

**Meios de Cultivo *In Vitro* e
Transformação Genética de
Arroz (*Oryza sativa*) Mediada
por *Agrobacterium*
*tumefaciens***



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1678-9601

Dezembro, 2005

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 18

Meios de Cultivo *In Vitro* e Transformação Genética de Arroz (*Oryza sativa*) Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Rosângela Bevitóri

Santo Antônio de Goiás, GO
2005

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão

Rodovia GO 462 - Km 12 - Zona Rural - Caixa Postal 179

75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO

Fone: (62) 3533 2123

Fax: (62) 3533 2100

www.cnpaf.embrapa.br

sac@cnpaf.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Carlos Agustin Rava*

Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*

Membros: *Josias Correa de Faria*

Supervisor editorial: *Marina A. Souza de Oliveira*

Revisão gramatical: *Vera Maria T. Silva*

Normatização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*

Capa: *Fernando B. P. Simon*

Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1ª edição

1ª impressão (2005): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Arroz e Feijão

Bevitóri, Rosângela.

Meios de cultivo *in vitro* e transformação genética de arroz (*Oryza sativa*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* / Rosângela Bevitóri. – Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2005.

23 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9601 ; 18)

1. Arroz – Cultura de Tecido. 2. Arroz – Transformação Genética.
I. Título. II. Embrapa Arroz e Feijão. III. Série.

CDD 633.18233 (21. ed.)

© Embrapa 2005

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução	9
Material e Métodos	10
Produção de calos e regeneração de arroz	10
Cultura de <i>Agrobacterium</i> e produção de células bacterianas	12
Transformação	13
Ensaio de atividade GUS	13
Análise estatística	14
Resultados e Discussão	14
Produção de calos e regeneração de arroz	14
Transformação	17
Ensaio de atividade GUS	18
Conclusões	20
Referências Bibliográficas	20

Meios de Cultivo *In Vitro* e Transformação Genética de Arroz (*Oryza sativa*) Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Rosângela Bevitóri¹

Resumo

Neste trabalho, objetivou-se testar meios de cultura de tecido para posterior utilização na transformação do arroz mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, que diferiram quanto à composição do meio de cultura e doses dos reguladores de crescimento. O meio de indução que proporcionou a maior frequência de calos foi o meio MS modificado por Xie et al. (1990). A frequência média de indução de calos foi de 89,6 e 95% para as cultivares Basmati 370 e Primavera, respectivamente. A frequência média de regeneração variou de 6,7 a 18,3% para a cultivar Primavera e 9,0 a 25% para Basmati 370. Apesar de não ter ocorrido diferença significativa entre os meios de regeneração utilizados, as maiores frequências de regeneração de plantas foram obtidas com o meio MS modificado contendo citoquinina e ácido a-naftaleno acético. Para aumentar a frequência de regeneração das plântulas, utilizou-se o meio de regeneração MS modificado por Xie et al. (1990) suplementado com 15% de água de côco. A frequência média de regeneração neste meio foi 39%. Para a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizou-se o isolado LBA4404, contendo o plasmídeo pTOK233. A expressão transiente de GUS foi otimizada pela aplicação de vácuo do substrato aos calos transformados com *Agrobacterium* e posterior incubação a 37°C por uma noite. Houve expressão de GUS em 67% dos calos.

Palavras-chave: regeneração de arroz, transgênico, cultura de tecido.

¹ Engenheira Agrônoma, Ph.D. em Biotecnologia, Embrapa Arroz e Feijão. Rod. GO 462, Km 12, 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO. bevitori@cnpaf.embrapa.br

***In Vitro* Culture Media and *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Rice (*Oryza sativa*)**

Abstract

*The objective of this study was to test tissue culture medium to be used in *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation. Calli derived from cultivars Primavera and Basmati 370 mature seeds were used as target tissue for transformation. Three calli induction media and four regeneration media were used which differed in composition and growth regulators doses. The MS media modified by Xie et al. (1990) provided the highest calli frequency, 89,6% and 95% to Basmati 370 and Primavera, respectively. Although, no significant differences were obtained, the highest number of regenerated green plants was observed from calli induced on MS medium containing kinetin and α -naftaleno acetic acid. The average ranged from 6.7-18.3% to Primavera and 9.0-25% to Basmati 370. To improve regeneration, the MS medium modified by Xie et al. (1990) was supplemented with 15% coconut water, which increased the regeneration frequency to 39%. The *Agrobacterium*-mediated transformation was carried out using the strain LBA4404, harboring the binary vector pTOK233. The transient expression of GUS was optimized by applying vacuum to deliver the substrate to the transformed calli. The GUS expression corresponded to 67% of the calli.*

Key words: rice regeneration, transgenic.

Introdução

As modernas ferramentas genômicas, que incluem técnicas de engenharia genética e mutagenese insercional para estudo da função de genes, utilizam o cultivo *in vitro* nos processos de transformação de plantas. Para que a transformação genética se torne capaz de gerar um produto final é preciso otimizar as condições do cultivo *in vitro* para permitir a regeneração das plantas. Conseqüentemente, a escolha do meio de cultivo apropriado é de fundamental importância para a produção de plantas transgênicas. No caso do arroz, existem poucos genótipos de origem tropical com características desejáveis e protocolo definido para a produção de calos embriogênicos friáveis com alta capacidade de regeneração de plantas *in vitro*.

O primeiro relato de regeneração de plantas de arroz por cultura de tecido data de 1968 (Tamura, 1968). Desde então, vários trabalhos de pesquisa sobre este assunto foram publicados visando o estabelecimento e otimização de meios de cultura para diferentes espécies de plantas. Em arroz, a capacidade de regeneração depende do genótipo e de sua interação com as condições de cultivo (Al-khayri et al., 1996; Zhang & Hattori, 1996). Genótipos do grupo *japonica* são mais responsivos à formação de calos que os do grupo *indica* (Chen et al., 1991) enquanto os deste último grupo são mais fáceis de regenerar que os do grupo *japonica* (Lentini & Martinez, 1992). Araújo (1994) avaliou 19 genótipos de arroz e observou grandes diferenças na indução de calos e regeneração das plantas. Há, portanto, necessidade de selecionar novos genótipos com estas características. Além disso, a composição dos meios de cultura e, especialmente, o tipo, o balanço e a dose dos reguladores de crescimento deverão ser adequados para cada genótipo e condição em particular.

Dentre os vários métodos de transformação, o sistema mediado pela *Agrobacterium tumefaciens* tem sido amplamente utilizado por vários autores (Upadhyaya et al. (2000), Garg et al. (2002), Schünmann et al. (2003), Breittler et al. (2004), em diversas espécies de plantas tais como arroz, milho, soja, algodão, tomate (Decléene & Delwy, 1976). Neste sistema, a bactéria tem a habilidade de transferir uma parte de seu plasmídeo, denominado Ti, para o genoma das plantas. Este método de transformação tem sido eficiente porque somente uma ou poucas cópias do T-DNA bacterial contendo o transgene são integradas ao genoma do hospedeiro (Klee et al., 1987).

Para selecionar células geneticamente transformadas ou modificadas, o gene *gus*, que codifica a enzima beta-glucuronidase (GUS) tem sido amplamente utilizado como um gene repórter em animais e plantas em diferentes sistemas de transformação. Porém, a expressão *gus* é considerada apenas como uma evidência da transformação, sendo necessário outras análises para servir como prova definitiva da integração do gene *gus* no genoma da planta (Potrykus, 1990). O ensaio histoquímico, método qualitativo para identificação de plantas ou tecidos transgênicos, baseia-se na clivagem do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-glucuronídeo (X-Gluc). O produto desta reação, na presença de oxigênio, forma dímeros, resultando em um precipitado insolúvel na cor azul (Jefferson, 1987).

O objetivo desta pesquisa foi o de testar meios de indução de calos e de regeneração de plantas verdes, descritos anteriormente para outras cultivares de arroz, e utilizar os mais adequados nos estudos de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Material e Métodos

Produção de calos e regeneração de arroz

Foram produzidos calos a partir de sementes maduras de Basmati 370 (grupo *indica*) e Primavera (grupo *japonica*). As sementes descascadas foram lavadas com água esterilizada contendo duas gotas de Tween, lavadas uma vez com álcool 70% e posteriormente desinfetadas com 30% de uma solução comercial contendo 1% de hipoclorito de sódio (NaClO) por 20 minutos e lavadas três vezes com água destilada estéril. As sementes das duas cultivares foram colocadas em placas de Petri, contendo os meios de indução de calos descritos na Tabela 1. O meio descrito por Xie et al. (1990) é o MS (Murashige & Skoog) com modificações. O descrito por Chu et al. (1975) é o meio N6 e o descrito por Garg et al. (2002) é o N6 modificado por este autor. Posteriormente, as sementes foram mantidas no escuro, a uma temperatura de 27 °C com 16 horas de luz, onde permaneceram por um período de 15-21 dias.

A frequência de indução de calos para cada cultivar foi estimada de acordo com a fórmula:

$$\text{Frequência de calos} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de sementes com calos}}{\text{N}^\circ \text{ total de sementes}} \times 100$$

Tabela 1. Meios de indução de calos provenientes de semente madura de arroz.

Garg et al. (2002) : macronutrientes MS 100 ml/L; micronutrientes MS 50 ml/L; vitaminas 1 ml/L; CaCl₂ 50 ml/L; 2,4-D 3 mg/L; BAP (6-benzilaminopurina) 0,2 mg/L; caseína 300 mg/L; maltose 30 g/L; agar 8 g/L; pH=5,8

Chu et al. (1975): macronutrientes N6 100 ml/L; micronutrientes N6 50 ml/L; vitaminas 1 ml/L; KH₂PO₄ 100 ml/L; MgSO₄ 100 ml/L; ferro 25 ml/L; sucrose 30g/L; caseína 0,3 g/L, prolina 2,8 g/L; 2,4-D 2 mg/L; 8 g/L agar; pH =5,7

Xie et al. (1990): macronutrientes MS 100 ml/L; micronutrientes MS 50 ml/L; vitaminas 1 ml/L; cinetina 1 ml/L; sucrose 50 g/L; 8 g/L agar; pH =5,7

Foram produzidos, também, calos a partir de panículas imaturas de Basmati 370. Segundo a descrição de Araújo (1994), este estágio é obtido quando a distância entre a aurícula da penúltima folha e a base interna da folha bandeira está em torno de 1 cm. As panículas imaturas (1-4 cm de comprimento, com espiguetas de coloração branca e levemente amarela), envolvidas pelas bainhas, foram coletadas de plantas cultivadas em casa de vegetação. As bainhas foram cortadas com auxílio de uma tesoura esterilizada e colocadas em placas de Petri estéreis e, com a ajuda de duas pinças também esterilizadas, fez-se um corte transversal e central para a retirada das panículas. Em câmara de fluxo laminar, as panículas imaturas foram desinfetadas com 30% de uma solução comercial contendo 1% de hipoclorito de sódio por 40 a 60 minutos.

O meio de cultura utilizado para a indução de calos das panículas foi o meio MS, modificado por Xie et al. (1990) e as sementes maduras e as panículas imaturas permaneceram neste meio durante 25-30 dias.

A frequência de indução de calos foi estimada da seguinte maneira:

$$\text{Frequência de indução de calos} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de espiguetas (sementes) com calos}}{\text{N}^{\circ} \text{ de calos transferidos}} \times 100$$

Após a formação de calos embriogênicos provenientes de sementes maduras, estes foram excisados e transferidos aspticamente para placas de Petri

contendo meios de regeneração descritos na Tabela 2. Aldemita & Hodges (1996), Rashid et al. (1996) e Toki (1997) utilizaram-se do meio de regeneração MS, porém com diferentes modificações. O mesmo procedimento foi realizado nos calos derivados da paniculas imaturas porém o meio de regeneração foi o MS modificado por Xie et al. (1990).

Tabela 2. Meios de regeneração de plantas.

Aldemita & Hodges (1996): macronutrientes MS 100 mL/L; micronutrientes MS 50 mL/L; citoquinina 2,5 mg/L; 0,1 mg/L ácido acético -?- nãfitaleno (AAN); 30 g/L sucrose; agar, pH=5,8

Toki (1997): macronutrientes MS 100 mL/L; micronutrientes MS 50 mL/L; vitaminas 1 mL/L; sorbitol 30g/L; caseína 2g; citoquinina; 2 mg/L; AAN 0,02 mg/L; agar; pH=5,7

Rashid et al. (1996): macronutrientes MS 100 mL/L; micronutrientes MS 50 mL/L; vitaminas 1 mL/L; sorbitol 30g/L; sucrose 30g/L; benzilaminopurina 2 mg/L, AAN 1 mg/L, agar; pH=5,8

Ms mod. Xie et al. (1990): macronutrientes MS 100 mL/L; micronutrientes MS 50 mL/L; vitaminas 1 mL/L; sucrose 40 g/L; AAN 3 mg/L; citoquinina 8 mg/L; pH = 6,5

A cada 15 dias fez-se repicagens para meios frescos, por três vezes até a obtenção das plântulas verdes.

A frequência de regeneração de plantas foi calculada da seguinte maneira:

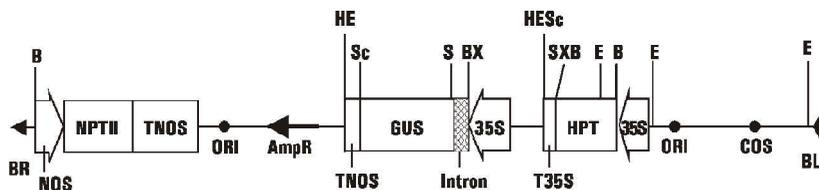
$$\text{Frequência de regeneração de plantas} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de plântulas obtidas}}{\text{N}^\circ \text{ de calos transferidos}} \times 100$$

De posse destes resultados, calos foram produzidos a partir de sementes maduras de Primavera, conforme descrito anteriormente, para utilização nos estudos de transformação de arroz.

Cultura de *Agrobacterium* e produção de células bacterianas

O isolado LBA4404, contendo o vetor binário pTOK233 (Figura 1), foi riscado no meio sólido LB, contendo 50 mg/L de canamicina e higromicina, e incubado a 28°C

por dois dias. Uma única colônia foi transferida para 20 mL de LB, contendo os mesmos antibióticos seletivos para incubação a 28°C e a 200 rpm por uma noite. Posteriormente, 10 mL desta suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm, e ressuspendida com 10 mL de MS líquido contendo os mesmos antibióticos seletivos e, também, acetosiringona (200 µM). Esta suspensão foi incubada por duas horas a 28°C e a 200 µpm. Depois de alcançar a Densidade ótica = 1 (600 nm), a cultura de *Agrobacterium* foi usada imediatamente para co-cultivo com os calos.



Abreviações: BR: borda direita; BL: borda esquerda; NPTII: neomicina fosfotransferase;

GUS: β-glucuronidase; HPT: higromicina fosfotransferase; NOS: promotor nopalina sintase; 35S: promotor 35S; TNOS: 3' sinal nopalina sintase; T35S: 3' sinal de nopalina sintase; ORI: origem de replicação de ColE1; AmpR: gene de resistência a ampicilina ativo em *Escherichia coli*; B: *Bam*HI; E: *Eco*RI; H: *Hind*III; S: *Sal*I; SC: *Sac*I; X: *Xba*II.

Fig. 1. T-DNA regiões de pTOK233.

Transformação

Os calos foram imersos na suspensão bacteriana por dez minutos, e, posteriormente, colocados sobre papel filtro esterilizado para retirar o excesso de bactéria e transferidos para o meio de indução de calos Xie et al. (1990), suplementado com 200 µM de acetosiringona e 50 mg/L higromicina e incubados por dois dias no escuro, a 26°C. Depois do período de co-cultivo, os calos foram lavados com água esterilizada contendo 500 mg de ácido clavulânico e transferidos para o meio de seleção contendo 50 mg/L higromicina e 500 mg/L de ácido clavulânico e cultivados por três semanas no escuro a 28°C.

Ensaio de atividade GUS

A expressão de GUS em calos de arroz foi realizada conforme Jefferson (1987). Os calos foram imersos em solução de X-Gluc contendo 50 µM de tampão fosfato, 1 mg/mL X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-glucuronídeo), 0,5% Triton X-100 e 20% metanol. Os calos imersos nesta mistura foram incubados por uma hora a 37°C, quando foram lavados e imersos em álcool 70% para visualização.

Posteriormente, os calos foram transferidos para um tubo contendo etanol 100% e a cor azul foi avaliada visualmente. Calos sem nenhum ponto azul detectável foram contados como GUS-negativo, ou como GUS-positivo, se qualquer ponto, faixa ou traço azul estivesse presente no calo.

Em outro experimento, para aumentar a expressão de GUS, a solução X-Gluc foi aplicada a vácuo aos calos por alguns minutos e os calos imersos nesta mistura foram incubados a 37° C. Os procedimentos de lavagem e visualização dos calos foram os mesmos citados anteriormente.

Para otimizar a regeneração de plantas a partir de calos provenientes de sementes maduras da cultivar Primavera, utilizou-se, também, o meio de regeneração MS modificado por Xie et al. (1990) suplementado com 15% de água de coco, que foi coada em papel filtro por seis vezes para retirar todas as impurezas e posteriormente autoclavada e guardada em alíquotas de 150 mL.

Análise estatística

Nos experimentos de indução de calos, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições e três tratamentos, constituído dos meios dos cultivo MS, modificado por Garg et al. (2002) e Xie et al. (1990), e meio N6, conforme Chu et al. (1975).

Nos experimentos de regeneração de plantas, o delineamento foi também o inteiramente casualizado, com três repetições e quatro tratamentos, constituído dos meios de regeneração MS, modificados por Xie et al. (1990), Aldemita & Hodges (1996), Rashid et al. (1996) e Toki (1997).

Os dados foram submetidos à ANOVA e para comparação entre as médias das frequências utilizou-se o teste t, a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Produção de calos e regeneração de arroz

Utilizaram-se 200 sementes, distribuídas em 20 placas de Petri com dez sementes cada. O início da formação dos calos nas sementes maduras, sobre os meios de indução de calos, variou de 7 a 12 dias, após iniciado o cultivo *in*

vitro, dependendo do meio. A iniciação dos calos se deu aos 7 dias, quando se utilizou o meio MS modificado por Garg et al. (2002), enquanto nos outros meios, os calos iniciaram aos 12 dias. Pôde-se observar que os calos cultivados nesse meio eram maiores que os formados nos outros meios de cultura, entretanto, a frequência de indução neste meio MS modificado por Garg et al. (2002) foi menor que aqueles provenientes dos demais meios (Tabela 3). A formação de calos variou de 7-21 dias. A proliferação de calos ocorreu na última semana de cultivo. O tamanho dos calos variou de 0,4-0,8 cm, para todos os meios de indução usados. A frequência média de indução de calos variou de 57,1 a 100% para a cultivar Basmati 370, nos diferentes meios de indução (Tabela 3). No meio de indução MS modificado por Garg et al. (2002), a frequência média de indução de calos da cultivar Primavera, foi de apenas 62,7%, menor do que a obtida pelo mesmo autor.

Tabela 3. Frequência média (FM) de indução de calos de duas cultivares de arroz, obtidos a partir de sementes maduras, em três meios de indução¹

<i>Meio de indução</i>	<i>FM de indução (%)*</i>	
	<i>Basmati-370</i>	<i>Primavera</i>
Xie et al. (1990)	100,0	95,0 a
Chu et al. (1975)	98,7 a	—
Garg et al. (2002)	57,8 b	62,7 b

¹As porcentagens basearam-se no número total de sementes variando de 70-75.

*As médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste t.

Utilizaram-se dez panículas por placa de Petri contendo meio de indução. As panículas imaturas foram mantidas também no escuro e à temperatura de 26°C. O início da formação dos calos variou de dez a 18 dias. Em trabalho realizado por Araújo (1994) utilizando esta mesma cultivar, o início da formação de calos se deu em seis dias. A proliferação de calos ocorreu entre a terceira e quarta semana, coincidindo com os resultados do mesmo autor. Os calos formaram-se inicialmente no pedicelo e depois nas ramificações secundárias e espiguetas das panículas, coincidindo também com os resultados de Araújo (1994). A frequência média de indução de calos foi de 89,6% e 95%, para as cultivares Basmati 370 e Primavera, respectivamente (Tabela 4). Resultados semelhantes obtidos com a cultivar Basmati 370 foram também obtidos por Araújo (1994).

Tabela 4. Freqüência média (FM) de indução de calos da cultivar Basmati 370, a partir de panículas maduras¹.

<i>Cultivar</i>	<i>FM de indução (%)*</i>
Basmati-370	85,7 a
Primavera	95,0 b

¹As porcentagens basearam-se no número total de espiguetas variando de 52-80.

*As médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste t.

O início da formação de raízes e da parte aérea das plântulas, nos diversos meios de regeneração, variou de 6 a 15 dias, respectivamente. Muitos calos iniciaram o processo, porém morreram antes de completar a regeneração.

As médias das freqüências de regeneração de plantas foram obtidas a partir de dez calos por genótipo. A freqüência média de regeneração variou de 6,7 a 18,3% para a cultivar Primavera e 9,0 a 25% para Basmati 370 (Tabela 5). Apesar de não ter havido diferença significativa entre os meios de regeneração utilizados, as maiores freqüências de regeneração de plantas foram obtidas com os meios MS modificados por Aldemita & Hodges (1996) e Toki (1997), para as cultivares Primavera e Basmati 370, respectivamente. Este resultado é considerado baixo e difere daquele encontrado por Araújo (1994), cuja média de regeneração da cultivar Basmati 370 foi em torno de 32,84%. Isto pode ser devido ao fato de que estas sementes estavam velhas.

Tabela 5. Freqüência média (FM) de regeneração de plantas de duas cultivares de arroz.

<i>Meio de indução descrito por</i>	<i>FM de regeneração (%)*</i>	
	<i>Basmati-370</i>	<i>Primavera</i>
Aldemita & Hodges (1996)	20,1	18,3
Rashid et al. (1996)	20,1	6,7
Toki (1997)	25,0	15,5
Ms modificado Araújo (1994)	9,0	14,0

*As médias não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste t.

Os calos cultivados em meio MS suplementado com 15% de água de coco exibiram maior capacidade de regeneração que aqueles cultivados sem água de coco. No primeiro, os calos iniciaram a regeneração aos 13-15 dias cultivo, exibindo pequenas raízes e algumas áreas verdes (Figura 2A). Ao contrário, os calos em

cultivo em meio MS sem a suplementação com água de coco, ainda não apresentavam radículas e nem início de parte aérea aos 15 dias (Figura 2B). A frequência média de regeneração nos meios MS sem e com de coco foi de 10% e 39%, respectivamente. A água de coco é constituída por vários reguladores de crescimento, tais como citoquinina, auxina, giberelina, dentre outros, e tem sido utilizada em meios de cultura para aumentar o desenvolvimento do calos e em regeneração de plantas tais como espinafre (Al-Khayri, 1991).

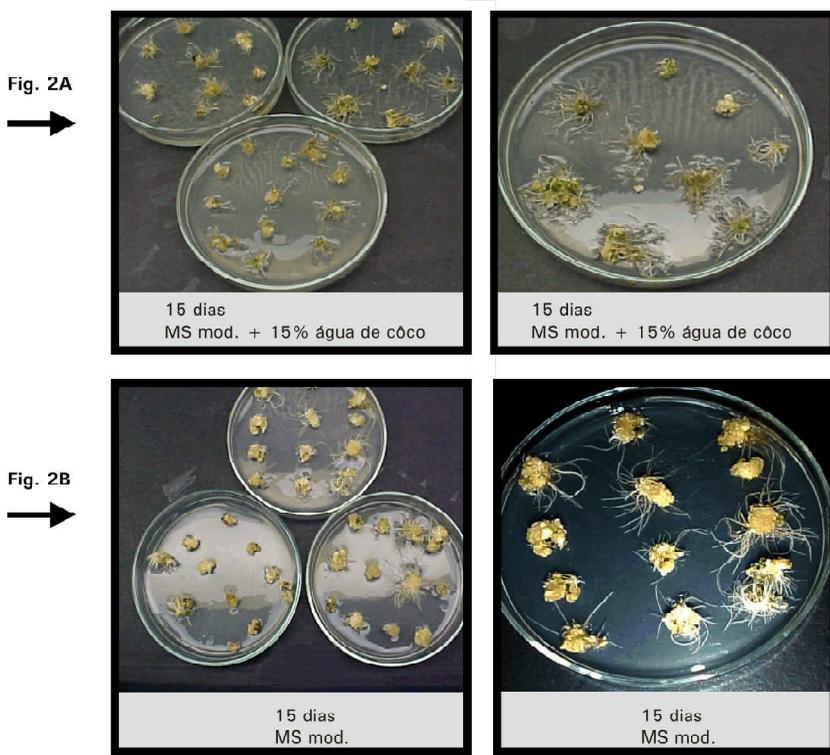


Fig. 2. Calos de arroz em meio de regeneração suplementado com 15% de água de coco.

Transformação

O isolado LBA4404 é amplamente usado para transformação de arroz (Chan et al., 1992; Hiei et al., 1994; Aldemita & Hodges, 1996; Dong et al., 1996; Uzé et al.,

1997; Khanna & Raina, 1999; Mohanty et al., 1999; Garg et al., 2002) como também o vetor binário pTOK233 (Hiei et al., 1994; Aldemita & Hodges, 1996; Dong et al., 1996; Uzé et al., 1997; Mohanty et al., 1999) pelo fato de ser efetivo em estudos de expressão transiente de GUS em arroz. Os meios utilizados na transformação estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Meios usados para transformação de arroz, cultivar Primavera.

Meio de cultura	Composição
Cultura de <i>Agrobacterium</i>	LB*, 50 mg/L higromicina; 50 mg/L canamicina, agar LB, 50 mg/L higromicina; 50 mg/L canamicina.
Pré-inóculo de bactéria	MS sais, 200 µM acetosiringona
Suspensão de <i>Agrobacterium</i>	Meio MS modificado por Xie et al. (1990), 200 µM acetosiringona
Co-cultivo	
Meio de seleção	Meio MS modificado por Xie et al. (1990), 50 g/L higromicina, 500 mg/L ácido clavulânico

*Luria-Bertani

Ensaio de atividade GUS

Atividade de GUS foi observada em quatro calos, representando 19% de expressão GUS. O regulador de crescimento 2,4-D é comumente usado em cultivo *in vitro* para suprimir o desenvolvimento morfológico e induzir a formação de calos em monocotiledôneas (Hodges et al., 1990). De acordo com resultados de Li et al. (1992), este regulador de crescimento tem dois importantes efeitos sobre a expressão transiente em calos de arroz. Primeiro, se as sementes estiverem presentes no meio de indução de calos contendo 2,4-D, a supressão transiente de GUS é reduzida. Para a cultivar IR54, estudada por este autor, 0,5 mg/L de 2,4-D não inibiu muito a expressão de GUS mas a inclusão de 2 mg/L de 2,4-D no meio a reduziu substancialmente. Esta concentração foi utilizada no meio de indução de calos no presente estudo e pode ter contribuído para a baixa expressão de GUS nos calos. O segundo efeito do 2,4-D na expressão transiente de GUS é que a adição de 6 mg/L deste regulador de crescimento no meio de co-cultivo aumenta a expressão de GUS e, de acordo com o mesmo autor, pode melhorar a probabilidade de se obter calos transformados com alta frequência. Outro fator que influencia a expressão transiente de GUS é o grupo a que pertence a cultivar. Li et al. (1992) relatam que a expressão de GUS é maior nas cultivares do grupo *indica*. A frequência de expressão em cultivares do grupo *japonica* foi metade a um terço menor que das cultivares *indica*.

Com base nestes resultados, a otimização da expressão transiente de GUS em calos de arroz, mediada por *Agrobacterium* foi efetuada pela aplicação de vácuo do substrato aos calos transformados e posterior, inoculação a 37 °C por uma noite. A atividade de GUS foi então observada em dez calos, representando 67% de expressão GUS.

A Figura 3 representa o processo de indução, regeneração e transformação dos calos.

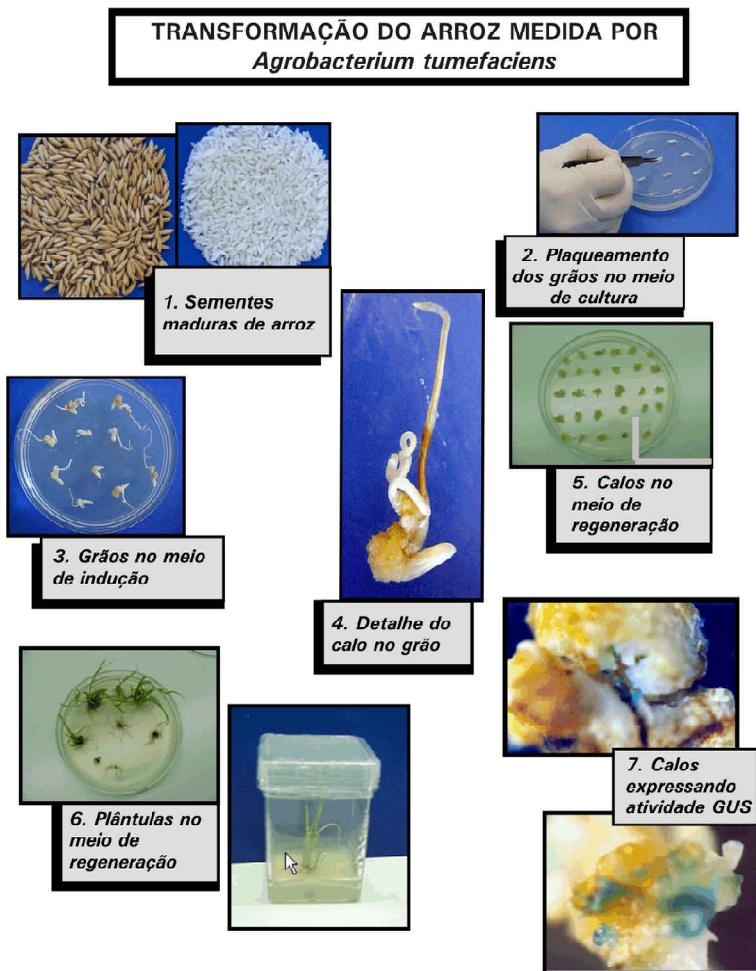


Fig. 3. Transformação e regeneração de calos de arroz induzidos à partir de semente madura.

Conclusões

- 1- O protocolo para transformação de arroz mediada por *A. tumefaciens* foi estabelecido para a cultivar Primavera;
- 2- O meio de indução que mais proporcionou calos foi o meio MS modificado por Xie et al. (1990).
- 3- Os meios MS modificados por Aldemita & Hodges (1996) e por Toki (1997) foram os que proporcionaram maior frequência de regeneração de plantas das cultivares Primavera e Basmati 370, respectivamente.

Referências Bibliográficas

ALDEMITA, R. R.; HODGES, T. K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *japonica* and *indica* rice varieties. **Planta**, New York, v. 199, n. 4, p. 612-617, Aug. 1996.

AL-KHAYRI, J. M. **In vitro regeneration, sex alteration, genetic transformation and DNA isolation in spinach (*Spinacia oleracea*)**. 1991. 110 f. Thesis (Doctor of Philosophy) - University of Arkansas, AR.

AL-KHAYRI J. M.; SHAMBLIN, C. E.; MCNEW, R. W.; ANDERSON, E. J. Callus induction and plant regeneration of U. S. rice genotypes as affected by medium constituents. **In Vitro Cellular & Development Biology**, Gaithersburg, v. 32, n.4, p. 227-232, Oct./Dec. 1996.

ARAÚJO, L. G. **Varição somaclonal em arroz, com relação a resistência à brusone**. 1994. 140 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

BREITLER, J. C.; MEYNARD, D.; BOXTEL, J. van; ROYER, M.; BONNOT, F.; CAMBILLAU, L.; GUIDERDONI, E. A novel two T-DNA binary vector allows efficient generation of marker-free transgenic plants in three elite cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). **Transgenic Research**, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 271-287, June 2004.

CHAN, M. T.; LEE, T. M.; CHANG, H. H. Transformation of *indica* rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 33, n. 5, p. 577-583, July 1992.

CHEN, C. C.; TSAY, H. S.; HUANG, C. R. Factors affecting androgenesis in rice (*Oryza sativa* L.). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Rice**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p. 193-215. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 14).

CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; CHEN, H.; YIN, K. C.; CHU, C. Y.; BI, F. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, Peking, v. 18, n. 5, p. 659-668, 1975.

DECLEENE, M.; DELWY J. The host range the crown gall. **Botanical Review**, New York, v. 42, n. 4, p. 389-466, 1976.

DONG, J.; TENG, W.; BUCHHOLZ, W. G.; HALL, T. C. *Agrobacterium*-mediated transformation of Javanica rice. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, n. 3, p. 267-276, 1996.

GARG, A. K.; KIM, J. K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; CHOI, Y. D.; KOCHIAN, L. V.; WU, R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 25, p. 15898-15903, Dec. 2002.

HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **Plant Journal**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 271-282, Aug. 1994.

HODGES, T. K.; PENG, J. Y.; LEE, L.; KOETIE, D. S. "In vitro" culture of rice: transformation and regeneration of protoplast. In: GUSTAFSON, P. (Ed). **Gene manipulation in plant improvement II**. New York: Plenum Press, 1990. p. 163-183.

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

KHANNA, H. K.; RAINA, S. K. *Agrobacterium*-mediated transformation of *indica* rice cultivars using binary and superbinary vectors. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 26, n. 4, p. 311-324, 1999.

KLEE, H.; HORSCH, R.; ROGERS, S. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further application to plant biology. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 38, p. 467-486, 1987.

LENTINI, C., MARTINEZ, C. P. Applications of anther culture in rice breeding. In: CUEVAS-PÉREZ, F. (Ed.). **Rice in Latin America: improvement, management and marketing**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1992. p. 230-231.

LI, X. Q.; LIU, C. N.; RITCHIE, S. W.; PENG, J. Y.; GELVIN, S. B.; HODGES, T. K. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *gusA* in rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 20, n. 6, p. 1032-1048, Dec. 1992.

MOHANTY, A.; SARMA, N. P.; TYAGI, A. K. *Agrobacterium*-mediated high frequency transformation of an elite *indica* rice variety Pusa Basmati 1 and transmission of the transgenes to R2 progeny. **Plant Science**, Limerick, v. 147, n. 2, p. 127-137, Sept. 1999.

POTRYKUS, I. Gene transfer to cereals: an assessment. **Bio/Technology**, Frankfurt, v. 8, n. 6, p. 535-542, June 1990.

RASHID, H.; YOKOI, S.; TORIYAMA, K.; HINATA, K. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *indica* rice. **Plant Cell Reports**, New York, v. 15, n. 10, p. 727-730, Jun. 1996.

SCHÜNMANN, P. H. D.; LLEWELLYN, D. J.; SURIN, B.; BOEVINK, P.; FEYTER, R. C. de; WATERHOUSE, P. M. A suite of novel promoters and terminators for plant biotechnology. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 30, n. 4, p. 443-452, 2003.

TAMURA, S. Shoot formation in calli originated from rice embryo. **Proceedings of the Japan Academy**, Tokyo, v. 44, n. 4, p. 544-548, 1968.

TOKI, S. Rapid and efficient *Agrobacterium* - mediated transformation in rice. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 15, n. 1, p. 16-21, Mar. 1997.

UPADHYAYA, N. M.; SURIN, B.; RAMM, K.; GAUDRON, J.; SCHUNMANN, P. H. D.; TAYLOR, W.; WATERHOUSE, P. M. WANG, M. G. *Agrobacterium*-mediated transformation of Australian rice cultivars Jarrah and Amaroo using modified promoters and selectable markers. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 27, n. 3, p. 201-210, 2000.

UZÉ, M.; WUNN, J.; PUONTI-KAERLAS, J.; POTRIKYS, I.; SAUTTER, C. Plasmolysis of precultured immature embryos improves *Agrobacterium* mediated gene transfer to rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, Limerick, v. 130, n. 1, p. 87-95, Dec. 1997.

XIE, Q. J.; RUSH, M. C.; CAO, J. Somaclonal variation for disease resistance in rice (*Oryza sativa*). In: GRAYSONM, B. T.; GREEN, M. B.; COPPING, L. G. (Ed.). **Pest management on rice**. London: Elsevier, 1990. p. 491-509.

ZHANG L.; HATTORI K. Genetic analysis of regeneration ability in rice seed-callus. **Genes & Genetic Systems**, v. 71. n. 5, p. 379-384, 1996.

