

TRANSFORMAÇÃO DA MANDIOCA VIA *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

TRANSFORMATION OF CASSAVA VIA *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

Aurora Yoshiko SATO¹, Tocio SEDIYAMA², José MARIA², Aluízio BORÉM², Paulo Roberto CECON³, Cristina Salgado JUNQUEIRA⁴

RESUMO: Com o objetivo de estudar a transformação da mandioca via *A. rhizogenes* foram analisados o efeito da canamicina, iluminação, idade dos discos foliares e concentrações de ANA. Após a transformação estudou-se o efeito de concentrações de BAP e compararam-se os seguintes tratamentos adicionais: meio MS, GA₃ + BAP + MS e picloram + MS. Os calos transformados foram submetidos à análise isoenzimática. Concluiu-se que a cultivar Urubu é sensível a concentrações de canamicina superiores a 100 mg/L. A luz e a idade das folhas foram determinantes na transformação; folhas novas no escuro formaram calos transgênicos. Concluiu-se que a concentração de 2 mg/L de ANA possibilitou maior número de calos e maior comprimento de raízes. A concentração de 10 mg/L BAP resultou em maior peso de matéria seca dos calos. O picloram favoreceu acúmulo de matéria seca. A análise isozimática revelou a perda de uma banda na mandioca transformada.

UNITERMOS: Transformação; *Manihot esculenta*; *Agrobacterium rhizogenes*; canamicina; ANA; BAP; GA₃

INTRODUÇÃO

A mandioca é uma cultura de destaque na conjuntura sócio econômica mundial, em função de sua importância como fonte de carboidrato e elevada capacidade de adaptação. Essa cultura tem potencial de produção de 90 t/ha/ano (COCK, 1985), entretanto a média de produção na África, Indonésia e Brasil é bem inferior. Esta baixa produção tem sido atribuída à baixa fertilidade dos solos cultivados, deterioração das raízes e severa incidência de pragas e doenças. Em função de sua grande importância econômica e problemas encontrados no seu cultivo, vários programas de melhoramento tradicional em mandioca foram iniciados com sucesso (HERSHEY; JENNINGS, 1992). Através do programa de fitomelhoramento da mandioca durante 4 anos foi obtido no CIAT linhas híbridas que rendem mais de 50 t/ha/ano, 100% acima da produção de cultivares locais. Mas, infelizmente, o melhoramento genético clássico é dificultado por vários motivos, tais como: alta heterozigose, poliploidia, baixa fertilidade, baixa produção de sementes e baixo nível de germinação de sementes (THRO et al., 1996).

A engenharia genética pôde complementar programas de melhoramento tradicional em várias áreas, como melhoramento para resistência a doenças virais (FAUQUET et al., 1992), alteração da qualidade do amido (SALEHUZZAMAN et al., 1993), redução do conteúdo

de glucosídeos cianogênicos (KOCH et al., 1994) e aumento da vida pós-colheita (SATO et al., 2001a). E, um pré-requisito para engenharia genética da mandioca é o uso de um sistema de transformação e propagação in vitro viáveis (SATO et al., 2001b). Existem diversos métodos de transformação, e a realizada através do uso do *Agrobacterium* não requer equipamentos específicos além de ter custo menor. Dessa maneira têm-se enfatizado a aplicação de modificação genética ou transformação para resolver alguns desses problemas (RAEMAKERS et al., 1993).

Dessa maneira o objetivo do presente trabalho é propor um protocolo de transformação para mandioca.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizados dois cultivares de mandioca (Urubu e Mantiqueira) fornecidos pelo Laboratório de Cultura de tecido da Universidade Federal de Lavras, MG.

A bactéria *Agrobacterium rhizogenes* R1601 foi cedida pelo Department of Plant and Life Science da Universidade de Nottingham-UK.

A bactéria utilizada é uma linhagem do tipo agropina, originária de *A. rhizogenes* A4, contendo o plasmídeo pRiA4b. Esse plasmídeo possui o gene quimérico nptII (Neomicina fosfotransferase) que confere resistência à

¹ Aurora Yoshiko Sato - Mestre em Fitotecnia

² Tocio Sedyama - Professor adjunto do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa

² José Maria - Professor titular do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa

² Aluízio Borém - Professor adjunto do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa

³ Paulo Roberto Cecon - Professor adjunto do Departamento de Informática da Universidade Federal de Viçosa

⁴ Cristina Salgado Junqueira - Mestre em Fitotecnia-Bolsista/EMBRAPA

Received: 05/01/03 Accept: 10/07/03

canamicina, cointegrado ao fragmento 21 de HindIII e pTVYK291 em trans, conferindo fenótipo de supervirulência.

As plântulas de mandioca utilizadas foram cultivadas em meio MS em sala de crescimento a $\pm 26^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa mínima de 2.000 lux ($36 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

As bactérias foram cultivadas em meio APM. Para inoculação elas foram ativadas em meio líquido APM sob agitação de 150 rpm, a 28°C por 12 horas até atingirem concentração celular de aproximadamente 5×10^8 células/mL. Daí, foram centrifugadas e ressuspensas em meio MS líquido e utilizadas para o co-cultivo com os discos foliares de mandioca.

1- Efeito da canamicina em plantas não transformadas

Este experimento foi realizado com o objetivo de se determinar um meio seletivo para obtenção de transformantes quiméricos. Neste trabalho foi utilizado o cultivar Urubu com em média quatro semanas de idade, essas plântulas foram repicadas em pequenos toletes sem folhas com aproximadamente 1 cm e contendo uma gema lateral. Esses toletes foram transferidos para os tratamentos com 11 níveis de Canamicina: (0,0; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1000 mg/L) com 14 repetições, em meio básico sólido MS, em delineamento inteiramente casualizado. Foram mantidos em sala de crescimento sob a condição de temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, de fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa média de $24 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

As características avaliadas após 30 dias foram número de folhas, comprimento da parte aérea e características visuais como cor da folha e talo.

2- Indução da transformação

2.1- Co-cultivo de discos foliares velhos e novos na presença e ausência de luz

Discos foliares do cultivar Urubu foram testados para avaliar o efeito da presença ou ausência da luz no período de co-cultivo de discos foliares velhos e novos em meio MS líquido com *Agrobacterium rhizogenes* para melhor condição de infecção visando a produção de transformantes. Os discos foliares de folhas velhas, com oito semanas e novas, com quatro semanas, foram removidos assepticamente e colocados em placas de petri contendo 10 mL de meio MS líquido com a face abaxial voltada para cima. Essa face foi ferida com bisturi cirúrgico antes do co-cultivo com a bactéria. Após um período de uma semana as folhas foram transferidas para meio MS sólido contendo 50 mg/L de canamicina, 500 mg/L de claforam e 10 mg/L de BAP para eliminar as bactérias e permitir o desenvolvimento de calos de células transformadas. A avaliação foi feita após um período de 6 semanas.

Avaliaram-se as frequências de folhas que sofreram injúria ou não na presença ou ausência da luz.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos (folhas novas no escuro e no claro e folhas velhas no escuro e no claro) e 7 repetições para cada tratamento. Avaliaram-se as frequências de folhas que sofreram injúria ou não na presença ou ausência da luz. A estatística aplicada foi a estatística descritiva.

2.2- Co-cultivo de discos foliares em meio MS mais *Agrobacterium rhizogenes* em vários níveis de concentração de ANA

Os discos foliares foram retirados da cultivar Mantiqueira e as plântulas estavam com aproximadamente quatro semanas de idade. Os tratamentos utilizados foram 7 níveis de ANA (0,0; 0,1; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/L) em meio MS líquido mais 100 mL da solução com bactérias por frascos do tipo magenta com 20 mL do meio, com 5 repetições por parcela, duas parcelas por tratamento em delineamento inteiramente casualizado. Os discos foliares foram feridos previamente e transferidos para os tratamentos onde foram mantidos durante período de quatro dias no escuro. Após esse período os discos foram transferidos para um meio MS sólido acrescido de 50 mg/L de canamicina, 500 mg/L de claforam e 10 mg/L de BAP onde permaneceram durante período de seis semanas para posterior avaliação. Os calos foram contados, e os comprimentos das raízes foram feitos utilizando-se um papel vegetal onde se copiaram as raízes desenvolvidas, depois com uma linha contornou-se os riscos para posterior medição.

As características avaliadas foram comprimento de raiz e número de raiz e foi feita análise de regressão dos dados e análise de frequência em estatística descritiva.

3- Indução da multiplicação dos calos transformados

3.1- Calos transformados cultivados em vários níveis de BAP

Os calos transformados foram coletados dos discos foliares da cultivar Urubu co-cultivada com a bactéria e transferida para o meio com canamicina, claforam e BAP pela metodologia já acima citada. Esses calos foram multiplicados em meio com os antibióticos mais a citocinina até atingirem quantidade suficiente para se elaborar outros experimentos. Nesse meio previamente multiplicado esse material se desenvolveu bem, mas testou-se outras concentrações para avaliar o comportamento. Os calos foram divididos em pedaços de aproximadamente 0,5 cm e colocados em meio MS sólido com BAP (1,0; 10,0; 50,0 e 100 mg/L) com 14 repetições em delineamento inteiramente casualizado. O material foi avaliado após 2 meses e as características avaliadas foram peso da matéria fresca e seca. O peso da matéria seca foi obtido após a secagem

do material em estufa até atingirem peso estável para posterior pesagem em balança de precisão.

3.2- Calos transformados cultivados em meio MS, GA₃ + BAP e Picloram

Os calos transformados foram divididos em pequenos pedaços de aproximadamente 0,5 cm e transferidos para os tratamentos os quais consistiam de MS sem nenhum regulador de crescimento, MS mais o GA₃ (0,05 mg/L) e BAP (2 mg/L) e MS mais o picloram (8 mg/L), o material foi avaliado após 2 meses.

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado com 14 repetições por tratamento sendo aplicado teste de médias, as características avaliadas foram o peso da matéria seca e aspectos qualitativos do material.

4- Análise de isozimas

Foi feita análise isozimática para averiguar o material transformado em relação ao material não transformado. Coletou-se material da plântula da mandioca não transformada, dos calos da mandioca não transformada e calos de mandioca do material transformado.

4.1- Preparo do gel

Os sistemas isozimáticos foram caracterizados pela técnica de eletroforese horizontal em géis de amido de milho (maisena) a 12 %, utilizando-se 42 g de amido de milho em 350 mL de solução-tampão (CONKLE, 1985).

No preparo do gel de amido, foram empregados 350 mL de solução-tampão, sendo que 80 mL foram vertidos em balão volumétrico de 1.000 mL e levados à fervura em fogo brando. Imediatamente, após a fervura, o conteúdo do balão volumétrico foi vertido no erlenmeyer, e este retornado à chama para o cozimento do amido durante três minutos e meio, no caso do sistema-tampão tris-citrato, e três minutos, no caso do sistema-tampão borato (BROWN, 1978). Em seguida, o conteúdo do erlenmeyer foi vertido em forma de acrílico de dimensões 17,0 x 14,0 x 1,0 cm sobre a qual se colocou uma placa de vidro pré-aquecida a 60 °C, com o fim de se uniformizar a superfície do gel. Os géis foram preparados, à tarde, e deixados à temperatura ambiente até a manhã do dia seguinte. Em seguida, foram resfriados a 4 °C por uma hora em câmara fria, antes da condução da eletroforese.

4.2- Coleta das amostras e extração das enzimas

Para extração das enzimas foram amostrados tecidos foliares de uma planta não transformada, dos calos de uma plântula de mandioca não transformada e dos calos transformados. A extração foi realizada utilizando-se almofariz e pistilo previamente congelados e mantidos sobre

barras de gelo. Triturou-se cerca de 1 g de tecido/mL de solução-tampão, previamente gelada.

4.3- Aplicação das amostras e corrida eletroforética

O tecido vegetal foi triturado e aplicado em uma tira de papel cromatográfico Whatman 3 M (12 x 5 mm) com auxílio de uma pinça para absorção do filtrado.

O gel foi preparado, como segue: retirou-se a placa de vidro e à cerca de 2,5 cm da extremidade fez-se um corte perpendicular, afastando a menor porção do gel para facilitar a aplicação das amostras. As amostras absorvidas pelas tiras de papel foram colocadas ao longo da face cortada do gel maior, cobrindo completamente a espessura do gel. Aplicou-se a solução de Azul de Bromofenol em tira própria para monitorar a migração. Em seguida foi apoiado o suporte do gel sobre as cubas e conectado a gel às cubas dos eletrodos, mediante uma ponte de pano tipo Perfex previamente embebida na solução-tampão para cada sistema enzimático.

Fez-se uma pré-corrída eletroforética durante 15 minutos de 150 volts a fim de que as proteínas fossem liberadas das tiras de papel Whatman 3 MM para o gel. Desligou-se o aparelho, desconectou-se o gel das cubas e removeu-se as tiras com auxílio de pinça cirúrgica. Limpou-se a face cortada do gel onde foram aplicados os extratos, mediante o uso de um cotonete. Conectou-se o gel às cubas e ligou-se o aparelho novamente a 200 volts.

4.4- Revelação das bandas de isozimas

Após a corrida eletroforética, o gel foi cortado em fatias com auxílio de guias e mediante o uso de um fio de náilon em 4 fatias horizontalmente, aproveitando 3 fatias por gel. As fatias dos géis foram então colocadas sobre bandejas refratárias onde foram vertidas as soluções com os substratos específicos para cada sistema enzimático.

Para o sistema peroxidase (POD), as bandejas refratárias foram colocadas em câmara fria a 4 °C, até o aparecimento das bandas isozimáticas. Já para os sistemas isozimáticos esterase (EST), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), malato desidrogenase (MDH) e isocitrato desidrogenase (IDH) (SOLTIS et al., 1983), as bandejas refratárias foram colocadas em estufa à temperatura de 37 °C, no escuro até o aparecimento das bandas isozimáticas. Em seguida, as soluções reveladoras foram descartadas pela passagem de água corrente e os padrões nos géis fixados, durante 12 horas em câmara fria a 4 °C, com uma solução a 10 % de glicerina. Após este período, a solução de glicerina foi removida e substituída por uma solução à 65 % de álcool etílico, 30 % de água e 5 % de glicerina, durante 5 minutos, com o objetivo de se desidratarem os géis. Imediatamente após, os géis foram secados pelo método do bastidor e armazenados entre papel-toalha.

4.5- Confeção de zimogramas

Para a identificação das bandas, os géis foram dispostos na superfície de um diafanoscópio e pelo uso de régua milimetrada, as migrações das bandas foram medidas e transferidas para um papel milimetrado. Em seguida calculou-se a mobilidade relativa (Mr) das bandas isozimáticas, pela razão entre a distância percorrida por banda particular, presente nas plantas. O conjunto de bandas de diferentes mobilidades eletroforéticas em suas respectivas posições em cada planta, designou-se padrão (PEREIRA, 1986).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da canamicina

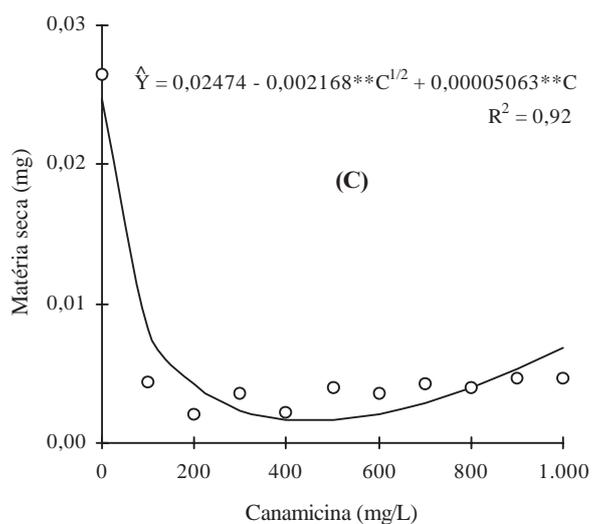
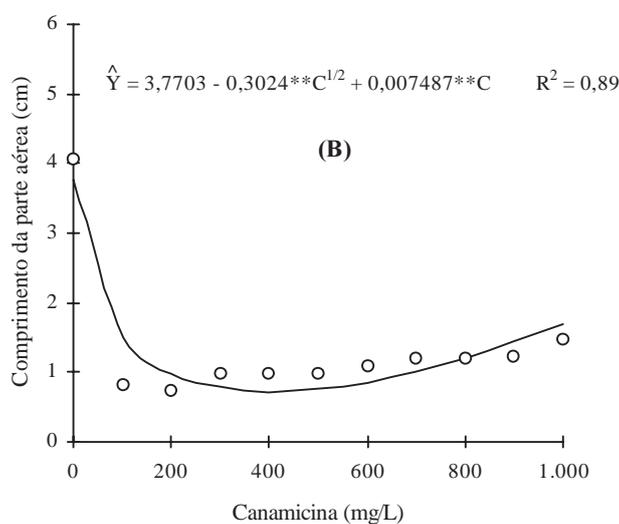
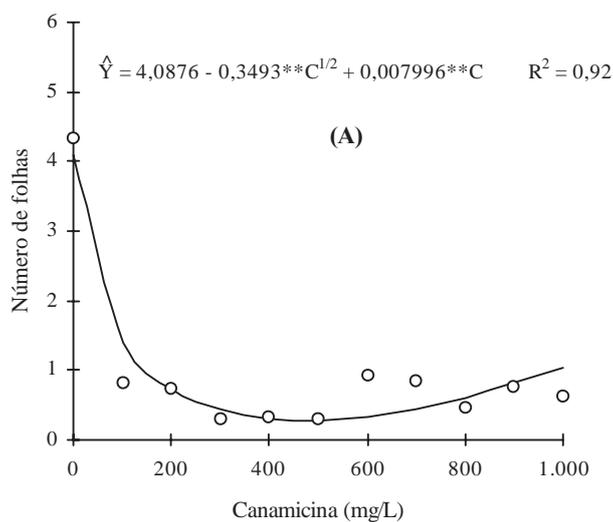
Na cultivar Urubu sob várias concentrações de canamicina observou-se que houve inibição no desenvolvimento dos explantes, apesar de não provocar a morte. Em todas as concentrações, com exceção da testemunha, houve o desenvolvimento da gema, que, logo após a emissão, paralisou o crescimento. Em relação à coloração dos folíolos desenvolvidos, em todos os tratamentos, com exceção da testemunha, eles eram de coloração branca. Para as raízes, a canamicina inibiu o seu desenvolvimento, ou seja, apenas a testemunha apresentou raízes (Quadro 1). Os resultados da análise de regressão do número de folhas, comprimento da parte aérea e peso

da matéria seca (Figura 1) indicam toxicidade a partir da concentração de 100 mg/L. O número de folhas teve diminuição de 74,57%, se comparado ao número de folhas da testemunha (4,09), em relação ao número de folhas na concentração de 1.000 mg/L (1,04); quanto ao comprimento da parte aérea, a diminuição foi de 44,82% da testemunha (3,77 cm) para a concentração de 1.000 mg/L (1,69 cm); e, em relação ao peso da matéria seca, a diminuição foi de 72,47% da testemunha (0,0247 g), para a concentração de 1.000 mg/L (0,0068 g).

Em experimento realizado com eucalipto, Santos (1996) observou a inibição a 50 e 100 mg/L de canamicina; as brotações não se desenvolveram; e suas folhas ficaram amarelas, apresentando-se pouco clorofiladas e menores que as do grupo controle, semelhante aos resultados obtidos neste trabalho. Entretanto, após sete dias, as plantas de eucalipto já começaram a senescer; na mandioca, isto não ocorreu. Os resultados indicam que as plântulas de mandioca são menos sensíveis a este antibiótico que o eucalipto (*E. grandis* e *E. citriodora*). Em *Rubus articus* L., ao testar o potencial seletivo da canamicina, Kokko e Karenlampi (1998) constataram que plântulas micropropagadas e não-transformadas não sofreram efeito inibitório a 40 mg/L. Já a 50, 75, 100 e 200 mg/L de canamicina obteve-se porcentagem de sobrevivência de 68, 35, 10 e 0%, respectivamente, e as plântulas transformadas se desenvolveram normalmente a até 100 mg/L de canamicina.

Quadro 1. Valores médios do número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR) e peso da matéria seca (MS) de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu, submetida a diferentes concentrações de canamicina

Canamicina (mg/L)	NF	CPA (cm)	NR	CR (cm)	MS (g)
0	4,33	4,06	7,67	7,34	0,0265
100	0,83	0,81	0,00	0,00	0,0044
200	0,75	0,74	0,00	0,00	0,0021
300	0,29	0,98	0,00	0,00	0,0036
400	0,33	0,98	0,00	0,00	0,0022
500	0,30	0,99	0,00	0,00	0,0039
600	0,93	1,08	0,00	0,00	0,0036
700	0,85	1,19	0,00	0,00	0,0042
800	0,46	1,21	0,00	0,00	0,0039
900	0,77	1,23	0,00	0,00	0,0046
1.000	0,62	1,46	0,00	0,00	0,0047



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 1. Estimativa do número de folhas (A), do comprimento da parte aérea (B) e do peso da matéria seca (C) de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu, em função de doses de canamicina.

Co-cultivo de discos foliares em meio MS com *Agrobacterium rhizogenes* na presença ou ausência de luz

Os discos foliares obtidos a partir de folhas novas, co-cultivadas no escuro, não sofreram injúrias; contudo, quando colocados sob luz, 85,7% sofreram oxidação, com apenas 12,5% permanecendo intactos (Figura 2). Os discos foliares de folhas velhas, co-cultivadas no escuro, também não sofreram nenhuma injúria; todavia, aqueles colocados no claro foram afetados, indicando que idade e luz são fatores críticos, uma vez que o melhor tratamento tanto

para folhas velhas ou novas foi o escuro, e as mais novas apresentaram tendência a resistir melhor na presença da luz. Estes resultados confirmam o efeito da luz não só na indução da embriogênese, mas também como fator determinante no sucesso da infecção e, conseqüentemente, da transformação.

A idade das folhas também mostra o efeito do estágio de desenvolvimento como fator determinante na transformação, haja vista, o fato de que somente folhas novas e no escuro formaram calos transformados, de onde foi retirado material para posteriores experimentos de tentativa de regeneração.

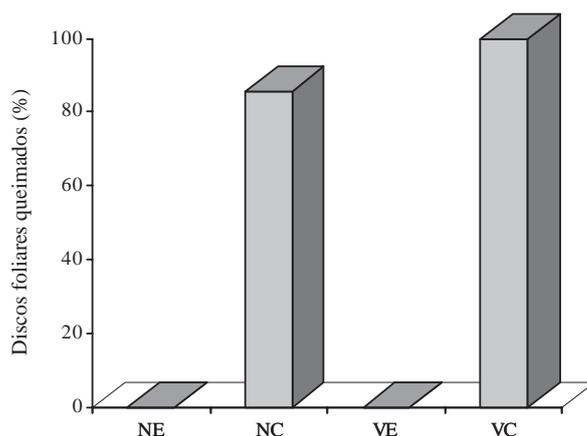


Figura 2. Percentual médio de discos foliares novos (N) e velhos (V) de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu, oxidados na presença (C) e na ausência (E) de luz.

Co-cultivo de discos foliares e *A. rhizogenes* em vários níveis de concentrações de ANA

No Quadro 2 pode-se observar que as concentrações onde foram encontrados o maior número de calos foram as de 0, 2 e 3 mg/L de ANA, com número médio de 2,30 ; 1,70 e 2,50, respectivamente. Dobigny et al. (1996), com o objetivo de induzir a regeneração direta de plantas transformadas de segmentos de caule de batata inoculada

com *A. rhizogenes* fizeram pré-tratamento com ANA, com 0,0, 5,3 e 26,5 μ M de ANA adicionado ao meio. Como resultado, constataram inibição da formação de brotações semelhante aos resultados deste trabalho, em que também não houve formação de brotações. Quanto ao comprimento de raízes, a maior média foi observada na concentração de 2 mg/L de ANA média de 20,36 cm (Quadro 2).

Quadro 2. Número médio de calos e comprimento médio de raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Mantiqueira, em vários níveis de ANA

ANA (mg/L)	Número de calos	Comprimento de raízes (cm)
0	2,30 \pm 2,16	8,40 \pm 25,86
0,1	1,10 \pm 2,42	3,31 \pm 7,87
1	0,10 \pm 0,32	0
2	1,70 \pm 2,36	20,36 \pm 61,60
3	2,50 \pm 4,09	11,02 \pm 23,24
4	1,20 \pm 1,93	2,07 \pm 3,85
5	0,80 \pm 1,75	0,25 \pm 0,54

Média \pm desvio-padrão.

Calos de mandioca transformados, em vários níveis de BAP

A concentração onde ocorreu a maior média de peso de matéria seca dos calos de mandioca, cultivar Urubu, foi na de 10 mg/L de BAP, com 0,1051 g (Quadro 3); a partir desta concentração, houve decréscimo de aproximada-

mente 95% para as concentrações de 1 mg/L e 100 mg/L de BAP, com pesos médios de 0,0050 e 0,0048 g, respectivamente. Provavelmente na concentração de 1 mg/L a concentração de BAP foi insuficiente para ocorrer incremento no peso da matéria seca e na concentração de 100 mg/L houve toxicidade.

Quadro 3. Peso de matéria seca média dos calos de mandioca, cultivar Urubu, transformados, cultivados em vários níveis de BAP

BAP (mg/L)	Matéria seca (g)
1	0,0050 ± 0,0031
10	0,1051 ± 0,2600
50	0,0072 ± 0,0126
100	0,0048 ± 0,0020

Média ± desvio-padrão.

Avaliação de diferentes meios de regeneração

Houve diferença estatística entre os tratamentos estudados (Quadro 4). O peso da matéria seca para o tratamento com picloram (Quadro 5) foi significativamente maior; já aqueles com GA₃ + BAP e sem regulador de crescimento foram inferiores e se igualaram, pelo teste de médias de Student-Newman-Keuls. O peso da matéria seca do tratamento com picloram foi 44,59% superior em relação

àquele com GA₃ + BAP e 41,21% em relação a testemunha, ou melhor, sem regulador de crescimento. Em trabalho com plântulas de mandioca Sato et al. (2001b) estudando o efeito da relação nitrato e amônio com e sem BAP observou-se que a presença de BAP também inibiu o aumento do peso da matéria seca.

Quanto a mudanças morfogênicas apesar de diferenças no tipo de células entre os tratamentos, não houve formação de embriões em nenhum tratamento.

Quadro 4. Resumo da análise de variância da matéria seca dos calos da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu, transformados, sob efeito de diferentes meios de cultura

FV	GL	Quadrado médio
Tratamentos	2	0,000199*
Resíduo	39	0,000054
C.V. (%)		68,23

* significativo pelo teste F (P < 0,05).

Quadro 5. Matéria seca média dos calos da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar urubu, transformados, sob efeito de diferentes meios de cultura

Meios de cultura	Matéria seca de calos (g)
MS	0,0087 b
MS + GA3 + BAP	0,0082 b
MS + picloram	0,0148 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls (P > 0,05).

Análise isozimática

Foi obtida boa separação com os sistemas enzimáticos peroxidase, malato desidrogenase e esterase.

Já para os sistemas isocitrato desidrogenase e glutamato oxaloacetato transaminase, as bandas isozimáticas mostraram-se de difícil visualização, em razão de estarem pouco definidas (Figura 3).

[+]	POD			EST			IDH			MDH			GOT		
	UP	UT	UC												
MR															
1.0	—			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.9	—		—	—	—	—		—	—	—	—	—			
0.8	—	—	—							—	—	—			
0.7	—									—	—	—			
0.6	—		—								—				
0.5		—		—	—	—									
0.4	—	—	—												
0.3	—	—	—												
0.2															
0.1															
0.0															

[-]

Figura 3. Representação esquemática dos fenótipos isozimáticos de peroxidase (POD), esterase (EST), isocitratodesidrogenase (IDH), malato desidrogenase (MDH) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), de material vegetal da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivar Urubu planta (UP), Urubu transformada (UT) e Urubu calos (UC), e suas mobilidades relativas (MR)

Na análise isozimática do sistema peroxidase dos calos transformados, observou-se ausência de uma banda presente na plântula normal e nos calos da plântula normal, no sistema malato desidrogenase, os calos transformados apresentaram uma banda a mais em relação as demais; e, no sistema esterase, apresentaram uma banda a menos.

Segundo Alves et al. (1994), as isozimas de esterase, peroxidase, glutamato oxaloacetatotransaminase e ácido fosfatase foram apropriadas para distinguir calos embriogênicos compactos dos calos embriogênicos friáveis em batata-doce. A reversão dos calos foi associada com perda de banda ou declínio na atividade isozimática.

Na análise isozimática pelo sistema peroxidase, pode-se observar que, apesar de o material não-transformado ser diferente, plantas e calos mostraram o mesmo padrão de bandas, diferindo dos calos transformados. Pode-se inferir que os calos transformados são diferentes dos demais mate-

riais, indicando que houve transformação do material.

CONCLUSÕES

A mandioca cultivar Urubu é extremamente sensível a concentrações superiores a 100 mg/L de canamicina. A presença da luz e idade da folha são fatores determinantes no sucesso da transformação; folhas novas e no escuro não sofreram oxidação além de formarem os calos transgênicos. A melhor concentração recomendada de ANA no co-cultivo é de a 2 mg/L, pois foi aquela em que houve maior número de calos e maior comprimento de raízes. A concentração de BAP mais indicada para os calos transformados é a de 10 mg/L que apresentou maior peso de matéria seca. Picloram favoreceu o maior incremento de matéria seca. Pela análise isozimática, percebe-se pelo diagrama a perda de uma banda na mandioca transformada.

ABSTRACT: With the objective to study cassava transformation using *A. rhizogenes* it was investigated the effect of the kanamcine, light, age of leaf disks and ANA concentrations in the co-cultivation of leaf disks, in a MS medium in the presence of *A. rhizogenes*. After the transformation it was studied the effect of concentrations of BAP and the following additional treatments: medium MS, GA₃ + BAP + MS and, picloram + MS. The transformed calli were submitted to the isozyme analysis. The obtained results allowed concluded that the Urubu cultivar is extremely sensitive to kanamycine in concentrations superior to 100 mg/L. The presence of light and the age of the leaves are also decisive factors in the transformation; new leaves cultivated in the darkness formed more transgenic calli. The results allowed

concluding that the concentration of 2 mg/L of ANA provided the best results, due to the larger number of calli and the larger roots formed. The concentration of BAP that resulted in higher dry matter of the calli was 10 mg/L. Picloram also favored the increase of dry matter. The isozyme analysis revealed the loss of a band in the transformed cassava.₃

UNITERMS: Transformation, *Manihot esculenta*, *Agrobacterium rhizogenes*, kanamcine, ANA, BAP, GA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVEZ, J. M. C.; SIHACHAKR, D.; ALLO, M.; TIZROUTINE, S.; MUSSIO, I.; SERVAES, A.; DUCREUX, G. Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.13, n. 8, p. 437-441, May. 1994.

BROWN, A. D. H. Isozymes, plant population, genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlin, v. 52, n. 4, p.145-157, Jun. 1978.

COCK, J. H. **Cassava new potential for a neglected crop**. Colorado: Westview Press/Bouderand, 1985. p. 191.

CONKLE, M. T.; HODGSKISS, P. D.; NUNNALLY, L. B. **Starch gel electrophoresis conifer seeds: a laboratory manual**. Berkeley: Forest Service, 1982. 18 p.

DOBIGNY, A.; TIZROUTINE, S.; GAISNE, C.; HAICOUR, R.; ROSSIGNOL, L.; DUCREUX, G.; SIHACHAKR, D. Direct regeneration of transformed plants from stem fragments of potato inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 45, n. 2, p. 115-121, May. 1996

FAUQUET, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C.; CHAVARRIAGA, P.; SCHOPKE, C.; BEACHY, R.N. Cassava viruses and genetic engineering. In: THOTTHAPILLY, G.; MONTI, L.; MOHAN RAJ, D. R.; MOORE, A. W. (Ed.). **Biotechnology: enhancing research on tropical crops in Africa**. Ibadan: CTA/IITA, 1992. p.287-296.

HERSHEY, C. H.; JENNINGS, D. L. Progress in breeding cassava for adaptation to stress. **Plant Breeding Abstract**, Oxon, v. 62, n. 5, p. 823-831, May. 1992.

KOCH, B. M.; SIBBESSEN, O.; SWAIN, E.; KAHN, R.A.; LIANGCHENG, D.; BAK, S.; HALKIER, B. A.; MOLLER, B. L. Possible use of a biotechnological approach to optimize and regulate the content and distribution of cyanogenic glucosides in cassava to increase food safety. Trabalho apresentado no Int. Workshop Cassava Safety. **Acta Horticulturae**, Hague, v.375, p.45-60, Aug. 1994.

KOKKO, H. I.; KARENLAMPI, S.O. Transformation of arctic bramble (*Rubus arcticus* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, n. 11, p. 822-826, Jul. 1998.

PEREIRA, E. A. **Caracterização morfoisozimática de 24 ecótipos de capim gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.)**. 1986. 63f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1986.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; SCHAVEMAKERS, C. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G .F. Improvements of cyclic somatic embryogenesis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, n. 4, p. 226-229, Feb. 1993.

SALEHUZZAMAN, S. N. I. M.; JACOBSEN, E. VISSER, R. G. F. Isolation and characterization of a cDNA encoding granule-bound starch synthase in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its antisense expression in potato. **Plant Molecular Biology**, Athens, v. 23, n. 8, p. 947-962, Dec. 1993.

SANTOS, M. O. **Transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes* visando aumentar o enraizamento em eucalipto**. 1996. 50f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

SATO, A. Y.; MARIA, J.; SEDIYAMA, T.; BORÉM, A.; CECON, P. R.; JUNQUEIRA, C. S. Influência do ácido abscísico na micropropagação da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 5, p. 1235-1237, out. 2001a.

SATO, A. Y.; MARIA, J.; SEDIYAMA, T., BORÉM, A.; CECON, P. R.; JUNQUEIRA, C.S. Micropropagação da mandioca: influência da concentração de nitrato de amônio com e sem BAP. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, n. 279, p. 405-413, jul.- ago. 2001b.

SOLTIS, D. E.; HAUFLER, C. H.; DARROW, D. C.; GOSTONY, G. J. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**, Washington, v. 73, p. 9-27, Jan.-Feb. 1983.

THRO, A. M.; BEACHY, R. H.; BONIERBALE, M.; FAUQUET, C.; HENRY, G.; HENSHAW, G. G.; HUGHES, M. A.; KAWANO, K.; RAEMAKERS, C. J. J. M.; ROCA, W.; SCHOPKE, C.; TAYLOR, N.; VISSER, R. G. F. International research on biotechnology of cassava (tapioca, *Manihot esculenta* Crantz) and its relevance to Southeast Asian economies: a cassava biotechnology network review. **Asian Journal of Tropical Biology**, Singapore, v.2, n. 1, p. 1-30, Dec. 1996.