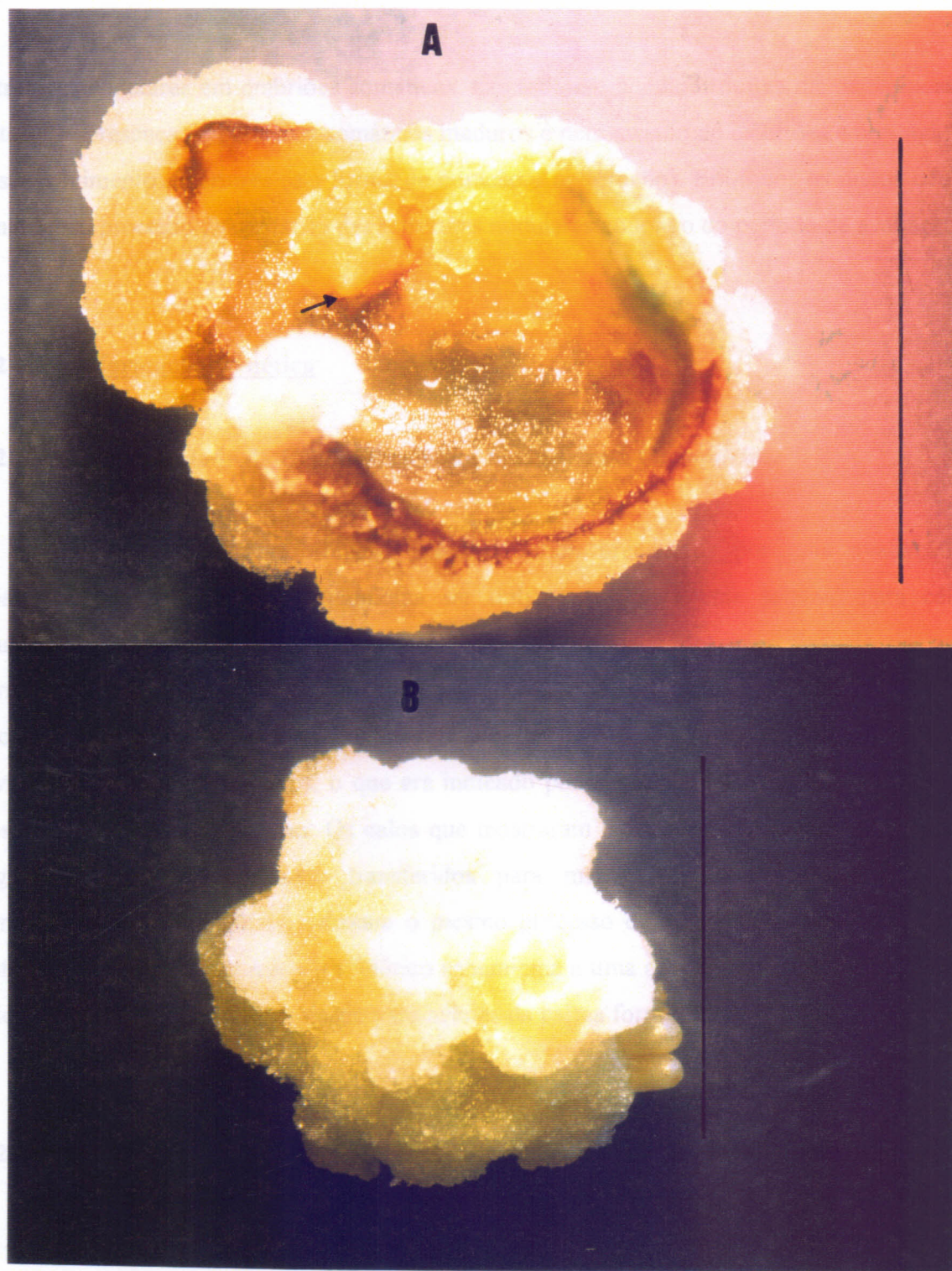


FIGURA 13 – Formação de estruturas nodulares nos cotilédones da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante, incubados no meio suplementado com cinetina a 0,2 mg/L e 2,4-D a 4,0 mg/L. Formação de estruturas nodulares, mostrando com uma seta o apice radicular, na superfície dos cotilédones (A) e nos calos induzidos (B) (cada barra representa 0,5 cm).

estruturas nodulares em embriões somáticos. Contudo em nenhum destes meios foi possível detectar a presença de embriões somáticos maduros e nem mesmo de embriões em estágios de desenvolvimento anteriores (em forma de coração e de torpedo). Em todos os meios ocorreu um intenso processo de oxidação das estruturas nodulares ao longo do período de avaliação.

3.2 - Transformação Genética

3.2.1 - Susceptibilidade de Células da Palma Forrageira à Canamicina

Os ensaios de transformação genética foram precedidos por uma avaliação da possibilidade do antibiótico canamicina ser utilizado como agente seletivo para células transformadas. Isto foi feito avaliando-se a susceptibilidade de calos friáveis da palma forrageira a diferentes níveis de canamicina no meio de cultura. Como mostrado na Tabela 17, o cultivo de calos friáveis em meio contendo canamicina a uma concentração de 100 mg/L leva a morte de todos os calos, o que era indicado por uma coloração esbranquiçada, e uma posterior oxidação dos mesmo. Os calos que mostraram crescimento no meio com 25 ou 50 mg/L de canamicina, quando transferidos para meios frescos contendo as mesmas concentrações de antibiótico sofreram o mesmo processo de esbranquiçamento e oxidação. Estes resultados indicam que o antibiótico canamicina a uma concentração de 100 mg/L é um eficiente marcador de transformação para células da palma forrageira.

3.2.2 - Expressão Gênica em Meristemas Caulinares e Segmentos de Cladódios

Experimentos preliminares foram importantes para determinar a pressão de tiro mais adequada. Foi determinado (resultados não mostrados) que uma pressão de tiro de 1200 psi conduz a que um número maior de partículas alcance o tecido alvo, sem danificá-lo. A utilização de partículas de tungstênio de 1,3 μm foi ditada pelo fato de que tais partículas estavam disponíveis no laboratório e pelo fato de tais partículas terem se mostrado adequadas para experimentos de transformação de diversas espécies de plantas. A distância tela de

TABELA 17 – Efeito da concentração de canamicina (mg/L) na morte de calos friáveis da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante. Todos os experimentos foram repetidos três vezes com igual número de explantes por tratamento.

Canamicina (mg/L)	Número de explantes	Calos mortos (%) (media \pm S.D)
0	20	0
25	20	46,8 \pm 10,4
50	20	70,4 \pm 11,6
100	20	100

retenção e o tecido alvo utilizada nos experimentos executados foi de 70 mm, que é também a distância que tem se mostrado apropriada em um grande número de experimentos de transformação de plantas.

A análise histoquímica da presença de atividade glucuronidásica tanto em meristemas, quanto em segmentos de cladódios, mostrou que células de ambos os tecidos foram transformadas e mostraram altos níveis de expressão do gene *uidA* (Figura 14). Nos experimentos executados, os tecidos alvos eram também bombardeados com partículas de tungstênio desprovidas de DNA, para eliminar a possibilidade de falso-positivos. A ausência de manchas azuis nestes tecidos bombardeados (Figura 14), indica assim que as células da palma forrageira não possuem atividade glucuronidásica endógena.

Nos experimentos de transformação dos meristemas, foi observado que as células da zona central do meristema expressaram o gene repórter a uma frequência maior que o tecido circundante (Figura 14). Foi observado, ainda, que a frequência de transformação dos meristemas foi independente do plasmídeo utilizado (Tabela 18).

3.2.3 - Transformação Integrativa de Células de Calos da Palma Forrageira

Os experimentos de transformação integrativa de células de calos da palma forrageira, foram realizados utilizando-se os mesmos parâmetros (pressão de tiro, distância do alvo e número de disparos) dos experimentos de expressão transiente em meristemas e segmentos de cladódios.

Exemplos representativos da análise histoquímica de calos logo após bombardeamento e após 3 ciclos de seleção, estão mostrados na Figura 15. Na Tabela 19, estão mostrados os resultados dos experimentos de seleção das células transformadas, após o bombardeamento dos calos. Após três ciclos de sub-cultivo em meio seletivo, foram selecionadas cinco linhagens de calos que apresentavam altos níveis de expressão do gene *uidA* (Tabela 19). É importante salientar que praticamente 100% dos calos bombardeados

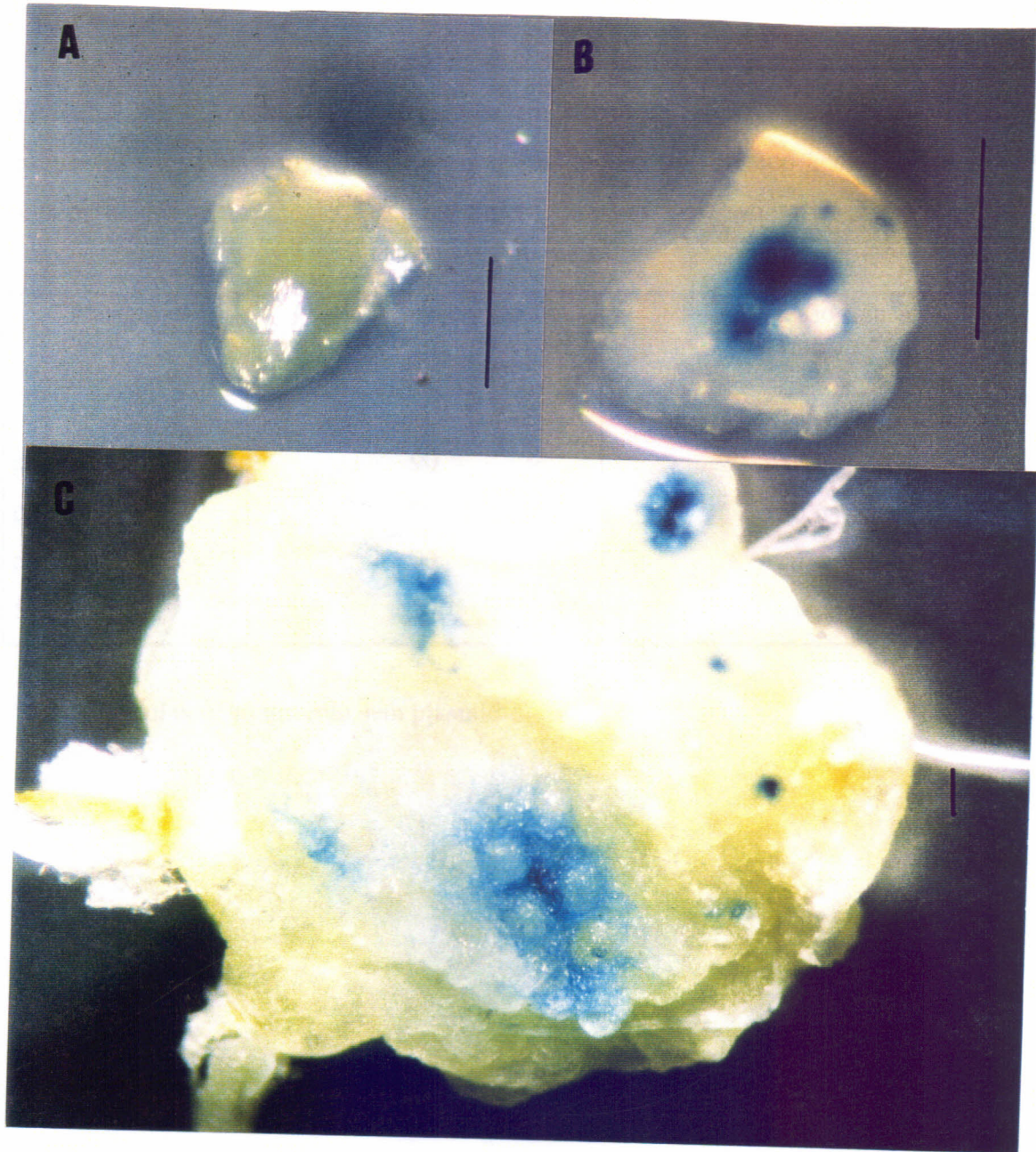


FIGURA 14 – Expressão transiente do gene *uidA* (teste histoquímico GUS) no meristema apical caulinar e no segmento de cladódio da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante, após o bombardeamento com partículas de tungstênio cobertas com o plasmídeo pPARGUSH; controle negativo, meristema apical caulinar bombardeado com partículas sem plasmídeo (A); meristema apical caulinar (B); e segmento de cladódio (C) (cada barra representa 0,5 mm).

TABELA 18 – Frequência da expressão transiente do gene *uidA* em meristemas apicais caulinares da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante após o bombardeamento com partículas de tungstenio. Todos os experimentos foram repetidos três vezes.

Plasmídeo	Número de meristemas Bombardeados	Expressão transiente (%) (media \pm S.D)
pFF19G	90	34,7 \pm 1,2
pNG	90	36,6 \pm 1,3
pPARGUSH	90	34,4 \pm 1,7
SP*	20	0

*SP= partículas de tungstenio sem plasmídeo

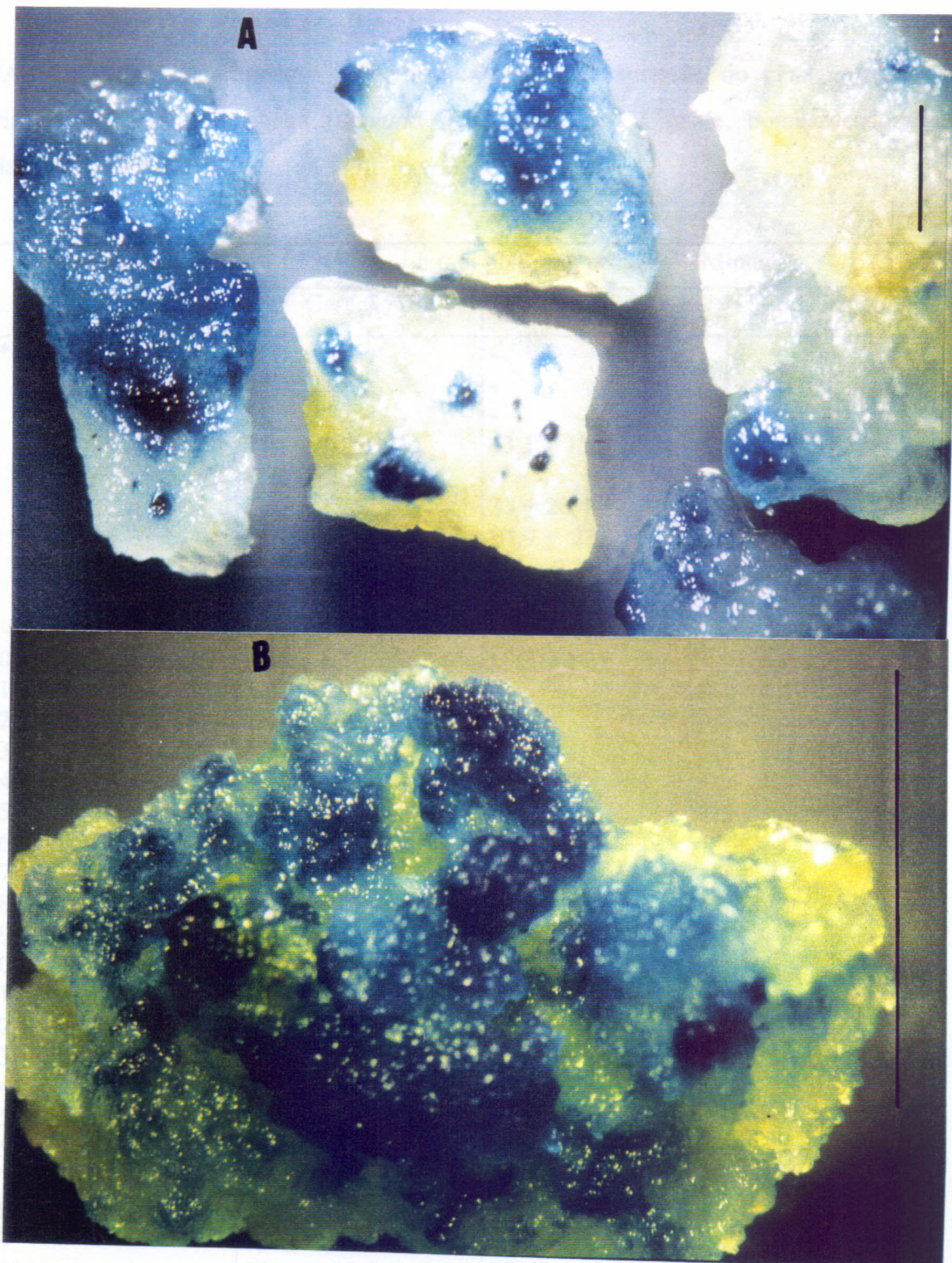


FIGURA 15 – Análise histoquímica da expressão do gene *uidA* (teste histoquímico GUS) nos calos friáveis da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante, após o bombardeamento com o pPARGUSH (A) e nos calos friáveis bombardeados após 3 ciclos de seleção em meio MCF. suplementado com canamicina a 100 mg/L (B) (barra representa 0,5 cm).

TABELA 19 – Determinação espectrofotométrica da expressão do gene *uidA* em calos friáveis da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante, bombardeados com o plasmídeo pPARGUSH.

Número do calo	n mol pNP. mg proteína ⁻¹ . Minuto ⁻¹		
	Geração 0	Geração 1	Geração 2
0*	0	-	-
1	0,8 ± 0,1	-	-
2	2,1 ± 0,7	-	-
3	27,9 ± 10,7	43,1 ± 15,2	73,9 ± 30,5
4	0,7 ± 0,2	-	-
5	20,5 ± 13,5	35 ± 20,4	22,9 ± 0,3
6	55,1 ± 14,9	94,9 ± 23,6	105,6 ± 15,3
7	14,2 ± 12,5	2,4 ± 0,3	-
8	1,0 ± 0,8	-	-
9	1,7 ± 0,3	-	-
10	27,8 ± 8,3	59,3 ± 11,1	108,1 ± 20,8
11	3,2 ± 2,1	-	-
12	3,4 ± 1,9	-	-
13	4,5 ± 2,0	-	-
14	20,7 ± 1,4	1,3 ± 0,7	-
15	3,7 ± 2,3	-	-
16	5,6 ± 3,7	-	-
17	2,8 ± 2,0	-	-
18	38,2 ± 8,4	75,3 ± 8,9	129,1 ± 17,8
19	6,1 ± 2,5	-	-
20	16,4 ± 6,2	4,3 ± 3,2	-
21	12,7 ± 10,1	119,2 ± 15,7	121,4 ± 20,9
22	11,9 ± 3,5	13,6 ± 10,4	-
23	3,4 ± 2,1	-	-
24	10,1 ± 4,8	13,4 ± 5,7	45,4 ± 9,2
25	2,5 ± 1,9	-	-
25	5,4 ± 3,3	-	-
27	10,9 ± 4,9	12,4 ± 9,2	-
28	21,4 ± 6,7	11,3 ± 4,7	47,7 ± 5,9
29**	8,4 ± 2,4	8,8 ± 3,1	8,0 ± 3,4
30***	121,6 ± 12,2	155,2 ± 10,9	140,4 ± 16,3

*controle negativo, calos friáveis de *Opuntia ficus-indica* não transgênicos

** controle positivo, *Nicotiana tabacum* W-38- PARGUSH

***controle positivo, raízes de *Nicotiana tabacum* W-38-PARGUSH

Foram realizadas três avaliações em cada linhagem de calos por cada geração.

produziram calos nos quais a atividade glucuronidásica pôde ser detectada. Assim, a frequência de transformação de calos foi bem superior àquela obtida na transformação de meristemas e cladódios.

Quando observados, o padrão de crescimento dos calos transformados e não transformados são essencialmente idênticos. Ambos tipos de calos com igual facilidade podem originar suspensões celulares, de idêntico padrão de crescimento.

Para demonstrar a ocorrência de transformação integrativa, o DNA genômico foi isolado de calos transformados com a plasmídeo pPARGUSH, selecionados a partir daqueles calos com maior atividade específica da GUS (ver Tabela 19) e de calos não transformados (controle) e submetidos a PCR, utilizando três classes de iniciadores, capazes de propiciar a amplificação dos genes *uidA*, *nptII* e *tet*. Estes pares de iniciadores iriam gerar fragmentos 895, 700 e 510 pb, respectivamente. Os resultados na Figura 16, confirmaram esta predição. Amplificação destes genes foi observada unicamente com o DNA extraído a partir de células transformadas e em nenhum caso foi amplificação do DNA obtido a partir de calos não transformados. Estes resultados indicam a transformação integrativa destes calos.

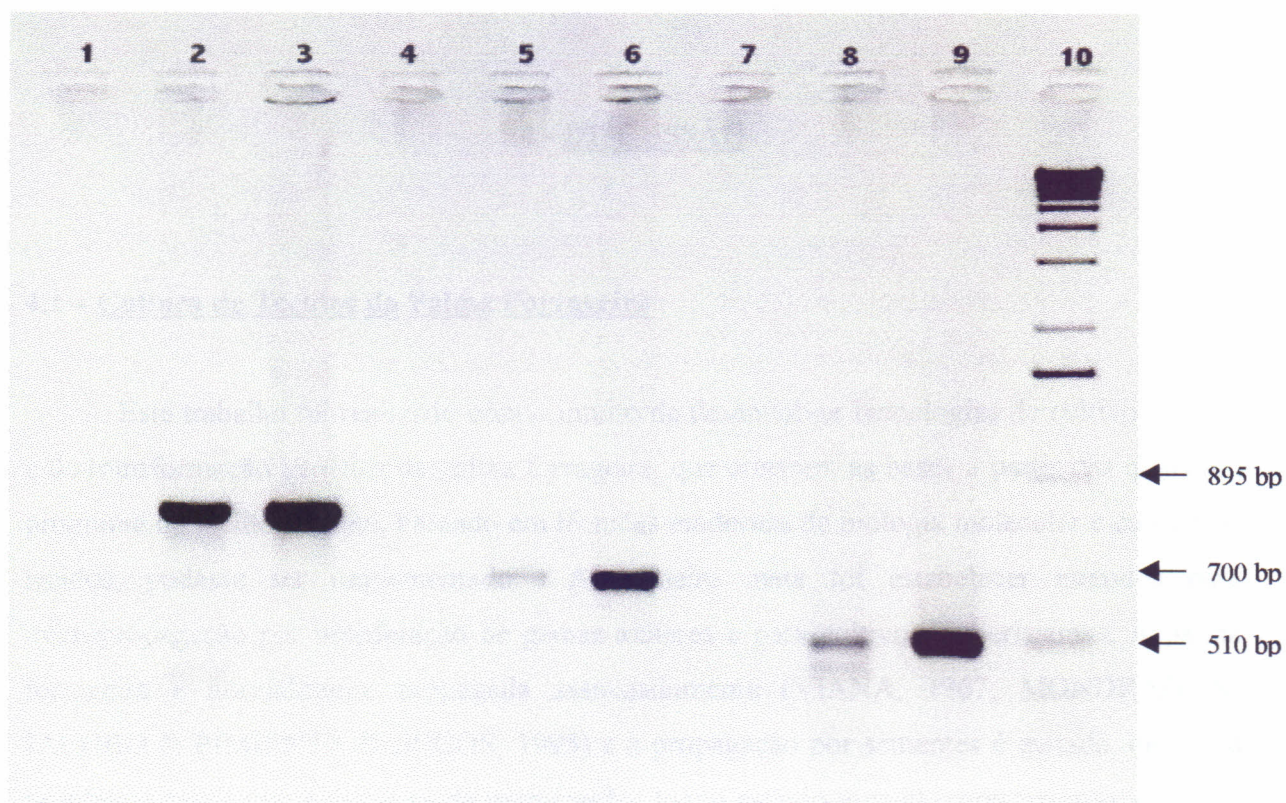


FIGURA 16 – PCR do DNA de calos friáveis de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante com *primer gus* (1, 2, 3), fragmento de 895 pb; *primer nptII* (4, 5, 6), fragmento de 700 bp e *primer tet* (7, 8, 9), fragmento de 510 bp. Linhas 1,4 e 7 calos friáveis não transformados; linhas 2, 5 e 8 calos friáveis transformados; linhas 3, 6 e 9 controle positivo (pPARGUSH) e linha 10 marcador (1 Kb *ladder*, GIBCO BRL).

4 - DISCUSSÃO

4.1 – Cultura de Tecidos da Palma Forrageira

Este trabalho foi realizado com o intuito de desenvolver tecnologias de cultivo *in vitro* e de transformação genética da palma forrageira, que criassem as bases a partir das quais um programa de melhoramento, baseado em técnicas modernas de biologia molecular e cultura de tecidos, pudesse ser implementado. A primeira meta foi estabelecer métodos para micropropagação por proliferação de gemas axilares e para cultivo de meristemas. A palma forrageira é normalmente propagada assexuadamente (VIANA, 1967; MONDRAGÓN-JACOBO & PIMIENTA-BARRIOS, 1995) e a propagação por sementes é evitada, devido a problemas tais como baixa taxa de germinação, longo estágio juvenil e crescimento lento das plântulas. O método de propagação normalmente utilizado, através do enraizamento de segmentos de cladódios maduros, não se presta a propagação rápida e econômica de clones de elite, dada a baixa taxa de multiplicação e ao fato de que para um enraizamento adequado dos propágulos, a planta matriz deve ter mais de dois anos (VIANA, 1967; SANTOS *et al.*, 1997)

O método de propagação que desenvolvemos consta de 4 etapas: (1) etapa de indução do desenvolvimento das gemas (2) etapa de crescimento, (3) etapa de proliferação e (4) etapa de enraizamento. Na primeira etapa, feita em meio MS completo, suplementado com sacarose a 5%, BA a 2,0 mg/L e IAA a 0,25 mg/L, 74% das gemas cultivadas têm seu crescimento e desenvolvimento iniciado (Tabela 5). A etapa seguinte consiste na transferência dos brotos para meio de crescimento, que se diferencia do meio anterior pela menor concentração de BA; a transferência dos brotos para o meio de crescimento é precedida pela retirada de todo o tecido suberizado na base do cladódio. O rendimento desta etapa é essencialmente 100%, ou seja, todos os brotos transferidos têm seu crescimento promovido. Na etapa de proliferação, os brotos obtidos na etapa anterior, são retirados do meio de cultura e após a retirada do ápice caulinar, cada broto produz seis explantes secundários, cada um contendo oito gemas (3.1.1.1); estes explantes são transferidos para meio de proliferação, que se distingue do meio de crescimento pela maior concentração de BA (1,0 mg/l) e a ausência de IAA. Nesta etapa,

70% das gemas cultivadas tiveram seu crescimento induzido. Após seu crescimento, cada um dos brotos ou podem ser submetidos a um novo ciclo de multiplicação ou, alternativamente, são transferidos para meio de enraizamento, onde uma percentagem de enraizamento de 100% é normalmente obtida. Este método leva a uma alta taxa de multiplicação. Por exemplo, normalmente de um cladódio jovem de 8,0 cm de comprimento, pelo menos 50 aréolas podem ser retiradas e quando transferidas para meio de indução, 74 % (37) destas têm seu desenvolvimento induzido. Na etapa de proliferação, de cada uma dos cladódios obtidos, pelo menos 34 novas plântulas podem ser obtidas. Assim, a partir de um único cladódio do qual 50 gemas são retiradas, no final de um único ciclo de multiplicação (37 x 34) 1258 plantas podem ser obtidas. Para que se possa ter uma idéia do que estes números significam, deve-se levar em conta que para plantar uma área de 1 hectare com a palma forrageira em fileiras duplas com espaçamento 1,0 x 0,5 m, são necessários 20.000 propágulos (SANTOS *et al.*, 1997). Esta taxa de multiplicação é comparável àquela obtida por ESCOBAR *et al.* (1986) na micropropagação de *Opuntia polyacantha*.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, MOHAMED-YASSEEN *et al.* (1995) publicaram um trabalho onde descreviam um método para micro-propagação de um cultivar (não nomeado) da palma forrageira dos Estados Unidos. Este método difere significativamente do protocolo aqui apresentado, não apenas em relação à suplementação de reguladores de crescimento aos meios de cultura, assim como na otimização de cada etapa de micropropagação, especialmente na etapa de proliferação. Nós encontramos que para uma alta taxa de proliferação, é importante limitar o tamanho do explante e, conseqüentemente, o número de gemas nele presente. Nós determinamos que nos explantes com mais de 8 gemas, quando estas começavam a se desenvolver era observada uma inibição no crescimento e desenvolvimento da maioria dos brotos, ocasionado provavelmente por dominância apical.

Uma vez que a otimização do protocolo para micro-propagação foi obtida, buscou-se, em seguida, o desenvolvimento de um protocolo para o cultivo de meristemas da palma forrageira. A cultura de meristemas apicais caulinares é normalmente feita utilizando-se cúpulas meristemáticas que possuam apenas um ou dois primórdios foliares, sem conexão vascular com os outros tecidos da planta (GILBERTSON & LUCAS, 1996). Em cactáceas, os

únicos exemplos de estudos para determinar os requerimentos hormonais necessários para induzir o desenvolvimento de meristemas são aqueles oriundos dos trabalhos de MAUSETH & HALPERIN (1975) e MAUSETH (1976) com *Opuntia polyacantha*.

Os requerimentos hormonais para a iniciação do desenvolvimento dos meristemas caulinares da palma forrageira (Tabela 9) foram similares àqueles encontrados por MAUSETH (1976) para *Opuntia polyacantha*. A adição de citocinina (BA) foi de fundamental importância para o desenvolvimento dos meristemas. Estes não tiveram seu desenvolvimento induzido quando cultivados em meio MS completo sem a adição de reguladores de crescimento, sugerindo que os níveis endógenos de citocininas não são suficientes para indução do desenvolvimento. Se este requerimentos de citocinina exógena para a indução do crescimento de meristemas *in vitro* é típico, apenas, de cactáceas não se sabe. Entretanto, estudos de KARTHA *et al.* (1981) indicam que a indução do desenvolvimento *in vitro* de meristemas de muitas espécies de plantas, pode ser obtido sem a adição de citocinina ao meio de cultura.

Uma observação importante foi que a adição de auxina (IAA) ao meio de indução de crescimento dos meristemas, mesmo a baixas concentrações, leva a uma massiva proliferação de calos nos explantes e estes calos rapidamente encobrem todo o meristema. Contudo após o desenvolvimento do meristema já ter sido induzido, estando o broto com aproximadamente um centímetro de comprimento, a adição de IAA é necessária para o crescimento continuado do broto (Tabela 6).

Estudos sobre os requerimentos para o desenvolvimento *in vitro* de meristemas isolados são importantes, não só por estes estudos levarem a uma maior compreensão da biologia da planta em questão, como também porque eles têm uma consequência prática para a agricultura: Devido a ausência de conexão vascular entre o meristema e os outros tecidos da planta, geralmente as plantas propagadas pelo cultivo de meristemas, são livres de doenças bacterianas, fúngicas e virais (CLARK, 1997; LOZOYA-SALDAÑA *et al.*, 1996). Dessa maneira, o método aqui apresentado para o cultivo de meristemas caulinares isolados da palma forrageira, quando combinado com o método de micro-propagação acima descrito, pode ser

utilizado para a obtenção em massa de propágulos de bom estado fitossanitário, obtidos a partir de clones de elite.

A indução de calos friáveis é uma etapa prévia para a formulação de um protocolo para obtenção de suspensões celulares e, em alguns casos, de protoplastos. Um pré-requisito para o estabelecimento de calos friáveis da palma forrageira foi a suplementação ao meio de cultura de picloram e caseína hidrolisada, além de 2,4-D, que é o regulador de crescimento mais utilizado para a indução de calos em plantas (BUITEVELD *et al.*, 1994; HOLME *et al.*, 1997). É muito provável que a friabilidade em cultura de calos, seja favorecida pela alta relação auxina/citocinina, como no caso da palma forrageira, bem como pela adição de outros componentes ao meio de cultura, tais como água de coco, uréia, prolina e caseína hidrolisada (ETIANNE *et al.*, 1997).

A alta correlação entre o aumento em diâmetro e em peso fresco (Figura 8) ($R^2=0,95$), permite afirmar que o crescimento dos calos friáveis pode ser avaliado medindo-se apenas o diâmetro dos calos. Quando na fase exponencial de crescimento, os calos da palma forrageira facilmente dão origem a suspensões celulares finas e de crescimento bastante rápido (Figura 9). Nós observamos, no entanto, que tal como em outras espécies vegetais (ARIAS-CASTRO *et al.*, 1993), para o estabelecimento da suspensão celular as características do inóculo (tamanho, idade e fase de crescimento) são importantes para a obtenção de suspensões de crescimento homogêneo. No caso da palma forrageira, a subcultura a cada 4 a 5 dias, utilizando-se um inóculo 1:25, resulta numa suspensão bastante homogênea. O crescimento de tal suspensão pode ser acompanhado tanto pela contagem de células vivas, como pela medida do volume de células empacotadas (VCE) e pelo aumento em peso fresco ou peso seco. A alta correlação encontrada entre VCE e peso fresco ($R^2= 1,0$) permite que as medidas do VCE, mais fáceis de serem avaliadas, sejam utilizadas sozinhas como indicadores do crescimento.

A percentagem de viabilidade de uma suspensão celular pode ser um parâmetro para correlacionar as células com capacidade de divisão celular, com aquelas que perderam esta capacidade (LARKIN, 1976). A suspensão celular aqui descrita, requer subcultivo a intervalos mais freqüentes que as culturas de calos das quais derivaram, devido ao crescimento acelerado

que apresentaram: as suspensões requerem subcultivo a cada 7 dias, enquanto os intervalos entre duas subculturas para a cultura de calos é de 28 dias (Figura 8 e Figura 10).

O potencial organogênico dos calos e suspensões celulares aqui obtidos, ainda não foi avaliado e esta avaliação deve ser uma meta prioritária, uma vez que tanto calos quanto suspensões celulares organogênicos são alvos preferidos para transformação genética, seja por métodos diretos ou indiretos (HANSEN & WRIGHT, 1999). A suspensão celular da palma forrageira aqui descrita, poderá ser ainda utilizada como um sistema modelo para o estudo da produção de compostos do metabolismo secundário, bem como no estudo da regulação genética do metabolismo ácido crassuláceo nesta espécie (CUSHMAN & BONERT, 1997).

A facilidade de manipulação, tem feito com que suspensões celulares sejam utilizadas com muita frequência no isolamento de protoplastos (KOMAI *et al.*, 1996). Como os protoplastos podem ser uma ferramenta útil para o melhoramento genético de plantas (via hibridização somática, por exemplo) e para o estudo da capacidade de diferentes promotores em dirigir altos níveis de expressão em células da palma forrageira, através de ensaios de expressão transiente, decidiu-se examinar a capacidade destas suspensões de dar origem a protoplastos com alto grau de viabilidade e capazes de formarem parede celular e se agregaram em microcalos.

A digestão de suspensões celulares da palma forrageira nas condições descritas no Item 3.1.4., levou à obtenção de protoplastos com uma densidade de $5,0 \times 10^5$ protoplastos por mililitro. Estes protoplastos (Figuras 11) foram capazes não apenas de formar parede celular, mas também de dividirem-se e formar microcalos (Figuras 12). A densidade de protoplastos aqui obtida ($5,0 \times 10^5$ protoplastos por mililitro) é comparável àquelas obtidas em outras espécies de plantas (2×10^4 até 2×10^6) (CHEN & CHEN, 1992; MURATA & MATHIAS, 1992; PEETERS *et al.*, 1994). Para a cultura de protoplastos, é necessário encontrar um balanço entre uma densidade mínima (abaixo da qual os protoplastos não se dividem) e a densidade máxima, acima da qual as toxinas liberadas no meio reduzem a viabilidade dos protoplastos (SHAIN, 1985). Um dos problemas mais frequentes encontrados no isolamento de protoplastos é que geralmente a proporção de protoplastos competentes para divisão

celular, é baixa em comparação com aqueles que não apresentam esta competência (MATHUR & KONCZ, 1998). Os protoplastos obtidos pelo método aqui descrito, observou-se que são altamente competentes para divisão (Figuras 12).

Este método para isolamento e cultura de protoplastos foi também utilizado para o isolamento de protoplastos de cotilédones de sementes germinantes da palma forrageira, tendo-se obtido rendimento e qualidade de protoplastos semelhante aos obtidos a partir de suspensões celulares (dados não mostrados).

A alta pressão osmótica, consequência das altas concentrações (0,7 M) de compostos osmoticamente ativos utilizados nos diferentes meios de preparação dos protoplastos (item 3.1.4.) é mais elevadas do que aquelas utilizadas para outras espécies de plantas (SARANGI *et al.*, 1992; GOLDS *et al.*, 1994; KRANZ & LÖRZ, 1994). Tal fato pode ser explicado pelas altas concentrações de ácidos orgânicos e íons (Ca, Mg, etc.) contidos no interior das células da palma forrageira (COOK *et al.*, 1995; CHEFFINGS *et al.*, 1997; MEYER & POP, 1997).

A disponibilidade de um protocolo eficiente para o isolamento de protoplastos altamente viáveis, a partir de suspensões celulares, vai tornar possível o isolamento de protoplastos a partir de suspensões celulares embriogênicas, quando estas estiverem disponíveis. Estes protoplastos poderão, assim, ser alvos para transformação e eventualmente plantas transgênicas serão obtidas.

No presente estudo, foram feitas tentativas de obter embriogênese somática a partir de explantes cotiledonários. Infelizmente, estes esforços não culminaram na obtenção de embriões somáticos, uma vez que as estruturas nodulares obtidas diretamente, a partir dos cotilédones, ou indiretamente a partir de calos cotiledonários (Figura 13, Tabela 16), não se diferenciaram em embriões somáticos quando transferidas para meio de cultura sem a suplementação de reguladores de crescimento, ou quando transferidas para meio de cultura suplementado com ABA. Na maioria dos trabalhos sobre embriogêneses somática *in vitro*, a adição de auxina ao meio de cultura ou a relação auxina/citocinina são de grande importância. Entre as auxinas normalmente utilizadas, o 2,4-D é considerado como uma das substâncias

responsáveis por desencadear os processos de embriogênese (CARIME *et al.*, 1994; SANTOS *et al.*, 1994; PILLON *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1998). A posterior transferência de estruturas pro-embriônicas, tais como as aqui observadas, para meio de desenvolvimento dos embriões é realizada em meio com baixa ou nula concentração de auxina. Alternativamente em alguns dos casos utiliza-se ABA (DODEMAN *et al.*, 1997; DONG *et al.*, 1997). A não diferenciação dessas estruturas nodulares em embriões, aqui observadas, não indica que a obtenção de embriões somáticos não seja possível e sim que para esta diferenciação, é necessário estimular a competência organogênica destas estruturas, variando-se as condições químicas e ambientais nas quais elas são cultivadas. Cotilédones de sementes germinantes têm sido utilizados freqüentemente como explantes para a obtenção de embriogênese somática em diversas espécies vegetais (EMONS, 1994). As estruturas nodulares que foram aqui observadas, assemelham-se aquelas obtidas em outras plantas (VICIENT & MARTINEZ, 1998; DODEMAN *et al.*, 1997; HUTCHINSON *et al.*, 1996; OTANI & SHIMADA, 1996; ETIANNE *et al.*, 1997), indicando assim que uma posterior manipulação das condições ambientais e/ou químicas em que estas estruturas nodulares são cultivadas, poderão culminar na formação de embriões somáticos.

4.2 – Transformação Genética da Palma Forrageira

Os estudos de transformação genética foram precedidos por ensaios que visaram avaliar a possibilidade de utilização, do antibiótico canamicina na seleção de células e/ou tecidos transformados da palma forrageira. O gene *nptII* que codifica para a enzima fosfotransferase da neomicina, que hidrolisa compostos aminoglicosídicos, como o antibiótico canamicina (KLEE *et al.*, 1987), é um dos genes marcadores mais comumente utilizados (SCHROTT, 1995). Calos friáveis da palma forrageira foram cultivados em meios de cultura contendo níveis crescentes de canamicina, sendo demonstrado que as células da palma forrageira não sobrevivem em meios de cultura contendo canamicina a uma concentração de 100 mg/L (Tabela 17). Estes níveis de canamicina são comparáveis àqueles utilizados na seleção de células transformadas de muitas outras espécies de plantas (MANOHARAN *et al.*, 1998; SHIRI & RAO, 1998). Uma confirmação posterior da utilidade da canamicina para a

seleção de células transformadas da palma forrageira, foi obtida quando do cultivo de calos transgênicos obtidos pelo bombardeamento de calos com micropartículas contendo o plasmídeo pPARGUSH. Todas as linhagens transgênicas de calos eram simultaneamente resistentes a canamicina e expressavam o gene *uidA*.

Os estudos de transformação transiente de meristemas caulinares isolados e segmentos de cladódios, após o bombardeamento de micropartículas, demonstraram a expressão do gene *uidA* nestes tecidos (Figuras 14) Esta foi a primeira vez em que a transformação genética de uma Cactaceae foi demonstrada. Esta demonstração é importante no sentido de provar que este método de transformação direta pode ser utilizado como alternativa à suposta recalcitrância da *Opuntia ficus-indica* a infecção por *A. tumefaciens* (DE CLEENE & DE LEY, 1976). Os parâmetros ótimos para o bombardeamento (pressão de tiro, distância do alvo, número de partículas, etc.), são compatíveis com aqueles utilizados em outras espécies de plantas (MAHN *et al.*, 1995; SCHULZE *et al.*, 1995; LI & GALLAGEHER, 1996; KEMPER *et al.*, 1996), confirmando assim as sugestões de SANFORD *et al.* (1991) de que este método pode ser aplicado indistintamente a qualquer espécie de planta. De particular importância para a transformação de meristemas apicais e cladódios da palma forrageira, foi a pré-incubação destes tecidos por 4 horas antes do bombardeamento em meio de cultura preparado em manitol a 0,6 M. Aparentemente estas condições protegem as células do impacto da onda de choque pela diminuição de turgescência. IGLESIAS *et al.* (1994) demonstraram a importância da plasmólise no aumento da expressão transiente em células meristemáticas de trigo. As condições ótimas para a transformação por microbombardeamento variam para cada tipo de célula e são determinadas empiricamente. Em geral, células com alta taxa de divisão e capazes de suportar o estresse do processo de transformação são as mais apropriadas (SPANGENBERG *et al.*, 1995; LI & GALAGHER, 1996). Tanto a transformação transiente, quanto a transformação integrativa parecem ser mais eficientes em células em divisão com alta atividade metabólica (MAHN *et al.*, 1995, SERRANO *et al.*, 1996). Na palma forrageira, a utilização de meristemas apicais caulinares e segmentos de cladódios provenientes de plantas jovens, pode ter contribuído para o sucesso obtido nos experimentos de transformação destes tecidos.

Os mesmos parâmetros para bombardeamento de meristemas apicais caulinares e segmentos de cladódios, foram utilizados para a transformação integrativa de calos friáveis (Figuras 15) obtidos de explantes cotiledonários. Após o bombardeamento, os calos foram transferidos para meio seletivo, sendo selecionados aqueles resistentes a canamicina e que possuísem elevados níveis de atividade glucuronidásica. Após três ciclos de seleção foram obtidos cinco linhagens de calos que apresentaram níveis médios de expressão da β -glucuronidase de 107,6 nmol pNP.mg proteína⁻¹.minuto⁻¹ (Tabela 19). Levando-se em conta que 1 μ g da enzima β -glucuronidase produz cerca de 36 nmol pNP. mg proteína⁻¹.minuto⁻¹, as linhagens de calos obtidas produzem 2,98 μ g da enzima por miligrama de proteína. Estes valores são comparáveis àqueles obtidos quando da análise de raízes de fumo transgênicas, transformadas com o mesmo plasmídeo (pPARGUSH) (VAN DER HOEVEN *et al.*, 1994). Os níveis de expressão aqui obtidos podem ser considerados altos, uma vez que os valores obtidos na produção comercial da β -glucuronidase em milho são de 0,7 % (WITCHER *et al.*, 1998). Isto demonstra que células da palma forrageira são capazes de expressar um transgene em níveis comparáveis aqueles obtidos em sistemas modelo, tais como fumo e milho e que a obtenção de plantas transgênicas, expressando altos níveis de proteínas em cladódios é factível, desde que se encontre o promotor apropriado.

As linhagens transgênicas de calos vêm sendo cultivadas em meio seletivo há aproximadamente dois anos e freqüentemente a atividade específica da GUS é avaliada e esta vem se mantendo nos níveis originais (100 nmol pNP.mg proteína⁻¹.minuto⁻¹). Adicionalmente, suspensões celulares obtidas a partir destes calos, foram utilizadas para o isolamento da β -glucuronidase. A enzima parcialmente purificada possui massa molecular e cinética (dados não mostrados) que são indistinguíveis daquelas da enzima isolada a partir de microorganismos.

A demonstração da ocorrência de transformação integrativa, foi feita através da análise da presença dos genes *uidA*, *tet* e *nptII* no DNA genômico de uma das linhagens de calos transgênicos selecionados, por experimentos de PCR (Figura 16). Os resultados destes experimentos confirmaram a ocorrência de transformação integrativa. Como experimentos de *Southern blot* não foram realizados, não é possível especular sobre o número de cópias dos

genes *uidA*, *tet* e *nptII* que estão integrados, nem tampouco sobre o arranjo destes transgenes nos cromossomos das linhagens transformadas.

Assim, baseados em critérios fenotípicos (atividade glucuronidásica e resistência a canamicina) e genéticos (amplificação dos genes *uidA*, *tet* e *nptII*) é possível concluir-se que houve integração dos genes *uidA*, *tet* e *nptII* no genoma das linhagens de calos selecionados.

5 – CONCLUSÕES

As pesquisas aqui relatadas levaram ao estabelecimento dos seguintes protocolos para o cultivo *in vitro* da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) cv. Gigante: (a) propagação em massa pela proliferação de gemas axilares; (b) regeneração de plantas através da cultura de meristemas apicais caulinares isolados; (c) indução e estabelecimento de calos friáveis e suspensões celulares; (d) isolamento e cultura de protoplastos. Os estudos para a obtenção de embriões somáticos a partir de explantes cotiledoários, mostraram a formação de estruturas pré-embriônicas, que no estanto não se diferenciaram em embriões maduros.

Além disto, conseguiu-se estabelecer protocolos para a transformação genética de diferentes explantes e calos dessa espécie vegetal através do microbombardeamento de partículas. Linhagens selecionadas de calos transformados apresentaram altos níveis de expressão do gene repórter utilizado, semelhantes aquelas obtidas em plantas de fumo e milho.

Os fundamentos metodológicos aqui estabelecidos, para um representante da família *Cactaceae*, permitirão a realização de experimentos para a regeneração e o desenvolvimento de variedades transgênicas, com características agronomicas de utilidade.

6 - APÊNDICE

Relação de publicações científicas originadas da presente Tese de Doutorado.

6.1. Trabalhos Completos

LLAMOCA-ZÁRATE, R. M., STUDART-GUIMARÃES, C., LANDSMANN, J. & CAMPOS, F.A.P. Establishment of callus and cell suspensions cultures of *Opuntia ficus-indica* Mill. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 58 (2)155-157, 1999.

LLAMOCA-ZÁRATE, R. M., PONTE, L. F. A., LANDSMANN, J. & CAMPOS, F.A.P. Biolistic-mediated transient gene expression in shoot apical meristems of the prickly-pear (*Opuntia ficus-indica*). **Brazilian Archives of Biology and Technology** 42:299-302, 1999

LLAMOCA-ZÁRATE, R. M., LANDSMANN, J. & CAMPOS, F.A.P. Establishment and transformation of callus and cell suspension cultures of the prickly-pear (*Opuntia ficus-indica*). **Journal of the Professional Association for Cactus Development** 4:27-36, 1999

LLAMOCA-ZÁRATE, R. M., PONTE, L. F. A., LANDSMANN, J. & CAMPOS, F.A.P. Whole plant regeneration from the shoot apical meristem of *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae). **Journal of Applied Botany** 73: 83-85, 1999

UCHOA, A. F., SOUZA, P.A. S., ZÁRATE, R. M. L., GOMES-FILHO, E. & CAMPOS, F. A. P. The isolation and characterization of a reserve protein from the seeds of *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 31(6)757-761, 1998.

COSTA, I. R., SOUZA, P. A. S., LLAMOCA-ZÁRATE, R. M., BLOCH, C. & CAMPOS, F. A. P. Isolation and characterization of a reserve protein from the seeds of *Cereus*

jamacaru (Cactaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 1999 (submitted).

6.2 - Comunicações em Congressos

CECATTO, V. M., ZÁRATE, R. M. L., SOUZA, M. S. & CAMPOS, F. A. P. A improved protocol for the micropropagation of the prickly-pear (*Opuntia ficus-indica*). Livro de Resumos, **XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, 1996**, Caxambu, MG. Resumo E-38

ZÁRATE, R, M. L., PONTE, L. F. A., LANDSMANN, J. & CAMPOS, F.A.P. Transient gene expression in shoot apical meristems of the prickly-pear (*Opuntia ficus-indica*). **XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, 1997**, Caxambu, MG. Resumo E-1.

LLAMOCA-ZÁRATE, R, M., GUIMARÃES, C, R. S., LANDSMANN, J. & CAMPOS, F.A.P. Establishment and transformation of callus and cell suspension cultures of the prickly-pear (*Opuntia ficus-indica*). **XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, 1998**, Caxambu, MG. Resumo E-71

LLAMOCA-ZÁRATE, R., COSTA, A. T. L., LANDSMANN, J. & CAMPOS, F.A.P. Prickly-pear protoplasts: isolation, culture and microcallus formation. **XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, 1999**, Caxambu, MG. Resumo G-27.

ZÁRATE, R, M. L., PONTE, L. F. A., LANDSMANN, J. & CAMPOS, F.A.P. Cultura de tecidos e transformação genética da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*). VII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 1999, Brasília-DF. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 11(supl.), p. 175.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIAS-CASTRO, C., SCRAGG, A. H., STAFOORD, A. & RODRIGUEZ-MENDIOLA, M. Growth characteristics of *Glycyrrhiza glabra* cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v. 34, p. 77-82, 1993.
- BORLAND, A.M. & GRIFFITHS, H. A comparative study on the regulation of C3 and C4 carboxylation processes in the constitutive crassulacean acid metabolism (CAM) plant *Kalanchoë daigremontiana* and the C3-CAM intermediate *Clusia minor*. **Planta**, v. 201, p. 368-378, 1997.
- BEETHAM, P.R., KIPP, P.B., SAWYCKY, X.L., ARNTZEN, C.J. AND MAY, G.D. A tool for functional plant genomics: Chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause *in vivo* gene-specific mutation. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, 1999. 96: 8774-8778.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Mossoro: ESAM, Coleção Mossoroense, 42, 3ª-edição, 1976.
- BRAR, M.S., AL-KHAYRI, J.M., MORELOCK, T.E. & ANDERSON, E.J. Genotypic response of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) to in vitro regeneration from cotyledon explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plants**, v. 35, p. 8-12, 1999.
- BUITEVELD, J. FRANSZ, P. F. & CREEMERS-MOLENAAR, J. Induction and characterization of embryogenic callus types for the initiation of suspension cultures of leek (*Allium ampeloprasum* L.). **Plant Science**, v. 100, p. 195-202, 1994.

- CABOCHE, M. Liposome-mediated transfer of nucleic acids in plant protoplasts. **Physiologia Plantarum**, v. 79, p. 173-176, 1990.
- CANTWELL, M. Post-harvest management of fruits and vegetable stems. In: BARBERA, G., INGLESE, P., PIMIENTA-BARRIOS, E. & ARIAS-JIMÉNEZ, E. (Eds). **Agro-Ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear**. Roma: FAO Plant Production and Protection, 1995, Paper 132, p. 120-136.
- CARIMI, F., PASQUALE, F. D. & CRASCIMANNO, F. G. Somatic embryogenesis from styles of lemon (*Citrus limon*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37, p. 209-211, 1994.
- CHEFFINGS, C. M., PANTOJA, O., ASCCROFT, F. M. & SMITH, J. A. C. Malate transport and vacuolar ion channels in CAM plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 623-631, 1997.
- CHEN, M. H. & CHEN, C. C. Plant regeneration from *Carica* protoplasts, **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 404-407, 1992
- CLAYTON, P. W., HUBSTENBERGER, J. & PHILLIPS, G. Micropropagation of members of Cactaceae subtribe Cactinae. **Journal of the American Society of Horticultural Sciences**, v. 115, n. 2, p. 337-343, 1990.
- CLARK, S. E. Organ formation at the vegetative shoot meristem. **Plant Cell**, v. 9, p. 1067-1076, 1997.
- COOK, R. M., LINDSAY, J. G., WILKINS, M. B. & NIMMO, H. Decarboxylation of malate in the crassulacean acid metabolism plant *Bryophyllum (Kalanchoë) fedtschenkoi*. **Plant Physiology**, v. 109, p. 1301-1307, 1995.

- CUSHMAN, J. C. & BOHNERT, H. J. Molecular genetics of crassulacean acid metabolism. **Plant Physiology**, v. 113, p. 667-676, 1997.
- DE BLOCK, M. The cell biology of plant transformation: Current state, problems, prospects and the implications for the plant breeding, **Euphytica**, v. 71, p. 1-14, 1993.
- DE CLEENE, M. & DE LEY, J. The host range of crown gall. **The Botanical Review**, v. 42, n. 4, p. 389-466, 1976.
- DELLAPORTA, S. L., WOOD, J. & HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p. 19-21, 1983.
- DIEFFENBACH, C. W. & DVEKSLER, G. S. (1995). **PCR Primer: A Laboratory Manual**, Cold Spring harbor laboratory Press, Cold spring Harbor, New York.
- DODEMAN, V. L., DUCREUX, G. & KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 1493-1509, 1997.
- DOMINGUES, G. Origem e introdução da Palma Forrageira no Nordeste. Recife, PE: Instituto Joaquim Nabuco de Estudos Sociais, Recife, 75p., 1963.
- DONG, J.-Z., PERRAS, M. R., ABRAMS, S. R. & DUNSTAN, D. Gene expression patterns, and uptake and fate of fed ABA in white spruce somatic embryo tissue during maturation. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 277-287, 1997.
- DRÖGE, W., BROER, I. & PÜHLER, A. Transgenic plants containing the phosphinothricin-n-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. **Planta**, v. 187, p. 142-151, 1992
- EMONS, A. M. C. Somatic embryogenesis; cell biological aspects. **Acta Botanica Neerlandensis**, v. 43, p. 1-14, 1994.

- ESCOBAR, H. A., VILLALOBOS V. M. A. & VILLEGAS, A. M. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 7, p. 269-277, 1986.
- ETIANNE, H., LARTAUD, M., CARRON, M. P. & MICHAUX-FERRÈRE, N. Use of calcium to optimize long-term proliferation of friable embryogenic calluses and plant regeneration in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 129-137, 1997.
- FARIAS, I., FERNANDES, A. P. M., LIMA, M. de A., DOS SANTOS, D. C. & FRANÇA, M. P. **Cultivo da palma forrageira em Pernambuco**. Recife: Secretaria de Agricultura, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, 1984. Instruções Técnicas do IPA. Documento n. 21
- FAY, M. F. & GRATTON, J. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and report on micropropagation at Kew. **Bradleya**, v. 10, p. 33-48, 1992.
- FELKER, P.. Forage and fodder production and utilization. In: BARBERA, G., INGLESE, P., PIMIENTA-BARRIOS, E. & ARIAS-JIMÉNEZ, E. (Eds). **Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear**. Roma: FAO Plant Production and Protection, 1995. Paper 132, pp. 144-154.
- FINER, J. J., VAIN, P., JONES, M. W. & McMULLEN, M. D. Development of particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 323-328, 1992.
- FIGURSKI, D. H & HELINSKI, D. R. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v. 76, n. 4, p. 1648-1652, 1979.
- FLORES-FLORES, V. & TEKELENBURG, A. (1995). Dacti (*Dactylopius coccus* Costa) dye production. In: BARBERA, G., INGLESE, P., PIMIENTA-BARRIOS, E. & ARIAS-

- JIMÉNEZ, E. (Eds). **Agro-ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear**. Roma: FAO Plant Production and Protection, 1995. Paper 132, pp. 167-185.
- GAFF, D. F., OKONG'O-OGOLA, O. The Use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 22, n. 72, p. 756-758, 1971.
- GAHAN, P. B. **Plant Histochemistry and Cytochemistry. An Introduction**. New York: Academic Press, 1984, 301 p.
- GARCÍA de CORTAZAR, V. & VARNERO, M.T.M. Energy Production. In: BARBERA, G., INGLESE, P., PIMIENTE-BARRIOS, E. & ARIAS-JIMÉNEZ, E. (Eds). **Agro-Ecology, Cultivation and Uses of Cactus-Pear**. Roma: FAO Plant Production and Protection, 1995. Paper 132, p. 186-191.
- GILBERTSON, R. L. & LUCAS, W.J. How do viruses traffic on the 'vascular highway'?. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 8, p. 260-268, 1996.
- GOLDSTEIN, G., ANDRADE, J. L. & NOBEL, P. S. Differences in water relations parameters for the chlorenchyma and the parenchyma of *Opuntia ficus-indica* under wet versus dry conditions. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.18, p. 95-107, 1991.
- GOLDS, T. J., BABCZINNSKY, J., MORDHORST, A. P. & KOOP, H.-U. Protoplast preparation without centrifugation: plant regeneration of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 188-192, 1994.
- GUIVARCH, A., CAISSARD, J. C., AZMI, A., ELMAYAN, T., CHRIQUI, D. & TEPFER, M. *In situ* detection of expression of the gus reporter gene in transgenic plants: ten years of beue genes. **Transgenic Research**, v. 5, p. 281-288, 1996
- HANDEL, C. L., WAGNER, C. M. MILACH, S. C. K. & FEDERIZZI, L. C. Transformação genética de cereais via *Agrobacterium tumefaciens*. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 359-365, 1997.

- HANSEN, G. & WRIGHT, M.S. Recent advances in the transformation of plants. **Trends in Plant Sciences**, v.4, p. 226-231, 1999.
- HOEKEMA, A., HIRSCH, P.R, HOYKAAS, P. J. J. & SCHILPEROORT, R. A. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T- region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, v. 303, p. 179-180, 1983.
- HOFFMANN, W. Ethnobotany. In: BARBERA, G., INGLESE, P., PIMIANTA-BARRIOS, E. & ARIAS-JIMÉNEZ, E. (Eds). **Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear**. Roma: Plant Production and Protection, 1995. Paper 132, pp. 12-19.
- HOLME, I. B., KROUGSTRUP, P. & HANSEN, J. Embryogenic callus formation, growth and regeneration in callus and suspension cultures of *Miscanthus x oriformis* Honda Giganteu's as affected by proline. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 50, p. 203-210, 1997.
- HUTCHINSON, M. J., KRISHNARAJ, S. & SAXENA, P. K. Morphological and physiological changes during thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x Hortorum bailey*) hypocotyl cultures. **Journal of Plant Sciences**, v. 157, p. 440-446, 1996
- INFANTE, R. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 31, p. 155-159, 1992.
- IGLESIAS, V. A., GISEL, A., BILANG, R., LEDUC, N., POTRYKUS, I. & SAUTTER, C. Transient expression of visible marker genes in meristem cells of wheat embryos after ballistic micro-targeting. **Planta**, v. 192, 84-91, 1994.

- JEFFERSON, R. A., BURGESS, S. M. & HIRSH, D. β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene fusion marker. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v. 83, p.84447-8451, 1986.
- JEFFERSON, R. A., KAVANAGH, T. A. & BEVAN, M. W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. **EMBO Journal**, v. 6, n. 13, p.3901-3907, 1987.
- JEFFERSON, R.A. Assaying chimeric in plants: The GUS gene fusion system. **Plant Molecular. Biology Reporter**, v. 5, p. 387-405, 1987.
- KARTHA, K. K., PAHL, K., LEUNG, N. L. & MROGINSKI, L. A. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p.1671-1679, 1981.
- KEMPER, E. L., DA SILVA, M. J. & ARRUDA, P. Effect of microprojectile bombardment parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (*Zea mays* L.) embryos. **Plant Science**, v. 121, p. 85-93, 1996.
- KLEE, H. HORSCH, R. & ROGERS, E. *Agrobacterium* mediated plant transformation and its further applications to plant biology. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, p.467-486, 1987.
- KLEIN, T. M., WOLF, E. D., WU, R. & SANFORD, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, v. 327, p. 70-73, 1987.
- KOMAI, F., MASUDA, K., HARADA. & OKUSE, I. Plant regeneration from adventitious roots of spinach (*Spinacia oleracea* L.) grown from protoplasts. **Plant Science**, v. 120, p. 89-94, 1996.

- KORTE, A. M.(1997). Entwicklung von Grundlagen für ein Regeneration- und Transformationssystem zur Induktion von Resistenz gegen das scharka-Virus (plum pox potyvirus) bei *Prunus domestica* L. **Dissertation**, Univewrsitat. Bonn., Bonn,139 p.
- KRANZ, E. & LÖRZ, H. *In vitro* fertilisation of maize by single egg and sperm cell protoplast fusion mediated by high calcium and high pH. **Zygote**, v. 2, p. 125-128, 1994.
- LANDSMANN, J., LLEWELLYN, D., DENNIS, E. S. & PEACOCK, W. J. Organ regulated expression of the *Parasponia andersonii* haemoglobin gene in transgenic tobacco plants. **Molecular and General Genetics**, v. 214, p. 68-73, 1988.
- LARKIN, P. J. Purification and viability determination of plant protoplasts, **Planta**, v. 128, p. 213-216, 1976.
- LI, H.-Q., GUO, J.-Y., HUANG, Y.-W. & LIANG, C.-Y. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 410-414, 1998.
- LI, X. & GALLAGHER, J. L. Expression of foreign genes, GUS and hygromycin resistance, in the halophyte *Kosteletzkya virginica* in response to bombardment with the Particle Inflow Gun. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p. 1437-1447, 1996.
- LOZOYA-SALDAÑA, H., ABELLÓ, J. F. & GARCIA, R. G. Electrotherapy and shoot tip culture eliminate potato virus x in potato. **American Potato Journal**, v. 4, p. 149-154, 1996.
- MAHN, A.. Untersuchugen zur Nutzung des direkten Gentransfers für die Transformation von Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.). **Diss.**, Techn. Univ. Braunschweig., Braunschweig, 1996, 136 p.

- MAHN, A., MATZK, A., SAUTTER, C., SCHIEMANN, J. Transient gene expression in shoot apical meristems of sugarbeet seedlings after particle bombardment. **Journal of Experimental Botany**, v. 46, p. 1625-1628, 1995.
- MANOHARAM, M., SREE VIDYA, C. S. & LAKSHMI SITA, G. Agrobacterium – mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var. *Pusa jwala*). **Plant Science**, v. 131, p. 77-83, 1998.
- MATHUR, J. & KONCZ, C. Protoplast Isolation, Culture, and regeneration. **Methods in Molecular Biology**, v. 82, p. 35-41, 1998.
- MAUSETH, J. D. Cytokinin- and gibberellic acid-induced effects on the structure and metabolism of shoot apical meristems in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). **Amer. Journal Botany**, v. 63, n. 10, p. 1295-1301, 1976.
- MAUSEHT, J. D. A new method for the propagation of cacti: Sterile culture of axillary buds. **Cactus & Succulent Journal**, v. 51, p. 186-187, 1979.
- MAUSETH, J. D. & HALPERIN, W. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). **American Journal of Botany**, v. 62, n. 8, p. 869-877, 1975
- McCABE, D. E., SWAIN, W. F., MARTINELLI, B. J. & CHRISTOU, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. **Bio/Technology**, v. 6, p. 9923-926, 1988.
- McGARVIE, D. & PAROLIS, H. The acid-labile, peripheral chains of mucilage of *Opuntia ficus-indica*. **Carbohydrate Research**, v. 94, p. 57-65, 1981.
- MEYER, A. & POPP, M. Free Ca²⁺ in tissue saps of calcitrophic CAM plants as determined with Ca²⁺ –selective electrodes, **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 307, p. 337-344, 1997.

- MOHAMED-YASSEEN, Y., BARRINGER, S. A., SPLITTSTOESSER, E. & SCHNELL, R. J. Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and plant establishment in soil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, p. 117-119, 1995.
- MONDRAGÓN-JACOBO, C. & PIMIENTA-BARRIOS, E. Propagation of the cactus-pear. In: BARBERA, G., INGLESE, P., PIMIENTA-BARRIOS, E. & ARIAS-JIMÉNEZ, E. (Eds). **Agro-Ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear**. Roma: FAO Plant Production and Protection, 1995. Paper 132, p. 64-70.
- ✦ MORRE, J. L., PERMINGEAT, H. R., ROMAGNOLI, M. V., HEISTERBORG, C. M. & VALLEJOS, R. H. Multiple shoot induction and plant regeneration from embryonic axes of cotton. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 54, p. 131-136, 1998.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURATA, T. & MATHIAS, R. J. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Moricandia arvensis*. **Plant Cell reports**, v. 11, p. 408-411, 1992.
- NEUHAUS, G. & SPANGENBERG, G. Plant transformation by microinjection techniques. **Physiologia Plantarum**, v. 79, p. 213-217, 1990.
- NOBEL, P. S. Environmental biology. In: BARBERA, G., INGLESE, P., PIMIENTA-BARRIOS, E. & ARIAS-JIMÉNEZ, E. (Eds). **Agro-Ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear**. Roma: FAO Plant Production and Protection, 1995. Paper 132, pp. 36-48.
- OLIVARES, E. & AGUIAR, G. Daily free sulphate fluctuations in tropical plants with crassulacean acid metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 300, p. 901-906, 1996.

- OLIVEIRA, S. A., PIRES, M. F. , PRIOLI, A. J. & MAGOLIN, C. A. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **In vitro cell. Dev. Biol.**, v. 31, p. 47-50, 1995.
- OTANI, M. & SHIMADA, T. Efficient embryogenic callus formation in sweet potato (*Ipomoea batata* (L.) Lam.). **Breeding Science**, v. 46, p. 257-260, 1996.
- PEETERS, M.-C., WILLEMS, K. & SWENNEN, R. Protoplasts-to-plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 312) using feeder layers. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 208-211, 1994.
- PILLON, E., TERZI, M., BALDAN, B., MARIANI, P. & SCHIAVO, F. L. A protocol for obtaining embryogenic cell lines from *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 9, n. 4, p. 573-577, 1996.
- PORTER, J. R. Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 10, n. 4, p. 387-421, 1991.
- RECH, E. L. & ARAGÃO, F. J. L. Biobalística. In: BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. (Eds.). **Manual de Transformação Genética de plantas**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 51-64.,
- SÁENZ-HERNÁNDEZ, C. Food manufacture and by-products. In: BARBERA, G., INGLESE, P., PIMIENTA-BARRIOS, E. & ARIAS-JIMÉNEZ, E. (Eds). **Agro-Ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear**. Roma: FAO Plant Production and Protection, 1995. Paper 132, p. 137-143.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA., 1989.

- SANFORD, J. C., KLEIN, T. M., WOLF, E. D. & ALLEN, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particle Science Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.
- SANFORD, J. C., VIT, M. J., RUSSELL, J. A., SMITH, F. D. HARPENDING, M. K., ROY, M. K. & JOHNSTON, S. A. An improved, helium-driven biolistic device. **Technique**, v. 3, p. 3-16, 1991.
- SANTOS, D. C. dos., FARIAS, I., LIRA, M. de A., TAVARES FILHO, J. J., SANTOS, M. V. F. dos., & ARRUDA, G. P. de. **A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill e *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck) em Pernambuco: Cultivo e Utilização**. Recife:IPA, 1997. (IPA. Documentos, 25), 23 p.
- SANTOS, I., GUIMARÃES & SALEMA, R. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Nerium oleander*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37, p. 83-86, 1994.
- SARANGI, B. K., KUCHUK, N. & GLEBA, Y.Y. Isolation and culture of protoplasts of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.), v. 11, p. 462-465, 1992.
- SAUTTER, C. , WALDNER, H., NEUHAUS-URL, G., GALL, A., NEUHAUS, G. & POTRYKUS, I. Micro-targeting: efficiency gene transfer using a novel approach for the acceleration of micro-projectiles. **Bio/Technology**, v. 9, p. 1080-1085, 1991.
- SCHEINVAR, L. (1995). Taxonomy of utilized opuntias. In: BARBERA, G., INGLESE, P., PIMIENTA-BARRIOS, E. & ARIAS-JIMÉNEZ, E. (Eds). **Agro-Ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear**, Roma: FAO Plant Production and Protection, 1995. Paper 132, p. 20-27.
- SCHROTT, M. (1995). Selectable marker and reporter genes. In: POTRYKUS, I. & SPANGERBERG, G. (Eds). **Gene Transfer to Plants**. Lab. Manual, pp. 325-336, Springer-Verlag, Berlin , Heidelberg.

- SCHULZE, J., BALKO, C., ZELLNER, B., KOPREK, T., HÄNSCH, R., NERLICH, A. & MENDEL, R. R. Biolistic transformation of cucumber using embryogenic suspension cultures: long-term expression of reporter genes. **Plant Science**, v. 112, p. 197-206, 1995.
- SERRANO, L., ROCHANGE, F., SEMBLAT, J. P., MARQUE, C., TEULIÈRES, C. & BOUDET, A-M. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p. 285-290, 1996.
- SHAIN, E. A. Totipotency of tomato protoplasts. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 69, p. 235-240, 1985
- SHIRI, V. & RAO, K. S. Introduction and expression of marker genes in sandalwood (*Santalum album* L.) following *Agrobacterium* – mediated transformation. **Plant Science**, v. 131, p. 53-63, 1998.
- SPANGENBERG, G., WANG, Z.-Y., WU, X., NAGEL, J. & POTRYKUS, I. Transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. **Plant Science**, v. 108, p. 209-217, 1995.
- STUPPY, W. & NAGL, W. Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. **Bradleya**, v. 10, p. 85-88, 1992.
- SULLIVAN, K. F. & KAY, S. (1998). **Green Fluorescent Proteins**. Academic Press, 1998, 450 p.
- TRACHTENBERG, S. & FAHN, A. The mucilage of *Opuntia ficus-indica*(L.) Mill.-development, ultrastructure, and mucilage secretion. **Botanical Gazette**, v. 142, n. 2, p. 206-213, 1981.

- VAN DER HOEVEN, C. (1992). Untersuchung zur Variabilität von gentechnisch veränderten Tabakpflanzen mit Resistenz- und Reporter genen. **Diss.**, Univ. Hannover, Hannover, 150p.
- VAN DER HOEVEN, C., DIETZ, A. & LANDSMANN, J. Variability of organ-specific gene expression in transgenic tobacco. **Transgenic Research**, v. 3, p. 159-165, 1994.
- VIANA, O.J. Pastagens de cactáceas nas condições do nordeste. **Revista Brasileira de Zootecnia**, VII(2): 55-68, 1967
- VICIENT, C. M. & MARTINEZ, F. X. The potencial uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.**, v. 10, p. 1-12, 1998.
- VIETMEYER, N. Lesser-known plants of potenTial use in agriculture and forestry. **Science**, v. 232, p. 1379-1384, 1986.
- WANG, N., ZHANG, H. & NOBEL, P. S. Phloem-xylem water in debveloping cladodes of *Opuntia ficus-indica* during sink-to-source transition. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 308, p. 675-682, 1997.
- WILMINK, A. & DONS, J. J. M. Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, p. 165-185, 1993.
- WITCHER, D. R., HOOD, E. E., PETERSON, D., BAILY, M., BOND, D., KUSNADI, A., NIKOLOV, Z., WOOG, C., MEHIGH, R., KAPPEL, W., REGISTER, J. & HOWARD, J. Commercial production of β -glucuronidase (GUS): a model system for the production of proteins in plants. **Molecular Breeding**, v. 4, p. 301-312, 1998.

WU, C. & SHIMAMOTO, K. Electroporation-Mediated Gene Transfer to Japonica Rice Protoplasts and Regeneration of Transgenic Plants. In: POTRYKUS, I. & SPANGERBERG, G. (Eds.). **Gene Transfer to Plants**. Lab. Manual, pp. 93-105, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

YANISH – PERRON, C., J. VIEIRA & J. MESSING. Improved M 13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M 13mp 18 and pUC 19 vectors. **Gene**, v. 33, p. 103-119, 1985.

YODER, J. I. & GOLDSBROUGH, A. P. Transformation systems for generating marker-free transgenic Plants. **Bio/Technology**, v. 12, p. 263-267, 1994.

ZHONG, H., WANG, W. & STICKLEN, M. In vitro morphogenesis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench: Efficient plant regeneration from shoot apices. **Journal of Plant Physiology**, v. 153, p. 719-726, 1998.