

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CULTIVARES DE TOMATEIRO INDUSTRIAL MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*¹

MARCIO GILBERTO CARDOSO COSTA², FÁBIO TEBALDI SILVEIRA NOGUEIRA³,
WAGNER CAMPOS OTONI⁴ E SÉRGIO HERMÍNIO BROMMONSCHENKEL⁵

Departamento de Biologia Vegetal e Instituto de Biotecnologia Aplicada à Pesquisa Agropecuária,
Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, 36571-000, Viçosa, MG, Brasil

RESUMO - Visando adequar um sistema de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, para as cultivares de tomateiro industrial 'IPA-5' e 'IPA-6', foram avaliados alguns fatores que afetam a eficiência de transformação, incluindo o genótipo, o vetor, a temperatura de co-cultivo e antibióticos. O genótipo foi um dos fatores mais importantes na eficiência de transformação. A tolerância natural à canamicina de explantes cotiledonares das cultivares de tomateiro 'IPA-5' e 'IPA-6' foi avaliada quanto à capacidade organogênica. Verificou-se que a concentração mínima de canamicina a ser utilizada na fase de seleção dos transformantes no meio de indução de brotos foi de 75 mgL⁻¹ para ambas as cultivares, enquanto que no meio de enraizamento, foi de 75 mgL⁻¹ de canamicina para 'IPA-6', e de 100 mgL⁻¹ para 'IPA-5'. O protocolo permitiu a transformação genética mediada por *A. tumefaciens* aplicável às cultivares nacionais de tomates 'IPA-5' e 'IPA-6', com uma eficiência média de transformação de 5%.

TERMOS ADICIONAIS PARA INDEXAÇÃO: *Lycopersicon esculentum*, regeneração, plantas transgênicas.

AGROBACTERIUM TUMEFACIENS-MEDIATED TRANSFORMATION OF TOMATO PROCESSING CULTIVARS

ABSTRACT - The objective of this study was to adapt an *A. tumefaciens*-mediated genetic transformation system to the processing of the Brazilian tomato cultivars 'IPA-5' and 'IPA-6'. Factors such as antibiotics, genotype, vector and temperature of co-cultivation, which affect transformation efficiency, were examined. The Genotype was the most important factor to influence the cultivars transformation efficiencies. Based on the natural tolerance to kanamycin of both cultivars a concentration of 75mg L⁻¹ was used during regeneration phase. Therefore, during 'IPA-6' and 'IPA-5' rooting phase was used 75 and 100mg L⁻¹ kanamycin, respectively. Based on the results of these experiments a protocol for *A. tumefaciens*-mediated genetic transformation of the 'IPA-5' and 'IPA-6' Brazilian tomato processing cultivars was developed with an average of 5% transformation efficiency.

ADDITIONAL INDEX TERMS: *Lycopersicon esculentum*, regeneration, transgenic plants.

Recebido em 21/6/99 - Aceito em 1/6/2000

1. Financiado pela FAPEMIG, CAPES e CNPq

2. Engenheiro Agrônomo, M.Sc. em Genética e Melhoramento, UFV

3. Engenheiro Agrônomo, M.Sc. em Fisiologia Vegetal, UFV

4. Professor Adjunto, Dr., Departamento de Biologia Vegetal, UFV - (✉)e-mail: wotoni@mail.ufv.br

5. Professor Adjunto, Ph.D., Departamento de Fitopatologia, UFV

INTRODUÇÃO

Desde 1986, têm sido publicados vários trabalhos descrevendo protocolos de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* em *Lycopersicon esculentum* (McCormick *et al.*, 1986; Chyi e Phillips, 1987; Fillatti *et al.*, 1987; Davis *et al.*, 1991a; Davis *et al.*, 1991b; Hamza e Chupeau, 1993; Van Roekel *et al.*, 1993; Patil, 1994; Frary, 1995; Frary e Earle, 1996). Entretanto, até o presente momento, não se encontram na literatura citações acerca de transformação genética envolvendo cultivares nacionais de tomateiro. Para a otimização de protocolos para o tomateiro, alguns fatores que afetam a eficiência de transformação têm sido examinados, dentre eles, o genótipo (McCormick *et al.*, 1986; Davis *et al.*, 1991a; Hamza e Chupeau, 1993; Frary, 1995), a fonte de explantes (Shahin *et al.*, 1986; Fillatti *et al.*, 1987; McCormick, 1991; Frary, 1995; Frary e Earle, 1996), a idade do material utilizado como fonte de explantes (Fillatti *et al.*, 1987; Davis *et al.*, 1991a; Hamza e Chupeau, 1993), o tamanho e a posição dos explantes (Shahin *et al.*, 1986; Davis *et al.*, 1991b; McCormick, 1991; Van Roekel *et al.*, 1993; Frary e Earle, 1996). Fatores relacionados com a virulência de *A. tumefaciens* também têm sido analisados, dentre eles a estirpe utilizada (Davis *et al.*, 1991b; Van Roekel *et al.*, 1993; Frary, 1995), a concentração da suspensão bacteriana utilizada na fase de co-cultivo (Fillatti *et al.*, 1987; Davis *et al.*, 1991a) e a duração da fase de co-cultivo (Fillatti *et al.*, 1987; Hamza e Chupeau, 1993). Os componentes do meio de cultivo também influenciam a eficiência de transformação, destacando-se o tipo e as combinações dos reguladores de crescimento (Fillatti *et al.*, 1987; Van Roekel *et al.*, 1993; Frary, 1995), a utilização de camadas nutritivas (Fillatti *et al.*, 1987; McCormick, 1991; Hamza e Chupeau, 1993; Van Roekel *et al.*, 1993; Frary, 1995; Frary e Earle, 1996) e a presença de acetoseringona (Fillatti *et al.*, 1987; McCormick, 1991; João e Brown, 1993).

O objetivo deste estudo foi determinar a influência de alguns fatores na frequência de transformação das cultivares de tomateiro industrial 'IPA-5' e 'IPA-6' e utilizar essa

informação na otimização de um protocolo de transformação genética mediada por *A. tumefaciens*. A cultivar 'IPA-5' atingiu, no ano de 1995, cerca de 75% da produção total de tomate cultivado para a indústria.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As sementes de *L. esculentum*, cultivares 'IPA-5' e 'IPA-6', utilizadas nos experimentos de transformação, foram cedidas pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA – PE).

O processo de desinfestação das sementes constou da imersão em álcool a 70% (v/v) por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) e Tween-20 a 0,1% (v/v) por 20 minutos. Em seguida, as sementes foram enxaguadas quatro vezes com água destilada e autoclavada. As sementes foram germinadas em Magentas (Sigma Chemical Company, EUA), em meio contendo a metade da concentração de sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 2 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 0,5 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl, 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 10 g L⁻¹ de sacarose e 8 g L⁻¹ de ágar (Sigma Chemical Company, EUA), em pH 5,8. Após a inoculação das sementes, as culturas foram incubadas à temperatura de 27 ± 2 °C, sob irradiância de 24 a 36 μmoles m⁻² s⁻¹ e 16 horas de fotoperíodo.

Plântulas de oito dias de idade, contados a partir da emissão da radícula, foram utilizadas como fonte de explantes. As plântulas foram retiradas do meio de cultura, e sob condições assépticas, as porções proximal e distal de pelo menos 200 cotilédones foram utilizadas nos experimentos de regeneração e de transformação.

Transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Os cotilédones foram cortados transversalmente sobre papel-toalha autoclavado e umedecido com água estéril. Em seguida, os explantes foram colocados sobre as camadas

nutrizes, onde permaneceram por 12 a 24 horas sobre papel-filtro. As camadas nutritivas consistiram de 30 mL de meio de pré-cultura e 2 mL de suspensão celular de tabaco. O meio de pré-cultura foi o KCMS (Frery, 1995) solidificado, com 5,2 g L⁻¹ de agargel (Sigma Chemical Company, EUA), distribuído em placas de Petri (90 x 15 mm). Foram inoculados 20 explantes em cada placa de Petri, com a face adaxial em contato com o papel-filtro. A pré-cultura ocorreu à temperatura de 22°C, sob irradiância de 24 a 36 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h.

Para o co-cultivo, colônias isoladas de *Agrobacterium* foram utilizadas para inocular 50 mL de meio Rhizo (Tepfer e Casse-Delbart, 1987), contendo 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tetraciclina. As culturas foram incubadas à temperatura de 28°C, com agitação orbital de aproximadamente 200 rpm. Após 16 a 18 horas, as culturas foram centrifugadas a 3.500 rpm, por 10 minutos, à temperatura de 22°C e ressuspensas em meio MS líquido, contendo 2% (p/v) de sacarose (Frery, 1995), até atingir a concentração de 3×10^8 células mL⁻¹ ($\text{OD}_{600} = 0,6$). Os explantes foram imersos na suspensão diluída de bactérias, por 5 minutos, enxugados em papel-filtro estéril e recolocados nas camadas nutritivas para mais dois dias de co-cultivo, sob as mesmas condições da fase de pré-cultura.

Regeneração e enraizamento

Após a etapa de co-cultivo, os explantes foram transferidos para o meio de regeneração seletivo, com a face abaxial em contato com o meio de cultura. O meio seletivo de regeneração conteve os sais de MS, 100 mgL⁻¹ de mio-inositol, vitaminas de Nitsch (Nitsch, 1969), 20 gL⁻¹ de sacarose, 5,2 gL⁻¹ de agargel, 1,0 mgL⁻¹ de zeatina, 0,1 mgL⁻¹ de AIA, suplementado com 75 mgL⁻¹ de canamicina (Sigma Chemical Company, EUA) e 300 mgL⁻¹ de Timentin (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, EUA). Após a fase de indução de gemas (21 dias), os explantes foram transferidos para meio seletivo de alongamento de brotos (MS suplementado com 1,0 mgL⁻¹ de zeatina, 75 mg L⁻¹ de canamicina e 300 mgL⁻¹ de Timentin,

recém-preparado, a cada 15-21 dias). Brotos diferenciados e alongados, com aproximadamente 1 cm de tamanho, foram individualizados e transferidos para Magentas contendo o meio seletivo de enraizamento descrito por Frery (1995), suplementado de 75-100 mgL⁻¹ de canamicina e 300 mgL⁻¹ de Timentin. O AIA e os antibióticos foram esterilizados por filtração em filtro Millex-GS (Millipore, EUA), com 0,22 μm de diâmetro de póro, sendo adicionados ao meio de cultura em processo de resfriamento, após a autoclavagem.

Fatores avaliados

Foram analisados e comparados a eficiência de transformação dos cultivares de tomateiro industrial ('IPA-5' e 'IPA-6') e dois diferentes vetores binários (pCLDO04541 e pBI121). O cosmídio binário pCLDO04541 (Brommonschenkel e Tanksley, 1997) contém o gene neomicina fosfotransferase (*npt*) sob controle do promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor, e o gene *Sw-5*, o qual confere resistência a tospovírus, sob controle do seu próprio promotor. O vetor binário pBI121 (Jefferson *et al.*, 1987) contém o gene da β -glucuronidase (*gus*) sob controle do promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor, e o gene neomicina fosfotransferase II (*nptII*) sob controle do promotor nopalina sintase. Esses vetores foram eletroporados na estirpe não-oncogênica de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Foram também analisadas diferentes concentrações do antibiótico canamicina (0, 50, 75 e 100 mg L⁻¹) na cauligênese e rizogênese *in vitro* das cultivares de tomateiro 'IPA-5' e 'IPA-6'. A sensibilidade de 'IPA-5' e 'IPA-6' ao antibiótico canamicina foi comparada por meio da degradação de clorofila total em explantes submetidos a diferentes concentrações do antibiótico, conforme metodologia descrita por Gortner e Gortner (1949). Para a cultivar 'IPA-6', foram avaliadas três temperaturas de co-cultivo (22, 24 e 28°C) quanto à eficiência de transformação.

Análise molecular das plantas transformadas (PCR e transferência de Southern)

Após a transformação do material vegetal, o DNA foi extraído segundo Ferreira e Grattapaglia (1996) e utilizado em técnica de reações de polimerização em cadeia (PCR), empregando-se iniciadores específicos do clone TC134 e do gene *nptII*, e em transferência de Southern. Após a eletroforese, os produtos da reação de PCR foram transferidos e imobilizados por ultravioleta (UV Stratalinker 2400, Stratagene, USA) em membrana de náilon (Hybond, USA) e hibridizados com sonda não-radioativa, específica para *nptII*, utilizando o kit "Illuminator Nonradioactive Detection System" (Stratagene). A marcação da sonda foi realizada utilizando-se o "Prime-It Fluor Fluorescent Labeling Kit" (Stratagene). A hibridização, marcação da sonda e todo o processo para "Southern blot" foram conduzidos segundo instruções do fabricante (Stratagene).

Análise histoquímica da atividade da enzima β -glucuronidase

Para determinação da atividade da enzima β -glucuronidase em tecidos vegetais, foram obtidos cortes transversais de tecidos foliares e de pecíolo, realizados em micrótomo de mesa, de plantas transformadas e plantas-controle (não-transformadas).

Os cortes foram imersos em 200 μ L da mistura de reação histoquímica (Jefferson *et al.*, 1987) e incubados à temperatura de 37°C, na ausência de luz, durante 12 horas. A mistura de reação foi constituída de 100 mmol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,0), 10 mmol L⁻¹ de K₃Fe(CN)₆, 10 mmol L⁻¹ de K₄Fe(CN)₆.H₂O, 10 mmol L⁻¹ de Na₂EDTA, Triton X-100 0,1% (v/v) e 0,5 mg do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-glucurônico (X-Gluc) por mililitro de solução preparada. Após o período de incubação, os cortes foram montados em lâmina e lamínula e utilizado água:glicerina (1:1) como líquido de inclusão. As fotomicrografias foram obtidas usando-se microscópio Olympus Provis (Mod AX70) e microscópio estereoscópio Olympus SZH.

Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 50 explantes em cada tratamento. Cada experimento foi repetido pelo menos uma vez. Para avaliação da eficiência de transformação, brotos isolados a partir de um único explante foram considerados como eventos de transformação independentes. A eficiência de transformação foi determinada pela relação entre número de brotos transformados e número total de explantes inoculados em meio de cultura. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey, com valor crítico de P = 0,05.

Para análise do enraizamento das plantas provenientes de brotos regenerados *in vitro*, cada repetição foi constituída por um frasco Magenta (Sigma Chemical Company, EUA) com quatro brotos. Cada tratamento constou de três repetições, utilizando-se 12 brotos por tratamento. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey, com P=0,05. Para os dados quantitativos, foi empregada a análise de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito de canamicina na cauligênese e rizogênese *in vitro* das cultivares 'IPA-5' e 'IPA-6'

Analisando o efeito de canamicina na frequência de regeneração das cultivares 'IPA-5' e 'IPA-6', verificou-se que o modelo de regressão linear apresentou melhor ajuste aos dados obtidos (Figura 1). Em relação ao controle (0 mgL⁻¹ de canamicina), houve uma drástica redução na frequência de regeneração dos explantes, para ambas as cultivares, em presença de 50 mgL⁻¹ de canamicina. No entanto, essa concentração do antibiótico foi insuficiente para eliminar completamente a diferenciação de gemas. A partir de 75 mgL⁻¹ de canamicina, não foi observada a indução de gemas em nenhuma das cultivares. Foi observada, para ambas as cultivares, uma redução nos teores de clorofila total dos explantes cultivados em concentrações crescentes de canamicina (Figura 2). Na ausência do antibiótico canamicina, os explantes cotiledonares de 'IPA-6'

apresentaram menores teores de clorofila total do que 'IPA-5'. Sugere-se que a maior sensibilidade da cultivar 'IPA-6' à canamicina seja causada pela senescência mais acelerada dos seus explantes, por apresentarem menores teores de clorofila total. A concentração de 75 mg L⁻¹ de canamicina no meio de regeneração de *L. esculentum* foi utilizada por Frary e Earle (1996), enquanto que concentração de 100 mg L⁻¹ foi utilizada por McCormick *et al.* (1986), Fillatti *et al.* (1987) e Patil (1994), para a seleção de brotos de tomateiro transformados.

A rizogênese dos cultivares 'IPA-5' e 'IPA-6' também foi estudada em meio de enraizamento (Frary, 1995) contendo o antibiótico canamicina, em diferentes concentrações. Verificou-se que o modelo de regressão linear apresentou melhor ajuste aos dados obtidos, tanto para a cultivar 'IPA-5', como para a cultivar 'IPA-6' (Figura 3). A concentração de 75 mgL⁻¹ de

canamicina foi suficiente para inibir completamente a rizogênese nos brotos de 'IPA-6'. No entanto, para a cultivar 'IPA-5', a rizogênese só foi inibida em concentrações a partir de 100 mgL⁻¹ de canamicina. Fillatti *et al.* (1987), Van Roekel *et al.*, (1993) e Frary e Earle (1996), visando a selecionar raízes de plantas de tomateiro transformadas, usaram como indicador de transformação meio de enraizamento contendo 50 mgL⁻¹ de canamicina. A concentração de 100 mgL⁻¹ de canamicina no meio de enraizamento de tomateiro foi utilizada por McCormick *et al.* (1986) e Hamza e Chupeau (1993), enquanto que 75 mgL⁻¹ foram utilizados por Frary (1995) e Frary e Earle (1996). A diferenciação de raízes adventícias pode ser utilizada como uma evidência adicional na identificação de brotos potencialmente transformados, contribuindo para a redução do período de seleção dos mesmos.

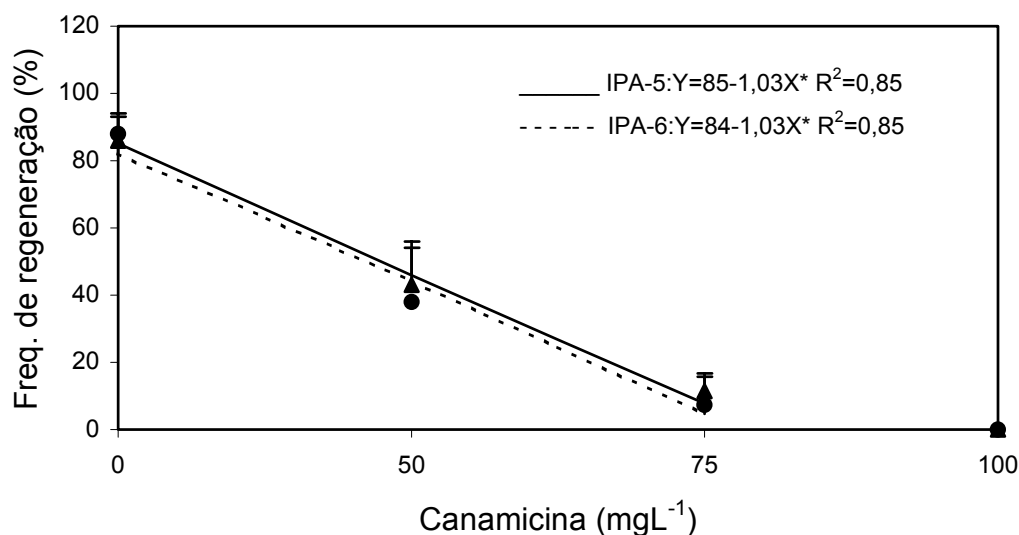


FIGURA 1- Efeito do antibiótico canamicina na frequência de regeneração de explantes cotiledonares das cultivares 'IPA-5' (—▲—) e 'IPA-6' (---●---), após o período de 42 dias de cultivo. As barras verticais indicam o desvio-padrão obtido nos experimentos.

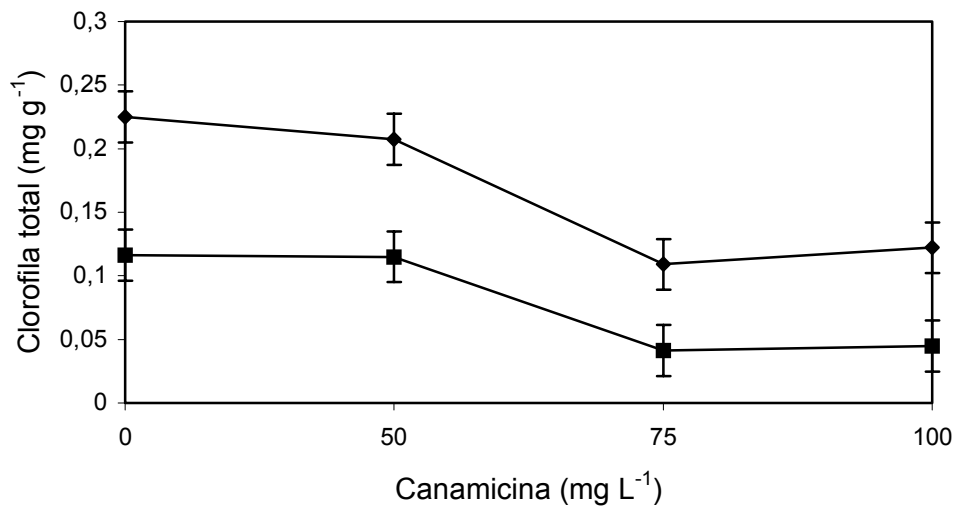


FIGURA 2 - Efeito do antibiótico canamicina sobre o teor de clorofila total de explantes cotiledonares das cultivares 'IPA-5' (—◆—) e 'IPA-6' (—■—) em meio de indução de brotos, após 42 dias de cultivo. As barras verticais indicam o desvio-padrão obtido nos experimentos.

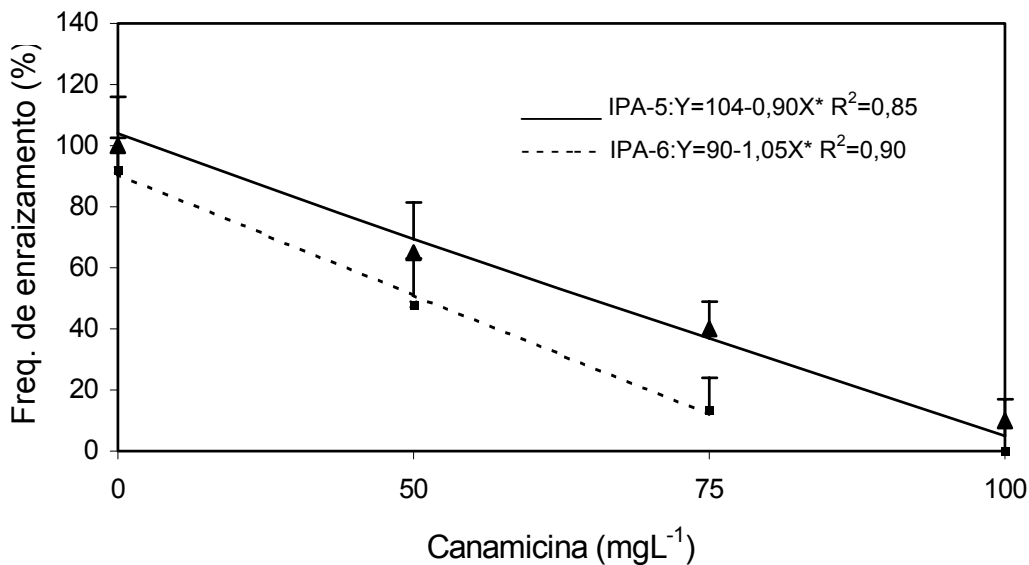


FIGURA 3 - Efeito do antibiótico canamicina na frequência de enraizamento *in vitro* das cultivares de tomateiro 'IPA-5' (—▲—) e 'IPA-6' (—■—), após 15 dias de cultivo. As barras verticais indicam o desvio-padrão obtido nos experimentos.

Transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Explantos de cotilédones de ambas as cultivares começaram a regenerar 15-30 dias após a transformação. Brotos com aproximadamente 45 dias foram isolados do explante original e transferidos para meio seletivo de enraizamento, onde enraizaram em 15 dias. Dessa forma, foi possível obter plantas transgênicas das cultivares 'IPA-5' e 'IPA-6', em média, após 60 dias do início do cultivo.

A transformação das plantas foi confirmada por PCR, utilizando-se iniciadores específicos do clone TC134 e do gene *nptII*, e por transferência de Southern (Figura 4). Evidência adicional da natureza transgênica dos brotos regenerados a partir de explantes inoculados com pBI121 foi obtida em seções transversais dos brotos, mediante a análise histoquímica da expressão do gene *gus*. Pela Figura 5, observa-se a coloração azul típica da atividade do gene *gus* junto aos feixes vasculares em caules (Figuras 5B e 5C), folhas (Figura 5F) e ovários (Figuras 5D e 5E) transgênicos. Não houve atividade do gene *gus* em caules (Figura 5A) e folhas (Figura 5G) das plantas não-transformadas (controle negativo).

Efeito da cultivar na eficiência de transformação

Em todos os experimentos, a cultivar 'IPA-5' apresentou uma maior habilidade de transformação (7%) quando comparada à 'IPA-6' (2,5%) (Figura 6). A diferença na frequência de transformação entre as cultivares pode ser atribuída às diferentes capacidades de regeneração após a transformação. Apenas 3% dos explantes cotilédones de 'IPA-6' produziram brotos após transformação, enquanto que aproximadamente 26% dos explantes de 'IPA-5' regeneraram brotos após transformação (dados não mostrados). Resultados similares também foram observados por McCormick *et al.*, (1986) e Frary (1995), os quais verificaram que a diferença na eficiência de transformação entre os genótipos estava

relacionada com as diferentes frequências de regeneração obtidas após a transformação.

Alguns fatores podem explicar a menor frequência de regeneração da cultivar 'IPA-6' após o tratamento com *Agrobacterium*. As células dos tecidos cotilédones de 'IPA-6' mostraram-se mais sensíveis à canamicina do que as de 'IPA-5' (Figura 2). Assim, a menor frequência de regeneração da cultivar 'IPA-6', após transformação, pode ser atribuída à sua maior sensibilidade ao antibiótico canamicina. Diferenças de sensibilidade à canamicina entre cultivares de tomateiro associada às eficiências de transformação foram sugeridas por Frary (1995) e Frary e Earle (1996).

Efeito do tipo de vetor na eficiência de transformação

A frequência média de transformação de 3,3%, obtida com o vetor pBI121, foi estatisticamente maior do que aquela obtida com o vetor pCLDO04541 (0,39%) (Figura 7). A diferença na eficiência de transformação entre os dois vetores está relacionada com o maior número de escapes de brotos regenerados a partir de explantes inoculados com pCLDO04541, que foi da ordem de 60%. Frary (1995) e Frary e Earle (1996), analisando a influência de três vetores na eficiência de transformação, verificaram que os valores de frequência de transformação estavam relacionados com o número de escapes obtidos. A diferença no número de escapes entre pBI121 e pCLDO04541 pode ser atribuída, principalmente, ao fato de esses vetores serem bem distintos, com tamanho de T-DNA de 7 e 22 kb, respectivamente.

Efeito da temperatura de co-cultivo na eficiência de transformação

Comparando-se as temperaturas de co-cultivo de 22, 24 e 28°C, a maior eficiência de transformação para a cultivar IPA-6 foi determinada pelas temperaturas de 22 e 24°C (Figura 8).

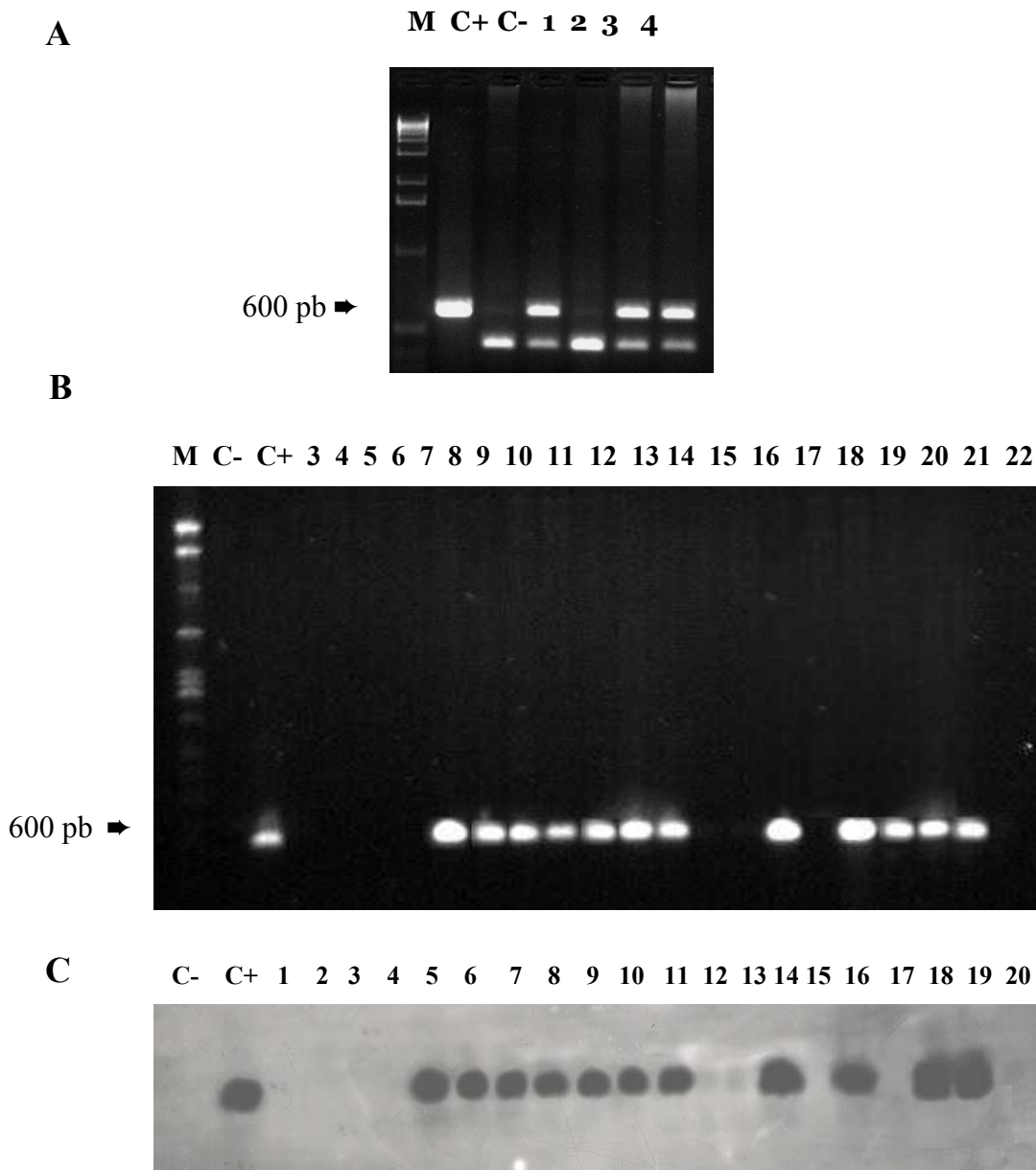


FIGURA 4 - PCR e transferência de Southern de 'IPA-5' e 'IPA-6' transformadas com os vetores pCLDO04541 e pBI121. A- PCR de 'IPA-5' e 'IPA-6' transformadas com o vetor pCLDO04541 utilizando-se iniciadores específicos do clone TC134, submetidos a digestão com *DraI*. Linhas 1 e 3: 'IPA-5' transformada; Linha 4: 'IPA-6' transformada. B- PCR de 'IPA-5' e 'IPA-6' transformadas com o vetor pBI121 utilizando-se iniciadores específicos do gene *nptII*. Linhas 7-13: cultivar 'IPA-5' transformada; Linhas 16, 18-21: cultivar 'IPA-6' transformada. C- transferência de Southern dos produtos de amplificação do PCR da Figura 4B, utilizando-se o gene *nptII* como sonda. M: marcador 1 kb "ladder"; C+: controle positivo (plasmídeo pBI121 ou pCLDO04541); C-: controle negativo (cv. Santa Clara).

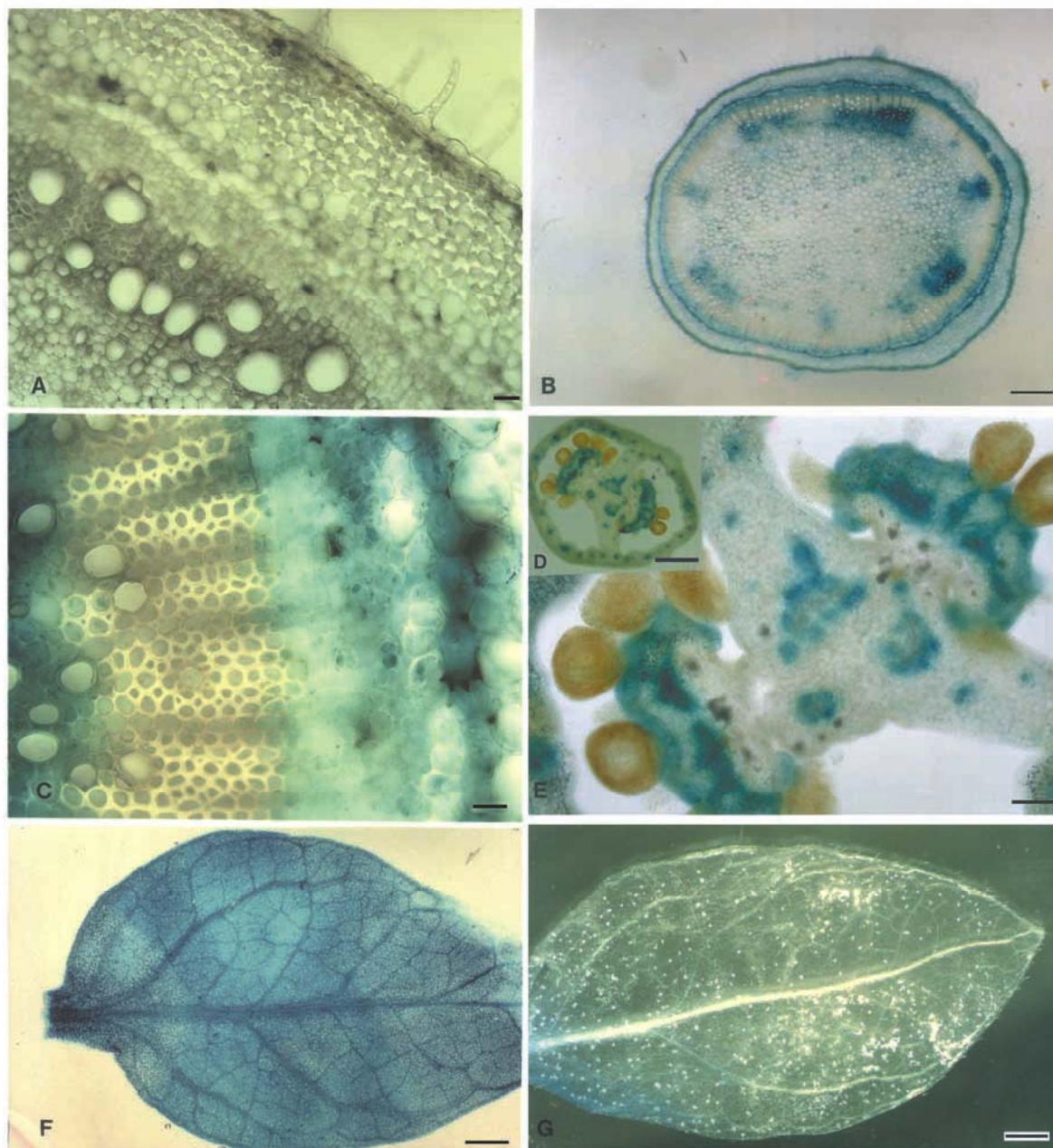


FIGURA 5- Detecção histoquímica *in situ* do gene *gus* em tecidos de plantas das cultivares de tomateiro ‘IPA-5’ e ‘IPA-6’ transformadas com *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404 – pBI121). **A** – Fotomicrografia de corte transversal do caule de uma planta não-transformada (controle negativo) (barra = 30 μ m); **B** e **C** – Detalhes da secção transversal do caule de uma planta transformada, mostrando a expressão *in situ* do gene *gus* junto aos feixes vasculares (B: barra = 0,3 mm; C: barra = 30 μ m); **D** e **E** – Detalhes da secção transversal do ovário de uma planta transformada, evidenciando a atividade do gene *gus* junto aos feixes vasculares (D: barra = 1 mm; E: barra = 0,25 mm); **F** – Detalhe de uma folha mostrando o padrão típico de expressão do gene *gus* (barra = 80 mm); **G** – Detalhe da folha de uma planta não-transformada (controle negativo) (barra = 80 mm).

Dillen *et al.*, (1997), analisando o efeito da temperatura de co-cultivo na oncogênese de tabaco e feijão, observaram que as melhores respostas foram obtidas na faixa de temperatura de 20 a 25°C. Outros relatos, incluindo a maior produção de VirD2 (Alt-Mörbe *et al.*, 1988), VirG (Alt-Mörbe *et al.*, 1989) e a maior indução de VirB (Alt-Mörbe *et al.*, 1988; Fullner e Nester, 1996) à faixa de temperatura de 20-25°C, também reforçam a hipótese de que a transferência do T-DNA para plantas é sensível à temperatura.

Os resultados obtidos, em conjunto, permitiram a adequação de um protocolo para transformação genética das cultivares 'IPA-5' e 'IPA-6'. Esse protocolo foi baseado no protocolo de transformação genética desenvolvido por Frary (1995) para a cultivar 'Moneymaker'. A frequência média de transformação, com pBI121, obtida por esse protocolo para 'IPA-5' e 'IPA-6' ($\pm 5\%$), foi comparável à frequência média obtida pelo protocolo de Frary (1995) para quatro cultivares de tomateiro ($\pm 7\%$).

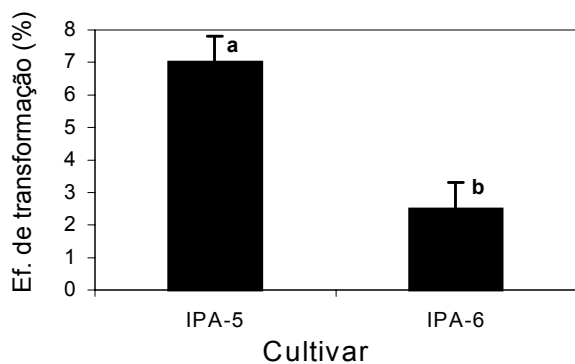


FIGURA 6 - Efeito da cultivar ('IPA-5' e 'IPA-6') na eficiência de transformação de explantes cotiledonares de tomateiro. Médias com pelo menos uma mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. As barras verticais indicam o desvio-padrão obtido nos experimentos.

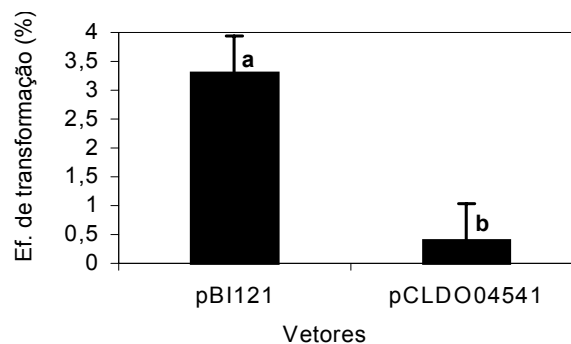


FIGURA 7 - Efeito do tipo de vetor (pBI121 e pCLDO04541) na eficiência de transformação de explantes cotiledonares da cultivar de tomateiro IPA-6. Médias com pelo menos uma mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. As barras verticais indicam o desvio-padrão obtido nos experimentos.

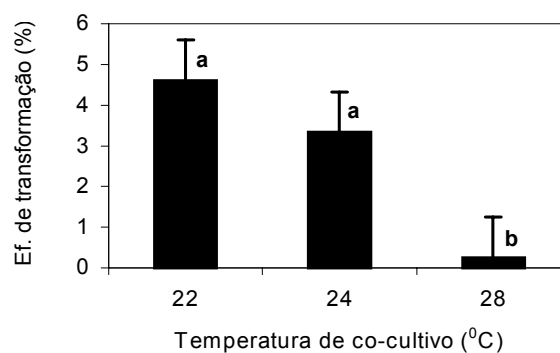


FIGURA 8 - Efeito da temperatura de co-cultivo na eficiência de transformação de explantes cotiledonares da cultivar de tomateiro IPA-6. Médias com pelo menos uma mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. As barras verticais indicam o desvio-padrão obtido nos experimentos.

REFERÊNCIAS

- ALT-MÖRBE, J.; NEDDERMANN, P.; VON LINTIG, J.; WEILER, E.W. and SCHRÖDER, J. Temperature-sensitive step in Ti plasmid *vir*-region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular General Genetics**, 213:1-8, 1988.
- ALT-MÖRBE, J.; KÜHLMANN, H. and SCHRÖDER, J. Differences in induction of Ti plasmid virulence genes *virG* and *virD*, and continued control of *virD* expression by four external factors. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, 2:301-308, 1989.
- BROMMONSCHENKEL, S.H. and TANKSLEY, S.D. Map-based cloning of tomato genomic region that spans *Sw-5* tospovirus resistance gene in tomato. **Molecular General Genetics**, 256:121-126, 1997.
- CHYI, Y.S. and PHILLIPS, G.C. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. **Plant Cell Reports**, 6:105-108, 1987.
- DAVIS, M.E.; LINEBERGER, R.D. and MILLER, A.R. Effects of tomato cultivar, leaf age, and bacterial strain on transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 24:115-121, 1991a.
- DAVIS, M.E.; MILLER, A.R. and LINEBERGER, R.D. Temporal competence for transformation of *Lycopersicon esculentum* Mill. cotyledons by *Agrobacterium tumefaciens*: relation to wound-healing and soluble plant factors. **Journal of Experimental Botany**, 42:359-364, 1991b.
- DILLEN, W.; DE CLERCQ; J., KAPILA, J.; ZAMBRE, M.; VAN MONTAGU, M. and ANGENON, G. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. **Plant Journal**, 12:1459-1463, 1997.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220p.
- FILLATTI, J.J., KISER, J., ROSE, R., COMAI, L. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. **Biotechnology**, 5: 726-730, 1987.
- FRARY, A. **The use of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in the map-based cloning of tomato genes and an analysis of factor affecting transformation efficiency**. Ph.D. Dissertation, Cornell University, Ithaca, NY, 1995, 165 p.
- FRARY, A. and EARLE, E.D. An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. **Plant Cell Reports**, 16:235-240, 1996.
- FULLNER, K.J. and NESTER, E.W. Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, 178:1498-1504, 1996.
- GORTNER, R.A. and GORTNER, W.A. **Outlines of biochemistry**. New York: John Willey and Sons, 1949. p. 845-869.
- HAMZA, S. and CHUPEAU, Y. Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*L. esculentum*). **Journal of Experimental Botany**, 44:1837-1845, 1993.
- JEFFERSON, R.A.; KAVANAUGH, T.A. and BEVAN, M.W. *Gus* fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, 6:3901-3907, 1987.
- JOÃO, K.H. and BROWN, T.A. Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif::pGSFR1161 in the presence of acetosyringone. **Plant Cell Reports**, 12:422-425, 1993.

- McCORMICK, S.; NIEDERMEYER, J.; FRY, J.; BARNASON, A.; HORSCH, R. and FRALEY, R. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, 5:81-84, 1986.
- McCORMICK, S. Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. In: LINDSEY, K. (Ed.) **Plant Tissue Culture Manual: Fundamentals and applications**. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands, 1991. p. B6/1-9.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.
- NITSCH, J.P. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. **Phytomorphology**, 19: 389-404, 1969.
- PATIL, R.S. **Genetic manipulation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for crop improvement**. Ph.D. Dissertation, University of Nottingham, Nottingham, 1994. 253 p.
- SHAHIN, E.A., SUKHAPINDA, K., SIMPSON, R.B. and SPIVEY, R. Transformation of cultivated tomato by a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*: transgenic plants with normal phenotypes harbor binary vector T-DNA but no Ri plasmid DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, 72:770-777, 1986.
- TEPFER, M. and CASSE-DELBART, F. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. **Microbiological Science**, 4:24-28, 1987.
- VAN ROEKEL, J.S.C.; DAMM, B.; MELCHERS, L.S. and HOEKEMA, A. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Cell Reports**, 12:644-647, 1993.