

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**DANIELLE CAMARGO SCOTTON**

**Otimização do cultivo *in vitro* visando a transformação genética das  
cultivares brasileiras de alho (*Allium sativum* L.)**

**Piracicaba**

**2007**

DANIELLE CAMARGO SCOTTON

Bióloga

**Otimização do cultivo *in vitro* visando a transformação genética das cultivares brasileiras de alho (*Allium sativum* L.)**

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Piracicaba - SP

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Seção Técnica de Biblioteca – CENA/USP**

Scotton, Danielle Camargo

Otimização do cultivo *in vitro* visando a transformação genética das cultivares brasileiras de alho (*Allium sativum* L.) / Danielle Camargo Scotton; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2007.

102 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. *Agrobacterium* 2. Cultura de tecidos vegetais 3. Hortaliças de bulbo 4. Organogênese vegetal 5. Regeneração da planta I. Título

bCDU 635.26:631.52

À minha família,

Aos meus amigos,

### **OFEREÇO.**

“Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos.”

Vinícius de Moraes

Só quem tenta o absurdo é capaz de alcançar o impossível.

Miguel de Unamuno (1864 – 1936)

A minha mãe Dim, ao meu eterno Fausto, a minha amada Brunna, aos meus irmãos, Karinna e Giovanni, e ao meu pai Dirceu (*in memoriam*) pela vida, pelo amor, carinho dedicados e pelo exemplo de vida, que muito tem me dado força durante minha caminhada.

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo maravilhoso dom da vida e pela oportunidade de realizar meus sonhos.

Ao professor e orientador Dr. Antonio Figueira, pela oportunidade, pela orientação, confiança e amizade.

Ao professor Dr. Augusto Tulmann Neto, pela amizade, pelo apoio, pela confiança, pela orientação desde a iniciação científica, pela disponibilização do laboratório de Melhoramentos de Plantas I, o que tornou possível a realização deste trabalho.

Ao amigo Dr. Vagner Augusto Benedito, pela idéia inicial do trabalho, pela experiência partilhada na pesquisa, pela dedicação, aprendizado recíproco, pelo convívio, pela confiança depositada, pelo incentivo, amizade e exemplo.

A amiga Dra. Jeanne Blanco de Molfetta Machado, pela experiência partilhada na pesquisa com sugestões sempre interessantes, conhecimentos adquiridos, por estar sempre disposta a ajudar na condução dos experimentos, aprendizado recíproco, pelo convívio, amizade e exemplo.

Ao Dr. Gildemberg Amorim Leal Júnior, ao Dr. Renato Rodrigues Ferreira e a Dra. Beatriz Maia Souza, pelas preciosas dicas, sugestões, críticas, discussões e pela amizade.

A amiga incondicional Benedita Inês F. P. Rodrigues, pelo apoio profissional, pela disponibilidade, pelo companheirismo e pela amizade prestados durante este período.

Aos amigos incondicionais Jurema Rosa de Queiroz Silva e Dr. Raul Santin Almeida pelo apoio profissional, pela ajuda na dissertação, nas fotos, nas discussões científicas, na disponibilidade e pela amizade prestados durante este período.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Melhoramento de Plantas (LAMP), Jeanne, Vagner, Renato, Jupará, Bia Maia, Jurema, Lorena, Janaína, João Fernando, Raul, Onildo, Rebeca, Tais BT, Nebó, Felipe, Ligia, Felipe (Bob), Deborah, Aline, Silvio, Cris, Nara, Ariane, Celso, Thaísa, Fabrício, Paulo Ricardo e Paulo Albuquerque, pelo convívio diário em equipe, pelo auxílio em várias situações, sugestões, críticas, discussões, pelos adoráveis

almoços, pela amizade e pela agradável convivência durante o desenvolvimento deste trabalho.

As amigas queridas Liliane Cristina Libório Stipp (Lili) e Alessandra Cristina B. de A. Monteiro-Hara (Pitty), do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pela longa, duradoura e sincera amizade, pelo apoio nos momentos difíceis, pela ajuda nos experimentos, pelas conversas e rizadas, e pelas horas de lazer...

A todos os funcionários do LAMP do CENA/USP, Benedita Inês Rodrigues, José Benedito Alves, Paulo Cassieri, Myriam Raquel Orsy, Wlamir Godoy e Luis Eduardo Fonseca, pelo auxílio imprescindível nas várias fases do desenvolvimento deste trabalho e pela amizade.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), pela oportunidade de realização do mestrado. Aos Professores do CENA/USP, que compõem a área de concentração Biologia na Agricultura e no Ambiente e ao Professores das disciplinas cursadas. Agradeço aos colegas da Pós-graduação pelo convívio e aprendizado mútuo.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo suporte através de concessão de bolsa de estudo de mestrado.

As Sras. Alzira Ferraz Adão, Cláudia Corrêa, Neuda Oliveira e Maria Regina Rodrigues (*in memorian*), secretárias da Pós-Graduação do CENA/USP. A Presidente da comissão da Pós-graduação do CENA/USP, Professora Dra. Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez.

Ao professor Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres e a sua aluna de mestrado Tatiana B. Farinha, pela ajuda fornecida durante o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade.

Aos professores do IAC/ APTA Dr. Paulo Espíndola Trani, Dr. Walter José Siqueira e Dr. Joaquim Adelino de Azevedo Filho pelas recomendações, longas conversas e apoio. Também pelo fornecimento de bulbos de alho das cultivares Amaranthe-Embrapa, Roxinho 5063, IAC 75 – Gigante de Curitibaanos, IAC 63 – Mexicano Br, Lavínia 1632, Cajuru 2315 e Cateto Roxo.

Ao pessoal da Empresa Boiani, em especial Sr. Ismael E. Boiani e ao funcionário Ariovaldo, produtores e comercializadores de alho na cidade de Iacanga – SP, e principalmente pelo fornecimento de bulbos de alho da cultivar Jonas.

Ao pessoal da Empresa SAKATA, em especial Sr. Rômulo Fujito Kobori e Sra. Olga, pelo fornecimento de bulbos de cebola e pela gentileza em nos receber na empresa.

As Sras. Raquel Carvalho, Renata Letícia Fini Mazzero e Marília Ribeiro Garcia Henyei, bibliotecárias do CENA/USP e ao Sr. Celsinho Aguiar.

A minha família, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio incessante e pelo amor dedicado.

A minha mãe, Maria Aparecida C. Scotton (Dim), por estar sempre ao meu lado e ter me mostrado que o mundo pode ser melhor e que o amor pode vencer todas as batalhas, por mais difíceis que sejam. Pelo exemplo, pela educação, apoio, amor incondicional, carinho, amizade eterna, compreensão e incentivo durante toda a minha vida, enfim, por tudo... E por ser minha referência de vida diária...

Ao meu amado e eterno Fausto Luiz Zério, por estar sempre ao meu lado, pela sua dignidade, pelo amor, carinho, pelos cuidados extras, por batalhar sempre comigo e pela compreensão durante este trabalho e toda a nossa vida... Te amo!!!!

A minha maravilhosa e queridíssima sobrinha Brunna Camargo Scotton Bombonato, pela felicidade de cada dia e pelo amor incondicional, pela espontaneidade, veracidade e pureza de seus gestos, que muito me alegram.

Aos meus irmãos Karinna e Giovanni Camargo Scotton pelo apoio durante todos os momentos de minha vida.

Ao meu pai, Dirceu Edibertes Scotton (*in memoriam*), por ter me ensinado a lutar pelos meus ideais e ser essa pessoa que sou hoje...

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS.....	13
LISTA DE SÍMBOLOS.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. Origem e caracterização botânica do alho.....	18
2.2. Importância econmica.....	21
2.3. Cultivares de alho, aspectos gerais, exigências e descrição.....	23
2.4. Cultura de tecidos e regeneração <i>in vitro</i> .....	24
2.5. Desenvolvimento floral.....	29
2.6. Florescimento em alho.....	31
2.7. Transformação de alho via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e sistemas de transformação gênica.....	34
3. OBJETIVOS.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. Material vegetal .....	40
4.2. Meio de cultura.....	40
4.3. Obtenção e cultivo dos explantes.....	42
4.3.1. Concentração do meio de cultura básico.....	42
4.4. Indução de calos.....	43
4.4.1. Indução de calogênese empregando outras combinações de reguladores vegetais.....	44
4.5. Regeneração <i>in vitro</i> de plantas.....	45
4.6. Dose letal de agentes seletivos aos calos de alho.....	45
4.7. Regeneração das plantas transformadas via organogênese.....	46
4.8. Linhagem de <i>Agrobacterium</i> , plasmídeo e condições de cultura.....	47
4.8.1. Inoculação e co-cultura.....	48
4.8.2. Seleção de plantas.....	49
4.8.3. Ensaio histoquímico da $\beta$ -glucuronidase para a avaliação da eficiência de transformação.....	49
4.9. Desenho de iniciadores.....	50
4.10. Extração do DNA.....	51
4.11. Condições de amplificação, eletroforese e purificação de fragmentos.....	52

4.11.1. Ligação num vetor de clonagem e MiniPrep.....	54
4.11.2. Seqüenciamento das amostras de DNA genômico.....	56
4.12. Análises estatísticas.....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1. Obtenção e cultivo dos explantes.....	58
5.1.1. Concentração do meio de cultura básico.....	61
5.2. Indução de calos.....	62
5.2.1. Indução de calogênese empregando outras combinações de reguladores vegetais.....	64
5.3. Regeneração <i>in vitro</i> de plantas.....	67
5.4. Dose letal de agentes seletivos aos calos de alho.....	74
5.5. Linhagem de <i>Agrobacterium</i> , plasmídeo e condições de cultura.....	76
5.5.1. Inoculação e co-cultura.....	76
5.5.2. Ensaio histoquímico da $\beta$ -glucuronidase para a avaliação da eficiência de transformação.....	77
5.6. Clonagem do gene <i>LFY</i> de alho.....	79
5.9. Condições de amplificação, eletroforese e purificação de fragmentos.....	80
6. CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXOS.....	99

## RESUMO

### **Otimização do cultivo *in vitro* visando a transformação genética das cultivares brasileiras de alho (*Allium sativum* L.)**

O melhoramento do alho (*Allium sativum* L.) está limitado à seleção clonal de genótipos mutantes, uma vez que a quase totalidade do germoplasma da espécie é sexualmente estéril, não florescendo nas condições padrões de cultivo. A esterilidade do alho tem implicações não somente no melhoramento da espécie, mas também influi diretamente nos custos de produção. A necessidade de propagação vegetativa utilizando-se bulbilhos (“dentes”) como material propagativo facilita a transmissão de doenças por vírus e pragas. A manipulação genética do alho com genes associados ao florescimento via *Agrobacterium tumefaciens* poderia permitir o desenvolvimento de um sistema mais eficaz para propagação da cultura e habilitar novas combinações genéticas. Portanto, o objetivo desse trabalho foi estabelecer protocolos de regeneração para cultivares comerciais brasileiras de alho, bem como de transformação genética mediada por *A. tumefaciens* de calos oriundos de segmentos radiculares. Foram utilizadas oito cultivares de alho, divididas em três grupos: semi-nobres de ciclo médio (‘Amarante-Embrapa’; ‘Roxinho 5063’; ‘IAC 75 – Gigante de Curitiba’; ‘IAC 63 – Mexicano Br’; e ‘Lavínia 1632’); comum, de ciclo médio (‘Cateto Roxo’) e de ciclo precoce (‘Cajuru 2315’); e nobre vernalizado (‘Jonas’). Para cada cultivar, foram isolados segmentos radiculares de bulbilhos cultivados *in vitro*. Esses explantes foram mantidos em cultura durante 60 dias em meio MS, adicionado de 4,5  $\mu$ M 2,4-D e 0,5  $\mu$ M iP para obtenção de calos. Os calos obtidos foram transferidos para meio MS suplementado com 8,8  $\mu$ M BAP e 0,1  $\mu$ M

ANA, e avaliados quanto à frequência de regeneração. Inicialmente, foram analisados diversos fatores durante a introdução dos bulbilhos e na obtenção de calo para cada cultivar. Esses resultados permitiram realizar testes para avaliar o potencial de regeneração dos calos obtidos, e a cultivar 'Jonas' apresentou a melhor taxa de regeneração via organogênese indireta (84%), seguida da cultivar 'Amarante' (52%), 'IAC 63' e 'Cajuru' (47%) e a cultivar que apresentou a menor taxa foi a 'Lavinia' (30%). Foi analisada a dose letal de higromicina ou canamicina, testando concentrações crescentes visando identificar os níveis ótimos de uso como agentes seletivos para a transformação. As doses acima de 50 mg/L de higromicina ou 200 mg/L de canamicina foram letais ao cultivo de calos de todas cultivares. A cultivar 'Jonas' foi utilizada para o estabelecimento do procedimento de transformação via *A. tumefaciens* LBA4404(pCAMBIA1303), empregando como repórter o gene *uidA* ( $\beta$ -glucuronidase) para determinação da eficiência da transformação. Foi demonstrado que a cultivar foi a 'Jonas' apresentou o melhor potencial de calogênese e de regeneração, sendo o meio de cultura proposto por Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000) o melhor para regeneração das cultivares brasileiras. Além disso, as cultivares brasileiras de alho parecem ser passíveis de transformação via *A. tumefaciens*.

Palavras-chave: *Allium sativum* L., florescimento, regeneração de plantas, transformação genética, segmentos radiculares

## ABSTRACT

### **Optimization of *in vitro* culture aiming at genetic transformation of Brazilian garlic (*Allium sativum* L.) cultivars**

Garlic (*Allium sativum* L.) breeding has been limited to clonal selection of mutant genotypes, since almost all the species germplasm is sterile, not flowering under standard culture conditions. Garlic sterility affects not only breeding but also directly influences production costs. Further, the requirement of vegetative propagation using small bulbs as propagules increases the risk of pest and viral disease transmission. Genetic manipulation of garlic introducing genes associated with flowering by *Agrobacterium tumefaciens* would allow the development of an efficient system for propagation and enable new genetic recombination. Thus, the objective of this work was to establish an *in vitro* regeneration protocol for commercial Brazilian cultivars of garlic, as well as genetic transformation by *A. tumefaciens* using calli derived from root segments. Eight garlic cultivars were used, derived from three groups: medium cycle semi-noble ('Amarante-Embrapa'; 'Roxinho 5063'; 'IAC 75 - Gigante de Curitibaanos'; 'IAC 63 - Mexicano Br'; and 'Lavínia 1632'); common garlic with medium ('Cateto Roxo'), or early cycle ('Cajuru 2315'); and from vernalized noble ('Jonas'). From each cultivar, root segments from small bulbs cultivated *in vitro* were isolated. These explantes were maintained in MS media supplemented with 4.5  $\mu\text{M}$  2,4-D and 0.5  $\mu\text{M}$  iP for 60 days to develop callus. The calli were then transferred to fresh MS media containing 8.8  $\mu\text{M}$  BAP and 0.1  $\mu\text{M}$  ANA, and evaluated for regeneration frequency. Initially, diverse factors were analyzed for each cultivar during the

introduction of the small bulbs and during calli development. These results enabled to conduct test of callus regeneration potential, with 'Jonas' showing the best regeneration rate via indirect organogenesis (84%), followed by cultivar 'Amarante' (52%), 'IAC 63' and 'Cajuru' (47%). The cultivar with less regeneration was 'Lavínia' (30%). The lethal dosis of hygromycin or kanamycin were estimated, testing increasing concentrations to establish optimum levels to be adopted as selective agents for transformation. Doses above 50 mg/L hygromycin or 200 mg/L kanamycin were lethal to callus of all cultivars. Cultivar 'Jonas' was chosen for the establishment of the genetic transformation protocol via *A. tumefaciens* LBA4404 (pCAMBIA1303), using *uidA* as a reporter gene ( $\beta$ -glucuronidase) to determine the transformation efficiency. 'Jonas' was the best cultivar in terms of callus and regeneration potential using the regeneration media proposed by Kondo, Hasegawa and Suzuki (2000). Moreover, the Brazilians garlic cultivars appeared to be amenable to transformation via *A. tumefaciens*.

Keyword: *Allium sativum* L., flowering, plant regeneration, genetic transformation, root segments

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	ácido naftaleno acético
BAP	6-benzilaminopurina
BLASTx	Ferramenta para alinhamentos comparativos e identificação de seqüências de DNA traduzidas em seqüências de aminoácidos (Basic Lenth Alignment Search Tool x)
CIA	Clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v)
CIN	cinetina
CTAB	Hexadeciltrimetil amônia
DNA	Ácido desoxirribonucléico
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxi acético
EDTA	Ácido etileno diaminotetrácetico
GA <sub>3</sub>	ácido giberélico
GFP	Gene da “green fluorescent protein”
GUS	Gene β-glucuronidase
iP	Isopentenil adenina
LEAFY	Fator de transcrição que afeta não somente a iniciação da inflorescência, mas também a determinação do órgão floral.
MS	meio básico de cultura de Murashige & Skoog (1962)
NCBI	<i>National Center for Biotechnological Information</i>
<i>nptII</i>	Gene da neomicina fosfotransferase II
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Picloram	ácido 4-amino 3,5,6 tricloropicolínico
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA	Ácido ribonucléico
35S	Promotor do vírus do mosaico da couve-flor
SDS	Sódio dodecil sulfato
T-DNA	Transferred DNA
TAE	1 mM EDTA pH 8,0; 40 mM Tris pH 8,0; 20 mM de ácido acético
TE	Tris-EDTA
Ti	Plasmídeo indutor de tumor
TRIS	Tris (hidroximetilaminometano)
TWEEN 20	Polioxietileno sorbitan monolanato

## LISTA DE SÍMBOLO

cm	centrímetro
°C	Graus Celsius
et al.	e outros
g	grama
g L <sup>-1</sup>	gramas por litro
h	hora
ha	Hectare
Kg	Kilograma
Kg ha <sup>-1</sup>	Kilograma por hectare
L	Litro
mg	miligrama
mg mL <sup>-1</sup>	miligramas por mililitro
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
ng	nanograma
pb	Pares de bases
s	segundo
t	Tonelada
U	Unidade de enzima (Weiss)
µg	micrograma
µL	microlitro
µg µL <sup>-1</sup>	microgramas por microlitro
λ	Lambda

## 1. INTRODUÇÃO

O alho é uma espécie monocotiledônea de clima temperado cultivada em todo o mundo. O alho plantado no Brasil teve origem provável no México, Egito e alguns países da América do Sul (Menezes Sobrinho, 1978). A cultura do alho (*Allium sativum* L.) é de elevada importância econômica e social por ser um produto condimentar de larga utilização popular e também pelos supostos efeitos terapêutico e medicinal. Pode ser classificado como alimento energético por possuir menos de 20% de proteínas e menos de 18% de fibra bruta (Saturnino, 1978).

Em 2005, a produção mundial de alho foi de 14,7 milhões de toneladas, sendo a China o maior produtor mundial (11 milhões de toneladas), seguido pela Índia (646 mil toneladas). A Argentina foi o maior produtor da América do Sul em 2005, com uma produção de 116 mil toneladas (FAO 2007). O Brasil é um dos países que mais consome alho no mundo, sendo que a maior parte é comercializada na forma *in natura*, ainda que o consumo de pastas e outros produtos processados de alho venham crescendo gradativamente (Oliveira, Souza e Mota, 2003; Oliveira, Souza e Yuri, 2004). No Brasil, a produção de alho em 2005 foi de aproximadamente 86 mil toneladas. Essa quantidade coloca o país como o 15º maior produtor mundial de alho. Essa produtividade ainda é baixa quando comparada com os principais países exportadores para o Brasil, portanto, sendo insuficiente para atender a demanda interna.

O consumo do alho no Brasil depende parcialmente da importação, sendo que 75% da produção nacional concentra-se entre os meses de outubro e

dezembro, ocorrendo maior escassez entre abril e julho (Trani et al., 1997). No primeiro semestre do ano importa-se alho, principalmente da Argentina, enquanto que no segundo semestre recebe-se alho oriundo da China.

A produtividade média mundial em 2005 foi de 12,73 ton ha<sup>-1</sup>, enquanto que o Brasil obteve uma produtividade de apenas 8,6 ton ha<sup>-1</sup>, demonstrando que há possibilidade de melhoria dos índices produtivos nacionais na cultura do alho (Camargo Filho, Mazzei e Alves, 1999). Portanto, o desafio da competitividade e da auto-suficiência da alhicultura nacional permanece atual.

Diversos fatores, tais como o menor peso de bulbos e a presença de anormalidades fisiológicas, fazem com que muitas cultivares apresentem baixo valor comercial. O maior atributo dos alhos importados é a qualidade comercial, que, atende aos mercados mais exigentes do Centro-Sul. Geralmente são alhos de bulbilhos graúdos e arroxeados, com bom revestimento de bulbo, de coloração branca e que permitem sua limpeza (toailete) pela eliminação da película externa. Entretanto, alguns clones nacionais apresentam características comerciais superiores às dos alhos importados, o que faz com que seja possível ao País passar de simples importador para exportador, com a utilização de tecnologias adequadas e a solução dos problemas da cultura.

Tradicionalmente, o melhoramento do alho esteve limitado à seleção clonal de genótipos mutantes, uma vez que a quase totalidade do germoplasma da espécie é sexualmente estéril, não florescendo nas condições padrões de cultivo. A floração pode ocorrer, em alguns clones de alho, mas a seqüência de desenvolvimento da semente é interrompida em vários estágios durante e após a meiose, e as flores abortam (Cheng, 1985). As técnicas de cultura de tecidos e transformação de alho via biobalística e via *Agrobacterium tumefaciens* alcançaram grande

desenvolvimento, permitindo a sua aplicação na propagação e no melhoramento de plantas, principalmente no caso de apomíticas obrigatórias.

A esterilidade do alho tem implicações não somente no melhoramento da espécie, mas também influi diretamente nos custos de produção. O ideal é utilizar o alho-planta originário da cultura de tecidos a partir de meristemas, o que possibilita a obtenção de bulbos livres de vírus, doenças e pragas. Além disso, a aquisição de alho-semente ( $800 \text{ kg ha}^{-1}$ ) é responsável por mais de 25% do custo de produção da cultura, devido à necessidade de propagação vegetativa utilizando-se bulbilhos (“dentes”) como material propagativo.

Sendo assim, é estratégico realizar a manipulação genética do alho empregando a transformação via *Agrobacterium*, como estratégia de melhoramento devido às restrições inerentes à cultura. A introdução de gene que facilitasse o florescimento poderia permitir o desenvolvimento de um sistema mais eficaz para a propagação da cultura e habilitar novas combinações genéticas, contribuindo tanto para facilitar o melhoramento convencional por permitir cruzamentos sexuais, quanto para a instalação de um sistema mais econômico para a propagação da cultura.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolos de regeneração para cultivares comerciais brasileiras e de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens* de calos oriundos de segmentos radiculares de alho, visando no futuro introduzir genes envolvidos nas rotas conservadas de desenvolvimento floral, como o *LEAFY (LFY)*, que poderão despertar a ontogênese sexual na espécie.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

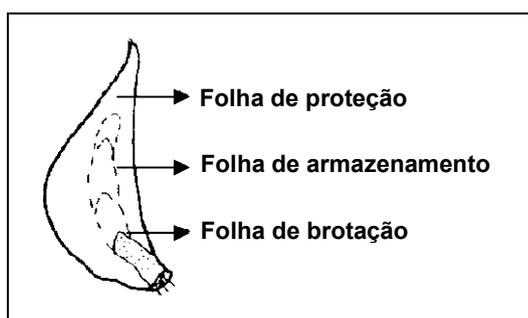
### **2.1. Origem e caracterização botânica do alho**

O cultivo do alho (*Allium sativum* L.) teve sua origem na Ásia Central, de onde se espalhou para a região do Mediterrâneo, e data de tempos remotos. Camargo e Barrera (1985) relatam que há mais de cinco mil anos o alho já era utilizado pelos hindus, egípcios, gregos e por quase todas as antigas culturas do Velho Mundo. Provavelmente foi trazido para as regiões ocidentais pelos navegadores espanhóis, portugueses e franceses. Segundo Menezes Sobrinho (1978), o alho plantado no Brasil tem provável origem no México, Egito e alguns países da América do Sul. Alguns botânicos europeus definiram uma nova família, denominada Alliaceae, que reuniria todas as espécies do gênero *Allium* (Filgueira, 1982). No Brasil, no entanto, alguns pesquisadores consideram essa espécie vegetal como pertencente à família Liliaceae.

O alho é uma planta anual, monocotiledônea, herbácea com 50 a 80 cm de altura. Suas folhas são lanceoladas e estreitas, em formato de V com uma camada de cera. As bainhas das folhas formam um pseudocaule único, ereto e curto, cuja parte inferior, de desenvolvimento subterrâneo, forma um bulbo. Sob condições climáticas favoráveis, as gemas do caule (meristemas) desenvolvem-se formando, cada uma, um bulbilho, que, em seu conjunto, formam o bulbo (Filgueira, 2000). O bulbo é arredondado, às vezes ligeiramente periforme, e constituído por cinco, até 56 bulbilhos, às vezes mais. Estes últimos têm, geralmente, morfologia ovóide-arqueada, sendo coberto por duas folhas protetoras (brácteas), quase transparentes,

de cor branca ou arroxeada. Os agrupamentos de bulbilhos são ligados ao caule pela base, e envolvidos por várias folhas que, em seu conjunto, constituem a capa (túnica). Essa é delgada, de cor clara ou ligeiramente arroxeada (Shymoya, 1970). Na porção basal do caule fica situado o sistema radicular. As raízes formam um sistema do tipo fasciculado, atingindo profundidades desde 40 até 82,5 cm. As folhas nascem na parte superior do caule, variando de estreitas a largas, podendo a superfície apresentar-se lisa ou com maior cerosidade. O escapo floral, quando presente, tem sua origem no centro do bulbo (Menezes Sobrinho, 1978).

Os bulbilhos são estruturas de reserva, ricas em amido, vitaminas e substâncias aromáticas de alto valor condimentar, contendo no seu interior e na base, um meristema, que dará origem à nova planta no ciclo seguinte (Mann, 1952). O bulbilho de alho apresenta um meristema apical com três a quatro primórdios foliares envolvidos por três folhas modificadas: a folha de brotação, a folha de armazenamento e a folha protetora (Chun e Soh, 1980), como representado na Figura 1.



**Figura 1.** – Componentes morfológicos de um bulbilho observado num corte longitudinal.

Pode-se dizer que temperaturas amenas na fase inicial, temperaturas baixas na fase média, e dias quentes e longos na fase final do ciclo, são condições ideais para uma boa produção. As diversas cultivares de alho em uso no Brasil apresentam

exigências próprias quanto ao comprimento do dia. O fotoperiodismo típico de cada cultivar determina qual a região e a época em que ela deve ser plantada (Menezes Sobrinho, 1983).

Hoje há cultivares que diferem entre si quanto ao tamanho de bulbos e bulbilhos, número de bulbilhos, coloração da túnica (bulbo) e película (bulbilho), ocorrência ou não do florescimento, altura do escapo ou haste floral, número e tamanho de bulbilhos presentes na haste floral e na umbela, rendimento, ciclo, exigências climáticas e resistência a pragas e doenças (McCollum, 1976; Chomatova, Turkova e Klozova, 1990; Havey, 1992; Poller e Simon, 1993). A propagação do alho ocorre exclusivamente por estruturas vegetativas denominadas bulbilhos (“dentes”), isto é, plantios sucessivos de bulbilhos ao longo dos ciclos. A ausência de órgãos reprodutivos viáveis não permite a produção de sementes botânicas verdadeiras e nem a utilização de métodos convencionais de melhoramento genético. A multiplicação assexuada é um dos grandes obstáculos da cultura, pois possibilita que patógenos e pragas se disseminem com facilidade através das gerações, causando a degenerescência generalizada dos clones comerciais (Resende, Guaberto e Souza, 2000).

Segundo a ANVISA (2005), o alho é considerado uma especiaria. Por definição, especiarias são os produtos constituídos de partes (raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes e talos) de uma ou mais espécies vegetais, tradicionalmente utilizadas para agregar sabor e aroma aos alimentos e bebidas.

## 2.2. Importância econômica

O alho tem grande importância econômica e social no Brasil. Nos últimos anos, os produtores brasileiros vêm se empenhando para alcançar a auto-suficiência do país no abastecimento de alho, pelo aumento da produção nacional com adoção de melhor tecnologia agrícola e aumento da área cultivada (Menezes Sobrinho, 1983). O valor total da produção é estimado em mais de R\$ 234 milhões por ano. É uma hortaliça cultivada, na grande maioria, por pequenos produtores, com utilização intensa de mão-de-obra. Estima-se que haja cerca de 25.000 empregos diretos na cadeia produtiva (EMBRAPA, 2004).

Em 2005, a produção mundial de alho foi de 14,7 milhões de toneladas, sendo a China o maior produtor mundial (11 milhões de toneladas), seguida pela Índia (646 mil toneladas). A Argentina foi o maior produtor da América do Sul em 2005, com uma produção de 116 mil toneladas (FAO 2007). No Brasil, a produção de alho em 2005 foi de aproximadamente 86 mil toneladas. Essa quantidade coloca o país como o 15º maior produtor mundial de alho (Oliveira, Souza e Yuri, 2004; Baghalian et al., 2005). O Brasil continua fortemente dependente de elevadas aquisições externas de alho, a fim de manter os índices de oferta e de demanda do produto em patamar equilibrado. Esta subordinação do país ao alho importado, principalmente do bulbo adquirido da Argentina e da China para a garantia da normalidade do abastecimento interno, tem-se ampliado de forma bastante significativa nos últimos anos; especialmente nos últimos três anos.

O baixo rendimento nacional de alho é devido a várias causas, tais como baixa densidade de plantio, presença de viroses no material propagativo, incidência de pragas e doenças na lavoura e durante o armazenamento, baixa adaptação das cultivares as condições do solo e clima em regiões de temperaturas mais elevadas.

A quantidade e a qualidade da produção nacional de alho não atendem a crescente demanda e as exigências do mercado consumidor brasileiro, o que induz a importação (Amorim et al., 2002). A importância econômica da cultura do alho tem aumentado sensivelmente nos últimos anos, não só pelo seu uso generalizado como especiaria, mas também por algumas qualidades terapêuticas que lhe são atribuídas. De fato, o Brasil é um dos países que mais consome alho no mundo, sendo que a maior parte é comercializada na forma *in natura*, ainda que o consumo de pastas e outros produtos processados de alho venham crescendo gradativamente (Oliveira, Souza e Mota, 2003; Oliveira, Souza e Yuri, 2004).

O Brasil já conta com um razoável elenco de cultivares de alho que permitem a obtenção de um produto de ótima qualidade comercial que pode competir com os melhores alhos importados. As cultivares em produção no país variam quanto ao aspecto morfológico, qualidade dos bulbos produzidos, precocidade, suscetibilidade a determinados fatores negativos como doenças, pseudoperfilhamento e ocorrência de “palitos” (bulbilhos ou dentes com peso abaixo de 1 grama, comercialmente rejeitados e não servem para plantio). Sendo o alho uma hortaliça propagada de forma vegetativa há acúmulo de agentes causais de doenças importantes, que são transmitidos de um ciclo de produção a outro via bulbilho contaminado, entre elas, as viroses e as pragas. Essas doenças causam diminuição não só na produtividade como na qualidade dos bulbos. O pseudoperfilhamento caracteriza-se pela brotação lateral, resultante do crescimento das folhas protetoras dos bulbilhos. Essa anomalia prejudica o aspecto comercial dos bulbos (Menezes Sobrinho, 1983).

### **2.3. Cultivares de alho, aspectos gerais, exigências e descrição**

O alho é muito exigente em fotoperíodo e temperatura para o seu completo desenvolvimento. De maneira bastante abrangente, pode-se dizer que o alho necessita de temperaturas amenas no início do ciclo ( $\pm 2$  meses), temperaturas baixas na fase média ( $\pm 1$  mês) e calor e dias longos no final do ciclo ( $\pm 2$  meses). As cultivares de alho são classificadas conforme o ciclo de vida. Em geral, quanto maior o ciclo da planta, maior a exigência por temperaturas baixas no meio do ciclo e de dias longos no final do período produtivo. (SEBRAE, 2006). Segundo Trani et al. (1997), as cultivares de alho podem ser divididas quanto ao ciclo como precoces, com ciclo igual ou inferior a 135 dias; médios, de 135 a 165 dias e tardios, com ciclo superior a 165 dias.

As cultivares precoces são menos exigentes em fotoperíodos longos e temperaturas baixas, sendo suscetíveis ao superbrotamento e ferrugem. Em condições experimentais, sua produtividade média varia de 4 a 6 toneladas por hectare. Como exemplo, 'Cajuru' possui bulbos achatados, capa branca, de 20 a 30 bulbilhos por bulbo e ausência de "palitos".

As cultivares de ciclo médio são alhos semi-nobres, os quais são recomendados para o plantio em São Paulo por serem mais adaptados às condições de fotoperíodo e temperatura do local. São exemplo as cultivares 'Amarante', 'Chinês', 'Gigante de Curitiba', 'Lavinia' e 'Roxinho'. Essas cultivares dispensam o tratamento com vernalização, sendo produtivas e de boa qualidade comercial. Os bulbos e os bulbilhos são arroxeados, porém, são mais claros do que os do alho nobre. Em condições experimentais, sua produtividade média varia de 8 a 12 toneladas por hectare. O número de bulbilhos por bulbo é de 15 em média e não produzem "palitos".

As cultivares tardias, devido as suas exigências em fotoperíodos (maior que 12 horas de luz), necessitam de frigidificação pré-plantio para sua bulbificação, nas condições climáticas de São Paulo, como exemplo a cultivar 'Jonas'. Em condições experimentais, o rendimento médio do alho vernalizado varia de 6 a 10 toneladas por hectare. Bulbos arredondados, capa branca, média de 8 a 15 bulbilhos por bulbo, ausência de "palitos" e sensibilidade ao pseudoperfilhamento (Trani et al., 1997).

Em alhos nobres vernalizados, o superbrotamento tem sido motivo de maior preocupação, já que as cultivares geralmente são mais sensíveis a esta anomalia. A prática da vernalização, que consiste em submeter os bulbos-semente a baixas temperaturas por um determinado período, visando a reduzir a exigência destas cultivares ao fotoperíodo e à temperatura, também pode interferir na ocorrência do superbrotamento. Segundo Burba (1983), a vernalização dos bulbilhos estimula o acúmulo de citocininas e giberelinas, modificando o balanço hormonal e levando o bulbilho à brotação precoce.

#### **2.4. Cultura de tecidos e regeneração *in vitro***

Como foi postulado por Haberlandt em 1902, cada célula vegetal possui o potencial genético para reconstituir um organismo inteiro, ou seja, possui a totipotencialidade celular para a regeneração de plantas inteiras. Os meristemas apicais e axilares e as sementes imaturas, ou em germinação, têm sido os tecidos que mais contribuíram para a cultura de tecidos. Na regeneração de diversas espécies, os avanços se deram na otimização dos meios de cultura e na escolha de genótipos. A escolha do tipo, concentrações e balanços entre reguladores vegetais, componentes do meio de cultura, o tempo de cultura e o tipo de meio de cultura

utilizado tiveram papel importante no desenvolvimento de protocolos (Christianson e Warnick, 1988).

A habilidade de induzir células vegetais a formarem órgãos e até plantas inteiras é uma importante ferramenta no melhoramento de qualquer espécie por permitir o acesso às técnicas de mutagênese *in vitro*, seleção *in vitro*, utilização de variantes somaclonais, rápida micropropagação e em especial a transformação genética (Gamborg e Philips, 1995).

A composição e a concentração dos reguladores vegetais no meio de cultura são fatores determinantes para o crescimento e para o padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultivo *in vitro*. Em 1957, Miller e Skoog demonstraram que a formação de dois órgãos *in vitro*, caules e raízes, era controlada pelas concentrações relativas entre auxina e citocinina. Meios de cultura contendo um balanço auxina/ citocinina favorável à auxina promoveram a formação de raízes em calo de tabaco (*Nicotiana tabacum*). De modo inverso, balanços hormonais favoráveis a citocinina fizeram com que fossem formadas gemas caulinares. Finalmente, balanços hormonais intermediários não levaram a uma diferenciação das células e sim a uma maior multiplicação delas e conseqüente crescimento do calo (Skoog e Miller, 1957).

As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores vegetais mais utilizadas em cultura de tecidos. As citocininas apresentam um papel importante na regulação da divisão celular e interagem com as auxinas no controle de muitos aspectos do crescimento e do desenvolvimento das plantas. A formação das raízes, parte aérea e calo em cultura de tecidos são reguladas pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores vegetais. São caracterizadas principalmente pela habilidade de promover a proliferação celular e a diferenciação

dos tecidos. As citocininas estão envolvidas também na diferenciação de cloroplastos, metabolismo de nutrientes, quebra da dominância apical e retardamento da senescência das folhas (Frank e Schmülling, 1999; Taiz e Zeiger, 2004).

Em experimentos de larga escala, a tecnologia de transferência genética requer sistemas eficientes de regeneração das plantas através da cultura de tecidos. A regeneração de plantas pode ocorrer por duas rotas distintas: a organogênese e a embriogênese. A organogênese normalmente envolve a regeneração de gemas a partir de grupos de células meristemáticas, ocorrendo através do balanço citocinina/auxina no meio de cultura, por meio da diferenciação de órgãos e brotos diretamente a partir da indução hormonal de células competentes do explante. A organogênese caracteriza-se por ser uma estrutura unipolar (formação de gemas caulinares que, mais tarde, darão origem a raízes adventícias) e apresenta ampla conexão vascular dos órgãos formados com o explante. A princípio, a formação de embriões a partir de tecidos somáticos *in vitro* imita a embriogênese zigótica, que ocorre nos órgãos reprodutivos das plantas. Desse modo, tanto a embriogênese somática quanto a zigótica culminam na formação de uma planta inteira a partir de uma única célula. Contudo, em certos explantes, os embriões somáticos formam-se a partir da diferenciação conjunta de grupos de células embriogênicas (Williams e Maheswaran, 1986). A embriogênese somática geralmente é induzida por tratamento com auxinas potentes e resulta na formação de estruturas não zigóticas semelhantes a um embrião. A embriogênese caracteriza-se principalmente por apresentar estrutura bipolar (eixo com os meristemas caulinares e radiculares) e sistema vascular fechado (Thorpe, 1995).

Nos dois processos de regeneração, há necessidade do estabelecimento de células competentes no explante inicial. Tanto as células meristemáticas, que darão origem às gemas caulinares, quanto às células embriogênicas podem se formar posteriormente ou podem estar preexistentes no explante. No caso do explante já possuir células meristemáticas ou embriogênicas, ocorrerá organogênese direta e embriogênese direta, respectivamente. Quando há necessidade de desdiferenciação do explante, com a conseqüente formação de calo ao estabelecimento das células competentes, ocorrerá organogênese ou embriogênese indireta (Kerbaudy, 1999).

Em relação ao explante, normalmente haverá maior sucesso se forem utilizados tecidos jovens, os quais possuem maior competência organogenética. Explantes que contém tecidos meristemáticos são escolhidos e eles são encontrados em gemas caulinares apicais e axilares. Uma ampla fonte de tecidos meristemáticos são as raízes, as quais possuem tecidos meristemáticos nos ápices. Diferenças significativas na capacidade organogenética *in vitro* são encontradas ao se variar à composição mineral, as vitaminas e as fontes de açúcares dos meios de cultura. Contudo, os componentes mais críticos adicionados ao meio de cultura são os reguladores vegetais. Existe considerável número de evidências de que o efeito dessas substâncias é indireto, através da alteração do balanço auxina/ citocinina endógeno. O próprio efeito das auxinas e das citocininas aplicadas ao meio de cultura parece ser, na verdade, o reflexo dessas substâncias alterando os balanços endógenos de auxina/ citocinina nas células vegetais (Peres et al., 1999).

As técnicas de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais oferecem excelentes recursos auxiliares aos melhoristas, geneticistas em geral, fitotecnistas e fitopatologistas no contexto atual da biotecnologia de plantas (Gallo e Crocomo, 1995). A cultura muito utilizada é a de meristemas, permitindo a produção de

progênies geneticamente iguais, não sendo observada nenhuma alteração cariotípica entre as plantas de alho regeneradas. Na obtenção de calos de alho são utilizados explantes foliares, radiculares, meristemas apicais e pratos basais, que são estritamente dependentes da presença de auxinas exógenas para a formação de tecido calogênico (Novak, 1980; Novak, Havel e Dolezel, 1985).

O melhoramento do alho visa em geral, a obtenção de cultivares mais produtivas, precoces, bulbos mais graúdos e arredondados, tolerância ao pseudoperfilhamento, menor exigência de fotoperíodo e resistência as principais doenças. Vários métodos para a cultura de tecidos de alho já foram descritos na literatura, a partir da cultura de protoplastos (Hasegawa et al., 1996), de células em suspensão (Cid, Illg e Piedrabuena, 1994; Mukhopadhyay et al., 2005), de folhas (Nagasawa e Finer, 1988; Fereol et al., 2002), de segmentos do prato (Koch, Tanami e Salomón, 1995; Ayabe e Sumi, 1998; 2001; Luciani et al., 2006), de bulbilhos (Myers e Simon, 1999; Kim et al., 2004) e de segmento radicular (Haque, Wada e Hattori, 1997; Myers e Simon, 1998; Barandiaran et al., 1999a, b; Robledo-Paz, Villalobos-Arámbula e Jofre-Garfias, 2000; Martín-Urdíroz et al., 2004; Luciani et al., 2006). A regeneração de plântulas de alho também pode ser feita a partir de calos obtidos dos segmentos radiculares (Myers e Simon, 1998; Barandiaran et al., 1999a, b; Zheng et al., 2003; Luciani et al., 2006), posto que a transformação vem sendo feita com maior eficiência nas células obtidas a partir desses calos. Os calos são estruturas com alto potencial de transformação, especialmente se comparados a meristemas, que são os únicos explantes que regeneram plantas *in vitro* (Kondo, Hasegawa e Suzuki, 2000; Zheng et al., 2004).

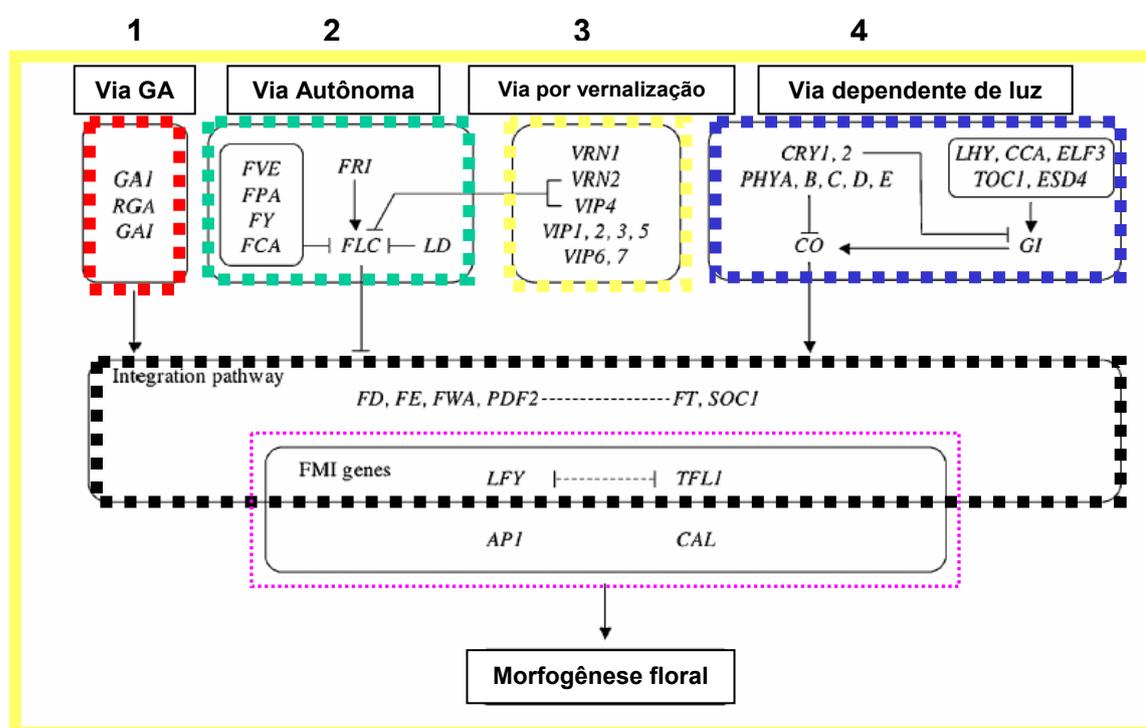
## 2.5. Desenvolvimento floral

O florescimento deve ser visto como um dos processos mais importantes durante o ciclo de vida das plantas superiores, representando a passagem do estado vegetativo para o reprodutivo. O meristema interrompe a produção de folhas e esse é convertido em um meristema de inflorescência, um meristema intermediário, o qual posteriormente dará origem ao meristema floral, quando finalmente são produzidos os órgãos florais e as flores. A duração da fase vegetativa ou o tempo de florescimento, é controlado por fatores internos e por sinais ambientais (Blázquez, 2000; Mouradov, Cremer e Coupland, 2002; Komeda, 2004).

O controle do desenvolvimento floral se dá através da atuação de sinais bioquímicos que promovem ou inibem o processo de conversão do meristema vegetativo em meristema da inflorescência e, que mais tarde, no meristema da flor, originando os respectivos órgãos florais (Zik e Irish, 2003). O conhecimento sobre o controle da transição floral é principalmente derivado dos estudos realizados com *Arabidopsis thaliana*, uma planta de dia longo. A existência de mutantes que apresentam florescimento tardio ou precoce tem proporcionado à identificação de muitos genes que promovem e reprimem o florescimento nessa espécie (Koornneef et al., 1998).

Os sinais endógenos e exógenos relacionados à indução do florescimento promovem e conservam o meristema apical em meristema da inflorescência, desencadeando o desenvolvimento dos órgãos florais. Os estudos atuais comprovam a existência de quatro vias que controlam o tempo de florescimento (Blázquez, 2000; Mouradov, Cremer e Coupland, 2002). Duas dessas, fotoperíodo e vernalização, são medidas por sinais ambientais, como luz e frio. As outras duas

vias são a via autônoma, que funciona como uma auto-regulação para florescer quando a planta se torna adulta; e a via dependente de GA (Blazquez et al., 1998), consideradas vias constitutivas que promovem ou reprimem o florescimento independente do comprimento do dia (Figura 2). As distintas rotas convergem atuando na ativação ou inibição de genes centrais integradores da via da regulação floral, como o fator de transcrição *LEAFY* (*LFY*) (Mouradov, Cremer e Coupland, 2002). A ativação ou a superexpressão dos principais genes envolvidos na indução floral pode desencadear o processo reprodutivo, mesmo em espécies heterólogas.



**Figura 2.** Vias genéticas do desenvolvimento floral de *Arabidopsis*. Quatro vias de indução floral foram encontradas nesta espécie (dependente de luz, temperatura, giberelina e uma via autônoma). Pode-se verificar a confluência das rotas em genes integradores principais, como o *LEAFY* (*LFY*). Adaptado de Komeda (2004).

Estudos sobre desenvolvimento floral vêm sendo realizados em diversas plantas além de *Arabidopsis* (Mouradov, Cremer e Coupland, 2002) como: *Antirrhinum major* (boca de leão), *Gerbera hybrida* (gérbera) (Kotilainen et al., 2000;

Uimari et al., 2004), *Lilium longiflorum* (lírio) (Benedito et al., 2004; a; b), tulipa (Kanno et al., 2003), *Oryza sp* (arroz) (Ikeda et al., 2002), *Sorghum bicolor* L. (sorgo) (Greco et al., 1997) e *Saccharum sp* (cana-de-açúcar), além de aspargo, milho, trigo e cevada. O arroz, porém, é a espécie que tem a genética molecular do florescimento mais caracterizada dentre as monocotiledôneas, sendo considerada como modelo biológico em Poaceae. O arroz, ao contrário da dicotiledônea modelo *Arabidopsis*, é uma planta de dia curto e tem sido alvo de estudos sobre regulação gênica floral (Kang et al., 1997), também em comparação às rotas de florescimento identificadas em *Arabidopsis* (Izawa, Takahashi e Yano, 2003).

Ortólogos de genes meristemáticos envolvidos no florescimento foram isolados em várias gramíneas, como em arroz e em milho, dentre muitos outros, os genes *RAP1A* e *RFL*, ortólogos de *AP1* e *LFY*, respectivamente (Kyojuka et al., 1998; 2000; Bombliés et al.; 2003).

LEAFY é um fator da transcrição que afeta não somente a iniciação da inflorescência, mas também a determinação do órgão floral. Nessa via, o *LFY* regula a expressão de ao menos três genes: o gene de identidade floral e do meristema *APETALA1* (*AP1*) que é altamente expresso em pétalas e sépalas; o gene de determinação órgão floral *APETALA3* (*AP3*), requerido para o desenvolvimento das pétalas e dos estames; e *AGAMOUS* (*AG*), que é requerido para o desenvolvimento dos estames e dos carpelos (Parcy et al., 1998; Busch, Bombliés e Weigel, 1999; Wagner, Sablowski e Meyerowitz, 1999; Wagner et al., 2004; Lamb et al., 2002).

## 2.6. Florescimento em alho

Hoje há cultivares que diferem entre si quanto ao tamanho de bulbos e bulbilhos, número de bulbilhos, coloração da túnica (bulbo) e película (bulbilho),

ocorrência ou não do florescimento, altura do escapo e haste floral, número e tamanho de bulbilhos presentes na haste floral e na umbela, rendimento, ciclo, exigências climáticas e resistência a pragas e doenças. Entretanto, existe a possibilidade de parte da variação encontrada na espécie ter-se originado quando o alho ou seus ancestrais apresentava ainda o ciclo sexual completo. O provável ancestral selvagem, a espécie *A. longicuspis*, de acordo com estudos filogenéticos, baseados em variação morfológica, marcadores RAPD e isoenzimas, é também de propagação vegetativa e não produz sementes verdadeiras (McCollum, 1976; Chomatova, Turkova e Klozova, 1990; Havey, 1992; Poller e Simon, 1993).

Algumas cultivares, no entanto, por influência de baixas temperaturas, chegam a florescer e produzem umbelas num escapo floral longo, rasteiro e flexível, porém não produzem sementes. As flores, em determinado momento do ciclo, caem, e em seu lugar formam-se numerosos pequenos bulbilhos (Koul e Gohil, 1970). Alguns poucos clones férteis, encontrados na Ásia Central, apresentam reduzido número de sementes formadas nas umbelas e baixa taxa de germinação (Etoh, 1983, 1986 e Kotlinska et al., 1991). A floração pode ocorrer em alguns clones, mas a seqüência de desenvolvimento da semente é interrompida em vários estágios durante e após a meiose, e as flores abortam. Bulbilhos podem ser gerados na parte aérea e, juntamente com os bulbos subterrâneos, podem ser utilizados no plantio (Cheng, 1985). Koul e Gohil (1970) propuseram que botões florais podem competir, na inflorescência, com o desenvolvimento de bulbilhos. Etoh e Ogura (1977) descreveram anormalidades morfológicas nas flores de alho interferindo ou concorrendo para a esterilidade.

Recentemente, a restauração da fertilidade em alho transformou-se em um dos principais objetivos de pesquisadores do gênero *Allium*, onde enfatizaram nos

processos morfológicos e fisiológicos durante o desenvolvimento floral (Kamenetsky e Rabinowitch, 2001, 2002; Etoh e Simon, 2002; Simon e Jenderek, 2003). O sucesso na restauração da fertilidade do alho forneceu evidências de que o florescimento é controlado por vários fatores genéticos diferencialmente regulados pelo fotoperíodo e pela temperatura, e que o genoma do alho contém de fato os genes requeridos para o desenvolvimento floral e a produção de semente (Kamenetsky et al., 2004). Uma compreensão mais completa da regulação do desenvolvimento floral e das suas interações com o ambiente devem melhorar o conhecimento dos processos do florescimento e facilitar a restauração da fertilidade no alho.

Este fato reabre as discussões sobre a origem do polimorfismo da espécie, bem como sua ancestralidade. As formas cultivadas de alho desenvolveram-se, provavelmente, a partir de espécies selvagens (Kotlinska et al., 1993). Supondo-se assim, no entanto, que no centro de origem do alho, onde se situam mais de 600 espécies, incluindo cebola, alho-poró e cebolinha, distribuídas no Afeganistão, Turquia, Irã e Rússia, existam formas e ecótipos de alho com diferentes níveis de sexualidade, chegando, portanto, a produzir sementes botânicas. Os povos primitivos daquelas regiões podem ter selecionado ou preferido tipos exclusivamente assexuais ou mais produtivos (que inibissem o florescimento), gerando as formas cultivadas e estas devem ter sido disseminadas para outros continentes. Vale salientar, ainda, que o alho possui plasticidade fenotípica, ou seja, a interação dos clones com os diversos fatores de ambiente (fotoperíodo, temperatura, adubação orgânica-mineral, irrigação, doenças, além de outros) pode resultar em modificações nos mais variados aspectos relacionados com o bulbo e a planta, dificultando a seleção (Siqueira, 1994). Este fato tem levado à criação de várias denominações

locais para a mesma cultivar, sendo a recíproca também verdadeira, o que causa alguns problemas na manutenção do germoplasma, e nos ensaios regionais de avaliação de cultivares (Filgueira, 1982; Siqueira et al., 1985).

## **2.7. Transformação de alho via *Agrobacterium tumefaciens* e sistemas de transformação gênica.**

As técnicas de transformação genética podem ser consideradas a continuação de uma longa lista de métodos tradicionais de melhoramento, como a indução de mutações, a hibridização entre espécies e gêneros, a duplicação de cromossomos, a cultura de células e tecidos *in vitro* e a fusão de células somáticas (Vieira, 2004).

Na natureza, um fragmento de DNA, parte do plasmídeo bacteriano, é transferido e integrado no genoma de células de plantas infectadas (Lee et al., 1995; Vicedo et al., 1996). No fragmento de DNA (T-DNA-‘Transferred DNA’) que é transferido para a célula vegetal estão genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de opinas e de fitohormônios (Nam, Matthysse e Gelvin, 1997; Tinland, 1996), produtos que são responsáveis pela formação do tumor e sobrevivência da bactéria.

Os hormônios vegetais sintetizados, auxinas e citocininas, induzem um desbalanço hormonal, que tem como consequência uma multiplicação descontrolada das células transformadas, assim como das células vizinhas, resultando na formação do tumor. Cultivando-se tecidos infectados *in vitro*, foram detectadas substâncias específicas nunca antes encontradas em tecidos vegetais, citado por Van Sluys (1999). Estas substâncias foram denominadas opinas e estão especificamente relacionadas com a estirpe bacteriana inoculada (Dessaux, Petit e Tempé, 1993).

Assim, o patógeno *Agrobacterium* cria para si um nicho favorável, pela modificação genética das células da planta, sendo este processo denominado “colonização genética” (Hooykaas e Beijersbergen, 1994) e assim, as estirpes de *Agrobacterium* são classificadas de acordo com o tipo de opina produzida. As opinas estão agrupadas em quatro famílias: octopina, nopalina, manopina e agrocinopina, tendo sido identificados cerca de 20 tipos de opinas (Weising e Kahl, 1996).

A região-T ou T-DNA, é a única parte do plasmídeo transferida para a célula vegetal. Os limites do T-DNA são definidos por 25 pb diretamente repetidos em cada extremidade, e definem a porção do plasmídeo que será transferida (Van Sluys, 1999). A região responsável pelo processo de transferência é denominada de região de virulência (*vir*). Essa região é ativada por compostos fenólicos liberados pelos tecidos vegetais lesados, iniciando o processo de transferência do T-DNA para a célula vegetal (Stachel et al., 1985; Van Sluys, 1999).

O processo de transferência do T-DNA pode ser dividido em duas etapas: uma etapa bacteriana e uma etapa vegetal. A etapa bacteriana inclui eventos que levam à produção e exportação de um vetor funcional contendo a informação genética do T-DNA. A etapa vegetal inclui o reconhecimento entre a *Agrobacterium* e a célula hospedeira, a transdução de sinais vegetais de patogênese e a ativação dos genes *vir* (Tinland, 1996).

A primeira demonstração de que esta interação, bactéria-planta, poderia resultar em sistemas eficientes de transformação em plantas foi à introdução do gene que confere resistência ao antibiótico canamicina em plantas de fumo (Herrera-Estrella et al., 1983), confirmando a possibilidade de manipulação do plasmídeo de *Agrobacterium*, permitindo assim, a passagem de uma informação genética desejada para o interior de uma célula hospedeira (Van Sluys, 1999).

Em monocotiledôneas, muitas plantas transgênicas foram originadas pela transformação mediada por *Agrobacterium* seguidas pela sucedida transformação de arroz com *Agrobacterium* por Hiei et al. (1994). Na espécie *Allium*, Dommissse et al. (1990) relataram que a cebola é um hospedeiro para *Agrobacterium*; entretanto, esta espécie e outras plantas do mesmo gênero são recalcitrantes à transformação genética (Eady et al., 1996). As espécies de *Allium* spp. foram consideradas durante muito tempo recalcitrantes à transformação via *Agrobacterium* e por isso os primeiros trabalhos realizados com alho transgênico utilizaram-se da biobalística (Barandiaran, Di Pietro e Martín, 1998; Ferrer, Linares e González, 2000) e a eletroporação de protoplastos (Hasegawa et al., 1996) como metodologias de transformação.

Em *Nicotiana tabacum*, a melhor temperatura de co-cultivo ficou entre 19-22°C e 22°C para *Phaseolus acutifolius* A. Gray, mostrando que a transferência de T-DNA é dependente da temperatura (Dillen et al., 1997). Houve um efeito positivo em *Arabidopsis thaliana* quando foi adicionado acetoseringona ao meio de crescimento bacteriano com pH ajustado para 5,6 (Sheikholeslam e Weeks, 1987). Estes resultados indicam que a indução da região *vir* é dependente de pH ácido (5,0-5,7) na presença de acetoseringona (Alt-Moerbe et al., 1988). Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000), testaram a influência da temperatura e do período de co-cultivo na transformação em calos de alho, concluindo que os calos de alho tiveram maior expressão do gene *GUS* a 22°C e com 3 dias de co-cultivos no escuro, com adição de acetoseringona ao meio de cultura e pH 5,2.

Atualmente, há trabalhos não só demonstrando a possibilidade, mas também descrevendo protocolos eficientes de transformação via *Agrobacterium* tanto em

alho (Kondo, Hasegawa e Suzuki, 2000; Zheng et al., 2004; Eady et al., 2005), quanto em cebola (Eady, Weld e Lister, 2000; Zheng et al., 2001).

A seleção das cepas de *Agrobacterium* a serem empregadas nos estudos de transformação é uma etapa importante para o sucesso do procedimento, especialmente em espécies de monocotiledôneas. Para liliáceas, tem sido descrito com sucesso o uso das cepas EHA105 e LBA4404 para cebola (Zheng et al., 2001) e as cepas EHA101 e LBA4404 para lírio e alho (Kondo, Hasegawa e Suzuki, 2000; Hoshi et al., 2004; Eady et al., 2005).

Tão importante quanto à cepa a ser utilizada num programa de transformação de alho é a metodologia da transformação, como a origem das células a serem transformadas, as condições de co-cultivo (tempo, temperatura, luminosidade, presença de substâncias indutoras de infecção, como acetoseringona), o processo de seleção das células transformadas (tipo de antibiótico e quantidade) e os procedimentos de regeneração das plantas (meios de cultivo, reguladores vegetais, condições ambientais, repicagens) (Holford, Hiernadez e Newbury, 1992; Confalonieri et al., 1995). Os melhores protocolos descritos para a transformação de calos de alho via *Agrobacterium* foram relatados por Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000) e Zheng et al. (2004), os quais utilizaram cultivares japonesas e européias, respectivamente, e para a indução de calogênese utilizando segmentos radiculares, foi relatado por Zheng et al. (2003), porém para cultivares brasileiras de alho não há relatos.

Um fator de grande importância no sucesso na transformação de plantas via *Agrobacterium* é a escolha do sistema genético da transformação. A maioria dos trabalhos descritos atualmente utiliza-se de sistemas binários, cujos plasmídeos se beneficiam por apresentarem os genes de virulência e a região de T-DNA

localizados em duas unidades genéticas distintas. Essa característica oferece flexibilidade para a sua manipulação molecular *ex vivo*, dado o menor tamanho do plasmídeo binário em relação ao plasmídeo de tipo selvagem (Van Sluys, 1999).

A série de vetores modulares CAMBIA foi desenvolvida com o intuito de obter uma série de vetores similares (Roberts et al., 1997), com opções de marcadores de seleção genética, permitindo também a inclusão de novas opções além de testar promotores e avaliar suas próprias construções.

Um fator chave parece ser uma fase de proliferação de calos transformados antes da indução de regeneração de gemas, o que poderia ser obtido pela combinação de um período de escuro longo e variação nas concentrações de reguladores vegetais (Mourgues et al., 1996).

### **3. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolos de regeneração para cultivares comerciais brasileiras e de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens* de calos oriundos de segmentos radiculares de alho, visando no futuro introduzir genes envolvidos nas rotas conservadas de desenvolvimento floral, como o *LEAFY* (*LFY*), que poderão despertar a ontogênese sexual na espécie.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP.

##### **4.1. Material vegetal**

Foram utilizadas oito cultivares de alho (*Allium sativum* L.), de diversos grupos (semi-nobres, nobres e comuns), classificadas de acordo com o seu ciclo vegetativo, aspecto comercial e número médio de bulbilhos por bulbo. As cultivares utilizadas foram 'Amarante-Embrapa', 'Roxinho 5063', 'IAC 75 – Gigante de Curitiba', 'IAC 63 – Mexicano Br' e 'Lavínia 1632' pertencente ao grupo semi-nobre de ciclo médio. As cultivares 'Cajuru 2315' e 'Cateto Roxo' pertencem ao grupo comum de ciclos precoce e médio, respectivamente. A cultivar 'Jonas' pertence ao grupo nobre (alhos vernalizados).

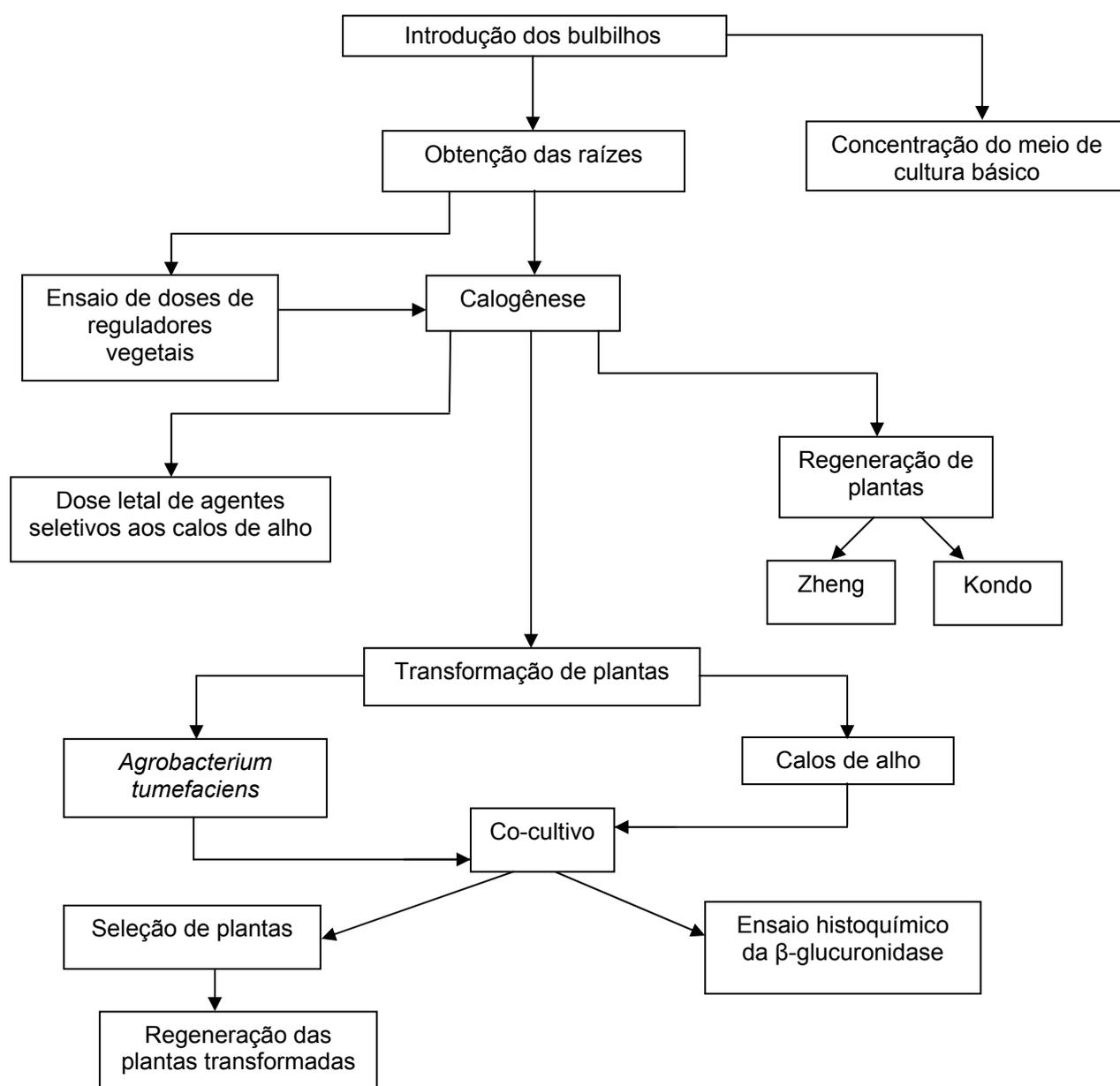
Todas as cultivares pertenciam ao Banco de Germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), e foram gentilmente cedidas pelos Pesquisadores Dr. Paulo Espíndola Trani e Dr. Walter José Siqueira – IAC, e pelo Pesquisador Dr. Joaquim Adelino de Azevedo Filho, IAC / APTA Pólo Regional Leste Paulista.

##### **4.2. Meio de cultura**

A constituição dos meios de cultura foi basicamente a mesma para os diferentes experimentos descritos a seguir contendo sais e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), contendo 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2 g L<sup>-1</sup> de phytigel, com o pH do meio ajustado para 5,8 antes da adição do agente

geleificante, sendo esterilizado através de autoclavagem a 121°C, à pressão de 1 atm, por 20 min.

O esquema 1 apresenta os passos resumidos dos experimentos de regeneração e transformação de plantas realizados nesse trabalho, que serão a seguir detalhados descritivamente em tópicos.



**Esquema 1.** Metodologia para desenvolvimento das técnicas *in vitro* visando regeneração e transformação genética de alho.

### **4.3. Obtenção e cultivo dos explantes**

Os bulbos de todas as cultivares foram submetidos a uma seleção individual, com o objetivo de serem escolhidos aqueles de melhor aspecto fitossanitário. As folhas que envolvem o conjunto de bulbilhos (túnicas) foram removidas e mais uma vez foi realizada uma nova seleção, desta vez, para os bulbilhos. Dos bulbilhos selecionados, foram retiradas as folhas protetoras (ou película) e imersos em etanol 70% (v/v) durante 5 min, seguindo-se a esterilização em hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v), adicionado de duas gotas Tween 20 para 100 mL de solução, sendo o tratamento mantido por 20 min. Em câmara de fluxo laminar, os bulbilhos foram lavados dez vezes em água destilada autoclavada para retirada do excesso de hipoclorito. Em seguida, cada explante teve seu tamanho reduzido para evidenciar a região meristemática apical.

Os ápices de cada bulbilho de todas as cultivares foram transferidos para tubos de ensaio (25 x 125 mm), contendo 20 mL do meio de cultura básico MS (meio de introdução), sendo um meristema por tubo (Anexo A). Os explantes foram incubados em sala de crescimento a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 16 h de luz fornecida por lâmpadas fluorescentes de luz branca fria, obtendo-se aproximadamente  $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , e repicados a cada quatro semanas.

#### **4.3.1. Concentração do meio de cultura básico**

Foi realizado um experimento com a finalidade de otimizar a formação de raízes, tanto em termos de quantidade como de qualidade, para serem utilizadas na indução de calos. Foi inoculado um bulbilho por tubo de ensaio, com dez repetições e três tratamentos para todas as cultivares, considerando-se o tubo de ensaio com um bulbilho como unidade experimental. Os meristemas de cada bulbilho foram

transferidos para tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultura, nas seguintes combinações:

- C1 = sais e vitaminas MS nas concentrações normais, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2 g L<sup>-1</sup> de phytigel;

- C2 = sais e vitaminas MS com metade das concentrações normais, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2 g L<sup>-1</sup> de phytigel;

- C3 = água + 0,8% de ágar;

Os explantes foram subcultivados a cada 30 dias, durante três meses. Os explantes foram incubados a 27 ± 2°C com fotoperíodo de 16 h de luz a 31 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Após os três meses, o número de bulbilhos que formaram raízes foram expressos em porcentagem.

#### 4.4. Indução de calos

Para indução de calos foram utilizadas raízes de bulbilhos oriundas da cultura *in vitro*, após quatro semanas de cultivo. As raízes de cada bulbilho foram coletadas e cortadas em segmentos de aproximadamente 1 cm. Esses segmentos radiculares foram transferidos para meio de indução de calo (IC), consistindo de meio MS básico, acrescido de 4,5 μM de 2,4-D (1 mg L<sup>-1</sup>); 0,5 μM de iP (0,1 mg L<sup>-1</sup>) e caseína hidrolisada (0,2 g L<sup>-1</sup>), segundo Zheng et al. (2003) (Anexo B). Posicionaram-se 25 segmentos por placa de Petri (90 x 15 mm) contendo 25 mL de meio de cultura, sendo mantidas no escuro a 27 ± 2°C. Os explantes, 25 segmentos radiculares de pelo menos 10 placas, foram subcultivados a cada 30 dias, durante dois meses. Após esse período, para cada cultivar, os segmentos que originaram calos foram estimados e as médias expressas em porcentagem, respectivos erro padrão de cada média e plotados em gráfico.

#### **4.4.1. Indução de calogênese empregando outras combinações de reguladores vegetais**

Realizou-se um experimento para otimizar a eficiência da formação de calos, tanto em termos de quantidade como de qualidade, para ser empregada nos testes de regeneração e na transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. Este experimento teve como base o meio de cultura básico MS, acrescido de diferentes combinações de BAP + 2,4-D e BAP + Picloran (Anexo C). Considerou-se a placa de Petri contendo 10 segmentos como unidade experimental, com oito tratamentos e seis repetições. Os segmentos radiculares, com 1 cm, foram transferidos para meio de cultura básico MS, acrescido de BAP, 2,4-D e Picloran nas seguintes combinações:

- Controle (ausência de regulador vegetal);
- L1 (4,43  $\mu$ M BAP);
- L2 (4,43  $\mu$ M BAP + 0,045  $\mu$ M 2,4-D);
- L3. (4,43  $\mu$ M BAP + 0,45  $\mu$ M 2,4-D);
- L4 (4,43  $\mu$ M BAP + 4,5  $\mu$ M 2,4-D);
- L5 (4,43  $\mu$ M BAP + 0,042  $\mu$ M Picloran);
- L6 (4,43  $\mu$ M BAP + 0,42  $\mu$ M Picloran);
- L7 (4,43  $\mu$ M BAP + 4,24  $\mu$ M Picloran);

Os explantes foram subcultivados a cada 30 dias, durante dois meses. Posicionaram-se 10 segmentos por placa de Petri contendo 25 mL de meio de cultura, sendo mantidas no escuro a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após os dois meses, o número de segmentos que originaram calos foi estimado e expresso em porcentagem.

#### **4.5. Regeneração *in vitro* de plantas**

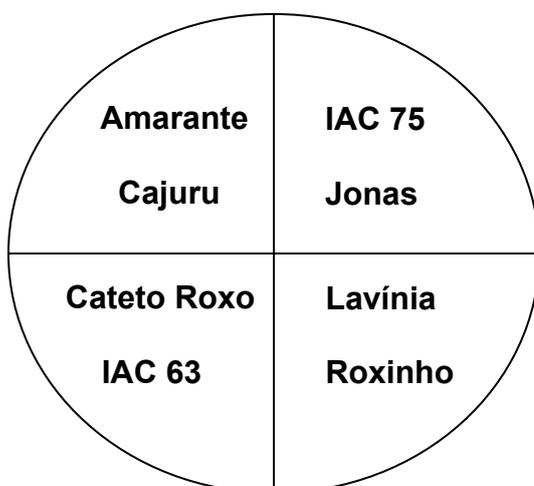
Os calos obtidos a partir de segmentos radiculares, de todas as cultivares, foram transferidos para frascos contendo meios de regeneração distintos, como proposto por Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000) e Zheng et al. (2003). Os meios de cultura foram compostos por meio de cultura básico MS, adicionado de 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) e 0,1  $\mu\text{M}$  de ANA ( $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ ), segundo Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000); ou Zheng et al. (2003), adicionado de 4,6  $\mu\text{M}$  de cinetina ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Anexos D e E). Os explantes foram incubados a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 16 h de luz ( $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Os calos foram transferidos para meio fresco a cada duas semanas, durante cinco meses, segundo Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000), ou dois meses segundo Zheng et al. (2003). Os calos de todas as cultivares que formaram brotos foram avaliados em relação à taxa de regeneração, determinando assim a(s) cultivar(es) com maior capacidade de regeneração, e o melhor meio de cultura para a regeneração. Após o período de cada tratamento, o número de calos que originaram brotos foi estimado e expresso em porcentagem.

#### **4.6. Dose letal de agentes seletivos aos calos de alho**

A dose letal dos calos de alho da higromicina e da canamicina foi avaliado visando determinar a dose ideal do agente seletivo nos experimentos de transformação. Os calos obtidos a partir de segmentos radiculares, de todas as cultivares, foram transferidos para meio IC, contendo concentrações crescentes dos antibióticos higromicina ou canamicina. As concentrações utilizadas de higromicina foram 0; 25; 50; 75 e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  ou de canamicina foram 0; 50; 100; 200 e  $400 \text{ mg L}^{-1}$ .

Foram inoculados três calos das oito cultivares por placa de Petri contendo 25 mL de meio de cultura de acordo com a Figura 3, sendo três placas por tratamento de cada antibiótico. Essas placas foram incubadas a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 16 h de luz a  $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Após os dois meses, foi avaliado o número de calos sobreviventes em cada tratamento e, com isso, determinando qual concentração de cada um dos antibióticos foi letal para as cultivares.



**Figura 3.** – Representação do posicionamento dos três calos das oito cultivares na mesma placa de Petri contendo meio de cultura mais antibióticos, para o teste de dose letal, sendo três placas por tratamento de cada antibiótico.

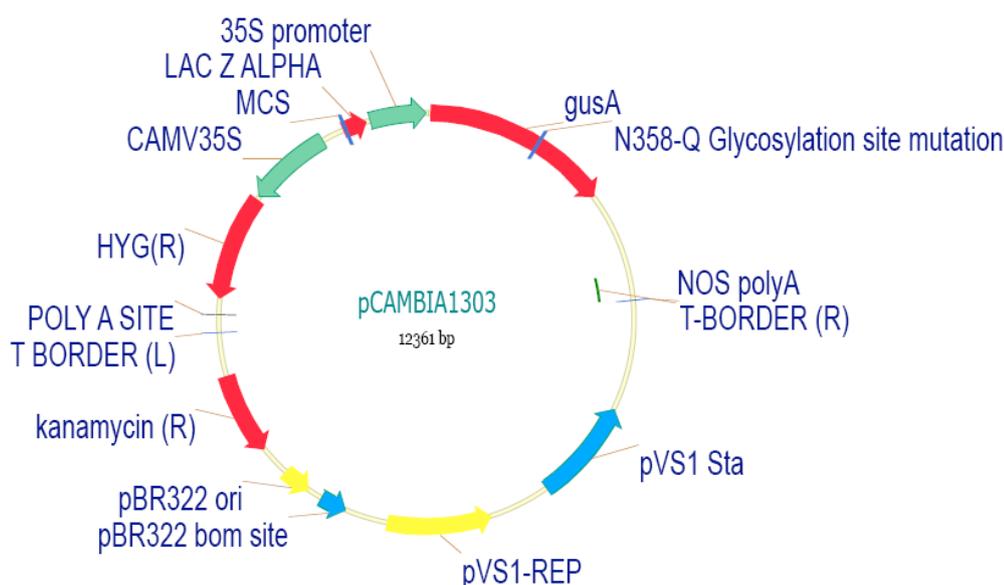
#### **4.7. Regeneração das plantas transformadas via organogênese**

Os calos transformados e selecionados pela higromicina ou canamicina foram transferidos após dois meses do meio de seleção para o meio de regeneração, segundo Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000), contendo  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de cefotaxima e  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de higromicina ou  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina. Os calos foram transferidos para meio fresco a cada duas semanas. Após 4-5 meses, os brotos regenerantes foram transferido para meio de cultura básico MS (meio de enraizamento) composto por sais e vitaminas MS,  $30 \text{ g L}^{-1}$  sacarose,  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de cefotaxima,  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de

higromicina ou 200 mg L<sup>-1</sup> de canamicina, sem reguladores vegetais, 2 g L<sup>-1</sup> phytigel (Anexo F), por dois meses, sendo transferidos para meio fresco a cada 30 dias.

#### 4.8. Linhagem de *Agrobacterium*, plasmídeo e condições de cultura

A linhagem de *Agrobacterium* com o plasmídeo binário LBA4404 (pCAMBIA 1303) foi utilizada nos ensaios de transformação genética. O vetor da série pCAMBIA 1303 (Figura 4) possui resistência na bactéria a canamicina (50 mg L<sup>-1</sup>); seleção de plantas transformantes com higromicina (25 a 50 mg L<sup>-1</sup>); “polinker” de pUC18 em *lacZ* $\alpha$ , contendo também o gene *mgfp5* expressando GFP em fusão para tradução com *gusA* com o arranjo: pCAMBIA1303 possui 5' – *uidA-mgfp5* - 3'.



**Figura 4.** – Diagrama esquemático do plasmídeo utilizado: região de T-DNA de pCAMBIA1303. Abreviaturas: L e R – bordas esquerda e direita; ORI – origem de replicação em *Escherichia coli*; *nos* – nopalina sintetase (promotor ou sinal de terminação poliadenina); 35S – promotor CaMV 35S; MCS: sítio múltiplo de clonagem; Kanamycin (R) – neomicina fosfotransferase II ( $kan^R$ ); HYG(R) – higromicina fosfotransferase; *gusA* – gene da  $\beta$ -glucuronidase.

A *Agrobacterium* foi mantida em solução 50% glicerol, a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A bactéria foi cultivada em meio de cultura AB sólido (5 g de glicose e 15 g de ágar em 900 mL de água. Após a autoclavagem, adicionar 50 mL do Tampão AB 20x e 50 mL dos Sais AB 20x), contendo rifampicina ( $50\text{ mg L}^{-1}$ ) adicionado pelo antibiótico para seleção da bactéria canamicina na concentração de  $50\text{ mg L}^{-1}$ , por 72 h. Após este período, uma única colônia foi isolada e transferida para um frasco de vidro estéril (250 mL) contendo 50 mL de meio de cultura AB líquido, suplementado com o antibiótico canamicina, incubado sob agitação constante de 150 rpm a  $28^{\circ}\text{C}$ , até atingir a fase logarítmica de crescimento ( $\text{OD}_{600} = 0,5$  a  $0,6$ ) por 16 h. Após a incubação, a suspensão bacteriana foi sedimentada por centrifugação a  $4.500\text{ g}$  por 15 min e ressuspendida, no mesmo volume, em meio de cultura MS líquido (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de  $100\text{ }\mu\text{M}$  de acetoseringona (3'5'-Dimethoxy-4'-hydroxy-acetophenone),  $10\text{ g L}^{-1}$  de glicose,  $1\text{ g L}^{-1}$  de caseína hidrolisada, com pH ajustado para 5,2, para a co-cultura líquida (Anexo G).

#### **4.8.1. Inoculação e co-cultura**

Os calos da(s) cultivar(es) selecionada(s), após dois meses no meio de indução de calo, foram colocados sobre papel de filtro estéril e levemente feridos. Esses calos foram submersos na suspensão das *Agrobacterium* contendo a construção de interesse por 15 min. Após a inoculação, os calos foram secos em papel de filtro estéril, e transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura MS acrescido de  $100\text{ }\mu\text{M}$  de acetoseringona,  $10\text{ g L}^{-1}$  de glicose,  $1\text{ mg L}^{-1}$  de caseína hidrolisada,  $2\text{ g L}^{-1}$  de phytigel e pH 5,2 (Anexo H). Esses calos foram mantidos na ausência de luz, à temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por um período de 3 dias, para o co-cultivo.

#### **4.8.2. Seleção de plantas**

Ao fim do co-cultivo, os calos foram lavados cinco vezes com solução esterilizada de cefotaxima ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) e transferidos para meio de cultura de seleção, constituído por meio de cultura de indução de calos acrescido de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de cefotaxima e  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de higromicina ou  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina (Anexo I), onde permaneceram até o momento da revelação da atividade *GUS*. A concentração de higromicina ou canamicina utilizada para seleção foi determinada testando-se diferentes concentrações. Os calos co-cultivados foram transferidos para meio de cultura novo em intervalo de duas semanas, durante 2 meses. Assim que se iniciou a proliferação dos calos friáveis, esses foram transferidos para meio de regeneração (Kondo, Hasegawa e Suzuki, 2000).

#### **4.8.3. Ensaio histoquímico da $\beta$ -glucuronidase para a avaliação da eficiência de transformação**

A expressão da  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) foi avaliada pelo ensaio histoquímico descrito por Jefferson (1987) e Lacorte (1998). Os calos após 3 dias de co-cultivo foram imersos na solução contendo  $100 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  pH 7,0,  $10 \text{ mM EDTA}$  pH 7,0,  $0,5 \text{ mM K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ,  $0,5 \text{ mM K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_4] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $1,0 \text{ mM}$  5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-ácido glucurônico (X-Gluc em DMF) e  $0,1 \%$  Triton X-100 (Anexo J) e mantidos a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 h. Após este período, foram desidratados em uma solução de etanol 70% e mantidos sob agitação por 1 h. A clorofila foi removida com trocas de álcool 70% até sua completa remoção. O etanol 70% foi substituído por etanol absoluto e deixado durante 24 h em temperatura ambiente.

A eficiência de transformação foi avaliada com gene bacteriano da enzima  $\beta$ -glucuronidase (*uidA*). Testes histoquímicos com a presença do substrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-ácido glucurônico) e lavagens alcoólicas foram realizados após a transformação, no intuito de se analisar o número de eventos de transformação. O produto desta reação, na presença de oxigênio, forma dímeros, resultando em um precipitado insolúvel, de cor azul (Jefferson, 1987). Após a realização do ensaio histoquímico *GUS*, calculou-se a eficiência de transformação genética definida por Peña et al. (1995), como sendo o resultado do número de gemas transformadas obtidas em relação ao número de explantes inoculados.

#### 4.9. Desenho de iniciadores

Foi buscado no Banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnological Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) o gene *LEAFY* (*LFY*) em alho (*Allium sativum* L.) que está ligado ao florescimento, com a intenção de sua manipulação genética em alho visando a indução do florescimento. O *LFY* de alho foi amplificado com *primers* específicos a partir de regiões conservadas e clonado, como descrito a seguir.

Para o estudo molecular foram desenhados oligonucleotídeos (*primers*) específicos para o gene *LEAFY* (Tabela 1), baseando-se na seqüência de nucleotídeos do gene de alho (AY563104), disponível no NCBI. Para isso foi utilizado o programa Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Os limites estipulados de temperatura de dissociação (TM) e tamanho do amplicon para seleção de iniciadores foram de 70 a 75°C e de 500 a 1000 pb, respectivamente. O par de iniciadores selecionados para o gene *LFY* foi testado para: estabilidade, Tm, conteúdo de base CG (%), e interações entre

iniciadores (homodímeros e heterodímeros), através do programa *NetPrimer* <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>. Sempre que possível os iniciadores foram desenhados de forma a se situarem entre éxons consecutivos, intercalados por um íntron. O que foi possível para o gene *LFY* de alho. Os oligonucleotídeos foram diluídos em água ultrapurificada, sendo o estoque diluído a 50 pmoles  $\mu\text{L}^{-1}$  e a solução de uso, diluída a 5 pmoles  $\mu\text{L}^{-1}$ .

**Tabela 1.** Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados e o tamanho do fragmento esperado na amplificação.

Gene	Oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento
<i>LEAFY</i>	Forward 1: TGCCCCTCGATGCCGTTTCTCA Reverse 1: TCGCAATCGCCTGAACCTGAACGA	520 pb
<i>LEAFY</i>	Forward 2: TCGGTGAACGCTATGGCATCAAGG Reverse 2: GCTCGCTCCCACCTTCTTCGCATA	530 pb

#### 4.10. Extração do DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o método de DOYLE e DOYLE (1990). O DNA genômico foi obtido de bulbilhos de alho descascados e macerados em nitrogênio líquido em almofariz e transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo 650  $\mu\text{L}$  de tampão de extração CTAB a 2% (p/v), 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8,0, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, PVP a 1% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol a 0,2% (v/v) e Proteinase K 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os tubos foram misturados por inversão e incubados a 55°C por 1 h em banho-maria, agitando-se a cada 15 min. Após a incubação, foram adicionados 650  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v), sendo agitados até formar uma emulsão. Em seguida, o material foi submetido à centrifugação a 13.000 *g* por 5 min a 20°C. O sobrenadante obtido foi transferido para novo microtubo e adicionado 650  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado (-5°C), ocorrendo à precipitação dos ácidos nucléicos (DNA e RNA). A solução foi incubada a -20°C durante 3 h.

Posteriormente, procedeu-se à centrifugação a 13.000 *g* por 5 min a 20°C, descartando-se, em seguida, o sobrenadante. O DNA que já se encontrava aderido ao fundo do microtubo, foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% gelado (v/v), e novamente centrifugado (13.000 *g* por 5 min a 4°C). O precipitado foi ressuspensionado em 50 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA), contendo 10 µg mL<sup>-1</sup> de RNase e incubado em banho-maria a 37°C por 30 min, e logo em seguida, armazenado a -20°C. A integridade do DNA e quantificação indireta, por comparação com padrão de DNA de concentração conhecida, foram verificadas em gel de agarose 1%.

#### **4.11. Condições de amplificação, eletroforese e purificação de fragmentos**

O DNA genômico de alho foi submetido à amplificação *in vitro* por PCR utilizando *Taq* DNA Polymerase (Fermentas), conduzidas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). O volume total da PCR foi de 25 µL, adicionando-se 10 µL de DNA genômico (5 ng µL<sup>-1</sup>), 2,5 µL de 10x *Taq* Buffer Fermentas, 0,5 µL de 10 mM dNTP mix, 2 µL de 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 1 µL de cada oligonucleotídeo a 5 pmol µL<sup>-1</sup> e 0,1 µL de *Taq* DNA Polymerase (5 U µL<sup>-1</sup>). A PCR foi estabelecida nas seguintes condições: 94°C por 2 min, 40 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 1 min, seguindo-se de uma extensão por 7 min a 72°C. Esse perfil da PCR foi padrão para os oligonucleotídeos desenhados (1 e 2). Os fragmentos obtidos com as reações de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1x (Tris base; ácido acético glacial; 0,5 M EDTA pH 8,0) a 3 V cm<sup>-1</sup>, com observação sobre luz U.V. e fotodocumentação. A cada uma das amostras foi adicionado 4 µL de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% e ficol tipo 400-DL

15%) contendo o corante SYBRgreen, para visualização das bandas de DNA. Os tamanhos dos fragmentos foram inferidos através de comparação com a migração de fragmentos de marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/*Hind* III Fragments (Invitrogen) e 100 pb (GE Healthcare), também aplicados no gel.

Os fragmentos de interesse foram recortados e purificados utilizando *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen). Com ajuda de um bisturi, recortou-se a banda alvo do gel de agarose, colocada num microtubo e submetida em seguida à pesagem em balança analítica. Foi adicionado 30  $\mu$ L do tampão GS1 para cada 10 mg de gel. Em seguida agitou-se (vortex) a mistura vigorosamente, posteriormente incubando a amostra a 50°C (banho-maria), durante 15 min, até o gel de agarose se dissolver completamente. Após esse passo, a mistura foi transferida para um *Quick Gel Extraction Column* (Invitrogen), onde foi centrifugada a 12.000 *g* por 1 min. Descartou-se o líquido presente no fundo do tubo. Em seguida, foram adicionados 500  $\mu$ L de tampão GS1 a coluna, esta foi incubada a temperatura ambiente por 1 min e novamente centrifugada a 12.000 *g* por 1 min. Após a centrifugação, descartou-se o líquido presente no fundo do tubo e foi adicionado 700  $\mu$ L de *Wash Buffer* (W9) a coluna, esta foi incubada a temperatura ambiente por 5 min e novamente submetida à centrifugação de 12.000 *g* por 1 min. Após a centrifugação, descartou-se o líquido presente no fundo do tubo e novamente submeteu-se à centrifugação de 12.000 *g* por 1 min para eliminar qualquer resíduo. Então, a coluna foi transferida para um *Recovery Tube* (Invitrogen), e adicionada no centro da coluna 30  $\mu$ L de água miliQ autoclavada morna (65 a 70°C), onde foi incubada a temperatura ambiente por 1 min. Após esse tempo, centrifugou-se a amostra a 12.000 *g* por 2 min para recuperar o DNA presente na coluna.

Para a verificação da integridade dos produtos purificados, os mesmos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1x e visualizados por iluminação UV.

#### **4.11.1. Ligação num vetor de clonagem e MiniPrep**

Foi realizada a ligação do produto de DNA amplificado e purificado em um vetor de clonagem pGEM-T Easy seguindo as especificações do Kit de clonagem (Promega). A ligação foi mantida a 8°C por 16 h. Após esse período, 2 µL da ligação foram transferidos para um tubo contendo células eletrocompetentes de *E.coli* DH10B utilizando-se um eletroporador (Micropulser – BioRad) e uma cubeta de 0,2 µm, previamente resfriada no gelo. A cubeta foi colocada no eletroporador, e um pulso de corrente elétrica de 1.8 kV foi aplicado. Imediatamente, foi adicionado na cubeta 1 mL de meio SOC (20 g L<sup>-1</sup> de triptona, 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 0,5 g L<sup>-1</sup> de NaCl, 10 mL L<sup>-1</sup> de solução KCl 250 mM, 5 mL L<sup>-1</sup> de solução MgCl<sub>2</sub> 2 M esterilizada, 20 mL L<sup>-1</sup> de solução de glicose 1 M filtrada e esterilizada). Após a mistura, o conteúdo da cubeta foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e foi mantido a 37°C durante 1 h, sob agitação constante. Em seguida, o microtubo foi ligeiramente centrifugado, por 5 min a 2.000 g, para a sedimentação das bactérias, e o sobrenadante foi descartado. O volume restante foi plaqueado em meio sólido LB (Luria-Bertani, composto por 10 g L<sup>-1</sup> de triptona, 10 g L<sup>-1</sup> de NaCl e 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura) contendo ampicilina (100 µg mL<sup>-1</sup>), 40 µL de IPTG (isopropil β-D-galactopiranoside) 100 mM e 20 µL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosideo) 50 mg mL<sup>-1</sup>. As placas foram incubadas por 16 h em estufa a 37°C. Depois desse período, colônias brancas, que correspondem às bactérias transformadas com o vetor contendo o inserto de interesse foram selecionadas.

As colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido LB com ampicilina ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e mantidas sob agitação constante de 140 rpm a  $37^\circ\text{C}$  por 16 h. Após o crescimento das colônias, 1,5 mL do volume foi submetido à centrifugação a  $10.000 g$  por 1 min. O sobrenadante foi descartado, sendo esse procedimento repetido por mais uma vez. Em seguida, o precipitado foi totalmente ressuscitado em  $300 \mu\text{L}$  de Solução I (glicose 50 mM, Tris-HCl pH 8,0 0,25 mM e  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  10 mM) com a ajuda de um agitador, incubando-se a temperatura ambiente por 10 min. Após esse período, foi adicionado  $300 \mu\text{L}$  de Solução II (NaOH 0,2 M e 1,0% SDS), misturando-se por inversão e incubando-se no gelo por 5 min. Em seguida, acrescentou-se  $300 \mu\text{L}$  de Solução III (KOAc 3M pH 5,5), também misturando-se por inversão e incubando-se no gelo por 5 min. Posteriormente, realizou-se uma centrifugação por 10 min a  $10.000 g$ , com isso transferindo-se o sobrenadante de cada tubo para microtubos novos, aos quais foram adicionados  $500 \mu\text{L}$  de isopropanol gelado. Os microtubos foram mantidos a  $-20^\circ\text{C}$  por 30 min, seguido de centrifugação a  $10.000 g$  por 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi feita a lavagem do precipitado com  $500 \mu\text{L}$  de álcool 70%, submetidos a centrifugação de  $10.000 g$  por 5 min a  $4^\circ\text{C}$ . Os microtubos foram deixados à temperatura ambiente até que as amostras secassem. Posteriormente, as amostras foram ressuscitadas em  $50 \mu\text{L}$  de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA), contendo  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de RNase.

Para confirmar a presença do inserto nos plasmídeo, foram realizadas novas reações de PCR utilizando os *primers* específicos para o gene *LEAFY*. As reações ocorreram nas mesmas condições que as citadas no tópico 4.11. Também foram feitas digestões, num volume final de  $20 \mu\text{L}$ ,  $1 \mu\text{L}$  de DNA ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $1 \mu\text{L}$  da enzima de restrição *EcoRI* ( $12 \text{ U mL}^{-1}$ ),  $2 \mu\text{L}$  do tampão H da enzima e  $0,2 \mu\text{L}$  de BSA

(10 mg mL<sup>-1</sup>). A reação de digestão foi incubada por 2 horas a 37°C (banho-maria). Em seguida, o resultado de todas essas reações foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x.

#### 4.11.2. Seqüenciamento das amostras de DNA genômico

As amostras dos clones obtidos foram submetidas à reação em termociclador para o seu seqüenciamento, seguindo orientações do *kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare). Para um volume final de reação de 10 µL, utilizou-se 1 µL de DNA (150 ng), 3 µL de tampão Save\$, 1 µL de mix Kit e 0,5 µL *primer* (T7 ou Sp6 5 pmol µL<sup>-1</sup>). As condições da termociclagem foram 30 ciclos de 95°C por 20 s, 50°C por 15 s e 60°C por 1 min. As amostras foram então precipitadas ao adicionar 80 µL de isopropanol 65%, seguido de leve agitação. A mistura foi incubada a temperatura ambiente e no escuro por 15 min. Em seguida, centrifugou-se a 4.000 *g* a 20°C por 45 min. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e adicionado 150 µL de etanol 60% gelado. Seguiu-se por uma nova centrifugação a 4.000 *g* a 20°C por 15 min, e, novamente o sobrenadante foi descartado. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente e no escuro por 1 h para que pudessem secar completamente. Foram adicionados 10 µL de formamida seguido de agitação para ajudar a ressuspender as amostras. Em seguida, cada amostra foi encaminhada para o seqüenciador ABI-3100.

As seqüências de bases nucleotídicas obtidas com o seqüenciamento, foram submetidas a alinhamentos comparativos de seqüências traduzidas a aminoácidos com a ferramenta BLASTx (Basic Lenth Alignment Search Tool X, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para confirmação da sua similaridade com a seqüência da proteína do gene *LEAFY* presente no banco de dados do NCBI.

#### **4.12. Análises estatísticas**

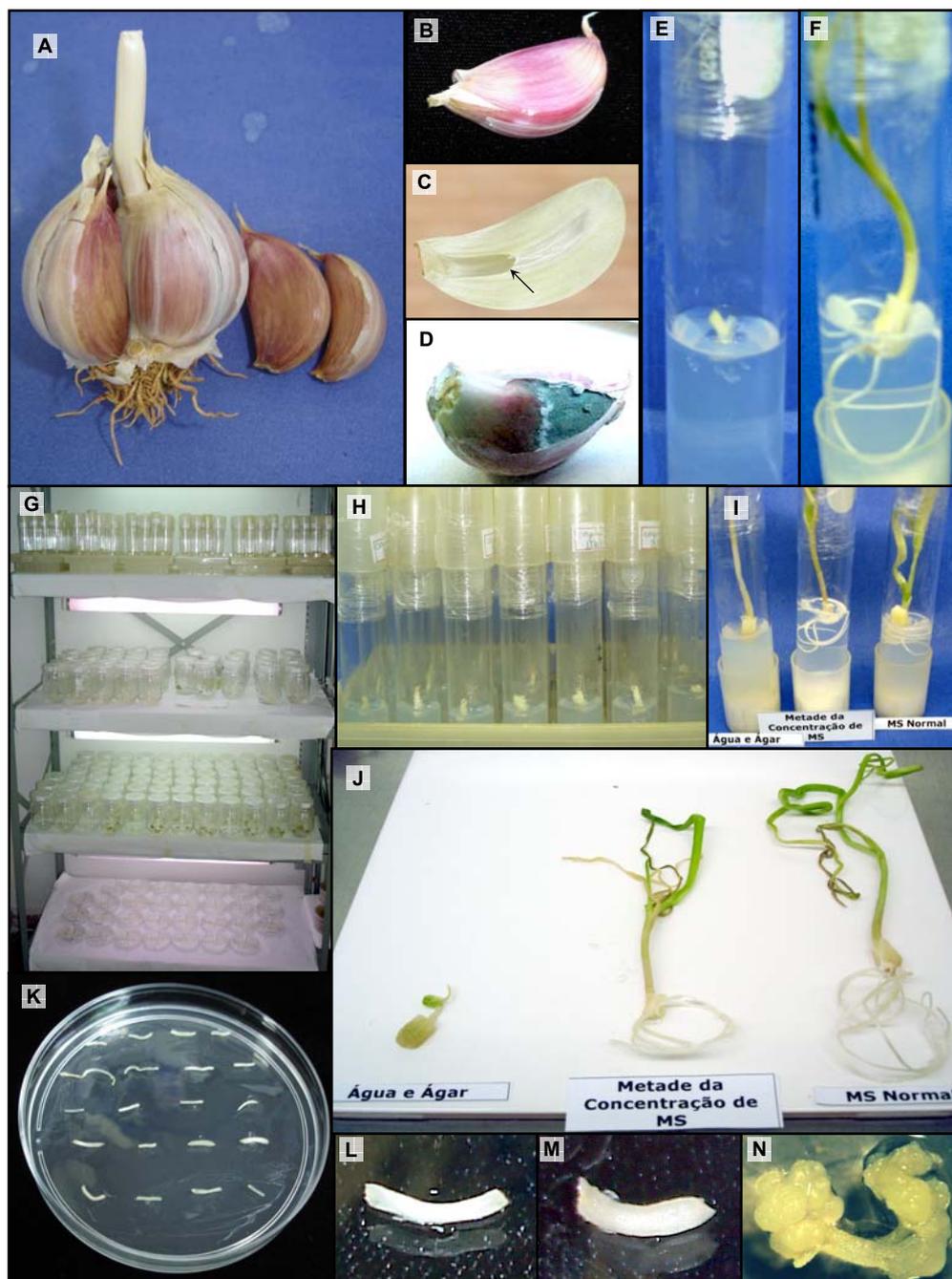
Nos experimento de eficiência de regeneração, foi utilizado delineamento estatístico fatorial 2 x 8, sendo 2 tipos de meios de cultura e 8 cultivares de alho. Os dados foram analisados no pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc. Cary, NC, EUA) para os fatores: meio de cultura (Kondo e Zheng) e as 8 cultivares, e para a interação [meio de cultura x cultivar]. A variável regeneração foi avaliada e sempre que apresentou diferença estatística na análise de variância foi então submetida ao teste de médias de Tukey.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

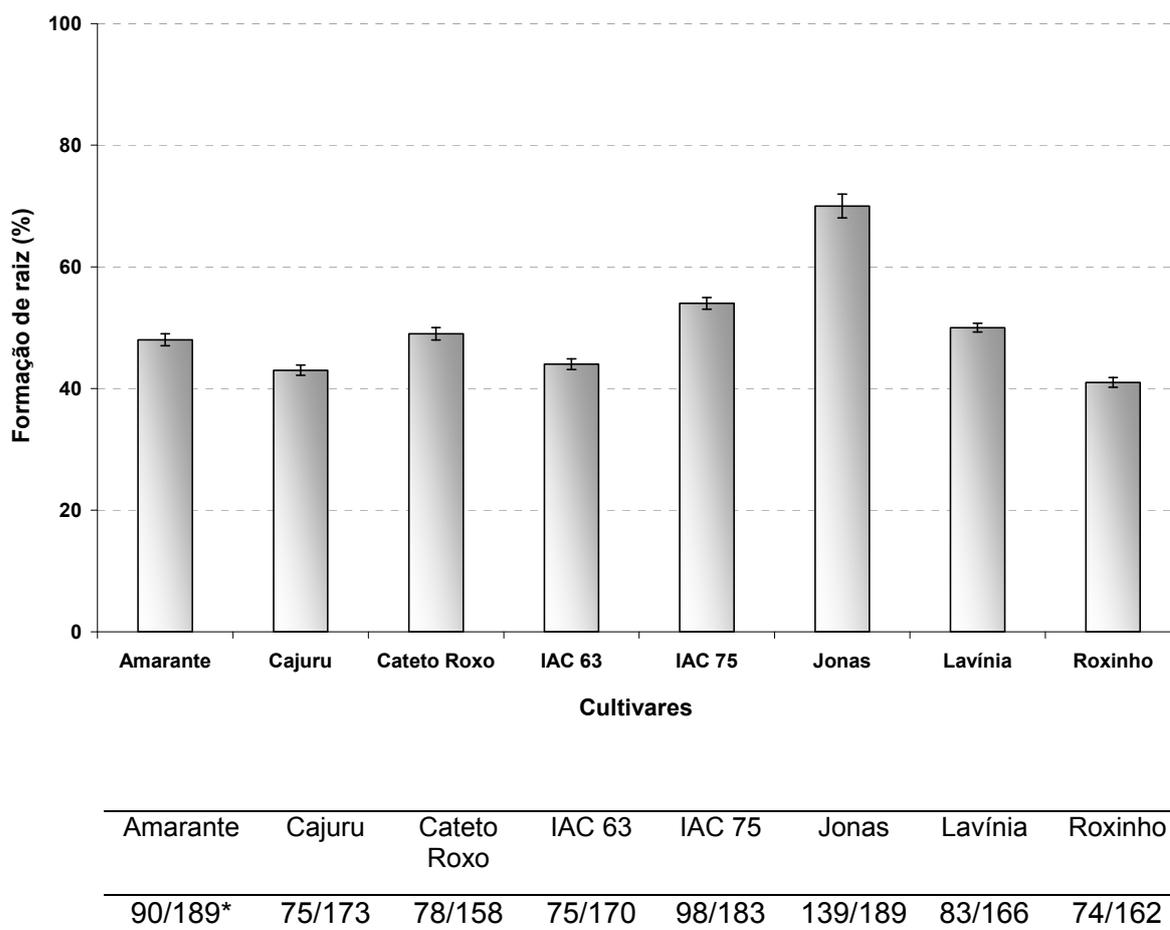
### **5.1. Obtenção e cultivo dos explantes**

Foram introduzidos bulbilhos de alho e as cultivares utilizadas foram 'Amarante-Embrapa', 'Roxinho 5063', 'IAC 75 – Gigante de Curitiba', 'IAC 63 – Mexicano Br', 'Lavínia 1632', 'Cajuru 2315', 'Cateto Roxo' e 'Jonas' (Figura 5). Após 30 dias de cultivo os bulbilhos das oito cultivares introduzidas formaram raízes e parte aérea (Figura 5F). Inicialmente, a contaminação dos bulbilhos introduzidos de todas as cultivares foi um dos problemas principais, atingindo cerca de 30% dos explantes. Uma das principais causas é de que as primeiras amostras de bulbos vieram contaminados (Figura 5D), dificultando assim a cultura *in vitro*. Para isso, foram feitas algumas modificações em relação a desinfestação alterando a quantidade de hipoclorito de sódio e o tempo em que os bulbilhos ficavam nessa solução, e com isso não se observou mais nenhuma contaminação. Durante todos os experimentos foram introduzidos *in vitro* mais de 200 bulbilhos das oito cultivares.

As raízes obtidas *in vitro* eram cortadas em segmentos de aproximadamente 1 cm e transferidas para placas contendo meio IC. Todas as cultivares apresentaram a formação de raízes, mas em proporções distintas. As cultivares 'IAC 75', 'Jonas' e 'Lavínia' foram as que mais raízes formaram, em cerca de 50% dos bulbilhos (Figura 6).

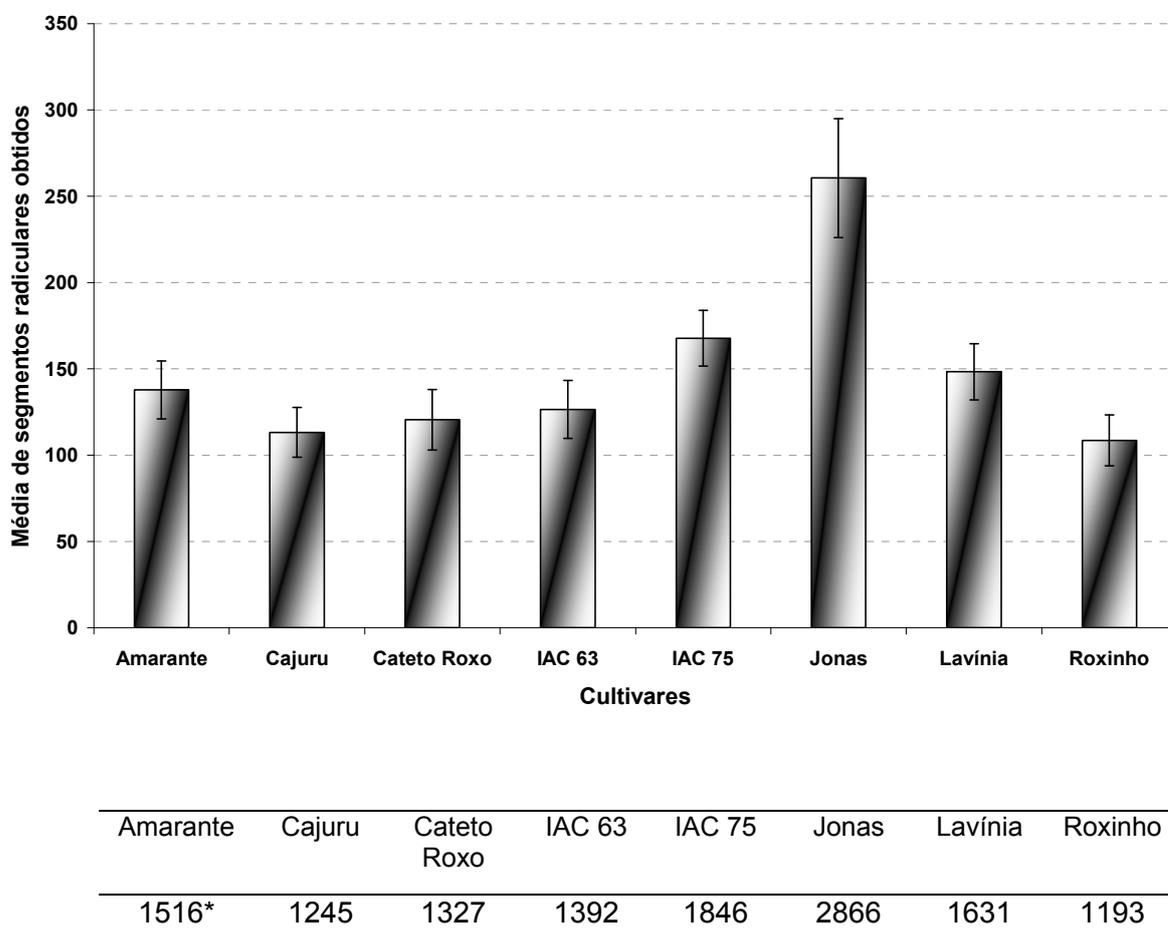


**Figura 5.** Estabelecimento da cultura *in vitro* de alho. Bulbo e bulbilhos selecionados da cultivar 'Jonas' (A); bulbilho sadio (B); região meristemática do bulbilho (C); bulbilho contaminado (D); meristema introduzido *in vitro* no meio de cultura MS (E) e após 30 dias mostrando a formação de raízes e da parte aérea (F); experimentos de cultura *in vitro* de alho na sala de luz (G); tubos de ensaios contendo meristemas de alho (H); efeitos dos meios de cultura, após 30 dias, na formação de raízes e da parte aérea (I e J); placa contendo segmentos radiculares em meio de cultura para indução de calo (K); segmento radicular recém introduzido (L), após 15 dias evidenciando o intumescimento do tecido (M) e calo originado após 60 dias (N).



**Figura 6.** Média de bulbilhos que formaram raízes nas oito cultivares de alho após 30 dias, utilizadas para a obtenção de segmentos radiculares usada para a calogênese em todas as introduções. Legenda: valores de formação de raízes mostrados na Figura. \* X/Y; X: número de bulbilhos que formaram raízes. Y: número total de bulbilhos introduzidos.

Entre as cultivares que apresentaram maior formação de raízes, destacaram-se a 'Jonas' que gerou uma maior quantidade de segmentos radiculares com mais de 2800 segmentos, seguida da 'IAC 75', com mais de 1800 segmentos (Figura 7). Observou-se que após a terceira repicagem os bulbilhos introduzidos não formavam mais raízes e, sim bulbificavam, necessitando assim de novas introduções.



**Figura 7.** Média de segmentos radiculares obtidos das oito cultivares de alho após 30 dias de cultivo dos bulbilhos, utilizadas para a calogênese. Legenda: valores totais de segmentos radiculares obtidos de todas as cultivares mostrados na Figura. \* X: numero total de segmentos radiculares obtidos.

### 5.1.1. Concentração do meio de cultura básico

Foi realizado um experimento, testando-se a concentração do meio de cultura básico com a finalidade de otimizar a formação de raízes, tanto termos de quantidade como em qualidade, para serem utilizadas na indução de calos, sendo um bulbilho por tubo de ensaio, com dez repetições e três tratamentos para todas as cultivares, considerando-se o tubo de ensaio com um bulbilho como unidade

experimental. Os meristemas de cada bulbilho foram transferidos para tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultura, nas seguintes combinações:

- C1 = sais e vitaminas MS nas concentrações normais, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2 g L<sup>-1</sup> de phytigel;

- C2 = sais e vitaminas MS com metade das concentrações normais, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2 g L<sup>-1</sup> de phytigel;

- C3 = água + 0,8% de ágar;

Os bulbilhos introduzidos no meio C1, após 30 dias, formaram mais de 50% de raízes do que nos outros dois meios testados (C2 e C3), visto que os bulbilhos introduzidos no meio C3 não formaram raízes (Figura 5I e J). Concluindo assim que o melhor meio de cultura para todas as cultivares formarem raízes é o meio básico C1, como proposto por Zheng et al. (2003).

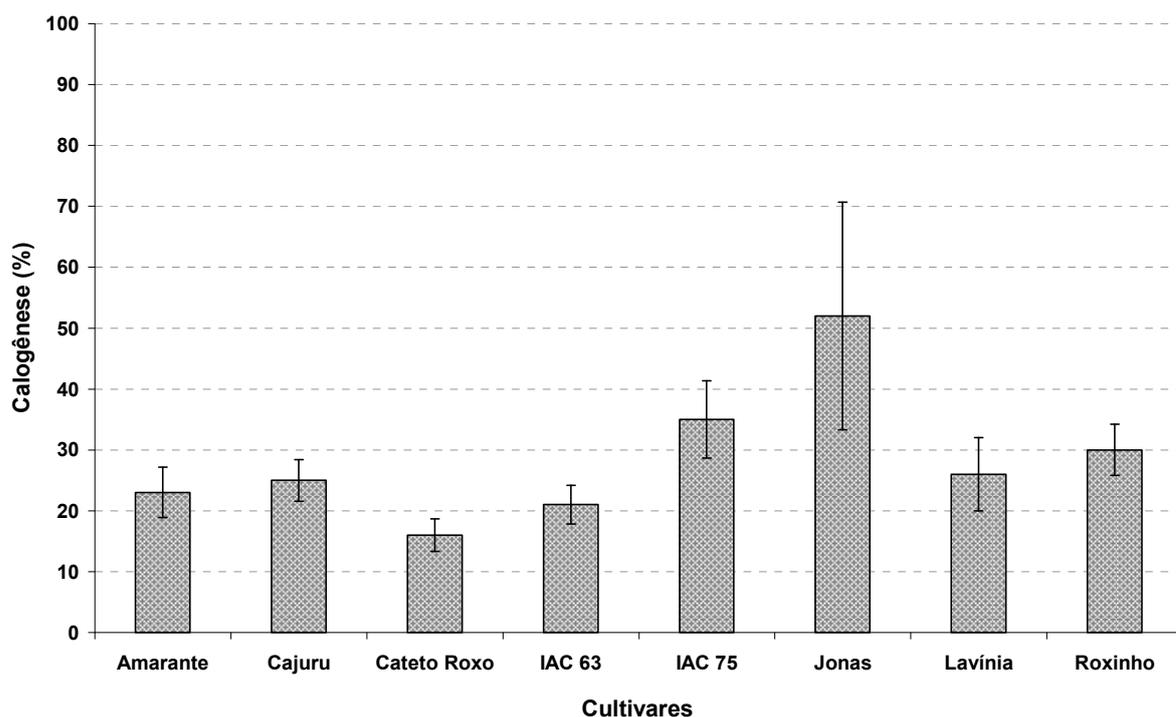
## 5.2. Indução de calos

Os segmentos radiculares foram testados na indução de calogênese demonstrando ser um explante favorável. O processo de calogênese caracterizou-se por um crescimento inicial do explante, intumescimento do tecido e formação de pequenas pontuações de calos, distribuídos na base e, ou, em todo o explante, seguidos da formação maciça de tecido calogênico (Figura 5L, M e N). As cultivares 'Cateto Roxo', 'Cajuru' e 'Roxinho' não apresentaram formação de calo aos 30 dias, somente quando os segmentos foram transferidos para meio fresco. No meio de cultura fresco os explantes dessas cultivares começaram a se desdiferenciar e originar calos aos 60 dias. As outras cultivares ('Amarante', 'IAC 75', 'IAC 63', 'Lavínia' e 'Jonas'), não necessitaram de 30 dias para originar alguns calos, mas

quando foram transferidos para meio de cultura fresco, alguns calos aumentaram de volume e outros segmentos começaram a originar calos.

Todas as cultivares originaram calos, mas em quantidade distintas, mostrando assim que todas podem ser utilizadas. Do total de segmentos radiculares (> 2500) introduzidos da cultivar 'Jonas' foram originados mais de 1300 calos, no meio de cultura IC. Seguida da cultivar 'IAC 75' que originou mais de 600 calos. A cultivar 'Jonas' atingiu um valor acima de 50% de calogênese, sendo superior as outras cultivares (Figura 8 e 9C+).

O número de segmentos radiculares que formaram calos após 60 dias foi estimado e expresso em porcentagem. Segundo Zheng et al. (2003), a utilização somente de auxina no meio de indução de calo produz uma alta frequência de calogênese nos explantes comparada com o uso da combinação auxina/ citocinina, mas essa alta indução resulta numa baixa porcentagem de regeneração desses calos. Nos seus resultados, quando utilizou somente auxina, conseguiu uma taxa de até 56% de indução de calo, mas quando associou a auxina uma citocinina, a taxa caiu para 33%. Sendo assim, a combinação da auxina (2,4-D) e da citocinina (iP), resultou numa das melhores condições para indução de calos nos segmentos radiculares de alho. Concluindo assim que o meio de indução de calo proposto por Zheng et al. (2003) foi o que proporcionou um número favorável de calos para as cultivares brasileiras de alho (Figura 8).



Amarante	Cajuru	Cateto Roxo	IAC 63	IAC 75	Jonas	Lavínia	Roxinho
267/1139*	260/1037	171/1059	285/1330	619/1651	1339/2597	408/1554	298/975

**Figura 8.** Porcentagem de calogênese dos segmentos radiculares das oito cultivares de alho após 60 dias. Legenda: valores de formação de calos mostrados na Figura. \* X/Y; X: número de segmentos radiculares que formaram calos. Y: número total de segmentos radiculares introduzidos.

### 5.2.1. Indução de calogênese empregando outras combinações de reguladores vegetais

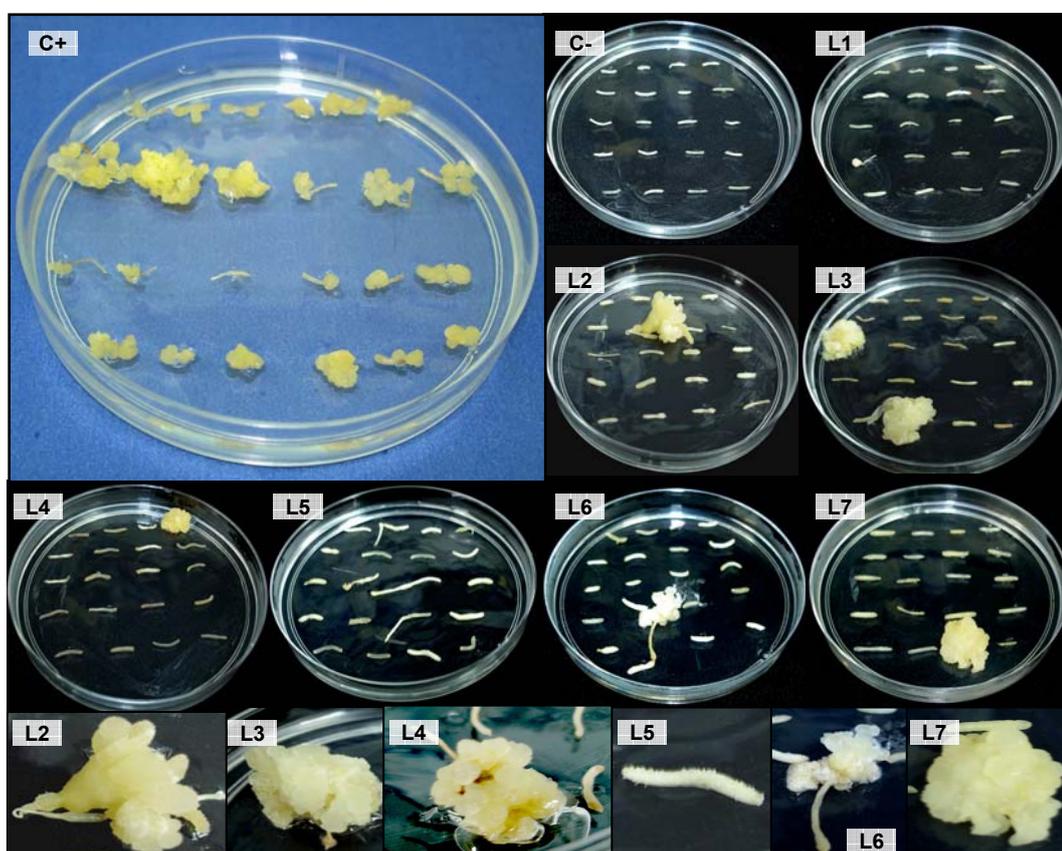
Devido a uma porcentagem favorável, mas não ideal, de calogênese obtida com o meio de cultura proposto por Zheng et al. (2003), realizou-se um experimento para otimizar a eficiência da formação de calos, tanto em termos de quantidade como de qualidade, para ser empregada nos testes de regeneração e na transformação genética via *Agrobacterium*. Este experimento teve como base o meio

de cultura básico MS, acrescido de diferentes combinações de BAP + 2,4-D e BAP + Picloran. Considerou-se a placa de Petri contendo 10 segmentos como unidade experimental, com oito tratamentos e seis repetições. Os segmentos radiculares, com 1 cm, foram transferidos para meio de cultura básico MS, acrescido de BAP, 2,4-D e Picloran nas seguintes combinações:

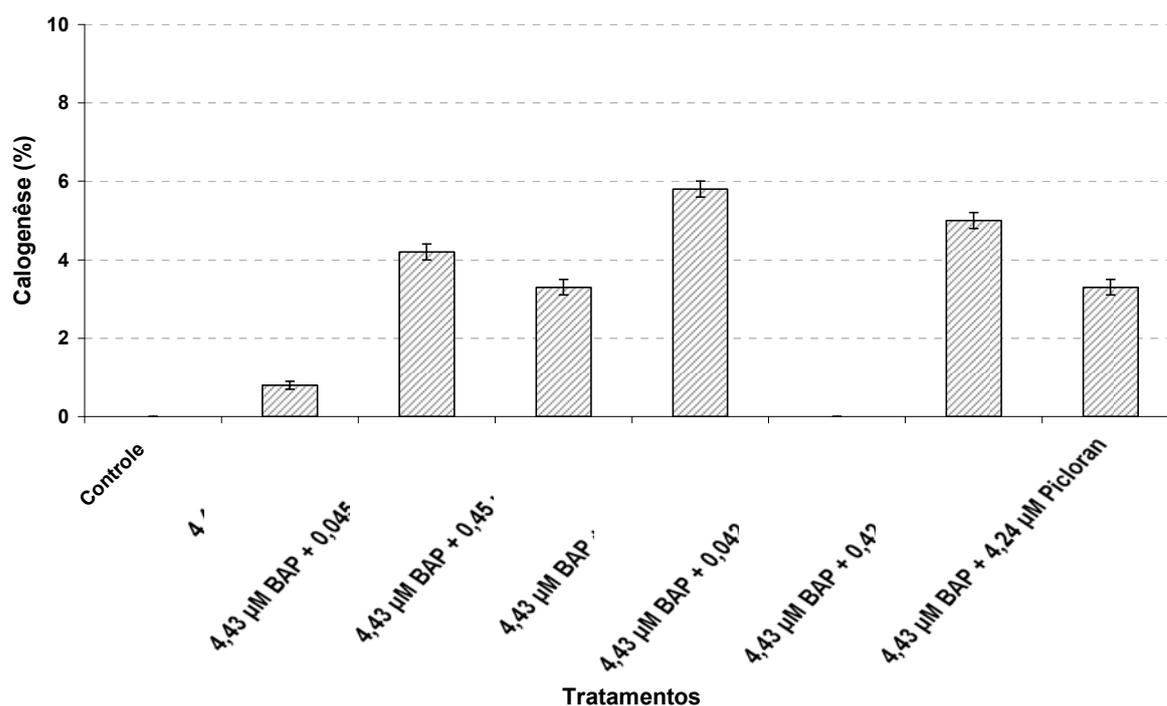
- Controle (ausência de regulador vegetal);
- L1 (4,43  $\mu$ M BAP);
- L2 (4,43  $\mu$ M BAP + 0,045  $\mu$ M 2,4-D);
- L3. (4,43  $\mu$ M BAP + 0,45  $\mu$ M 2,4-D);
- L4 (4,43  $\mu$ M BAP + 4,5  $\mu$ M 2,4-D);
- L5 (4,43  $\mu$ M BAP + 0,042  $\mu$ M Picloran);
- L6 (4,43  $\mu$ M BAP + 0,42  $\mu$ M Picloran);
- L7 (4,43  $\mu$ M BAP + 4,24  $\mu$ M Picloran);

A formação de um calo com coloração esbranquiçada e de aspecto granular, com capacidade organogênica, semelhante ao descrito por Luciani et. al. (2006), ocorreram em alguns tratamentos com presença de reguladores vegetais BAP, 2,4-D e Picloran. Os calos induzidos em diferentes combinações dos reguladores vegetais foram avaliados visualmente quanto à morfologia e também quanto a características de aspecto geral como brilho e a coloração dos calos (Figura 9). Os resultados mostram que a quantidade de calos originados em todos os tratamentos foi baixa, variando de 0,8% (Tratamento L1) a 5,4% (Tratamento L4). Os tratamentos Controle e L5 não originaram nenhum calo (Figura 9 e 10). Luciani et al (2006) conseguiram 100% de indução de calo utilizando a combinação 2,4-D e BAP e 47% de regenerantes.

Em contradição ao proposto por Luciani et al. (2006), as cultivares brasileiras de alho não obtiveram altos índices de calogênese, mostrando assim, que nenhuma dessas combinações foi suficiente na formação de calos em grande quantidade, quando comparada ao meio IC, proposto por Zheng et al. (2003). Em conclusão, é necessário uma combinação auxina/ citocinina para as cultivares brasileiras utilizadas, para a indução de calo, e que o melhor meio de cultura testado foi o proposto por Zheng et al. (2003).



**Figura 9.** Calogênese dos segmentos radiculares de alho. Calos no meio de indução de calo (IC), após 60 dias (C+); controle no meio de cultura sem regulador vegetal (C-). Experimento de calogênese segundo Luciani et al. (2006) nos meios de cultura e seus respectivos calos: L1, L2, L3, L4, L5, L6 e L7.



Controle	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
0/60*	1/60	5/60	4/60	7/60	0/60	6/60	4/60

**Figura 10.** Porcentagem de calogênese dos segmentos radiculares das oito cultivares de alho após 60 dias. Legenda: valores de formação de calos mostrados na Figura. \* X/Y; X: número de segmentos radiculares que formaram calos. Y: número total de segmentos radiculares introduzidos.

### 5.3. Regeneração *in vitro* de plantas

De acordo com Myers e Simon (1998, 1999), Barandiaran et al. (1997, 1999a, b, c), Robledo-Paz, Villalobos-Arámula e Jofre-Garfias (2000), Sata, Bagatharia e Thaker (2000) e Fereol et al. (2002), os fatores que mais afetam a regeneração de plantas são o tipo de explante, as condições fisiológicas do explante, o genótipo e a combinação de reguladores vegetais utilizada no meio de cultura. Segundo Myers e Simon (1998), foi constatado que quanto mais velho for o calo de alho, mais difícil

será a sua regeneração. Segundo Robledo-Paz, Villalobos-Arámbula e Jofre-Garfias (2000) usar segmentos radiculares como explante aumenta extremamente o potencial da regeneração de alho, e conforme os resultados encontrado por Barandiaran et al. (1999a) confirmam a influência da cultivar no comportamento da cultura *in vitro* de alho, sugerindo que os protocolos podem ser otimizados para cada cultivar.

A organogênese *in vitro* em explantes de alho ocorre de forma indireta, quando são incubados na ausência de luz, havendo neste caso, a formação de calos e a regeneração de gemas adventícias a partir destas células. Então, segundo os protocolos de regeneração de calos de alho existentes na literatura, foram utilizados os propostos por Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000) e Zheng et al. (2003).

Após 60 dias no meio IC (meio MS básico, acrescido de 4,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; 0,5  $\mu\text{M}$  de iP e caseína hidrolisada), os calos formados foram transferidos para frascos contendo meio de cultura básico adicionado de reguladores vegetais, segundo Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000) ou Zheng et al. (2003), e foram incubados a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 16 h de luz ( $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Foi possível observar que houve diferença na regeneração dos calos entre os dois meios de cultura utilizados, concluindo assim que para a regeneração dos calos de alho de todas as cultivares foi melhor usando o meio de cultura proposto por Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000) (Tabela 3).

A análise de variância mostrou que existe diferença para os meios de culturas testados e as 8 cultivares utilizadas para a variável regeneração. Já em relação à interação meios de cultura e cultivares, não houve diferença (Tabela 2). Isso demonstra que a utilização de reguladores vegetais tem um efeito na regeneração, em relação ao tipo utilizado. Com base nesses resultados, foi feito um teste de

médias para os dois meios de cultura utilizados, onde o meio de Kondo apresentou uma média de 2,45 números de calos responsivos, e o de Zheng de 1,74. Esses valores podem ser considerados baixos em termos de regeneração *in vitro*, no entanto, o meio de cultura Kondo apresentou uma regeneração de 40% a mais do que o Zheng (Tabela 3).

**Tabela 2.** Efeito da regeneração em função dos meios de cultura. Os fatores, Meios de cultura, Cultivares e a interação (Meios de cultura x Cultivares), foram avaliados em ANOVA para a variável regeneração, cujos valores de quadrado médio (QM) são apresentados.

Fatores	GL	Regeneração (QM)
Meios de cultura	1	13,6154***
Cultivares	7	2,2051***
Meios de cultura x Cultivares	7	0,4654
GL	21	0,2625
CV(%)		23,64

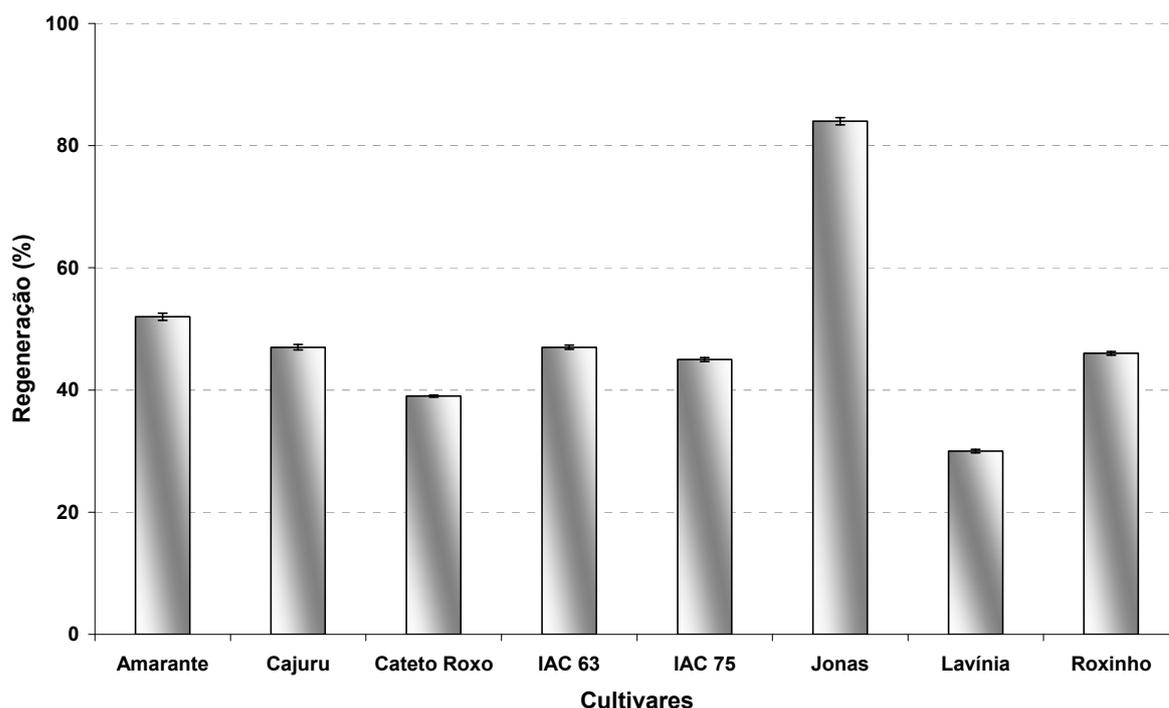
\*\*\* valores significativos para  $P < 0,001$ ; CV (%) = coeficiente e variação.

**Tabela 3.** Regeneração por organogênese indireta *in vitro* das 8 cultivares brasileiras de calos de alho.

Meios de cultura	Nº de calos responsivos
KONDO	2,45 a
ZHENG	1,74 b

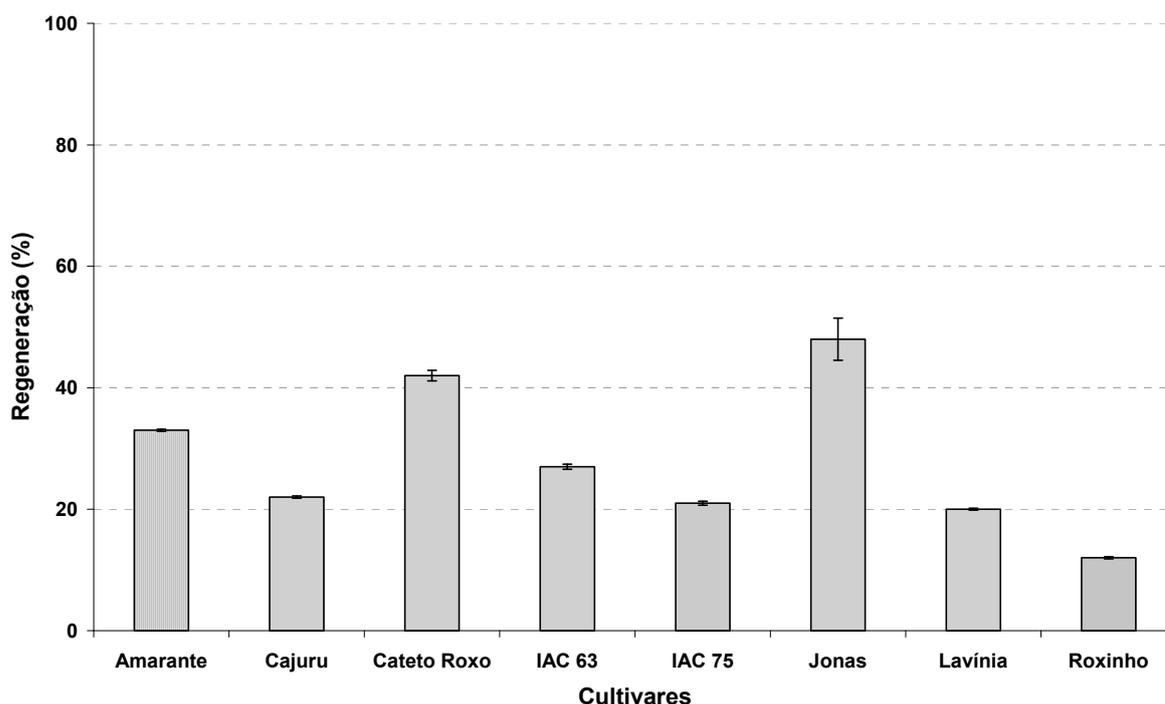
Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

Segundo Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000), o meio de cultura para regeneração de alho é constituído por um balanço auxina/ citocinina, sendo ANA/ BAP respectivamente. Foi possível observar que houve diferença entre as cultivares em relação à regeneração, onde a cultivar 'Jonas' teve a maior quantidade de calos regenerados (84%) (Figura 11), e estatisticamente difere das demais cultivares. Observou-se que nas cultivares 'Jonas', 'Amarante' e 'IAC 63' a regeneração dos calos foi mais vigorosa em relação as outras cultivares, originando brotos com folhas, corroborando com os dados da análise estatística (Tabela 4).



**Figura 11.** Porcentagem de regeneração dos calos das oito cultivares de alho após 5 meses no meio de cultura proposto por Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000).

Segundo Zheng et al. (2003), o meio de cultura para regeneração de alho é constituído por uma citocinina, no caso cinetina.. Foi possível observar que houve diferença entre as cultivares em relação à regeneração, onde a cultivar 'Jonas' teve a maior quantidade de calos regenerados (48%) (Figura 12), e estatisticamente difere da cultivar 'Roxinho' (Tabela 4). Entretanto nenhuma cultivar obteve uma taxa superior a 50% de calos regenerados.



**Figura 12.** Porcentagem de regeneração dos calos das oito cultivares de alho após 2 meses no meio de cultura proposto por Zheng et al. (2003).

A partir dos resultados obtidos por Zheng et al. (2003), a pequena quantidade de citocinina (iP 0,5  $\mu$ M) no meio de indução de calo teve um efeito estimulador no potencial de regeneração. A frequência de regeneração nos meios de indução de calo com auxina, variou de 6,6 a 8,9%, enquanto que nos meios de indução de calo com a combinação auxina/ citocinina, a frequência de regeneração foi maior, variando de 30 a 48%.

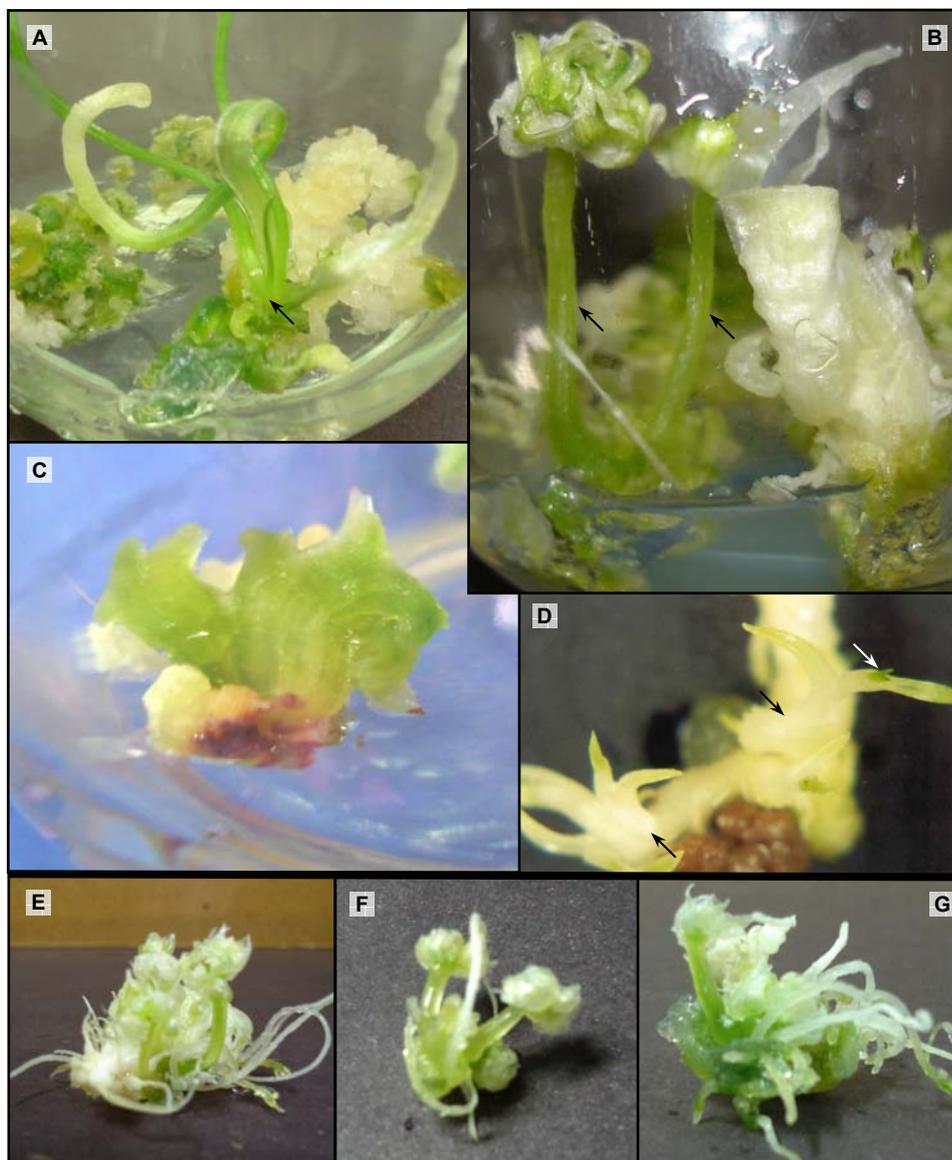
Foi possível observar que existe diferença significativa entre 'Jonas' e as outras cultivares, independente dos meios de cultura. No meio de cultura proposto por Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000) 'Jonas' obteve a maior média, diferindo das outras cultivares, já no meio de cultura proposto por Zheng et al. (2003), 'Jonas' continuou com a maior média de calos responsivos e diferindo significativamente apenas de 'Roxinho' (Tabela 4).

**Tabela 4.** Valores da regeneração em função dos meios de cultura.

Cultivares	Nº de calos responsivos	
	KONDO	ZHENG
JONAS	3,57 a	2,43 a
AMARANTE	2,57 b	1,50 ab
IAC 63	2,43 b	1,57 ab
CAJURU	2,43 b	1,86 ab
IAC 75	2,29 b	1,57 ab
CATETO ROXO	2,14 b	2,14 ab
ROXINHO	2,14 b	1,29 b
LAVÍNIA	2,00 b	1,57 ab

**Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste Tukey ( $p > 0,05$ ).**

Concluindo assim que 'Jonas' foi a cultivar que melhor regenerou e que o melhor meio de cultura para regeneração das cultivares brasileiras, é o meio de cultura proposto por segundo Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000), mostrando a importância da dosagem e do balanço de auxina/ citocinina na regeneração do alho.



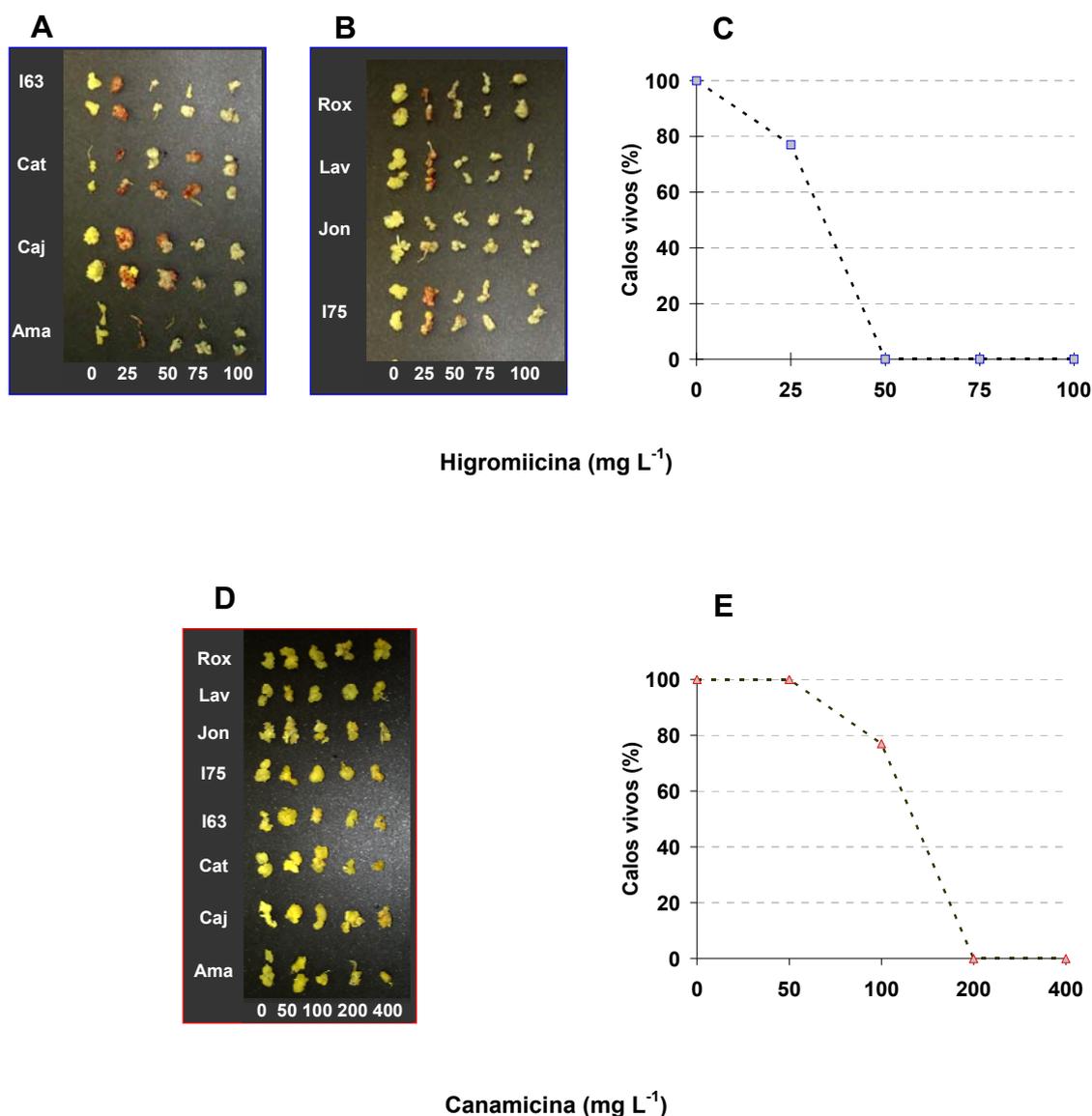
**Figura 13.** Regeneração por organogênese indireta de alho como proposto por Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000) (**A**, **B**, **C** e **D**) e Zheng et al. (2003) (**E**, **F** e **G**). 'Amarante' com a formação de parte aérea (seta em **A**); 'Jonas' mostrando duas brotações, formação a parte aérea (setas em **B**); 'Cajuru' início do desenvolvimento foliar (**C**); calo com brotações contendo primórdios foliares da cultivar 'Jonas' (setas em **D**); 'IAC 75' (**E**), 'IAC 63' (**F**) e 'Amarante' (**G**), raízes e parte aérea em início de formação.

#### 5.4. Dose letal de agentes seletivos aos calos de alho

A eficiência de transformação de uma determinada espécie está relacionada ao sistema de seleção das células ou tecidos transformados. O sistema de seleção deve inibir o crescimento e do desenvolvimento dos tecidos não transformados, favorecendo ou permitindo que as células ou tecidos transformados se desenvolvam, com vantagem seletiva. O primeiro passo para a utilização de um agente seletivo é encontrar a concentração adequada que permita a seleção diferencial em favor dos tecidos transformados.

Neste experimento foram avaliadas diferentes concentrações de higromicina (0; 25; 50; 75 e 100 mg L<sup>-1</sup>) e canamicina (0; 50; 100; 200 e 400 mg L<sup>-1</sup>). Na concentração de 25 mg L<sup>-1</sup> de higromicina a taxa de sobrevivência dos calos vivos reduziu significativamente para 75% (Figura 14). Na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> de higromicina 100% dos calos morreram após 60 dias de contato com o meio de cultura. Esses resultados mostram que a concentração de higromicina a ser utilizada, para todas as cultivares, para seleção de tecidos de calos de alho transformados por *Agrobacterium* deve ser de 50 mg L<sup>-1</sup>, e concentrações superiores a esta são letais (Figura 14).

Para canamicina, na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> de canamicina a taxa de sobrevivência dos calos vivos reduziu significativamente para 75%. E na concentração de 200 mg L<sup>-1</sup> de canamicina 100% dos calos morreram após 60 dias de contato com o meio de cultura. Esses resultados mostram que a concentração de canamicina a ser utilizada, para todas as cultivares, para seleção de tecidos de calos de alho transformados por *Agrobacterium* deve ser de 200 mg L<sup>-1</sup>, e concentrações superiores a esta são letais (Figura 14).



**Figura 14.** Experimento dose letal higromicina (**A**, **B** e **C**) e canamicina (**D** e **E**). Aspecto visual dos calos após 60 dias de cultivo com as doses 0, 25, 50, 75 e 100 mg L<sup>-1</sup> de higromicina (**A** e **B**) e com 0, 50, 100, 200 e 400 mg L<sup>-1</sup> de canamicina (**D**) e as respectivas curvas de letalidade (**C** e **E**) considerando o percentual de calos vivos médio das oito cultivares: 'Amarante' (**Ama**), 'Cajuru' (**Caj**), 'Cateto Roxo' (**Cat**), 'IAC 63' (**I63**), 'IAC 75' (**I65**), 'Jonas' (**Jon**), 'Lavínia' (**Lav**) e 'Roxinho' (**Rox**).

## 5.5. Linhagem de *Agrobacterium*, plasmídeo e condições de cultura

As espécies de *Allium* spp. foram consideradas durante muito tempo recalcitrantes à transformação via *Agrobacterium* e por isso os primeiros trabalhos realizados com alho transgênico utilizaram-se da biobalística (Barandiaran et al., 1998; Ferrer, Linares e González, 2000) e a eletroporação de protoplastos (Hasegawa et al., 1996) como metodologias de transformação. Atualmente, há trabalhos não só demonstrando a possibilidade, mas também descrevendo protocolos eficientes de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* em alho (Kondo, Hasegawa e Suzuki, 2000; Zheng et al., 2004). Porém, os protocolos utilizados mostram uma baixa eficiência de transformação, cerca de 1,4 %.

Durante a definição do protocolo de transformação genética de alho via *Agrobacterium* são necessários ajustes para avaliar-se a eficiência do sistema e definir as correções possíveis. Estes ajustes do protocolo de transformação iniciam-se pela definição da linhagem de *Agrobacterium* a ser utilizada até a determinação dos procedimentos de seleção das células transformadas. A seguir são apresentados os resultados de experimentos realizados com o objetivo de otimizar os parâmetros da transformação de calos de alho competentes para a regeneração de plantas.

### 5.5.1. Inoculação e co-cultura

A linhagem de *Agrobacterium* com o plasmídeo binário LBA4404 (pCAMBIA 1303) foi utilizada nos ensaios de transformação genética com calos de alho da cultivar 'Jonas'. Os calos foram colocados sobre papel de filtro estéril e levemente feridos. Esses calos foram submersos na suspensão das *Agrobacterium* contendo o gene *mgfp5* expressando GFP em fusão para tradução com *gusA* por 15 min. Após

a inoculação, os calos foram secos em papel de filtro estéril, e transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura MS acrescido de 100  $\mu\text{M}$  de acetoseringona, 10  $\text{g L}^{-1}$  de glicose, 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de caseína hidrolisada, 2,0  $\text{g L}^{-1}$  de phytigel e pH 5,2. Esses calos foram mantidos na ausência de luz, à temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , por um período de 3 dias, para o co-cultivo.

Ao decorrer desse período, foi possível observar que não houve um super crescimento da *Agrobacterium* ao redor dos calos transformados, corroborando com os resultados de Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000), onde obtiveram a melhor eficiência de transformação com 5 dias de co-cultivo, mas em compensação uma diminuição na frequência da regeneração de brotos transformados. O co-cultivo por 3 dias mostrou uma expressão mais elevada de *GUS* quando comparada com os 1 ou 2 dias de co-cultivo, concluindo assim que o período do co-cultivo deve se otimizado.

Os períodos de co-cultivo diferem de acordo com a espécie da planta descritos na literatura. Longos períodos de co-cultivo parecem ser eficientes para a eficiência da transferência do plasmídeo Ti para as células das plantas. Entretanto, era mais difícil eliminar a *Agrobacterium* após períodos mais longos de co-cultivo, segundo Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000).

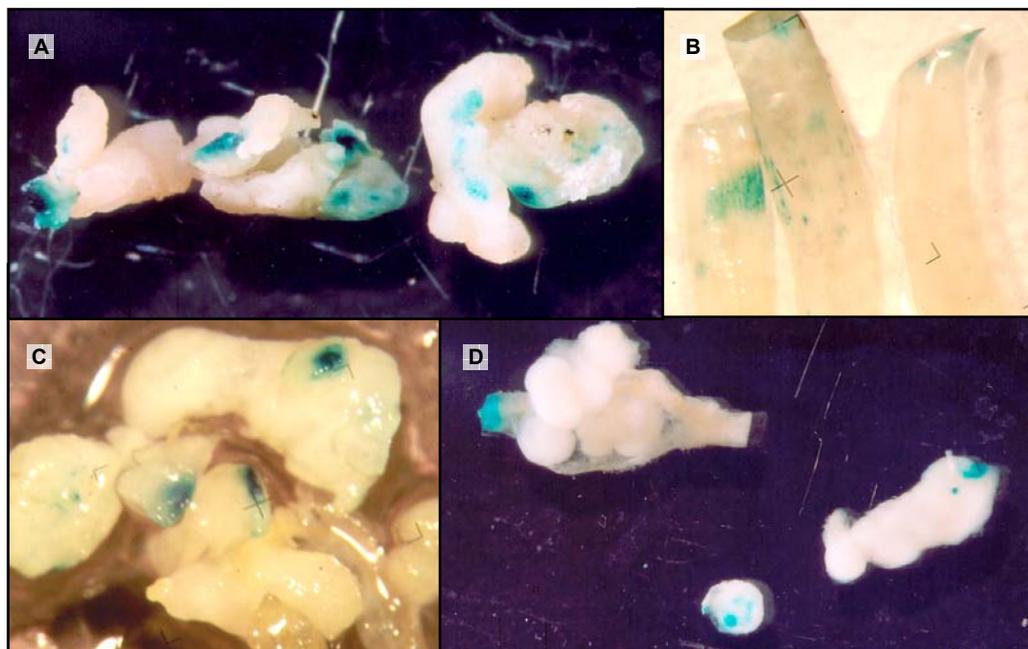
#### **5.5.2. Ensaio histoquímico da $\beta$ -glucuronidase para a avaliação da eficiência de transformação**

Ao fim do co-cultivo, os calos foram avaliados pela expressão da  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) pelo ensaio histoquímico descrito por Jefferson et al. (1987) e Lacorte (1998). Os calos após 3 dias de co-cultivo, foram imersos na solução contendo: 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  pH 7,0, 10 mM EDTA pH 7,0, 0,5 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ,

0,5 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>4</sub>].3H<sub>2</sub>O, 1,0 mM X-Gluc e 0,1 % Triton X-100 e mantidos a 37°C durante 24 h. Após este período, foram desidratados em uma solução de etanol 70% e mantidos sob agitação por 1 h. A clorofila foi removida com trocas de álcool 70% até sua completa remoção. O etanol 70% foi substituído por etanol absoluto e deixado durante 24 h em temperatura ambiente.

A eficiência de transformação transiente foi avaliada pela expressão do gene bacteriano da enzima β-glucuronidase (*uidA*). Testes histoquímicos com a presença do substrato X-Gluc e lavagens alcoólicas foram realizados após a transformação, no intuito de se analisar o número de eventos de transformação. O produto desta reação, na presença de oxigênio, forma dímeros, resultando em um precipitado insolúvel, de cor azul (Jefferson, 1987). Após a realização do ensaio histoquímico *GUS*, calculou-se a eficiência de transformação genética transiente presumível definida por Peña et al. (1995b), como sendo o resultado do número de gemas transformadas obtidas em relação ao número de explantes inoculados.

A eficiência da transformação transiente presumível de calos de alho da cultivar 'Jonas' foi satisfatória (14,3%). Dos 35 calos tratados com a solução bacteriana, 5 calos apresentaram pontos azuis, evidenciando a expressão do gene *GUS* (Figura 15). Os protocolos disponíveis na literatura para transformação de alho mostram uma baixa eficiência (1,4 %). O aumento da porcentagem de expressão transitória é fundamental para a obtenção de calos de alho transformados. O aumento da expressão transitória e da expressão estável depende de condições favoráveis do meio de cultura e das condições fisiológicas do explante, no momento da inoculação (Kondo, Hasegawa e Suzuki, 2000). Portanto, a cultivar brasileira 'Jonas' poderia ser utilizada para a transformação genética.



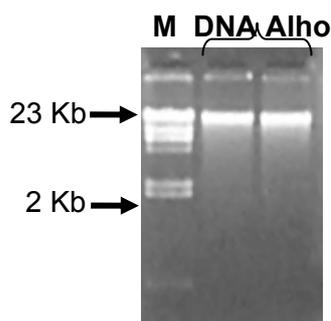
**Figura 15.** Calos (A, C e D) e segmentos radiculares (B) de alho da cultivar 'Jonas' expressando o gene *uidA* após 3 dias de co-cultivo depois do teste histoquímico *GUS*.

### 5.6. Clonagem do gene *LFY* de alho

A cultivar 'Jonas' necessita de vernalização e isso associado às características de melhor potencial de transformação e de regeneração, essa cultivar pode ser considerada a melhor candidata para a superexpressão do gene *LFY*, visando assim o florescimento na cultura do alho. Com isso, seria interessante cloná-lo em um outro vetor de expressão em plantas, para assim utilizá-lo na transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* das cultivares brasileiras de alho.

A partir do meristema de alho da cultivar 'Jonas' foi realizada extração de DNA genômico, o qual se apresentou íntegro e sem contaminantes visíveis em eletroforese. A observação de uma única banda de elevado peso molecular (>20 Kb)

das amostras e a concentração obtida ( $3106 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) configuram amostras de DNA de boa qualidade e quantidade para a manipulação e clonagem molecular do gene de interesse (Figura 16).

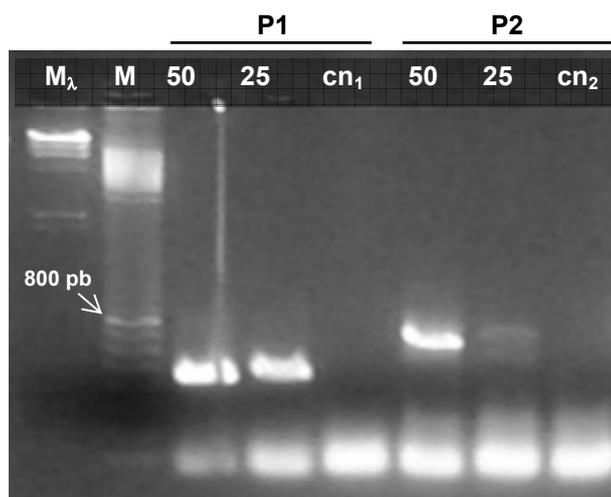


**Figura 16.** Gel de agarose 1% contendo a extração do DNA genômico de alho. **M:** marcador de peso molecular  $\lambda$  HindIII (GE Healthcare).

### 5.7. Condições de amplificação, eletroforese e purificação de fragmentos

Os iniciadores foram desenhados de forma a se situarem entre éxons consecutivos, intercalados por um íntron. Com base na seqüência completa do ortólogo em *Arabidopsis* (Nº AB010069), disponível no Banco de dados NCBI, observou-se na estrutura do gene a presença de 3 éxons e 2 íntrons. A seqüência e o tamanho são os seguintes: éxon 1 (456 pb), íntron 1 (459 pb), éxon 2 (406 pb), íntron 2 (907 pb) e éxon 3 (410 pb), totalizando 2638 pb. A princípio, com base nessa organização de íntrons e éxons do gene *LFY* de *Arabidopsis*, ao realizar a amplificação do gene *LFY* de alho com o desenho do *primers Forward* e *Reverse 1* era esperado amplificar um fragmento contendo parte dos éxons 1 e 2, e o íntron 1. Já para os *primers Forward* e *Reverse 2* situados nos éxons 1 e 3 respectivamente, uma amplificação via PCR incluiria o éxon 2 e os íntrons 1 e 2. Com base na

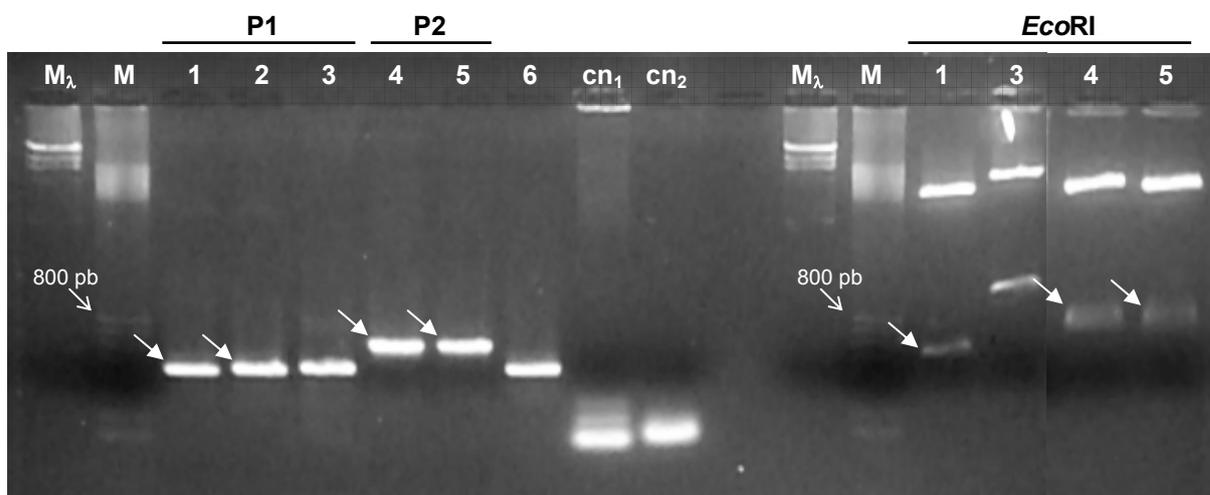
seqüência parcial do gene *LFY* de alho (AY563104) para qual foram desenhados os *primers* 1 e 2, o tamanho dos fragmentos esperados a partir da PCR seriam de 520 e 530 pb. No entanto, a amplificação de DNA genômico obteve fragmentos de aproximadamente 500 e 700 pb para os conjuntos de *primers* 1 e 2, respectivamente. Para o conjunto de iniciadores 2, a amplificação do gene *LFY* da cultivar 'Jonas' obteve um fragmento em cerca de 700 pb, sendo este maior do que o esperado conforme a seqüência AY563104 (Figura 17). É presumível que o fragmento de 700 pb inclui uma seqüência não codante, um íntron presente no gene da cultivar 'Jonas' sendo, portanto, maior que o esperado.



**Figura 17.** Gel de agarose 1% contendo fragmentos de DNA obtidos através da PCR para o gene *LFY* de alho. Amplificação de DNA genômico com os conjuntos 1 e 2 de *primers* (**P1** e **P2**) para amostras com 50 ou 25 ng de DNA molde (**50** e **25**) e os respectivos controles negativos (**cn**) sem DNA molde. Marcadores de peso molecular λ *Hind*III (**M<sub>λ</sub>**) e 100 pb (**M**, GE Healthcare).

Após a purificação dos fragmentos com cerca de 500 e 700 pb obtidos com o gel de agarose, estes foram separadamente clonados no vetor pGEM-T Easy. Em seguida, foram eletroporadas em células eletrocompetentes DH10B de *E. coli*. Após

a incubação a 37°C “overnight”, formaram-se colônias brancas e azuis em meio LB contendo o antibiótico ampicilina (100 ug uL<sup>-1</sup>). Foram selecionadas 12 e 9 colônias brancas provindas das transformações com fragmentos 500 e 700 pb, respectivamente. Depois de isoladas e crescidas individualmente em 5 mL de meio LB seletivo com ampicilina (100 µg mL<sup>-1</sup>) pelo período de 16 h, as colônias foram submetidas ao procedimento de extração de DNA plasmidial. Os plasmídeos obtidos foram então clivados com a enzima de restrição *EcoRI*. O corte dessa enzima nos vetores liberaria o inserto clonado. O resultado dessa reação foi observado através de eletroforese em gel de agarose (Figura 18).



**Figura 18.** Gel de agarose 1% contendo fragmentos de DNA obtidos através da PCR e da clivagem do vetor+inserto do gene *LFY* com a enzima *EcoRI*. Fragmentos amplificados a partir de DNA plasmidial de clones utilizando o par de *primers* 1 (**1**, **2**, **3** e **6**) ou com o par de *primers* 2 (**4** e **5**); controles negativos colônia azul (**cn<sub>1</sub>**) e reação sem DNA molde (**cn<sub>2</sub>**); Reação de clivagem a enzima *EcoRI* (**EcoRI**) de clones de 500 pb (**1** e **2**) e 700 pb (**3** e **4**). Marcadores de peso molecular  $\lambda$  *HindIII* (**M<sub>λ</sub>**, Invitrogen) e 100 pb (**M**, GE Healthcare).

Com a reação da PCR e a clivagem com *EcoRI* foram gerados fragmentos de tamanho equivalente ao DNA do gene *LFY* (500 e 700 pb) (Figura 18), o que indica sucesso no processo de clonagem. A partir destas informações, os clones 1, 2, 4 e 5 foram submetidos ao seqüenciamento. A seqüência obtida do clone 2 foi submetida à análise no programa BLASTx e apresentou 43% de similaridade com a proteína LEAFY (AAT75006). A Figura 19 mostra o resultado da leitura dos nucleotídeos e o consenso formado entre elas.

O resultado do seqüenciamento indica a comprovação da clonagem do gene *LFY* de alho no vetor pGEM-T EASY. Com isso, seria interessante cloná-lo em um outro vetor de expressão em plantas, para assim utilizá-lo na transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* das cultivares brasileiras de alho. A cultivar 'Jonas' necessita de vernalização e isso associado às características de melhor potencial de transformação e de regeneração, essa cultivar pode ser considerada a melhor candidata para a superexpressão do gene *LFY*, visando assim o florescimento na cultura do alho.

```
> gb|AAT75006.1 LEAFY splice variant 2 [Allium sativum]
Length=190

Score = 78.6 bits (192), Expect = 6e-13
Identities = 60/137 (43%), Positives = 73/137 (53%), Gaps = 10/137 (7%)
Frame = -3

Query  470  SVTXPPXXNPXPPADLSHX----PRTTQXNGGXVITRXRAXXPLXRKXXPKPTGQXXXKE  303
          +V  P   +  P   L+H      R   +GG VIT          +K  KP  +   K+
Sbjct  56    AVARPNLTHSQPFHRLNHAGLSEERAHHESGGEVITDRGKRTVTCTCK---KPNRKDNIKK  112

Query  302  EEG-TPSEXTAEGARETD*DXDSXGSGXgxgtgaaxgAPIHSYRXPGEVARAXDRHGLDY  126
          ++   P+E T  EG RETD D DS GSG G GT   P   PGEVARA  ++GLDY
Sbjct  113  KKKKAPAEVTGEGERETDSDSDSDGSGVGYGTERQREHPF-IVTVPGEVARAK-KNGLDY  170

Query  125  LFHLYEQCRDFRVQVQA  75
          LFHLYEQCR+F VQVQA
Sbjct  171  LFHLYEQCREFLVQVQA  187
```

Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
<a href="#">gb AAT75006.1</a> LEAFY splice variant 2 [ <i>Allium sativum</i> ]	<a href="#">78.6</a>	6e-13
<a href="#">gb AAT44517.1</a> <b>floral meristem identity control protein</b> [ <i>Allium</i>	<a href="#">78.2</a>	7e-13
<a href="#">gb AAS66668.1</a> LEAFY spliced variant 1 [ <i>Allium sativum</i> ]	<a href="#">77.0</a>	2e-12
<a href="#">gb AAX13294.1</a> transcription factor LFY [ <i>Lotus corniculatus</i> var.	<a href="#">53.5</a>	5e-07
<a href="#">gb AAT57872.1</a> leafy/floricaula-like protein [ <i>Hevea brasiliensis</i> ]	<a href="#">53.9</a>	5e-07
<a href="#">gb AAY57438.1</a> FLORICULA/LEAFY-like protein [ <i>Carica papaya</i> ]	<a href="#">52.8</a>	9e-07
<a href="#">sp Q40505 FL2_TOBAC</a> Floricaula/leafy homolog 2 (NFL2) > <a href="#">gb AAC489</a>	<a href="#">52.8</a>	1e-06
<a href="#">gb AAF77118.1 AF230078_1</a> TroLFY protein [ <i>Trochodendron aralioides</i> ]	<a href="#">52.8</a>	1e-06
<a href="#">gb AAX22220.1</a> Unifoliata protein [ <i>Medicago truncatula</i> ] > <a href="#">gb A</a>	<a href="#">53.5</a>	1e-06 <b>U</b>
<a href="#">gb ABA29838.1</a> transcription factor LEAFY [ <i>Iberis amara</i> ]	<a href="#">53.5</a>	1e-06

**Figura 19.** Resultado do Blastx entre seqüência de nucleotídeos traduzida em aminoácidos do clone 2 (500 pb) e seqüência de aminoácidos da proteína LEAFY de *Allium sativum* (AAT75006) depositada no NCBI. Destaque para os valores dos campos “Expect” ( $6e^{-13}$ ) e “Identities” (43%).

## **6. CONCLUSÕES**

Com base nos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que é possível a regeneração e transformação genética das cultivares brasileiras de alho, sendo que a cultivar que obteve melhor resultado foi a 'Jonas' e o que o meio de cultura proposto por Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000) foi o melhor para a regeneração das cultivares de alho. Sendo assim, é estratégico realizar a manipulação genética do alho empregando a transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, visto que esta foi eficiente, como estratégia de melhoramento.

## REFERÊNCIAS

ALT-MOERBE, J. et al. Temperature-sensitive step in Ti plasmid *vir*-region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacteria*. **Molecular and General Genetics**, Heidelberg, v. 213, p. 1-8, 1988.

AMORIM, J. R. A. et al. Efeito da salinidade e modo de aplicação da água de irrigação no crescimento e produção de alho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 167-76, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução RDC-276, de 22/09/05: dispõe sobre regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 jun.2005.

AYABE, M.; SUMI, S. Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, p. 773-779, 1998.

AYABE, M.; SUMI, S. A novel and efficient tissue culture method – “stem-disc dome culture” – for producing virus-free garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 20, n. 6, p. 503-507, 2001.

BAGHALIAN, K. et al. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 103, n. 2, p. 155-166, 2005.

BARANDIARAN, X.; DI PIETRO, A.; MARTÍN, J. Biolistic transfer an expression of a *uidA* reporter gene in different tissues of *Allium sativum* L. **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, p. 737-741, 1998.

BARANDIARAN, X. et al. Callus induction and organogenesis in *Allium sativum* (cv. Morado de Cuenca). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 16, p. 181-185, 1997.

BARANDIARAN, X. et al. Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, p. 434-437, 1999a.

BARANDIARAN, X. et al. An efficient method for callus culture and shoot regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). **HortScience**, St. Joseph, v. 34, p. 348-349, 1999b.

BARANDIARAN, X. et al. An efficient method for the *in vitro* management of multiple garlic accessions. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Gaithersburg, v. 35, p. 466-469, 1999c.

BENEDITO, V. A. *Lilium longiflorum* and its molecular floral development: the ABCDE model. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.651, p. 83-89, 2004.

BENEDITO, V. A. et al. Overexpression of a MADS-box gene from *Lilium longiflorum* homologous to *SEPALLATA3* is able to induce early flowering in *Arabidopsis*. **Acta Sinica**, p. 172-180, 2004a.

BENEDITO, V. A. et al. Ectopic expression of *LLAG1*, an *AGAMOUS* homologue from lily (*Lilium longiflorum* Thunb.) causes floral homeotic modifications in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1391-1399, 2004b.

BLÁZQUEZ, M. A. et al. Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 791-800, 1998.

BLÁZQUEZ, M. A.; WEIGEL, D. Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. **Nature**, London, v. 404, p. 889-892, 2000.

BOMBLIES, K. et al. Duplicate *FLORICAULA/LEAFY* homologs *zfl1* and *zfl2* control inflorescence architecture and flower patterning in maize. **Development**, Cambridge, v. 130, p. 2385-2395, 2003.

BRAZILIAN PEPPERTRADE BOARD. **O alho no Brasil**. São Paulo. Disponível em: <http://www.peppertrade.com.br/alhostats1.htm>. Acesso em: 09 jun. 2007.

BREWSTER, J. L. Medicinal effects of alliums. In: \_\_\_\_\_. **Onions and other vegetable alliums**. Wallingford: Horticulture Research International Wellesbourne, 1994. p. 207-208. (Crop Production Science in Horticulture, 3).

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: A Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Westborough, v. 36, n. 2, p. 214-216, 2004.

BURBA, J.L. **Efeitos do manejo de alho-semente (*Allium sativum* L.) sobre a dormência, crescimento e produção da cultivar Chonan**. 1983. 112 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1983.

BUSCH, M. A.; BOMBILES, K.; WEIGEL, D. Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. **Science**, Washington, v. 285, p. 585-587, 1999.

CÂMARA, F. A. B. **Obtenção de plantas de alho (*Allium sativum* L.) a partir de meristemas e microbulbificação *in vitro***. 1988. 55 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1988.

CAMARGO, C. D.; BARRERA, P. **Alho: uma planta mágica com um futuro garantido no mercado nacional**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1985. 98 p.

CAMARGO FILHO, W. P.; MAZZEI, A. R.; ALVES, H. S. Concorrência da China e Argentina no mercado brasileiro de alho. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 29, n. 10, p. 63-70, 1999.

CHENG, S. S. Sexual process in garlic (*Allium sativum* L. cv. Chonan). **Proceedings of the Tropical Region American Society for Horticultural Science**, Mexico City, v. 25, p. 69-72, 1985.

CHOMATOVA, S.; TURKOVA, V.; KLOZOVA, E. Protein complex and esterase isoenzyme patterns of *Allium sativum* L. cultivars and clones regenerants. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 32, n. 5, p. 321-331, 1990.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Organogenesis in vitro as a developmental process. **HortScience**, St. Joseph, v. 23, p. 515-519, 1988.

CHUN, K. B.; SOH, W. Y. Histological observation on the formation of cloves in the development process of garlics plants. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, Seoul, v. 21, n. 2, p. 119-125, 1980.

CID, L. P. B.; ILLG, R. D.; PIETRABUENA, A. E. Regeneration of garlic plants (*Allium sativum* L., cv. Chonan) via cell-culture in liquid-medium. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Gaithersburg, v. 30, n. 3, p. 150-155, 1994.

CONFALONIERI, M. et al. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in several black poplar clones. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 43, p. 215-222, 1995.

CORRÊA, T. M. Adubação química e cobertura morta em alho proveniente de cultura de tecidos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 601-604, 2003.

DE ANDRADE, A. **Avaliação de parâmetros que influenciam a transformação genética do *Eucalyptus grandis* via *Agrobacterium***. 2001. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

DESSAUX, Y.; PETIT, A.; TEMPÉ, J. Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism. **Phytochemistry**, Oxford, v. 34, p. 31-38, 1993.

DILLEN, W. et al. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, p. 1459-1463, 1997.

DOMMISSE, E.M. et al. Onion is a monocotyledonous host for *Agrobacterium*. **Plant Science**, v. 69, p. 249-257, 1990.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v. 12, p. 13-15, 1990.

EADY, C.C. et al. Transient expression of *uidA* constructs in *in vitro* onion (*Allium cepa* L.) cultures following particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated DNA delivery. **Plant Cell Reports**, New York, v. 15, p. 958-962, 1996.

EADY, C. C.; WELD, R. J.; LISTER, C. E. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and transgenic-plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, p. 376-381, 2000.

EADY, C. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leek (*Allium porrum*) and garlic (*Allium sativum*). **Plant Cell Reports**, New York, v. 24, p. 209-215, 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Controle de qualidade de produção de alho-semente da cultivar amarante por meio de marcadores RAPD**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 15p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 61).

ETOH, T. Germination of seeds obtained from a clone of garlic, *Allium sativum* L. **Proceedings of the Japan Academy Series B - Physical and Biological Sciences**, Tokyo, v. 59, n. 4, p. 83-87, 1983.

ETOH, T. Fertility of the garlic clones collected in Soviet Central Asia. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v.55, n.3, p.312-319. 1986.

ETOH, T.; OGURA, H. A morphological observation on the formation of abnormal flowers in garlic (*Allium sativum* L.). **Memoirs of the Faculty of Agriculture Kagoshima University**, Kagoshima, v. 13, p. 77-88, 1977.

ETOH, T.; SIMON, P.W. Diversity, fertility and seed production of garlic. In: RABINOWITCH, H. D.; CURRAH, L. (Ed.). **Allium crop sciences: recent advances**. Wallingford, UK: CAB International, 2002. p. 101-117.

FAO. **Statistical databases**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 12 jun. 2007.

FEREOL, L. et al. Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, p. 197-203, 2002.

FERRER, E.; LINARES, C.; GONZÁLEZ, J. M. Efficient transient expression of the  $\beta$ -glucuronidase reporter gene in garlic (*Allium sativum* L.). **Agronomie**, Paris, v. 20, p. 869-874, 2000.

FILGUEIRA, F. A. R. Aliáceas I-alho: em desafio nacional. In: \_\_\_\_\_. **Manual de olericultura, cultura e comercialização de hortaliças**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1982. v. 2, p. 105-142.

FILGUEIRA, F. A. R. **Manual de olericultura: cultura e comercialização de hortaliças**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2000. 357 p.

FINER, J. J.; MCMULLEN, M. D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, New York, v. 8, n. 10, p. 586-589, 1990.

FRANK, M.; SCHMÜLLING, T. Cytokinin cycles cells. **Trends in Plant Sciences**, Killington, v. 4, n. 7, p. 243-244, 1999.

GALLO, L. A.; CROCOMO, O. J. A cultura de tecidos em fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, 494 p.

GAMBORG, O. L.; PHILLIPS, G. C. **Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 358 p.

GRECO, R. et al. MADS-box genes expressed in developing inflorescences of rice and sorghum. **Molecular and General Genetics**, Heidelberg, v. 253, p. 615-623, 1997.

HAQUE, M. S.; WADA, T.; HATTORI, K. High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 50, p. 83-89, 1997.

HASEGAWA, H. et al. Plant regeneration from protoplast of garlic (*Allium sativum* L.) and gene introduction to garlic protoplast by electroporation. **Breeding Science**, Tokyo, v. 46, p. 279, 1996. Supplement 1.

HAVEY, M. J. Restriction enzyme analysis of the nuclear 45S ribosomal DNA of six cultivated alliums (Alliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 181, n. 1-2, p. 45-55, 1992.

HERRERA-ESTRELLA, L. et al. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid derived vector. **Nature**, London, v. 303, p. 209-213, 1983.

HIEI, Y. et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **Plant Journal**, v. 6, p. 271-282, 1996. Supplement 1.

HOLFORD, P.; HIERNADEZ, N.; NEWBURY, H. J. Factors influencing the efficiency of T-DNA transfer during co-cultivation of *Antirrhinum majus* with *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, p. 196-199, 1992.

HOLUB, B. J. et al. Organosulfur compounds from garlic. In: SHI, J.; MAZZA, G.; MAGUER, M. L. (Ed.). **Functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2002. p. 213-279.

HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 157-159, 1994.

HOSHI, Y. et al. Production of transgenic lily plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, New York, v. 22, p. 359-364, 2004.

IKEDA, A. et al. The slender rice mutant, with constitutively activated gibberellin signal transduction, has enhanced capacity for abscisic acid level. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 43, n. 9, p. 974-979, 2002.

IZAWA, T.; TAKAHASHI, Y.; YANO, M. Comparative biology comes into bloom: genomic and genetic comparison of flowering pathways in rice and *Arabidopsis*. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, p. 113-120, 2003.

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

JIN, S. G. et al. Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 169, n. 10, p. 4417-4425, 1987.

KAMENETSKY, R.; RABINOWITCH, H. D. Floral development in bolting garlic. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 13, p. 235-241, 2001.

KAMENETSKY, R.; RABINOWITCH, H. D. Florogenesis. In: RABINOWITCH, H. D.; CURRAH, L. (Ed.). **Allium crop sciences: recent advances**. Wallingford, UK: CAB International, 2002. p. 31-58.

KAMENETSKY, R. et al. Environmental control of garlic growth and florogenesis. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 129, p. 144-151, 2004.

KANG, H. G. et al. Characterization of two rice MADS-box genes that control flowering time. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 7, p. 559-566, 1997.

KANNO, A. et al. Heterotopic expression of class B floral homeotic genes supports a modified ABC model for tulip (*Tulipa gesneriana*). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 52, p. 831-841, 2003.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. p. 519-531.

KIM, E. K. et al. Enhanced shoot and bulblet proliferation of garlic (*Allium sativum* L.) in bioreactor systems. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 79, n. 5, p. 818-822, 2004.

KLEIN, T. M. et al. High velocity microprojectiles for delivering nucleic-acids into living cells. **Nature**, London, v. 327, n. 6117, p. 70-73, 1987.

KOCH, M.; TANAMI, Z.; SALOMÓN, R. Improved regeneration of shoots from garlic callus. **HortScience**, St. Joseph, v. 30, p. 378, 1995.

KOMEDA, Y. Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 521-535, 2004.

KONDO, T.; HASEGAWA, H.; SUZUKI, M. Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, p. 989-993, 2000.

KOORNNEEF, M. et al. The isolation and characterization of gibberellin deficient mutants in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 80, p. 852-857, 1998.

KOTILAINEN, M. et al. *GRCD1*, an *AGL2*-like MADS Box Gene, Participates in the C Function during Stamen Development in *Gerbera hybrida*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 12, p. 1893-1902, 2000.

KOTLINSKA, T. et al. Collecting onion, garlic and wild species of *Allium* in Central Ásia, USSR. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, n. 83-84, p. 31-32, 1991.

KOUL, A. K.; GOHIL, R. N. Causes averting sexual reproduction in *Allium sativum* Linn. **Cytologia**, Tokyo, v. 35, p. 197-202, 1970.

KYOZUKA, J. et al. Down-regulation of *RFL* the *FLO/LFY* homolog of rice, accompanied with panicle branch initiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 95, p. 1979-1982, 1998.

KYOZUKA, J. et al. Spatially and temporally regulated expression of rice MADS-box genes with similarity to *Arabidopsis* class A, B, C genes. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 41, p. 710-718, 2000.

LACORTE, C.  $\beta$ -glucoronidase (GUS). In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. D. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CENARGEN, 1998. p. 127-141.

LAMB, R. S. et al. Regulation of APETALA3 floral homeotic gene expression by meristem identity genes. **Development**, Cambridge, v. 129, p. 2079-2086, 2002.

LEE, Y. W. et al. Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the Vir A protein of *Agrobacterium tumefaciens*. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, Washington, v. 92, p. 12245-12249, 1995.

LUCIANI, G. F. et al. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 87, p. 139-143, 2006.

MANN, L. K. Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. **Hilgardia**, Berkeley, v. 21, n. 8, p. 195-251, 1952.

MARTÍN-URDÍROZ, N. et al. Effect of light on the organogenic ability of garlic roots using a one-step in vitro system. **Plant Cell Reports**, New York, v. 22, p. 721-724, 2004.

McCOLLUM, G. D. Onion and allies. In: SIMMONDS, N. W. **Evolution of crop plants**. London: Longman, 1976. p. 186-190.

MENEZES SOBRINHO, J. A. Origem e botânica do alho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 4, n. 48, p. 14, 1978.

MENEZES SOBRINHO, J. A. **Cultivo do alho (*Allium sativum* L.)**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA, CNPH, 1983. p. 1-16. (Instruções Técnicas, 2).

MOURADOV, A.; CREMER, F.; COUPLAND, G. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. S111-S130, 2002.

MOURGUES, F. et al. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). **Plant Cell Reports**, New York v. 16, p. 1041-1045, 1996.

MUKHOPADHYAY, M. et al In vitro stable regeneration of onion and garlic from suspension culture and chromosomal instability in solid callus culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 104, n. 1, p. 1-9, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 15, p. 473-497, 1962.

MYERS, J. M.; SIMON, P. W. Continuous callus production and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) using root segments from shoot tip-derived plantlets. **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, p. 726-730, 1998.

MYERS, J. M.; SIMON, P. W. Regeneration of garlic callus as affected by clonal variation, plant growth regulators and culture conditions over time. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, p. 32-36, 1999.

NAGASAWA, A.; FINER, J. J. Induction of morphogenic callus cultures from leaf tissue of garlic. **HortScience**, St. Joseph, v. 23, p. 1068-1070, 1988.

NAM, J.; MATTHYSSE, A. G.; GELVIN, S. B. Differences in susceptibility of Arabidopsis ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 317-333, 1997.

NOVAK, F. J. Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus culture of *Allium sativum* L. **Zeitschrift für Pflanzenzuchtung**, Berlin, v. 84, p. 250-260, 1980.

NOVAK, F. J.; HAVEL, L.; DOLEZEL, J. Allium. In: SHARP, W. R. et al. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1985. p. 919-956.

OLIVEIRA, C. M.; SOUZA, R. J.; MOTA, J. H. Determination of the harvest date for garlic cultivars. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 506-509, 2003.

OLIVEIRA, C. M.; SOUZA, R. J.; YURI, J. E. Harvest date and storage potential in garlic cultivars. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 804-807, 2004.

PARCY, F. et al. A genetic framework for floral patterning. **Nature**, London, v. 395, p. 561-588, 1998.

PEÑA, L. et al. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, Amsterdam, v. 104, p. 183-191, 1995.

PERES, L. E. P. et al. Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) into buds. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 155, p. 551-555, 1999.

POOLER, M. R.; SIMON, P. W. Characterization and classification of isozyme and morphological variation in a diverse collection of garlic clones. **Euphytica**, Wageningen, v. 68, n. 1/2, p. 121-130, 1993.

RESENDE, F. V.; GUALBERTO, R.; SOUZA, R. J. Crescimento e produção de clones de alho provenientes de cultura de tecidos e de propagação convencional. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 1, p. 61-66, 2000.

ROBERTS, C.S.; RAJAGOPAL, S.; SMITH, L.A.; NGUYEN, T.A.; YANG, W.; NUGROHO, S.; RAVI, K.S.; CAO, M-L.; VIJAYACHANDRA, K.; PATELL, V.; HARCOURT, R.L.; DRANSFIELD, L.; DESAMERO, N.; SLAMET, I.; KEESE, P.; KILIAN, A.; JEFFERSON, R.A. 1997. A comprehensive set of modular vectors for advanced manipulations and efficient transformation of plants. **Rockefeller Foundation Meeting of the International Program on Rice Biotechnology**, 15-17 Set. 1997, Malásia.

ROBLEDO-PAZ, A.; VILLALOBOS-ARÁMBULA, V. M.; JOFRE-GARFIAS, A. E. Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root-tip culture. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Gaithersburg, v. 36, p. 416-419, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SATA, S. J.; BAGATHARIA, S. B.; THAKER, V. S. Induction of direct somatic embryogenesis in garlic (*Allium sativum* L.). **Methods in Cell Science**, Berlin, v. 22, p. 299-304, 2000.

SATURNINO, H. M. Propriedades químicas e uso do alho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 4, n. 48, p. 64-67, 1978.

SEBRAE. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br>> Acesso em: 29 dez. 2006.

SHEIKHOESLAM, S. N.; WEEKS, D. P. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 8, p. 291-298, 1987.

SHYMOYA, C. Anatomia do bulbo do alho (*Allium sativum* L.) durante seu ciclo evolutivo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 17, n. 91, p. 102-118, 1970.

SILVA, N. F. D. da. **Estudo da superação da dormência, crescimento e produção de alho (*Allium sativum* L.), cv. Peruano submetido a frigorificação, calor e lavagem pré-plantio e efeito de fitorreguladores na produção e nos aspectos comerciais**. 1984. 86 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984.

SIMON, P. W.; JENDEREK, M. M. Flowering, seed production, and the genesis of garlic breeding. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 23, p. 211-244, 2003.

SIQUEIRA, W. J. **Desempenho agrônômico e estabilidade fenotípica de clones de alho (*Allium sativum* L.) derivados do cultivo in vitro de ápices caulinares**. 1994. 135 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

SIQUEIRA, W. J. et al. Caracterização isoenzimática e morfológica de clones e introduções de alho. **Bragantia**, Campinas, v. 44, n. 1, p. 357-374, 1985.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-231, 1957.

SOUZA, R. J. de. **Influência do nitrogênio, potássio, cycocel e paclobutrazol na cultura do alho (*Allium sativum* L.)**. 1990. 143 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1990.

STACHEL, S. E. et al. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, London, v. 318, p. 624-629, 1985.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

THORPE, T. A. **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. 558 p. (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 20).

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

TRANI, P. E. et al. **Cultura do alho** – recomendações para seu cultivo no Estado de São Paulo. Campinas: Instituto Agrônomo, 1997. 39 p. (Boletim Técnico, 170).

UIMARI, A. et al. Integration of reproductive meristem fates by a SEPALLATA-like MADS-box gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 101, n. 44, p. 15817-15822, 2004.

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

VICEDO, B. et al. Spontaneous transfer of the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the noplaine catabolism plasmid of *A. radiobacter* strain K84 in crown gall tissue. **Phytopathology**, Lancaster, v. 36, p. 528-534, 1996.

VIEIRA, L.G.E. Organismos geneticamente modificados – Uma tecnologia controversa. **Ciência Hoje**, v. 34, n. 203, p. 28-32, 2004

WAGNER, D.; SABLONSKI, R. W.; MEYEROWITZ, E. M. Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. **Science**, Washington, v. 285, p. 582-584, 1999.

WAGNER, D. et al. Floral induction in tissue culture: a system for the analysis of LEAFY-dependent gene regulation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 39, p. 273-282, 2004.

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

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group. **Annals of Botany**, Oxford, v. 57, p. 443-462, 1986.

ZHENG, S.J. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Allium cepa* L.: the production of transgenic onions and shallots. **Molecular Breeding**, Berlin, v. 7, p. 101-115, 2001.

ZHENG, S. J. et al. The development of an efficient cultivar-independent plant regeneration system from callus derived from both apical and non-apical root segments of garlic (*Allium sativum* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Gaithersburg, v. 39, p. 288-292, 2003.

ZHENG, S. J. et al. The development of a reproducible *Agrobacterium tumefaciens* transformation system for garlic (*Allium sativum* L.) and the production of transgenic garlic resistant to beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hübner). **Molecular Breeding**, Berlin, v. 14, p. 293-307, 2004.

ZIK, M.; IRISH, V. F. Flower development: initiation, differentiation, and diversification. **Annual Review of Cellular Development**, Palo Alto, v. 19, p. 119-140, 2003.

## ANEXOS

### Anexo A – Componentes do meio de introdução

Componentes	Quantidade
Sais MS (Murashige & Skoog, 1962): Macro	20 mL L <sup>-1</sup>
Micro	10 mL L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	15 mL L <sup>-1</sup>
FeEDTA	5,0 mL L <sup>-1</sup>
Vitamina MS	10 mL L <sup>-1</sup>
Sacarose	30 g L <sup>-1</sup>
Phytigel	2 g L <sup>-1</sup>

pH: 5,8

### Anexo B – Componentes do meio de cultura de indução de calo (IC) – segundo Zheng et al. (2003)

Componentes	Quantidade
Sais MS (Murashige & Skoog, 1962): Macro	20 mL L <sup>-1</sup>
Micro	10 mL L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	15 mL L <sup>-1</sup>
FeEDTA	5 mL L <sup>-1</sup>
Vitamina MS	10 mL L <sup>-1</sup>
Sacarose	30 g L <sup>-1</sup>
2,4-D (4,5 µM)	1 mg L <sup>-1</sup>
iP (0,5 µM)	0,1 mg L <sup>-1</sup>
Caseína Hidrolisada	0,2 mg L <sup>-1</sup>
Phytigel	2 g L <sup>-1</sup>

pH: 5,8

Solução estoque dos reguladores vegetais: 1 mg mL<sup>-1</sup>

### Anexo C – Componentes do meio de cultura de indução de calo (IC) e reguladores vegetais – segundo Luciani et al. (2006)

Componentes	Quantidade
Sais MS (Murashige & Skoog, 1962): Macro	20 mL L <sup>-1</sup>
Micro	10 mL L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	15 mL L <sup>-1</sup>
FeEDTA	5 mL L <sup>-1</sup>
Vitamina MS	10 mL L <sup>-1</sup>
Sacarose	30 g L <sup>-1</sup>
2,4-D	
BAP	
Picloran	
Phytigel	2 g L <sup>-1</sup>

pH: 5,8

Solução estoque dos reguladores vegetais: 1 mg mL<sup>-1</sup>

**Anexo D** – Componentes do meio de cultura de regeneração – segundo Kondo, Hasegawa e Suzuki (2000)

Componentes	Quantidade
Sais MS (Murashige & Skoog, 1962): Macro	20 mL L <sup>-1</sup>
Micro	10 mL L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	15 mL L <sup>-1</sup>
FeEDTA	5 mL L <sup>-1</sup>
Vitamina MS	10 mL L <sup>-1</sup>
Sacarose	30 g L <sup>-1</sup>
BAP (8,8 µM)	2 mg L <sup>-1</sup>
ANA (0,1 µM)	0,02 mg L <sup>-1</sup>
Phytigel	2 g L <sup>-1</sup>

pH: 5,8

Solução estoque dos reguladores vegetais: 1 mg mL<sup>-1</sup>

**Anexo E** – Componentes do meio de cultura de regeneração – segundo Zheng et al. (2003)

Componentes	Quantidade
Sais MS (Murashige & Skoog, 1962): Macro	20 mL L <sup>-1</sup>
Micro	10 mL L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	15 mL L <sup>-1</sup>
FeEDTA	5 mL L <sup>-1</sup>
Vitamina MS	10 mL L <sup>-1</sup>
Sacarose	30 g L <sup>-1</sup>
Cinetina (4,6 µM)	1 mg L <sup>-1</sup>
Phytigel	2 g L <sup>-1</sup>

pH: 5,8

Solução estoque dos reguladores vegetais: 1 mg mL<sup>-1</sup>

**Anexo F** – Componentes do meio de cultura de enraizamento

Componentes	Quantidade
Sais MS (Murashige & Skoog, 1962): Macro	20 mL L <sup>-1</sup>
Micro	10 mL L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	15 mL L <sup>-1</sup>
FeEDTA	5,0 mL L <sup>-1</sup>
Vitamina MS	10 mL L <sup>-1</sup>
Sacarose	30 g L <sup>-1</sup>
2,4-D (4,5 µM)	1,0 mg L <sup>-1</sup>
iP (0,5 µM)	0,1 mg L <sup>-1</sup>
Caseína Hidrolisada	0,2 mg L <sup>-1</sup>
Phytigel	2,0 g L <sup>-1</sup>

pH: 5,8

Depois de autoclavar, acrescentar:

Cefotaxima (500 mg L<sup>-1</sup>)

Higromicina (50 mg L<sup>-1</sup>) ou Canamicina (200 mg L<sup>-1</sup>)

## Transformação

### Anexo G – Componentes do meio de cultura líquido de crescimento

Componentes	Quantidade
Sais MS (Murashige & Skoog, 1962): Macro	20 mL L <sup>-1</sup>
Micro	10 mL L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	15 mL L <sup>-1</sup>
FeEDTA	5 mL L <sup>-1</sup>
Vitamina MS	10 mL L <sup>-1</sup>
Glicose	10 g L <sup>-1</sup>
Acetoseríngona (100 µM)	2 mL L <sup>-1</sup>
Caseína Hidrolisada	1 mg L <sup>-1</sup>
pH: 5,2	

### Anexo H – Componentes do meio de co-cultivo

Componentes	Quantidade
Sais MS (Murashige & Skoog, 1962): Macro	20 mL L <sup>-1</sup>
Micro	10 mL L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	15 mL L <sup>-1</sup>
FeEDTA	5 mL L <sup>-1</sup>
Vitamina MS	10 mL L <sup>-1</sup>
Glicose	10 g L <sup>-1</sup>
Acetoseríngona (100 µM)	2 mL L <sup>-1</sup>
Phytigel	2 g L <sup>-1</sup>
Caseína Hidrolisada	1 mg L <sup>-1</sup>
pH: 5,2	

### Anexo I – Componentes do meio de cultura de seleção

Componentes	Quantidade
Sais MS (Murashige & Skoog, 1962): Macro	20 mL L <sup>-1</sup>
Micro	10 mL L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	15 mL L <sup>-1</sup>
FeEDTA	5 mL L <sup>-1</sup>
Vitamina MS	10 mL L <sup>-1</sup>
Sacarose	30 g L <sup>-1</sup>
2,4-D (4,5 µM)	1 mg L <sup>-1</sup>
iP (0,5 µM)	0,1 mg L <sup>-1</sup>
Caseína Hidrolisada	0,2 mg L <sup>-1</sup>
Phytigel	2 g L <sup>-1</sup>
pH: 5,8	
Depois de autoclavar, acrescentar: Cefotaxima (500 mg L <sup>-1</sup> )	

Higromicina (50 mg L<sup>-1</sup>) ou Canamicina (200 mg L<sup>-1</sup>)

**Anexo J** – Componentes para ensaio histoquímico da  $\beta$ -glucuronidase para a avaliação da eficiência de transformação

Solução de Coloração de X-Gluc

Reagente	Estoque	Uso	Para 100 mL
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O pH 7,0	1 M	0,1 M	10 mL
EDTA pH 7,0	0,5 M	10 mM	2 mL
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	5 mM	0,5 mM	10 mL
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>4</sub> ].3H <sub>2</sub> O	5 mM	0,5 mM	10 mL
X-Gluc em DMF	1 M	1 mM	0,1 mL
(5-bromo-4-cloro-3-indolil - $\beta$ -D-ácido glucurônico)			
Triton X-100	100 %	0,1 %	0,1 mL
		Subtotal	34,2 mL
		H <sub>2</sub> O	67,8 mL

DMF = N, N Dimethyl Formamide

X-Gluc = 521,8

K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> = 329,25

K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>4</sub>].3H<sub>2</sub>O = 368,34