



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**Biofortificação de Plantas de Alface
(*Lactuca sativa* L.) Geneticamente Modificadas
para Aumento do Teor de Folato**

Aline Costa Santos Nunes

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão

**Brasília
Abril de 2009**



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**Biofortificação de Plantas de Alface
(*Lactuca sativa* L.) Geneticamente Modificadas
para Aumento do Teor de Folato**

Aline Costa Santos Nunes

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular, curso da Pós-Graduação em Biologia Molecular como parte do requisito à obtenção do título de Doutora em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão

Brasília

Abril de 2009



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**Biofortificação de Plantas de Alface
(*Lactuca sativa* L.) Geneticamente Modificadas
para Aumento do Teor de Folato**

Aline Costa Santos Nunes

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular, curso da Pós-Graduação em Biologia Molecular como parte do requisito à obtenção do título de Doutora em Biologia Molecular.

Aprovada por

Dr. Francisco José Lima Aragão

Dra. Lidia Maria Pepe de Moraes

Dra. Vera Tavares de Campos Carneiro

Dr. Cristiano Lacorte

Dr. Thales Lima Rocha

Dedicatória

Dedico à minha filha Letícia, que nasceu durante a realização desta Tese, por iluminar meus dias e noites com lindos sorrisos,
à meu marido Antônio Carlos, por acreditar em mim e estar sempre ao meu lado,
à minha mãe e nonna Nara, por minha educação e por nos dar amor e carinho incondicionais,
à meu pai e nonno Alfranci, por minha educação e por ser um exemplo de dedicação e perseverança.

Agradecimentos

Letícia, te agradeço por ter aberto mão do tempo comigo para que eu pudesse concluir este trabalho e sempre me esperar, quando acordada, com um sorriso meigo e alegre, sem cobranças nem culpas apenas carinho e amor.

Antônio Carlos, meu gi, por estar sempre ao meu lado, me apoiando, incentivando e ser parte da minha vida há mais de 17 anos.

Nara, minha mãe e nonna da Letícia, por dar a base da educação que tenho hoje, me aconselhar, me dar força, pelo amor e carinho incondicionais durante toda a minha vida.

Alfranci, meu pai e nonno da Letícia, por me apoiar, me incentivar, me educar e ser um exemplo de perseverança e dedicação.

Rafael e Alexandre, meus irmãos, por torcerem por mim sempre, e por compreenderem minhas ausências.

Ao Dr. Prof. Francisco José Lima Aragão, que acreditou em mim e neste projeto, por me orientar e ser um amigo.

Ao Dr. Elábio, Dr. Giovanni e Dr. Cristiano Lacorte pelo apoio, orientações e conselhos durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Transferência de Genes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelas conversas, ajudas e incentivos. Agradeço especialmente à Danielle C. Kalkmann, amiga e excelente estagiária, Andréa, André, Aisy, Bárbara Dias, Elsa, Emanuel, Fernanda, Helena, Luís, Maria Laine, Nicolau Brito, Paula, Sharon, Taina, Thaís, Warley e Welcimar.

Ao pessoal do laboratório de integração praga-planta, em especial ao Dr. Thales Rocha, Ariane F. Lacerda, Caroline de A. Bezerra e Raquel S. de Oliveira pela ajuda com a análise de Western blot.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela disponibilidade das instalações físicas, equipamentos e pela capacitação de recursos humanos.

Ao Programa de Pós-Graduação da Biologia Celular e Molecular da Universidade de Brasília pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Ao Instituto Sabin pelas análises de quantificação de folato por quimioluminescência.

Enfim, a todos aqueles que de uma maneira direta ou indireta, estiveram presentes e participaram desta grande conquista, o meu muito obrigado.

Índice

Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Índice	vi
Abreviaturas & Símbolos	ix
Índice de figuras e tabelas	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiii
Capítulo 1	1
Introdução	1
1.1. O Folato	1
1.1.1. Breve histórico, composição e funções	1
1.1.2. Biossíntese de folato em planta	5
1.1.3. Quantificação de folato em plantas	11
1.1.4. Doenças associadas à deficiência de folato	13
1.2. A Alface	18
1.2.1. Doenças e pragas que atacam a cultura de alface	21
1.3. Método de transformação genética mediado por <i>Agrobacterim tumefaciens</i>	24
1.3.1. O gênero <i>Agrobacterium</i>	25
1.3.2. Ocorrência da doença	26
1.3.3. Biologia do processo infeccioso	27
1.3.4. <i>Agrobacterium</i> como vetor de transformação de plantas	35
1.3.5. Sistema de transformação	36
1.4. Método de transformação genética mediado pelo processo biobalístico	37
1.4.1. Os sistemas	38
1.4.2. As micropartículas	40
1.4.3. Parâmetros físicos importantes	41
1.4.4. Os vetores	43
1.4.5. Transformação de meristemas apicais	44
1.4.6. Transformação cloroplasmática	45
1.4.7. Inoculação de vírus e viróides	46
1.4.8. Diolística	46
1.5. Método de transformação genética por eletroporação de protoplasto	47
1.6. Engenharia genética de alface	49
1.7. Engenharia genética para biofortificação de plantas	51

1.8. Objetivo geral	56
1.8.1. Objetivos específicos	56
Capítulo 2	57
Aumento da expressão de <i>GTP ciclohidrolase I</i> em plantas de alface	57
2.1. Introdução	57
2.2. Materiais & Métodos	58
2.2.1. Construção do vetor para transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	58
2.2.2. Transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	59
2.2.2.1. Preparo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> sepa EHA105	59
2.2.2.2. Transformação da <i>Agrobacterium</i> EHA105 com o gene de interesse (pCGCHI)	59
2.2.2.3. Desinfestação e germinação de sementes	60
2.2.2.4. Co-cultura alface- <i>Agrobacterium</i>	60
2.2.2.5. Seleção e crescimento das plantas	61
2.2.3. Análise das plantas por reações em cadeia da polimerase (PCR)	61
2.2.3.1. Extração de DNA genômico das plantas para análise por PCR	61
2.2.3.2. A PCR	62
2.2.4. Análise de western blot	62
2.2.4.1. Expressão de <i>gchI</i> em <i>E. coli</i>	62
2.2.4.2. Extração protéica de folhas de alface para western blot	62
2.2.4.3. SDS-PAGE e western blot	63
2.2.5. Análise de folato em plantas pelo método microbiológico	63
2.2.5.1. Crioproteção da cultura de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	63
2.2.5.2. Extração de folato de folhas de alface	64
2.2.5.3. Tratamento bi-enzimático dos extratos de folato	64
2.2.5.4. Quantificação de folato em folha de alface	65
2.3. Resultados & Discussão	66
Anexo	71
Nunes, A.C.S.; Kalkmann, D.C.; Aragão, F.J.L. (2009) Folate Biofortification of Lettuce by expression of a codon optimized chicken GTP cyclohydrolase I gene. <i>Transgenic Research (in press)</i>	71
Capítulo 3	79
Aumento da expressão de <i>corismato sintase</i> em plantas de alface	79
3.1. Introdução	79
3.2. Materiais & Métodos	80
3.2.1. Construção do vetor para transformação plastidial por bombardeamento	80

3.2.2. Otimização dos parâmetros de transformação cloroplasmática por biobalística _____	82
3.2.3. Transformação cloroplasmática por bombardeamento e regeneração das plantas ____	83
3.2.4. Confirmação da inserção do transgene _____	85
3.2.4.1. Extração de DNA genômico das plantas para análise por PCR _____	85
3.2.4.2. A PCR _____	85
3.2.5. Análise de folato em plantas pelo método microbiológico _____	85
3.3. Resultados & Discussão _____	86
Capítulo 4 _____	92
Conclusões & Perspectivas _____	92
Referências Bibliográficas _____	94

Abreviaturas & Símbolos

ACA	anticardiolipina
ACA-IgM	anticorpo anticardiolipina
ADC	aminodeoxicorismato
ADCS	aminodeoxicorismato sintase
ATP	adenosina trifosfato
BAP	6-benzilaminopurina
CaMV	vírus do mosaico da couve-flor
cs	corismato sintase
CTB	subunidade B da toxina do cólera
CTB-GFP	subunidade B da toxina do cólera com a proteína verde fluorescente
CTB-Pins	subunidade B da toxina do cólera com a proinsulina humana
Cu	cobre
CSPD	substrato quimiluminescente de marca registrada
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
DAMP	3-deoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato
DHFS	dihidrofolato sintase
DHM	dihidromonapterina
DHN	dihidroneopterinina
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
FAAM	folic acid assay medium (sigma)
Fe	ferro
FIGLU	ácido formiminoglutâmico
FPGS	folilpoliglutamato sintase
g	grama
<i>gchl</i>	GTP ciclohidrolase I
Glu	glutamato
GTP	guanosina trifosfato
H ₄ PteGlu _n	5,6,7,8-tetrahidropterilpoliglutamatos
HbsAg	proteína de superfície do antígeno da hepatite B
HPLC	cromatografia líquida de alta performance (em inglês)
IDR	ingestão diária recomendada
IFN-GFP	interferon com proteína verde fluorescente
IgG	imunoglobulina
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida
<i>LeCS</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> corismato sintase
M	molar
mA	miliampères
Mg	magnésio
Mn	manganês
MTHFR	5,10-metilenotetrahidrofolato redutase
NAA	ácido naftaleno acético
NaCl	cloreto de sódio

NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
nm	nanômetros
<i>oxdc</i>	oxalato decarboxilase
PCR	reações em cadeia da polimerase
Pi	fósforo inorgânico
-P	monofosfato
-PP	pirofosfato
-PPP	trifosfato
pABA	ácido para-aminobenzóico
pb	pares de base
psi	libra-força por polegada quadrada
PteGlu _n	pteroilpoliglutamato
PTS	proteína total solúvel
PVDF	difluorido polivinilideno
PVP	polivinilpirrolidona
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
sCTN	gene fusionado da subunidade B da toxina do cólera com um peptídeo sinal de retenção no retículo endoplasmático
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
<i>SERK</i>	<i>Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase</i>
THF	tetrahidrofolato
tRNA	RNA transportador
UI	unidades internacionais
UV	ultravioleta
X-gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurônico
Zn	zinco

Índice de figuras e tabelas

<i>Fig. 1 - Estrutura química da forma monoglutamílica do folato (THF)</i>	<i>2</i>
<i>Fig. 2 - Reações dependentes de folato e o fluxo de carbono na fotorespiração em plantas</i>	<i>3</i>
<i>Fig. 3 - A via metabólica de biossíntese do folato em plantas</i>	<i>6</i>
<i>Fig. 4 - Via metabólica da fenilalanina, tirosina e triptofano, em destaque o ramo metabólico do chiquimato ao corismato</i>	<i>9</i>
<i>Tabela 1. Composição nutricional da alface (por 100 gramas de produto)</i>	<i>21</i>
<i>Fig. 5 - Esquema biológico do processo infeccioso, mostrando todos os passos da transferência do DNA da bactéria para a planta hospedeira</i>	<i>28</i>
<i>Fig. 6 - Esquema básico dos principais sistemas biobalísticos para transformação genética de plantas</i>	<i>39</i>
<i>Fig. 7 - Representação esquemática do T-DNA presente no vetor pCGCHI utilizado para transformar folhas de alface mediado por Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>58</i>
<i>Fig. 8 - Eletroforese em gel de agarose 12% mostrando os fragmentos de 461 pb amplificados por PCR do gene gchl de algumas plantas T₀</i>	<i>66</i>
<i>Fig. 9 - Expressão de GgGCHI em folhas de alface transgênicas. Western blot da expressão de GgGCHI em folhas de plantas transgênicas, fígado de galinha e E. coli detectados pelo uso de anticorpo anti-hGCHI</i>	<i>67</i>
<i>Fig. 10 - Quantificação de folato total em linhagens de alface transgênicas T₃ e não transgênicas</i>	<i>69</i>
<i>Fig. 11 - Cassete de expressão do vetor pRL1000 usado na construção do vetor de transformação plastidial de alface</i>	<i>80</i>
<i>Fig. 12 - Vetor de transformação plastidial pLeCS para bombardeamento de folhas de alface</i>	<i>822</i>
<i>Tabela 2. Números de pontos azuis obtidos na expressão transiente do gene gus em folhas de alface.</i>	<i>866</i>
<i>Fig. 13 - Folhas de alface após o experimento com gene gus</i>	<i>877</i>
<i>Fig. 14 - Broto da planta ABD8, 5 semanas após o bombardeamento, saindo de uma intensa massa branca de células</i>	<i>888</i>
<i>Fig. 15 - Eletroforese em gel de agarose 12% mostrando os fragmentos de 1.100 pb amplificados por PCR do gene lecs de algumas plantas T₃</i>	<i>889</i>
<i>Fig. 16 - Quantificação de folato de três linhagens transgênicas, de planta de alface não transformada e de planta de espinafre</i>	<i>90</i>

Resumo

O folato é uma vitamina do complexo B, solúvel em água, formada por pterina, ácido para-aminobenzóico (pABA) e uma a oito partes de glutamato. Estudos sugerem que sua deficiência em gestantes está relacionada ao aborto espontâneo, e no feto a defeitos do tubo neural, anencefalia, anacefalia, coluna bífida, lábio leporino e síndrome de Down, e estabelece uma relação entre dietas com níveis inadequados de folato e o surgimento de defeitos congênitos, problemas para o desenvolvimento cognitivo, aumento do risco de doenças cardiovasculares, esquizofrenia, mal de Alzheimer, anemia megaloblástica e depressão. A alface foi escolhida para ter o seu teor de folato aumentado por ser uma hortaliça cultivada e consumida em todo o mundo, *in natura*, e ter seu protocolo de transformação estabelecido. Foram modificadas duas vias metabólicas do folato: a via das pterinas e a via do pABA. Para isso dois sistemas em paralelo foram usados: um sistema mediado por *Agrobacterium tumefaciens* em que foi transferida a região codificante do gene GTP ciclohidrolase I (*gchl*), que catalisa o primeiro passo na via metabólica das pterinas. O gene do *gchl* foi sintetizado baseado em uma seqüência de *Gallus gallus* com a otimização de códons para expressão em alface, sob o controle do promotor 35S de CaMV duplicado. Na via de síntese do pABA foi usado o sistema de bombardeamento, para inserir a região codificante do gene Corismato Sintase (*lecs*) de tomate (*Solanum lycopersicum = Lycopersicon esculentum*) no genoma cloroplasmático de alface. A LeCS catalisa o primeiro passo desta via. 29 linhagens de alface contendo o transgene *gchl* e 4 linhagens contendo o transgene *lecs* foram obtidas. Plantas da geração T₁ foram analisadas para quantificação de folatos totais pelo método microbiológico com *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC7469). Os resultados mostram que houve um aumento de até 8,5 vezes no teor de folato em linhagens transgênicas expressando *gchl* e de 1,8 vezes nas linhagens transgênicas transformadas com *lecs*, quando comparadas com plantas não transformadas. Essas linhagens serão utilizadas em experimentos para a determinação da biodisponibilidade de folato em animais.

Abstract

Folate is a complex B vitamin, water-soluble, formed by pterine, para-aminonzoic acid (pABA) and one to eight parts of glutamate. Some studies suggest that its deficiency in pregnant women is related to miscarriage, and that in the foetus it is related to defects of the neural tube, anencephalia, anacephalia, spine bifide, leporine lip and Down syndrome, and establish a relation between diets with inadequate folate levels and the appearance of congenital defects, problems in the cognitive development, increase in the risk of cardiovascular diseases, schizophrenia, Alzheimer's disease, megaloblastic anemia and depression. The lettuce plant was chosen to have its folate level increased because it is a vegetable cultivated and consumed throughout the world, *in natura*, and because it has its transformation protocol established. We have transformed two metabolic ways of folate: the way of pterines and the way of pABA. For such purpose two systems have been used in parallel: a system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in which we have transferred the codifying region of the gene *GTP ciclohidrolase I (gchl)*, which catalyzes the first step in the metabolic way of the pterines. The gene of the *gchl* was synthesized based on a sequence of *Gallus gallus* with the optimization of codons for the expression in lettuce, under control of the promoter 35S dCaMV. In the way of pABA we used the bombardment system, in which we inserted the codifying region of the gene corismato sintase (*lecs*) of tomato (*Solanum lycopersicum =Lycopersicon esculentum*) in the lettuce chloroplatic genome, which catalyses the first step of this pathway. We obtained 29 lineages of lettuce containing the transgene *gchl* and 4 lineages containing the transgene *lecs*. Plants of the generation T₁ were analysed for the quantification of total folates by means of the microbiological method with *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC7469). The results show there has been a increase in up to 8.5 times in the folate level in transgenic lineages expressing *gchl* and 1.8 times in transgenic lineages transformed with *lecs*, when compared to non transformed plants. These lineages will be used in experiments for the determination of the bioavailability of folate in animals.

Capítulo 1

Introdução

1.1. O Folato

1.1.1. Breve histórico, composição e funções

O folato é uma vitamina do complexo B solúvel em água, também conhecido como ácido fólico, ácido pteroilmonoglutâmico, folacina ou vitamina B₉. Descoberto em 1931 por Lucy Wills, foi isolado pela primeira vez de folhas de espinafre em 1941 por Herschel K. Mitchell, Esmond E. Snell e R. J. Williams, e por isso foi chamado inicialmente de *folium* (folha em latim) e posteriormente de ácido fólico (derivado de *folium*). Em 1946 foi sintetizado pela primeira vez por Robert B. Angier, James H. Boothe, Brian L. Hutchings na forma de pteroilmonoglutamato (Eskes, 2000).

O termo folato é usado para se referir aos folatos naturais das plantas ou fortificados; e ácido fólico à todas as formas sintéticas ou suplementadas. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em sua Portaria n°32, de 13 de janeiro de 1998, suplementos ou suplementos vitamínicos e ou de minerais, são alimentos que servem para complementar com estes nutrientes a dieta diária de uma pessoa saudável, em casos onde sua ingestão, a partir da alimentação, seja insuficiente ou quando a dieta requerer suplementação. Devem conter de 25% a 100% da ingestão diária recomendada (IDR) de vitaminas e ou minerais, na porção diária indicada pelo fabricante, não podendo substituir os alimentos, nem serem considerados como dieta exclusiva. Conforme Portaria n°31, de 13 de janeiro de 1998, alimento fortificado/enriquecido ou simplesmente adicionado de nutrientes é todo alimento ao qual for adicionado um ou mais nutrientes essenciais contidos naturalmente ou não no alimento, com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo, prevenir ou corrigir deficiências demonstradas em um ou mais nutrientes, na alimentação da população ou em grupos específicos da mesma. De forma semelhante alimento restaurado ou com reposição de nutrientes essenciais é todo alimento ao qual for adicionado nutriente

com a finalidade de repor, quantitativamente, aquele reduzido durante o processamento e armazenamento do alimento.

Os folatos e seus derivados, conhecidos genericamente como folato, são moléculas formadas por três partes, que consistem em pterina, pABA e uma a oito partes de glutamato. O THF, monoglutamilado, possui apenas um resíduo de glutamato e fórmula molecular $C_{19}H_{19}N_7O_6$ (fig. 1) (Eskes, 2000).

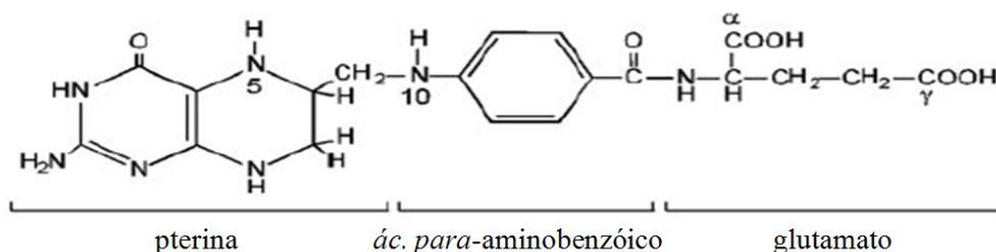


Fig. 1 - Estrutura química da forma monoglutamilada do folato (THF). A maioria dos folatos em plantas tem uma cauda γ -poliglutamilada e até sete resíduos ligados ao primeiro glutamato. O anel pterínico pode existir em tetra- e di-hidro e nas formas totalmente oxidadas (De La Garza et al., 2004).

Bactérias, fungos e plantas sintetizam folato *de novo* por uma complexa via metabólica que termina com a adição de resíduos de glutamato ATP-dependente (adenosina trifosfato dependente). As células dos mamíferos não possuem a habilidade de gerar folatos, portanto é fundamental que estes estejam presentes em sua dieta (Konings et al., 2001; Scott et al., 2000). As principais fontes de folato são: cereais, frutas (abacates, bananas, maçãs, tomates), frutas cítricas (laranjas e grapefruit), folhas verdes (espinafres, brócolis, couve), sementes, frango, carne e fígado crus. No entanto, os folatos estão presentes em pequenas concentrações em plantas (tipicamente ≤ 5 nmoles por peso fresco). Segundo Johansson et al. (2007) a quantidade de folato total presente em folhas de alface variam entre 30 e 198 μg por 100 g de peso fresco. Holasová et al. (2008) encontraram valores acima de 50 μg de folato por 100 g de peso fresco de espinafre, repolho, alface, couve-flor e brócolis; e menos de 25 $\mu\text{g}/100$ g em batatas, cenoura e pimenta. Konings et al. (2001) quantificaram folato em vários alimentos utilizando HPLC (sigla em inglês para cromatografia líquida de alta performance), encontrando valores de 65 μg de folato por 100 g de brócolis, 100 μg de folato por 100 g de espinafre cru e 83 μg de folato por 100 g de produto cozido, 8 μg de folato por 100 g de tomate fresco e 43 μg de folato por 100 g de alface fresco. Os resultados de Konings et al. (2001) também

apontaram que não há diferença nos níveis de folato dos vegetais analisados com relação à estação do ano, ou seja, não houve variação estatisticamente significativa nos níveis de folato relacionados à estação de crescimento da planta.

A absorção do folato ingerido compreende a conversão de poliglutamatos a monoglutamatos por uma conjugase do jejuno. O folato na forma monoglutamilada entra nas células do intestino e é completamente reduzido à THF por uma enzima tetrahidrofolato redutase. O THF, folato derivado de pteroilpoliglutamato (PteGlu_n), é a forma ativa do folato e pode ser transportado diretamente para a circulação ou ser convertido a THF-poliglutamato que é estocado, ou a 5-metil THF monoglutamato, a forma predominante do folato no soro e tecidos. Os locais de estocagem no corpo são fígado, pâncreas, rins, cérebro e hemácias (Eskes, 2000).

O THF pode aceitar uma unidade de carbono da serina ou glicina para formar 5,10-metileno-tetrahidrofolato. Isto também ocorre para a síntese de timidilato que é incorporado ao DNA, oxidado a formil-THF, usado para a síntese de purinas para incorporação no RNA e DNA, ou reduzido a 5-metil-THF, usado na metilação da homocisteína (Eskes, 2000) (fig. 2).

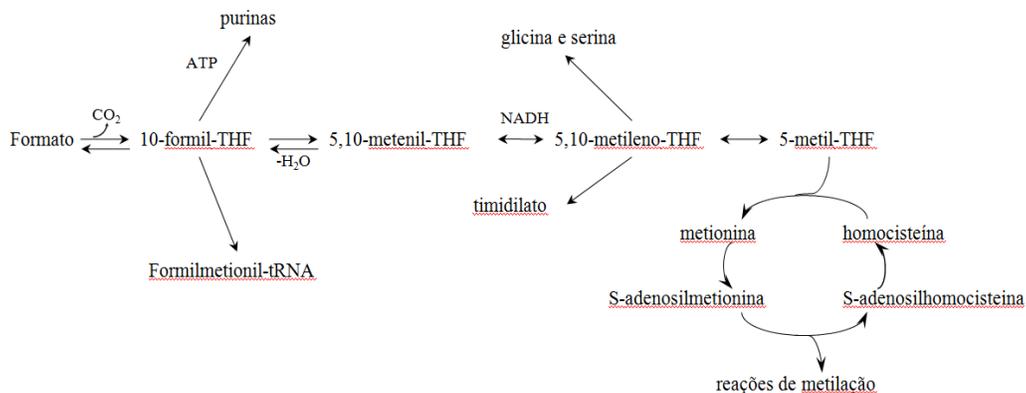


Fig. 2 - Reações dependentes de folato e o fluxo de carbono na fotorespiração em plantas (Cossins, 2000; Sahr et al., 2005).

A homocisteína é um intermediário formado quando da metabolização do aminoácido essencial metionina. O processo começa com a desmetilação de um intermediário secundário sulfurado da metionina, a S-adenosilmetionina, dando origem à homocisteína. A seguir, duas rotas são seguidas: a primeira regulada pela concentração da vitamina B₆, que visa à excreção da homocisteína pelos rins, diminuindo sua concentração sérica e a segunda, responsável pelo retorno da

homocisteína à metionina, dependente da concentração de vitamina B₁₂ e de folato. Dessa forma, as vitaminas do complexo B são cofatores essenciais no metabolismo da homocisteína, pois ambas as rotas são dependentes desses substratos. A ingestão média diária de homocisteína deve ser responsável por manter a concentração sérica na ordem de 10 mmol/L em homens adultos, mas dietas ricas em metionina e pobres em vitamina B produzem a elevação dos níveis séricos desse aminoácido, chamada hiperhomocisteinemia, o que pode levar a algumas doenças (Eskes, 2000) (ver item 1.3.4. Doenças associadas à deficiência de folato).

Folatos metabolicamente ativos também contêm um número de resíduos γ -glutamil e são chamados folilpoliglutamatos. O *pool* celular do 5,6,7,8-tetrahidropterilpoliglutamato (H₄PteGlu_n) participa no metabolismo de um carbono pela doação ou recepção de grupos carbono simples, com ordem de oxidação de formil a metenil (fig. 2).

Os processos celulares das plantas e de outros organismos dependem muito do metabolismo de um carbono mediado por THF poliglutamilados, que significa a transferência de um carbono para diversos processos metabólicos. O folato é um cofator que age como um doador, bem como receptor destes grupos (Cossins, 2000). Os processos celulares que requerem unidades de um carbono são: biossíntese de ácidos nucleicos, biossíntese de aminoácidos e biogênese de grupo metil, essencial para a divisão celular (Sousa et al., 2007). O que reforça a importância desta vitamina, vital para o desenvolvimento e funcionamento normal do corpo (Eskes, 2000) (fig. 2).

A função primária do folato é prover unidades de carbono para a síntese de três das quatro bases do DNA, guanina, adenina e timina. Os folatos normalmente adquirem seus grupos C₁ da serina ou do formato, e as enzimas da via de síntese de purinas necessitam desse C₁, que fica ligado ao tetrahydrofolato, para o inserirem como C-2 ou C-8 do anel da purina. Igualmente, a conversão da uracila (RNA) em timina (DNA), é realizada pela enzima timidilato sintase, que usa o cofator como seu doador de C₁ (Scott, 1999).

Alternativamente, o 5,10-metilenotetrahydrofolato usado pela timidilato sintase pode ser direcionado para o ciclo de metilação. Esse ciclo assegura à célula um suprimento adequado de S-adenosilmetionina, que age como um doador de grupos metil para uma série de metiltransferases. Estas enzimas metilam uma série de substratos de lipídeos, hormônios, DNA e proteínas (Scott, 1999)(fig. 2).

Humanos e outros mamíferos não podem produzir essa molécula, devendo inseri-lo em sua dieta. Pelo fato de as plantas serem a maior fonte de folato e a deficiência do mesmo ser um problema global, o aumento dos níveis de folato em plantas é um alvo da engenharia metabólica (Basset et al., 2002).

1.1.2. Biossíntese de folato em planta

O fracionamento celular e estudos imunohistoquímicos nos últimos 40 anos têm revelado a extensa compartimentalização do metabolismo das plantas. Em anos mais recentes, novas tecnologias como espectrometria de massa e programas que predizem seqüências de proteínas a partir de dados encontrados em bancos de dados aceleraram o fluxo de informação (Lunn, 2007). De uma maneira geral, as proteínas desempenham nas plantas função estrutural, enzimática, reguladora, de nutrição, de defesa e de transporte, porém a localização intracelular da maioria das proteínas no proteoma de plantas ainda é desconhecida ou incompleta (Lunn, 2007). Atualmente sabe-se que todas as vias metabólicas das plantas estão interconectadas, e o maior desafio dos bioquímicos é entender a regulação e o controle das redes metabólicas. Para entender como funcionam as células dos eucariotos, é necessário entender não apenas como o metabolismo e outros processos são compartimentalizados na célula, mas também como eles são interligados e controlados. Entender este processo em plantas é particularmente difícil pela presença de estruturas e compartimentos adicionais, como plastídios, parede celular, plasmodesmata, apoplasto e vacúolos (Lunn, 2007).

Como já mencionado, o folato é uma molécula formada por três grupos funcionais: pterina, pABA e de um a oito resíduos de glutamato. Em plantas, o resíduo de pterina, hidroximetildihidropteroato, é formado a partir de GTP no citosol, enquanto o precursor pABA é sintetizado nos plastídios, ambos se unem na mitocôndria ocorrendo subseqüentes condensação, glutamilação e redução, para a síntese de THF (Basset et al., 2004; Hanson & Gregory III, 2002; Lunn, 2007) (fig. 3).

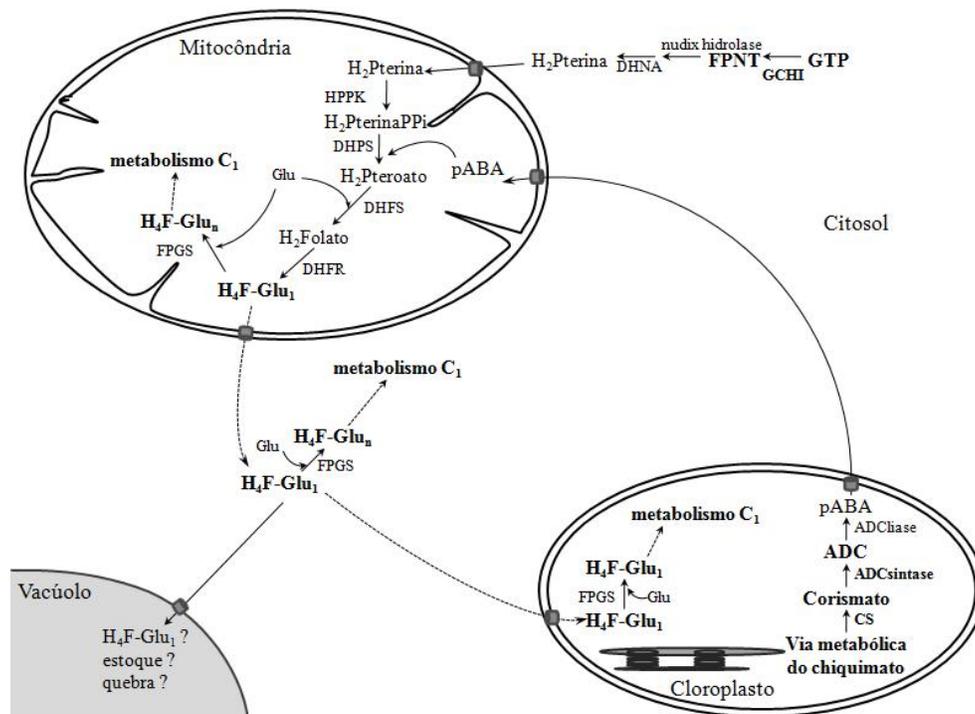


Fig. 3 - A via metabólica de biossíntese do folato em plantas. Aminodeoxicorismato (ADC), ácido para-aminobenzóico (pABA), guanosina trifosfato (GTP), dihidropterina ($H_2Pterina$), dihidropteroato ($H_2Pteroato$), dihidrofolato ($H_2Folato$), tetrahydrofolato (H_4F-Glu_1) formamidopirimidina nucleosídeo trifosfato (FPNT), GTP ciclodrolase I (GCHI), corismato sintase (cs), dihidroneopterina aldolase (DHNA), hidroximetildihidropterina pirofosfokinase (HPPK), dihidropteroato sintase (DHPS) dihidrofolato sintase (DHFS), dihidrofolato redutase (DHFR), folilpoliglutamato sintase (FPGS), resíduo de glutamato (Glu) (Cossins, 2000; Hanson & Gregory III, 2002; Sahr et al., 2005).

O folato é relativamente estável tanto na sua forma sintética quanto nas formas existentes *in vivo*, quando está associado a proteínas e o anel pteridínico não é reduzido (Scott, 1999). No entanto, os folatos são instáveis se expostos à luz (Hanson & Gregory III, 2002), e até 50% de sua quantidade natural é destruída no cozimento, processamento e estocagem dos alimentos. Essa degradação ocorre por oxidação, com quebras que ocorrem entre o C-9 e o N-10, gerando resíduos de pterinas ou pABA-glutamil (Scott, 1999). O tempo, a temperatura e o pH da água de cozimento são alguns fatores responsáveis pelas perdas de folato dos alimentos (Dang et al., 2000). As plantas compõem a principal fonte de folato em dietas humanas, mas muitas frutas, tubérculos e grãos são pobres nesta vitamina, sendo sua deficiência um problema mundial (De La Garza et al., 2004).

Apesar de sua baixa quantidade e suscetibilidade a alterações, o status de folato em plantas mantém-se para grandes fluxos metabólicos. Por exemplo, na fotorrespiração normal de uma folha C_3 , se 30% do folato total da folha participasse

na reação mitocondrial de conversão de glicina para serina, mediada por THF, um *pool* de 1 nmol/g de folato deveria levar a um fluxo de carbono de 1-2 $\mu\text{mol/g/min}$, isto é, a unidade C_1 precisa retornar 20 a 30 vezes por segundo para ser reutilizada, o que é diversas vezes mais rápido que o *turnover* de ATP nas folhas, que já é bastante rápido (Hanson & Gregory III, 2002).

Os passos da via metabólica da síntese de folato em plantas não são totalmente conhecidos, mas provavelmente são os mesmos encontrados em bactéria (Hanson & Gregory III, 2002). Os poliglutamatos são as coenzimas preferidas no metabolismo de um carbono, porque a afinidade das enzimas dependentes de folato aumenta proporcionalmente ao número de resíduos de glutamato (Ravanel et al., 2001).

A ligação de glutamatos para a formação do folato envolve duas reações. A primeira é catalisada pela dihidrofolato sintase (DHPS), que adiciona o primeiro resíduo de glutamato ao grupo carboxil do dihidropteroato (DHP) para formar dihidrofolato (DHF). Presente apenas em organismos que possuem a habilidade para produzir THF *de novo* de 6-hidroximetildihidropterina, pABA e precursores de glutamato (plantas, algumas bactérias, fungos e protozoários). A segunda é formada por uma seqüência de ligações γ entre os resíduos de glutamato, uma reação catalisada pela enzima folipoliglutamato sintase (FPGS) (Ravanel et al., 2001).

Dos quatorze passos para esta síntese, nove são mediados por enzimas específicas. Os genes e enzimas de plantas para os cinco passos finais foram caracterizados e as enzimas se mostraram mitocondriais, o que contraria sua primeira localização citosólica em outros eucariotos (Hanson & Gregory III, 2002). Os primeiros passos que produzem pterina e pABA são menos conhecidos em plantas, no entanto, dados genômicos mostram que plantas têm uma enzima homóloga a de bactérias na síntese de pterina, a GTP ciclohidrolase I (GCHI) e dihidroneopterina aldolase (DHNA). As seqüências de resíduos de aminoácidos destas proteínas parecem não possuir sinais de endereçamento para organelas específicas, e por isso são presumivelmente citosólicas (Hanson & Gregory III, 2002) (fig. 3).

Dados genômicos também mostram que plantas têm homólogos da primeira enzima da síntese de pABA, aminodeoxicorismato sintase (ADCS) e as proteínas destas plantas têm domínios que correspondem a ambas as subunidades da enzima bacteriana. A ADCS de planta tem peptídeos sinais de endereçamento para os plastídios, o que é consistente com a síntese de corismato, o substrato da ADCS, também ocorrer no cloroplasto (Hanson & Gregory III, 2002) (fig. 3). Por isso, são

necessárias reações coordenadas para a produção de folato nas plantas, ocorrendo três passos de transporte de membrana que envolve três compartimentos celulares distintos, o que é diferente em procarionotos, onde as enzimas são predominantemente citosólicas (Basset et al., 2002).

A via do chiquimato é responsável pela biossíntese de componentes aromáticos em bactérias, leveduras, fungos e plantas (Herrmann & Weaver, 1999; Roberts et al., 1998). A via do chiquimato é o precursor para a via de síntese de corismato e envolve sete reações (fig. 4). A primeira envolve a condensação de dois intermediários do metabolismo de carboidratos: fosfoenolpiruvato da glicólise e D-eritrose-4-fosfato da via das pentose-fosfato, que é eventualmente convertido a corismato, o último intermediário comum na síntese de três aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano). Esta reação é catalisada por 3-deoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato (DAMP) sintase (fig. 4), que não é inibida pelo *feedback* de qualquer dos resíduos de aminoácidos aromáticos formados, e é ativada por triptofano e Mg^{+2} . A segunda enzima, 3-deidroquinato sintase (fig. 4), catalisa o primeiro passo de ciclização, formando 3-deidroquinato. Por meio da liberação de uma molécula de água, a 3-deidroquinato desidratase catalisa a síntese de 3-deidrochiquimato, que é o substrato da enzima chiquimato desidrogenase para síntese de chiquimato (fig. 4). O quinto passo é catalisado pela chiquimato quinase (fig. 4), que fosforila chiquimato a chiquimato 3-fosfato. A penúltima enzima envolvida, a 3-fosfochiquimato-1-carboxiviniltransferase (fig. 4) catalisa fosfoenolpiruvato a 5-O-(1-carboxivinil)-3-fosfochiquimato e fosfato. E o último passo da via é a enzima corismato sintase (fig. 4) que catalisa 5-O-(1-carboxivinil)-3-fosfochiquimato para sintetizar o corismato e fosfato, requerendo a redução do cofator nucleotídico flavina (Buchanan et al., 2002). O corismato sintetizado pode ser direcionado à síntese de pABA, quinonas, flavonóides e alcalóides, ou pode ser direcionado para as mitocôndrias para a síntese de folato. Em todos os genes que codificam as enzimas da via do chiquimato se encontrou peptídeos sinais de direcionamento para os cloroplastos (cTP) nos N-terminais das regiões codificantes, corroborando que a via da chiquimato é realmente localizada nos plastídios (Weaver & Herrmann, 1997).

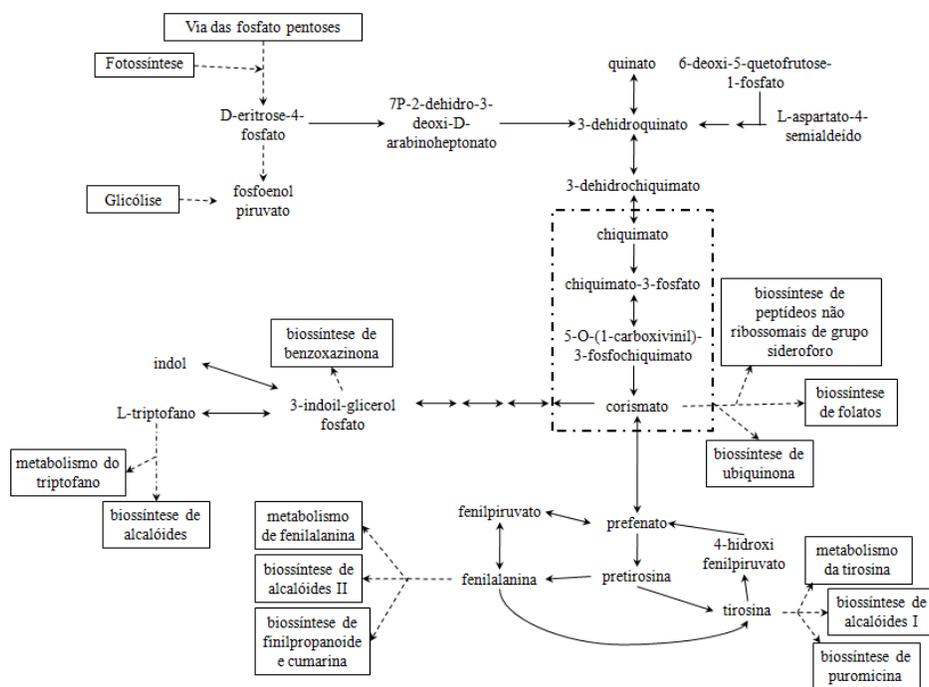


Fig. 4 - Via metabólica da fenilalanina, tirosina e triptofano, em destaque o ramo metabólico do chiquimato ao corismato (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)* <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map00400.html>).

As plantas possuem também homólogos de enzimas que participam da síntese de pterinas (que também formam folato), como a GTP cyclohydrolase I (GCHI) e a dihidroneopterina aldolase (DHNA) (fig. 3). As seqüências de resíduos de aminoácidos destas proteínas parecem não possuir sinais de endereçamento para organelas específicas, e por isso são presumivelmente citosólicas (Hanson & Gregory III, 2002), o que implica que a mitocôndria deve importar a pterina para produzir folato do citosol da célula (Basset et al., 2002). O primeiro passo da síntese de pterina é de interesse especial, pois envolve guanossina trifosfato (GTP), controlando o fluxo da via de síntese de folato. Este passo, mediado por GCHI, é uma expansão complexa do anel, que converte GTP a dihidroneopterina (DHN) trifosfato e formato (fig. 3) (Basset et al., 2002). No segundo passo um pirofosfato é quebrado por dihidroneopterina trifosfato sintase (DHPS), formando dihidroneopterina monofosfato (Klaus et al., 2005). A seguir a dihidrofolato sintase (DHFS), presente exclusivamente na mitocôndria, catalisa a síntese de dihidropteroato a 7,8 dihidrofolato. Este é convertido a THF-monoglutamilado pela catalização da enzima dihidrofolato redutase (DHFR) (fig. 3). Como último passo para a síntese das diferentes formas de folatos, a folilpoliglutamato sintase (FPGS) catalisa as ligações entre a molécula de folato e os

resíduos de glutamato (Ravanel et al., 2001). FPGS está presente em diferentes isoformas na mitocôndria, no citosol e no cloroplasto, com cada isoforma codificada por um gene (fig. 3).

As enzimas da síntese de folato em *Arabidopsis* são codificadas por um a três genes. Dados de *EST* (*Expressed Sequence Tag*) indicam uma situação similar em outras plantas, porém, a abundância de *ESTs* para genes das enzimas de síntese de folato é muito superior se comparado com o status do folato. Os *ESTs* de síntese de NAD(-P), purinas e pirimidinas são similares, mesmo o status de folato sendo dez vezes menor que de NAD(-P) e 100 a 200 vezes menor que de purinas e pirimidinas, que implica em uma altíssima capacidade de síntese de folato. Esta capacidade talvez ocorra devido: (1) ao retorno do *pool* de folato mitocondrial na fotorrespiração de folhas ter que ser extremamente rápido, por não se encontrar complexado entre a glicina decarboxilase e a serina hidroximetiltransferase, por isso pode ficar exposto à matriz mitocondrial e a uma degradação química e (2) a constatação de que a luz degrada o folato, por isso as folhas expostas à luz solar têm o seu folato rapidamente degradado, o que implica em uma igualmente rápida síntese de folato (Hanson & Gregory III, 2002). Por isso, a atividade das enzimas de síntese de folato da mitocôndria são mais que suficientes para repor o *pool* mitocondrial de folato a cada meia hora (Neuburger et al., 1996).

Em um estudo com *A. thaliana*, Ravanel et al. (2001) isolaram cDNAs que codificam DHFS e três formas de FPGS, usaram mutantes deficientes na atividade destas enzimas, mediram *in vitro* a incorporação de glutamato no dihidrofolato e tetrahydrofolato e analisaram a função de cada uma destas enzimas. A conclusão que chegaram é que DHFS está presente exclusivamente na mitocôndria, fazendo deste compartimento o único local de síntese de dihidrofolato nas células das plantas. Já FPGS está presente em diferentes isoformas na mitocôndria, no citosol e no cloroplasto, sendo cada isoforma codificada por um gene separado, situação única entre os eucariotos. Esta compartimentalização das isoformas está em acordo com a predominância de derivados de tetrahydrofolato conjugados a γ -glutamil e a presença de serina hidroximetiltransferases e C₁-tetrahydrofolato interconvertendo enzimas no citosol, mitocôndria e plastídios. A combinação do FPGS e estas reações mediadas por folato pode suprir cada compartimento com coenzimas folato poliglutamílicos, necessárias nas reações de metabolismo de um carbono, além de sugerir que o transporte das formas de folato não são conjugadas (Ravanel et al., 2001).

Ao que tudo indica o controle substancial da via metabólica do folato reside no conhecimento e controle das enzimas das vias metabólicas de pterina e pABA (principalmente, *gchI* e *adcs*) (Hanson & Gregory III, 2002).

1.1.3. Quantificação de folato em plantas

A determinação dos níveis de folato em plantas é complicada, devido ao comprimento da cauda de poliglutamil, dos estados de oxidação do anel de pterina e dos C substituintes. Além disso, as moléculas são suscetíveis a interconversão e degradação oxidativa durante a extração das folhas e análise quantitativa. Assim, a validade dos resultados analíticos depende muito do uso de um método apropriado de extração, processamento do extrato e da quantificação (Hanson & Gregory III, 2002).

O folato total de alimentos é determinado após a extração, deconjugação de poliglutamatos a monoglutamatos com o uso de uma conjugase (γ -glutamil hidrolase), e de um método de quantificação (Pandurangi & LaBorde, 2004). Folatos podem ser medidos por métodos de quimioluminescência, HPLC e ensaios microbiológicos. Os métodos de quimioluminescência são comumente usados para determinação de folato em sangue, e têm-se mostrado inadequados para determinação de folato total em plantas, devido às diferenças entre as várias formas de folato e de afinidades entre a molécula de folato e a proteína ligante usada no ensaio. O método HPLC proporciona informação qualitativa e quantitativa, mas o preparo de padrões confiáveis é difícil para medir folatos instáveis.

O método microbiológico utiliza *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469, = *L. casei*) é o mais usado para quantificação de folato total (Hanson & Gregory III, 2002) e possui alta sensibilidade (Gregory III et al., 1984). Entretanto, esse método possui pouca precisão, porque o microrganismo não responde aos folatos poliglutâmicos, respondendo apenas aos di e monoglutamilfolatos, é moroso e não diferencia entre as principais formas de folato (Gregory III et al., 1984). Além disso, certos componentes da planta em análise podem estimular ou inibir o crescimento da bactéria, resultando em dados não confiáveis (Konings et al., 2001).

Os *Lactobacillus* são bactérias Gram positivas, anaeróbicas facultativas, que preferencialmente crescem em meio microaerofílico. Elas são organismos fastidiosos, que apenas crescem em meio contendo carboidrato como fonte de energia, além de

fontes de carbono, nucleotídeos essenciais, aminoácidos e vitaminas (Pandurangi & LaBorde, 2004).

O método utiliza placas de Elisa para medição do crescimento da bactéria em extratos de alimentos. O crescimento da bactéria é medido pela turbidez das amostras após certo período de incubação. Um importante aperfeiçoamento na técnica é o uso de culturas crioprotegidas em glicerol, pois se pode produzir a bactéria em larga escala e congelá-las para posterior uso, o que gera economia de tempo e uniformidade das alíquotas da cultura no uso (Tamura, 1990; Wilson & Horne, 1982). Mas, mesmo com os avanços nesta análise, muitas vezes o organismo encontra dificuldades para crescer. Além disso, as culturas crioprotegidas perdem a viabilidade após 2-3 meses, tornando difícil a manutenção adequada das culturas.

A efetiva extração de folato é essencial para sua quantificação, e essa fase pode ser dificultada nas plantas porque o folato pode estar em paredes celulares ou ligadas a proteínas e resíduos de amido (Hanson & Gregory III, 2002). Outro passo enzimático importante é a deglutaminação de folatos poliglutâmicos, uma vez que *L. rhamnosis* responde mais a folatos com apenas três ou menos resíduos de glutamato (Gregory et al., 1990). Similarmente, muitos métodos de HPLC requerem a completa conversão do folato à forma monoglutâmica (Pfeiffer et al., 1997).

Alguns trabalhos demonstram um significativo aumento nas medidas de folato após um tratamento com algumas enzimas deglutamilantes: protease, α -amilase e conjugase. Konings *et al.* (2001), em ensaio para quantificar folato de uma série de alimentos, encontraram que extratos de fruta tratados bi-enzimaticamente com protease e α -amilase, apresentaram concentrações 16% maiores de folato que os exemplos não tratados. Da mesma forma, extratos tratados de produtos derivados de leite apresentaram 21% a mais de folato na quantificação que os mesmos não tratados com as enzimas. Examinando 12 diferentes tipos de cereais, Pfeiffer et al. (1997) encontraram que no tratamento trienzimático a quantidade de folato foi em média 19% maior que nos extratos tratados apenas com a conjugase. Holasová et al. (2008), encontraram maior eficiência na determinação de folato em espinafre, repolho e brócolis após o tratamento com α -amylase e conjugase, do que com o tratamento trienzimático ou apenas com conjugase. Já Pandurangi e LaBorde (2004) concluíram que a extração ótima de folato de folhas de espinafre envolve um tratamento bi-enzimático, consistindo em incubação a 37°C com protease por 8 horas a pH 4,0, seguido de tratamento com conjugase a 37°C por 3 horas a pH 7,0. Porém, os

resultados variados dos estudos já feitos demonstram que as condições ótimas para a análise de folato precisam ser determinadas para cada alimento, e que as condições sub-ótimas podem resultar em subestimação da quantidade de vitamina.

1.1.4. Doenças associadas à deficiência de folato

Em 1960, M. M. Nelson reportou os efeitos da deficiência de folato no desenvolvimento de embriões de ratos (Persad et al., 2002). Em humanos o estudo desta vitamina começou antes de 1965, com o pediatra Richard Worthington Smithells, um dos primeiros a reconhecer o possível papel da nutrição, particularmente o metabolismo do folato, para a embriologia humana (Eskes, 2000).

Os primeiros estudos de associação de doenças envolvendo deficiência de folato foram realizados em Liverpool, em colaboração com a obstetra Elizabeth D. Hibbard, usando o teste do ácido formiminoglutâmico (FIGLU), produto intermediário excretado pela urina quando o folato encontra-se em falta no organismo. Mulheres que deram a luz a recém-nascidos com má formação mostraram uma incidência cinco vezes maior de FIGLU do que as mães de recém-nascidos normais. Os autores concluíram que “a ocorrência familiar de malformação do sistema nervoso sérico pode ser mediado, em certos casos, por um defeito genético determinado do metabolismo do folato” (Eskes, 2000). Foi reconhecida então que a má nutrição era um dos fatores responsáveis por más formações congênitas. Em pesquisas posteriores, os níveis de vitaminas em um grupo de 900 mulheres durante o primeiro trimestre de gestação foram investigados e seis destas tiveram bebês com defeitos do tubo neural (DTN). Nestas mães, baixos níveis de folato sérico foram observados, com valores significativamente menores que aqueles encontrados nas outras mães. A seqüência lógica seria o estudo de uma possível prevenção destes defeitos por meio de uma intervenção com o uso de multivitaminas no período pré-concepção, este período foi escolhido por saber-se que o tubo neural se fecha na terceira semana pós-concepção, e o uso de multivitaminas devido à deficiência de mais de uma vitamina por estas mulheres. Para este estudo mães que já tinham filhos com estes defeitos foram selecionadas. Os estudos finais confirmaram o efeito protetor de um preparo multivitamínico contendo 360 µg diários de ácido fólico (Eskes, 2000).

Após Nicholas Wald e Paul Polani (1984) expressarem consideráveis dúvidas da eficácia da suplementação com vitamina pré-concepção, os autores anunciaram um

grande estudo clínico randomizado duplo-cego na tentativa de validar os resultados precedentes. Após quase 10 anos, tal estudo demonstrou uma redução de 72% da reocorrência de DTN quando 400 µg de ácido fólico era administrado no período próximo à concepção (MRC, 1991).

Outros estudos mostram também que a ingestão de suplementos vitamínicos contendo ácido fólico no período pré-concepção reduz o risco de DTN em recém-nascidos (Abramsky et al., 1999; Liu et al., 2004; Persad et al., 2002). Recomendações do Departamento de Saúde do Reino Unido (UK Department of Health) sugerem que a proteção contra DTN pode ser obtida pela ingestão de doses diárias de 400 µg de ácido fólico usando suplementação, alimentos fortificados com ácido fólico e dietas com alimentos ricos em folato. No entanto, não houve aumento significativo do status de folato quando as mulheres estudadas apenas comiam alimentos ricos nesta vitamina (Cuskelly et al., 1999).

Outro estudo parece demonstrar a diminuição do risco de nascimentos de crianças com lábio leporino em mulheres que haviam ingerido complexos multivitamínicos contendo ácido fólico, de um mês antes até dois meses depois da concepção. Porém esta associação pode não ser atribuída especificamente ao ácido fólico, podendo ser uma consequência de outros componentes do suplemento vitamínico, mas parece estar altamente relacionado ao uso de multivitamínicos contendo ácido fólico (Shaw et al., 1995).

A gravidez está associada com um aumento acelerado nas reações de transferência de um carbono, incluindo as necessárias à síntese de nucleotídeos e à divisão celular, o que é a base para o substancial aumento no requerimento de folato durante a gravidez. Um estudo com dieta controlada, conduzido com grávidas, confirmou as descobertas de estudos populacionais que a combinação de 300µg de ácido fólico sintético por dia de suplementos, alimentos fortificados ou ambos, mais 100 µg de folato de alimentos ricos nesta vitamina por dia, são suficientes para manter o status normal durante a gravidez (Fitzpatrick, 2003).

Dados recentes também indicam que ácido fólico pode reduzir o risco de aborto espontâneo. Pesquisas na Suécia e Suíça, onde os grãos consumidos não foram fortificados com ácido fólico, encontraram que a deficiência desta vitamina está associada com o aumento do risco de aborto espontâneo (George et al., 2002; Hess et al., 2001). Outros dados sugerem que suplementação com ácido fólico antes da concepção pode ser um potencial redutor na frequência de síndrome de Down.

Algumas mães de crianças com síndrome de Down tinham valores alterados de folato, bem como, mutação no gene da metilenotetrahidrofolato redutase, estas alterações também foram observadas em bebês com DTN (Barkai et al., 2003; James et al., 1999).

O valor da Ingestão Diária Recomendada (IDR) para lactantes é de 500µg de Folato Dietético Equivalente (FDE) por ser importante durante a amamentação, já que todo o folato fornecido para a formação do bebê é dado pela mãe (FDE é 1µg de folato dos alimentos ou 0,6µg de ácido fólico de suplementos ou alimentos fortificados. Esta equivalência se dá pela diferença entre a biodisponibilidade destes tipos de folato) (Fitzpatrick, 2003).

O folato é necessário para a formação e crescimento das células vermelhas do sangue. Na anemia por deficiência de folato, as células vermelhas são anormalmente grandes, chamadas de megalócitos e, quando na medula óssea, são chamados de megaloblastos. Conseqüentemente, esta anemia é chamada de anemia megaloblástica. Dietas pobres, alimentos muito cozidos, alcoolismo, doenças de má absorção e gravidez são fatores de risco. Nestes casos, suplementos de ácido fólico oral ou intravenoso podem ser dados em curto espaço de tempo até a anemia ser corrigida, ou pelo resto da vida no caso de má absorção pelo intestino (Fitzpatrick, 2003).

O uso crônico de álcool pode levar à deficiência secundária de folato. Isto se dá devido a uma redução na absorção de folato pela competição com o etanol, alteração no metabolismo hepatobiliar e aumento da excreção biliar de folato causado pelo etanol. Estudos com animais sugerem que a deficiência de folato acelera o desenvolvimento precoce de doenças do fígado ligado ao alcoolismo. Humanos que consomem álcool regularmente devem consumir diversos alimentos ricos em folato e consumir um suplemento alimentar contendo ácido fólico (Fitzpatrick, 2003).

O metabolismo do folato também tem um papel importante na função do sistema nervoso. Estudos de deficiência de folato e hiperomocisteinemia são reportados para doenças cardiovasculares, derrames (Boushey et al., 1995; Selhub et al., 1995) esquizofrenia (Regland et al., 1995) e os níveis de folato tendem a ser baixos em pessoas com mal de Alzheimer (Clarke et al., 1998), demência vascular (Faßbender et al., 1999; Gallucci et al., 2004) e depressão (Fava et al., 1997).

O estudo *Framingham Heart* (Fitzpatrick, 2003) mostrou que quanto maior o nível sanguíneo de homocisteína maior o estreitamento das artérias carótidas ao cérebro, o que aumenta a probabilidade de derrames. A homocisteína do soro pode ser

reduzida com suplementação de ácido fólico conforme Brouwer et al. (1999) e Wald et al. (2001). Baseados nas descobertas de Wald et al. (2001), uma redução na homocisteína do soro para 3 $\mu\text{mol/L}$, pode ser conseguida com a ingestão diária de 0,8 mg de ácido fólico. Isso pode reduzir os riscos de isquemia no coração em 16 %, trombose em 25 % e derrame em 24 %. O mecanismo pelo qual a hiperhomocisteinemia pode aumentar o risco de doença vascular está incerto. Embora diversas hipóteses tenham sido propostas, ainda são necessários mais estudos bem controlados para se provar a eficiência do ácido fólico na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (Fitzpatrick, 2003).

Estudos em várias partes do mundo, inclusive Bélgica, México e Brasil, têm mostrado que mutações no gene 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) podem reduzir a atividade desta enzima e levar à hiperhomocisteinemia, uma deficiência que tem sido associado a várias doenças vasculares, em particular, doença arterial coronária e trombose venosa profunda. Em um estudo no México com 45 pacientes com altas concentrações de homocisteína e baixos níveis de folato no sangue foram associados ao aumento no risco de trombose venosa cerebral. Populações com baixo poder socio-econômico e deficiência nutricional podem contribuir para a alta incidência desta doença (Cantu et al., 2004). Em outro estudo realizado na Bélgica com diabéticos tipo 2, com e sem hiperhomocisteinemia, mostrou uma maior incidência de mutação na metilenotetrahidrofolato redutase (C677T) em diabéticos com hiperhomocisteinemia do que nos pacientes com homocisteína normal e pode contribuir juntamente com fatores não genéticos na prevalência de hiperhomocisteinemia (Buysschaerta et al., 2004). Um estudo de caso foi relatado no Brasil, de uma jovem de 19 anos na segunda gestação e com um filho que apresentou trombose venosa profunda em seu pós-parto anterior. Sendo uma das possíveis causas de trombose a presença de um anticorpo anticardiolipina (ACA). Uma investigação das causas de trombose revelou anticorpo anticardiolipina (ACA-IgM) e heterozigose para a mutação C677T no gene MTHFR. A paciente recebeu 55.000 UI de heparina subcutânea diariamente da 15^a a 36^a semana de gestação, quando ela deu a luz. Não houve complicações clínicas durante o período pós-parto e ela foi liberada 3 dias após o parto (Couto et al., 2002).

Estudo realizado no *Kaiser Permanente's Southern California Endocrinology Laboratory* dos E.U.A. analisou amostras de sangue humano no período de 1994 a 1998 a fim de avaliar se houve mudança nas concentrações de folato sérico desde que

a fortificação de alimentos começou em 1º de janeiro de 1998. O valor médio de folato destas amostras aumentou de 12,6 para 18,7 µg por litro. Além disso, a porcentagem de indivíduos com valores baixos foi reduzida. A explicação provável é a fortificação de alimentos com ácido fólico desde 1996 nos E.U.A. ano em que a *Food and Drug Administration (FDA)*, agência americana responsável pela regulação e controle de alimentos e remédios, obrigou a fortificação com 140 µg para cada 100g de cereais (Lawrence et al., 1999).

No Canadá, de 1995 a 1998 houve uma recomendação na suplementação de ácido fólico para mulheres antes da concepção e, a partir de novembro de 1998 houve a implementação da fortificação de produtos graneleiros, isto é, produtos a base de arroz, milho, batata, cereais e produtos panificados são fortificados com ácido fólico. Um estudo na Nova Escócia avaliou a incidência de DTN antes (1991-1994) e após a suplementação (1995-1998) e comparativamente não foi observado mudança significativa na incidência de DTN, no entanto, quando foram comparados os dados antes (1991-1997) e após a fortificação (1998-2000) foi mostrada uma queda de mais de 50% na incidência de DTN, dando destaque ao que tange anencefalia e coluna bífida (Hossain et al., 2004; Persad et al., 2002).

No Brasil, os altos índices de anemia e de doenças causadas pela deficiência de ácido fólico na população brasileira, levaram o Ministério da Saúde e a ANVISA a tornar obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho. Com a publicação da Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, desde junho de 2004 as farinhas de trigo e de milho vendidas diretamente ao consumidor, e aquelas utilizadas como matéria-prima pelas indústrias na fabricação de outros produtos, passaram a ser enriquecidas com Fe e ácido fólico. Cada 100 g das farinhas de trigo e milho deverão conter 4,2 mg de Fe e 0,15mg de ácido fólico. Com isso, as farinhas e produtos industrializados, como pães, macarrão, biscoitos, misturas para bolos e salgadinhos deverão apresentar maior quantidade de Fe e ácido fólico em sua formulação final (ANVISA, acessado em 01/04/2009). Espera-se assim, reduzir a incidência destas doenças relacionadas com dietas de níveis inadequados de folato.

1.2. A Alface

A alface (*Lactuca sativa*) é uma hortaliça da Divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, Ordem *Asterales*, Família *Asteraceae*, Genero *Lactuca*, Espécie *Lactuca sativa* (Mabberley, 1997). Considerada a hortaliça folhosa mais importante na alimentação do brasileiro, sendo seu consumo médio anual em torno de 41 kg *per capita* (Nadal et al., 1986), o que assegura à cultura expressiva importância econômica (Grangeiro et al., 2006).

Quanto à sua estrutura, a alface é uma planta herbácea delicada, com caule diminuto, ao qual se prendem folhas amplas que crescem em volta do caule em roseta, podendo ser lisas ou crespas, formando ou não uma cabeça. Conforme a cultivar, a coloração pode ocorrer em vários tons de verde e roxo (Filgueira, 2000). Originária da região do Mediterrâneo, de clima temperado, esta espécie vegetal já era utilizada como planta medicinal desde 4.500 a.C., como tranquilizante, digestivo, emoliente e fornecedor de vitaminas e como hortaliça, sua utilização é registrada desde 2.500 a.C. Acredita-se que tenha sido trazida para o Brasil pelos portugueses e as espécies silvestres trazidas na época ainda podem ser encontradas no sul da Europa e na Ásia Ocidental, regiões de clima temperado (Goto & Tivelli, 1998).

A sua adaptação a regiões de temperatura mais elevada, como o Brasil, tem gerado obstáculos ao seu crescimento e desenvolvimento, impossibilitando que a cultura expresse todo o seu potencial produtivo. Nestas condições, ocorre redução do ciclo da cultura, comprometendo sua produção, devido à aceleração do metabolismo da planta e, conseqüentemente, a antecipação da fase reprodutiva. Mesmo assim, são cultivados no Brasil, aproximadamente 30 mil hectares sendo responsável pela geração de aproximadamente 60 mil empregos diretos (Grangeiro et al., 2006; Makishima, 1993; Setúbal & Silva, 1992).

No Brasil existem informações de pesquisas a respeito do crescimento e acúmulo de nutrientes em diferentes cultivares. Entretanto, as mesmas foram realizadas em regiões de clima mais ameno (Radin et al., 2004), ou em condições de cultivo protegido (Lopes et al., 2003; Menezes Júnior et al., 2004) sem aplicação prática naquelas regiões que cultivam alface, em condições de altas temperatura e luminosidade (Grangeiro et al., 2006). O seu cultivo em estufas agrícolas permite a utilização intensiva da terra e do capital, e sua produção de maneira controlada, dependendo menos das condições climáticas e com melhor aproveitamento dos

insumos, possibilitando a distribuição da produção ao longo do ano, o que regulariza a oferta e possibilita ao produtor evitar épocas de menor preço (Rodrigues et al., 1997; Trani et al., 2006). Outra técnica que tem se mostrado muito promissora no cultivo de alface é a hidroponia, que trouxe vantagens como a antecipação da colheita, a homogeneidade de oferta e qualidade dos produtos durante todo o ano, a ausência de necessidades de rotação de culturas e a redução no uso de agrotóxicos, quando comparado com o cultivo tradicional (Luz et al., 2006).

Até 1993, segundo Nagai (1993), a preferência predominante no Brasil era para a alface de folhas lisas do tipo manteiga, entretanto, foi observado, atualmente, grande demanda para o tipo crespa (Oliveira et al., 2004), sendo que a participação de folhas crespas atende a 70% do mercado consumidor dessa folhosa. Nos últimos anos, tem sido observado no mercado de sementes de alface um número crescente de cultivares, sendo algumas delas adaptadas ao cultivo protegido. Para outras, há ausência de informações (Trani et al., 2006).

No Brasil atualmente são plantados seis grupos de cultivares de alface, sendo: grupo Americana, com folhas que formam uma cabeça, semelhante ao repolho, com os bordos das folhas crespas (ex.: cultivares Tainá e Lucy Brown); Repolhuda-Manteiga, semelhante ao anterior, mas com os bordos das folhas lisas (ex.: cultivares Elisa e Aurélia); grupo Solta-Lisa que são alfices que não formam uma cabeça e possuem os bordos das folhas lisos (ex.: cultivares Regina e Uberlândia-10000); Solta-Crespa que são alfices semelhantes ao grupo anterior, mas possuem os bordos das folhas crespas (ex.: cultivares Vera e Verônica), é o que mais cresceu em área plantada no Brasil, correspondendo hoje a 70% do mercado. Existe ainda o grupo Mimosa, que são alfices com folhas bem recortadas (como a cultivar Salas Bowl) e o grupo Romana, sendo estes dois últimos com menor importância econômica (Filgueira, 2000).

A alface é uma hortaliça mundialmente conhecida e consumida crua como salada, no entanto, em alguns lugares as folhas são secas, curadas e fumadas como tabaco (USDA, 2008), em outros, como na China, é consumida quente em sopas (Simoon, 1991). Para os Yazidi, comunidade fechada do nordeste do Iraque com estimativa de, no máximo, 700.000 pessoas, comer alface é um tabu, uma das mais antigas tradições desta religião “kurdish”, envolta em mistérios e segredos que nem eles explicam (MacFarquhar, 2003).

Variedades de alface de todos os tipos, lisas e crespas, são cultivadas ao redor do mundo em regiões de clima moderado e necessitam de muita água e luz para seu crescimento. Os principais produtores da União Européia são: Espanha, Itália e França. No mundo os principais produtores são China e EUA. Segundo dados da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) a produção mundial de alface combinada com a de chicória foi de 23,55 milhões de toneladas em 2007, e de 22,77 milhões de toneladas em 2006, com um aumento de 3,4% em um ano, e sendo sempre observado algum crescimento ao longo dos últimos anos (FAOSTAT, acessado em 15/02/2009).

Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) 100 g das folhas verdes da alface possuem em sua composição nutricional mais de 95% de água, baixo valor calórico (15 kcal), baixo teor de gorduras totais (0,15g) e quantidade razoável de proteínas totais (1,36 g), vitaminas e minerais. Entre estes destaca-se a vitamina A, vitamina C, niacina, cálcio, fósforo e ferro (tabela 1). Cada 100g de folhas de alface crua possui 38 µg de folato, enquanto outros produtos são considerados ricos em folato como o espinafre (*Spinacia oleracea*) que possui 194 µg de folato em 100 g de produto cru, brócolis têm 71 µg de folato em 100 g de produto cru, couve (*Brassica oleracea var. viridis*) com 166 µg de folato em 100 g de produto cru, que se reduz para 93 µg de folato quando cozida e fervida e o feijão preto (*Phaseolus vulgaris*) que contem 444 µg de folato quando cru e diminui para 149 µg de folato após cozido. Outros são considerados pobres em folato como o espinafre (*Tetragonia tetragonoides*) que possui 15 µg de folato por 100 g de produto cru, o tomate possui 29 µg de folato em 100 g de produto e quando verde tem 9 µg por 100 g de produto e batata tanto crua quanto cozida sem casca possuem 9 µg de folato por 100 g de produto o que sobe para 22 µg de folato por 100 g de produto com casca.

Tabela 1. Composição nutricional da alface (por 100 gramas de produto)

Nutrientes	Valores	Vitaminas	Valores
Água	95,07 g	Vitamina C	18,0 mg
Energia	15 kcal	Tiamina	0,070 mg
Proteína	1,36 g	Riboflavina	0,080 mg
Gordura Total	0,15 g	Niacina	0,375 mg
Carboidratos	2,79 g	Ácido pantotênico	0,134 mg
Fibra total	1,3 g	Vitamina B-6	0,090 mg
Açúcares totais	0,78 g	Folato total	38 µg
Glicose (dextrose)	0,36 g	Colina total	13,4 mg
Frutose	0,43 g	Betaina	0,2 mg
Minerais	Valores	Vitamina A, RAE	370 µg
Cálcio	36 mg	β-Caroteno	4443 µg
Ferro	0,86 mg	Vitamina A	7405 UI
Magnésio	13 mg	Vitamina E	0,29 mg
Fósforo	29 mg	Vitamina K	173,6 µg
Potássio	194 mg		
Sódio	28 mg		
Zinco	0,18 mg		
Cobre	0,029 mg	mg – miligramas	
Manganês	0,250 mg	µg – microgramas	
Selênio	0,6 µg	UI – Unidades internacionais	

(USDA, 2008)

1.2.1. Doenças e pragas que atacam a cultura de alface

Todas as doenças causadas por fungo têm condições favoráveis de desenvolvimento em alta umidade e clima ameno com temperaturas entre 10 e 28°C, condições estas que são ideais também para o desenvolvimento da cultura de alface.

A septoriose causada pelo fungo *Septoria lactucae* Passerini é uma das doenças mais disseminadas que afetam a cultura da alface. Sua importância deve-se às lesões necróticas no limbo foliar que prejudicam o valor comercial do produto. Nos campos, a doença causa nas folhas manchas com contornos irregulares e seca das folhas devido a coalescência de muitas manchas, resultando em danos na formação das sementes. O fungo ataca principalmente as folhas, mas pode afetar também a haste e os órgãos florais. O tecido afetado, inicialmente com aspecto desidratado, torna-se pardacento, com numerosos pontos de cor escura visíveis a olho nú. Não há cultivares consideradas imunes a esta doença, mas em observações de campo pode-se verificar diferenças nos níveis de resistência horizontal (Sousa et al., 2003).

A cercosporiose ou mancha de cercospora é causada pelo fungo *Cercospora longissima*, e atingem inicialmente as folhas mais baixas. As lesões têm tamanhos variados, tornando-se irregulares ou angulares, com coloração marrom clara a escura, circundadas por tecido clorótico com ponto central de coloração acinzentada. Quando a doença apresenta alta severidade, as lesões coalescem e extensas áreas do tecido foliar morrem (Gomes et al., 2006).

O míldio é uma das principais doenças da alface, com ocorrência em qualquer fase do ciclo da cultura. O fungo oomiceto *Bremia lactucae* ataca as folhas através de manchas amareladas de tamanho variável, afetando a produção, a qualidade e o valor do produto colhido. É responsável por perdas superiores a 80% na produtividade. Para minimizar os danos, além do emprego de cultivares resistentes e do controle da água de irrigação, é de fundamental importância o diagnóstico correto no início do desenvolvimento dos primeiros sintomas, bem como a adoção de fungicidas adequados às exigências do patógeno.

A doença do tombamento das mudas é um problema que afeta principalmente solos frios com pouca drenagem e com excesso de irrigação. É causado por fungos que permanecem no solo por longos períodos de tempo. As sementes morrem sem germinar. As plantas germinadas também são atacadas murchando e tombando. Lesões escuras e encharcamento são normalmente visíveis no caule da planta na linha do chão.

O mofo-branco ou podridão do caule é causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, que sobrevive no solo e que infecta mais de 360 espécies de plantas (Amorin, 1995). Este patógeno pode atacar a planta em qualquer estágio de desenvolvimento, principalmente próximo à colheita e produz estruturas de resistência denominadas escleródios, que tornam a doença de difícil controle em função do longo período de permanência destas no solo (Rodrigues et al., 2007).

A doença queima da saia, embora surja com certa frequência, não causa grandes prejuízos a não ser quando existe atraso na germinação da planta. É causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* e os sintomas mais graves causado pelo estrangulamento parcial dos caules são: atraso no desenvolvimento da planta, deformação e descoloração dos caules, necrose do tecido vascular, pigmentações púrpuras nas folhas. Em período úmido, o fungo pode manifestar-se na base dos caules necrosados e formar uma bainha esbranquiçada. A rizoctônia produz uma toxina que tem efeito inibidor do crescimento. As raízes são igualmente infectadas e

algumas delas destruídas, razão pela qual as plantas dispõem de um sistema radicular fraco. O fungo mantém-se de um ano para o outro, sob a forma de esclerotos no solo, ou como micélio em resíduos vegetais existentes no solo. Na primavera, quando as condições são mais favoráveis, os esclerotos germinam e invadem os caules da planta, especialmente através de feridas. O desenvolvimento da doença é estimulado por umidade elevada e temperaturas baixas do solo.

O mofo cinzento causado pelo fungo *Botrytis cinerea* ocasiona um acinzentamento das folhas, gerando perdas de produtividade.

A podridão-mole ou podridão-da-base-das-folhas-externas, causada pela bactéria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, é uma das doenças mais destrutivas nas culturas da alface. Aparece inicialmente como uma murcha nas folhas externas, sendo que plantas próximas à colheita são mais suscetíveis. A murcha é causada pelo colapso dos tecidos vasculares, com o desenvolvimento de descoloração rosa a marrom. Com o progresso da doença, a medula do caule torna-se encharcada, macerada e esverdeada. Em estágios avançados, toda a planta pode tornar-se apodrecida. Durante a pós-colheita as folhas externas tornam-se murchas, descoloridas e toda a planta pode apodrecer.

A podridão negra das raízes ou murchadeira é uma doença relativamente recente, que foi constatada em 1999 e que se encontra em expansão no estado de São Paulo. É causado pelo fungo *Thielaviopsis basicola* e seus sintomas são manchas escuras nas raízes que, com o avanço da doença vão se tornando totalmente apodrecidas. A planta pode emitir novas raízes e há a redução do crescimento da planta e murcha nas horas mais quentes do dia.

A doença da mancha de alternaria, causada pelo fungo *Alternaria alternata* que afetam as folhas até estas amadurecerem. Os sintomas são observados 48 horas após a infecção, formando pequenas manchas escuras, rodeadas por um halo amarelado. Podem se expandir, ocupando grandes áreas da superfície foliar e atingir as nervuras. Nos ramos, os sintomas são semelhantes aos observados em folhas, com lesões de 1 a 10 mm de diâmetro.

A mancha bacteriana é causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e ocasiona prejuízos na produção de alface. Os sintomas iniciais são observados nas bordas das folhas mais velhas como manchas irregulares de coloração marrom. O aumento da severidade provoca necrose total das folhas, que por sua vez secam, afetando a produtividade e aceitabilidade pelo consumidor.

O vírus do mosaico da alface ou ferrugem é causado por um potyvirus, que é totalmente inofensivo para o consumidor, mas torna a planta não comercializável por causar defeitos e alterações na cor das folhas, tornando-as marrons nas suas partes inferiores. O que pode causar uma perda de 100% da produção devido aos sintomas serem observados apenas na colheita.

Há ainda a doença chamada nematóide-das-galhas, causada pelo nematóide *Meloidogyne* sp., que tem se tornado um dos principais problemas enfrentados no cultivo da alface, sendo responsáveis por importantes perdas, uma vez que reduzem a quantidade e a qualidade do produto colhido. Cultivares de alface quando atacadas pelos nematóides apresentam debilidade intensa da planta, ocasionando uma densa formação de galhas no sistema radicular. As galhas obstruem a absorção de água e nutrientes do solo, resultando em plantas amareladas, com cabeça de tamanho reduzido, pequeno volume foliar e sem valor para o consumo *in natura*.

As principais pragas que atacam a plantação de alface são: pulgões ou afídios que tem dupla importância na cultura: que se alimentam das folhas e das raízes e causam danos diretos sugando a seiva, injetando toxinas, e até provocando o desenvolvimento da fumagina, causando perdas, tanto quantitativas, como qualitativas; ou como vetores de vírus, especialmente o vírus do mosaico da alface, lagarta minadora e lagarta tesourinha, mosca-branca, cochonilha, paquinhas, grilo, lesmas, caracóis, tatuzinhos, tripses do fumo e besouro preto e tanto podem se alimentar da planta como serem transmissoras de doenças ao se alimentarem de uma planta doente e após de uma saudável.

1.3. Método de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens*

A galha-da-coroa (do inglês *crown-gall*) é uma doença de plantas conhecida na Europa desde a Antiguidade, manifestando principalmente em plantas de propagação vegetativa. Essa doença traduz-se pela formação de uma galha na coroa (junção entre o tronco e a raiz) ou diretamente nas raízes da planta infectada. Sabe-se, há mais de um século, que o agente etiológico causador da galha-da-coroa é uma bactéria tipicamente do solo, a *Agrobacterium tumefaciens* (Cavara, 1897; Smith & Townsend, 1907).

Ao contrário das células saudáveis, os tecidos da galha-da-coroa, quando isolados da planta e cultivados *in vitro*, são capazes de crescer indefinidamente em meio de

cultura, sem o acréscimo de reguladores de crescimento (Braun, 1958; White & Braun, 1941). Essa particularidade despertou o interesse de cientistas que trabalham nos mais diferentes campos da pesquisa, pois, até então, pensava-se que a proliferação do tecido das galhas vegetais seria induzida somente por um estímulo externo, de natureza química ou mecânica. Os pesquisadores inicialmente associaram o desenvolvimento dessas galhas ao câncer animal, o que estimulou numerosas pesquisas para o entendimento das causas dessa doença (Fernandes & Martins, 1985; Hooykaas & Schilperoort, 1992). Esses estudos concluíram que o surgimento da galha é, na realidade, o resultado de um processo natural de transferência de genes da bactéria para a célula vegetal, que passam a sintetizar substâncias que estimulam a divisão celular no sítio de infecção.

Os conhecimentos gerados desde então levaram a um entendimento aprofundado do parasitismo *Agrobacterium*-planta, sendo considerado atualmente um sistema modelo para estudos das interações patógeno-hospedeiro, do transporte intercelular de macromoléculas e do direcionamento de proteínas para o núcleo. Nos últimos anos, o mecanismo de transferência de informação genética destas bactérias para as plantas tem propiciado o uso de *Agrobacterium* como vetor natural de transferência de genes e permitido a obtenção de um grande número de plantas geneticamente modificadas.

1.3.1. O gênero *Agrobacterium*

As agrobactérias (*Agrobacterium* spp.) são bactérias tipicamente do solo, do tipo bacilo Gram negativo e aeróbico, porém, alguns isolados conseguem sobreviver sob condições reduzidas de oxigênio quando se encontram nos tecidos vegetais. Suas células apresentam um tamanho de 0,6 a 1,0 x 1,5 a 30 µm, ocorrem isoladas ou aos pares e não formam esporos. As agrobactérias são móveis na rizosfera graças a dois flagelos polares e de dois a quatro filamentos laterais que permitem sua movimentação a 60 µm/segundo, aproximadamente. A temperatura de crescimento destas bactérias está na faixa de 25 a 28°C, com colônias geralmente convexas, circulares, lisas, apigmentadas ou de cor creme (Holt et al., 1994).

Agrobacterium tumefaciens é considerada a espécie-tipo do gênero *Agrobacterium* e foi descrita pela primeira vez por Smith e Townsend (1907), como

Bacillus tumefaciens. Posteriormente, o gênero *Agrobacterium* foi proposto por Conn e enquadrado na família Rhizobiaceae que agrupa, entre outros, os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium* e *Azorhizobium* que são bactérias fixadoras de nitrogênio (Holt et al., 1994; Kersters & De Ley, 1984). No gênero *Agrobacterium* (do grego *agros* = campo e *bakterion* = bastonete) estão descritas, além de *Agrobacterium tumefaciens*, que causa a doença conhecida como galha-da-coroa (*crown-gall*), outras quatro espécies, que diferem entre si pela sintomatologia e especificidade de hospedeiro: (1) *A. rhizogenes* (Riker) Conn. que provoca a síndrome da raiz em cabeleira (do inglês *hairy root*); (2) *A. rubi* (Hildebrand) Starr e Weiss que induz tumores em *Rubus* spp.; (3) *A. vitis* Ophel e Kerr que induz tumores em *Vitis* spp. e (4) *A. radiobacter* (Beijejerinck e van Delden) Conn., que são bactérias saprófitas, não-patogênicas.

1.3.2. Ocorrência da doença

As agrobactérias encontram-se distribuídas em todo mundo, em solos cultivados ou não e na rizosfera das plantas contaminadas onde são encontradas nas galhas, raízes ou no solo adjacente. As agrobactérias patogênicas ocorrem com maior frequência em regiões de clima frio. Esta preferência deve estar ligada à sensibilidade das mesmas a altas temperaturas e a sensibilidade térmica do processo de infecção (Lippincott et al., 1981).

Mais de 600 espécies vegetais são susceptíveis à infecção por *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, pertencendo, a maioria delas, à classe das Angiospermas dicotiledôneas (>60%) e Gymnospermas e, mais raramente, às Angiospermas monocotiledôneas (De Cleene & De Ley, 1976; Escobar & Dandekar, 2003). Na Europa, a doença é conhecida desde a antigüidade, quando foi primeiramente observada por Aristóteles e por seu estudante Teofrasto em videiras. Embora sua incidência seja baixa, a galha-da-coroa pode tomar proporções devastadoras em certas culturas, principalmente em países temperados, conduzindo à altas perdas da produção, em particular para algumas espécies ornamentais, frutíferas e florestais, que são propagadas vegetativamente.

No Brasil, os primeiros relatos sobre doenças causadas por espécies de *Agrobacterium* surgiram na década de 30 em pessegueiro e, posteriormente a galha-da-coroa foi relatada em várias outras espécies como castanheira, videira, ameixeira,

alface, chuchu, mandioca, entre outras (Barros et al., 2004; Beriam et al., 1996; Gomes et al., 1998). Em Minas Gerais, a galha da roseira surgiu primeiramente em algumas propriedades e, posteriormente, as práticas agronômicas adotadas para esta cultura, como a propagação vegetativa e enxertia, contribuíram para uma rápida disseminação do patógeno (Romeiro, 1995).

Além de plantas, *Agrobacterium* pode transformar, em condições de laboratório, uma vasta gama de organismos eucarióticos, incluindo fungos filamentosos, levedura, cogumelos cultivados, ouriço-do-mar e células humanas (Bulgakov et al., 2006; Lacroix et al., 2006b). Essas descobertas abriram a possibilidade de utilização de *Agrobacterium* como um vetor universal de transformação genética e pode ser explorado como uma nova ferramenta biotecnológica para a engenharia genética de todos os organismos eucarióticos.

1.3.3. Biologia do processo infeccioso

No início do processo de infecção de uma planta por *Agrobacterium*, ocorre o reconhecimento e a penetração da bactéria no tecido vegetal lesado em decorrência de ferimentos superficiais causados por insetos, geadas ou tratos culturais. As bactérias são atraídas em direção ao tecido vegetal por quimiotactismo positivo em relação às moléculas-sinal (compostos fenólicos, monossacarídeos, aminoácidos e prótons), que são exsudadas pelas células presentes no local da lesão, como uma resposta inespecífica de defesa (Tzfira & Citovsky, 2000). A liberação de íons H^+ (prótons) nos espaços intercelulares culmina com o abaixamento do pH no local do ferimento, condição que favorece o processo infeccioso (fig. 5).

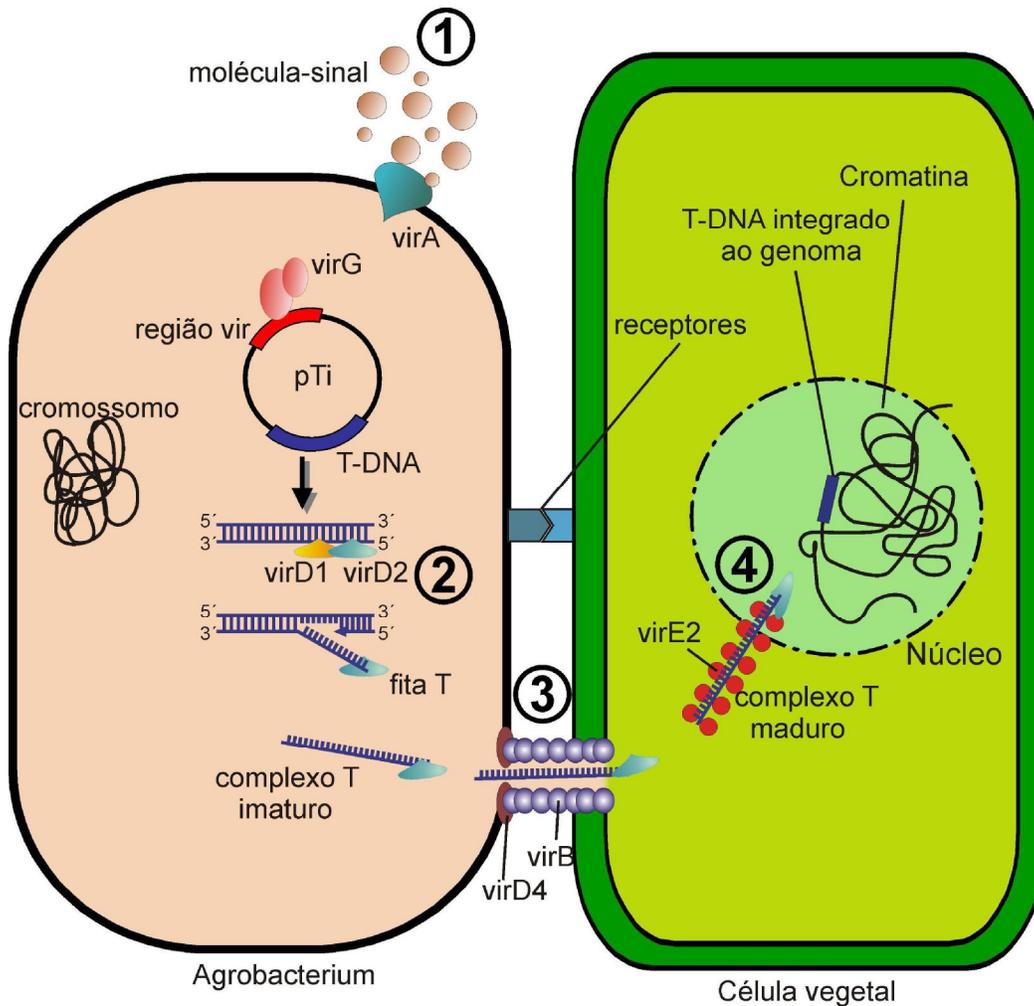


Fig. 5 – Esquema do processo infeccioso, mostrando todos os passos da transferência do DNA da bactéria para a planta hospedeira (Brasileiro & Aragão, 2009).

Uma vez em contato com as células vegetais, as bactérias sintetizam microfilamentos de celulose que estabilizam a ligação inicial, propiciando uma melhor fixação entre a bactéria e a célula hospedeira (Matthysse et al., 2000).

Os filamentos de celulose formados permitem a formação de agregados de células bacterianas em volta das células vegetais próximas ao tecido ferido. Acredita-se que existam receptores específicos para *Agrobacterium* na superfície da célula da planta, pois um número finito de agrobactérias é capaz de se ligar a estas células (Gelvin, 2000; Matthysse & McMahan, 1998). Recentemente, foi demonstrado que a infecção por *Agrobacterium* ativa a expressão de vários genes de defesa da planta durante os estágios iniciais do processo infeccioso (Dafny-Yelin et al., 2008). Essas proteínas de defesa são utilizadas pela bactéria para auxiliar no seu processo de

transformação genética, um exemplo de desvio do sistema biológico de defesa vegetal a seu favor. Quando não mais necessários, nos estágios mais avançados da infecção (formação do tumor), esses genes de defesa terão sua expressão reprimida pela bactéria.

Com a ligação bactéria-planta estabilizada, as moléculas-sinal sintetizadas pela planta ativam a expressão de genes de virulência que estão localizados em um plasmídio de alto peso molecular (200 a 800 kb), conhecido como plasmídio Ti (do inglês *tumor-inducing*). Em determinadas linhagens, o plasmídio Ti pode representar 50% do genoma (Allardet-Servent et al., 1993). Este plasmídio está presente somente em linhagens patogênicas de *Agrobacterium*, em um baixo número de cópias, e pode ser transferido via conjugação, para outras bactérias (van Larebeke et al., 1974; Watson et al., 1975).

Duas importantes regiões funcionais no plasmídio Ti envolvidas diretamente no processo de indução tumoral foram identificadas: a região-T, que corresponde ao segmento de DNA transferido para a célula vegetal e a região de virulência ou região *vir*, que contém genes que codificam enzimas responsáveis pela excisão e transferência da região-T (Stachel & Nester, 1986; van Larebeke et al., 1974).

O plasmídio Ti possui também outras três regiões funcionais que não estão diretamente envolvidas com o processo de indução tumoral. Estas regiões são conhecidas como: (1) região de transferência conjugativa (*loci tra* e *trb*), responsável pela transferência conjugativa do plasmídio Ti entre linhagens de *Agrobacterium* spp. ou para outras bactérias Gram-negativas; (2) região de absorção e catabolismo de opinas (região *opc*), envolvida na síntese de mais de 40 enzimas específicas responsáveis pela absorção das opinas para dentro da célula e posterior catabolismo das mesmas pela bactéria, e (3) região de replicação (região *rep*), que é necessária para a replicação e funções ligadas à manutenção e estabilidade do plasmídio Ti dentro da bactéria, controle do número de cópias durante a divisão celular e incompatibilidade entre bactérias. A maioria dessas regiões é conservada entre os diferentes tipos de plasmídio Ti, principalmente àquelas pertencentes à mesma classe de opina.

A região *vir*, que é ativada pelas moléculas-sinal durante a ligação *Agrobacterium*-hospedeiro, é formada por um conjunto de seis ou mais operons (conhecido como regulon *vir*), contendo 34 genes conhecidos. Os operons da região *vir* são co-regulados por duas proteínas da própria região *vir*, VirA e VirG, que são

induzidas, de maneira coordenada, em resposta às moléculas-sinal (estímulos químicos), isto é, após o reconhecimento extracelular, o sinal químico é convertido em uma resposta intracelular (McCullen & Binns, 2006).

No sistema conhecido como *two-component regulatory system* ao qual pertencem as duas proteínas, a proteína VirA funciona como uma proteína sensora, enquanto a proteína VirG age como um ativador transcricional. Liga-se a regiões promotoras dos operons *vir*, iniciando assim o processo de transferência da região-T (Hooykaas & Beijersbergen, 1994; Winans et al., 1994). Na presença das moléculas-sinal, a proteína VirA, uma histidina quinase presente na membrana da bactéria, vai se autofosforilar e, subsequentemente transfosforilar a proteína VirG, localizada no citoplasma bacteriano. Uma vez fosforilada, a proteína VirG passa de sua forma inativa para uma forma ativa, ativando a sua própria transcrição e a dos demais operons *vir* (Hooykaas & Beijersbergen, 1994; Winans et al., 1994). Esta proteína interage com a região *vir box*, uma seqüência específica e altamente conservada de 12 pb, presente na região promotora de cada operon *vir*, permitindo uma regulação e uma expressão coordenada desses genes (Jin et al., 1990). Uma vez que todos os genes da região *vir* forem ativados, inicia-se o processo de transferência da região-T para a célula vegetal.

A região-T é definida e delimitada por duas seqüências repetidas de 23 pb, conhecidas como extremidades direita e esquerda. O processo de reconhecimento, clivagem e transferência da região-T inicia-se graças à atividade do operon *virD* e *virC* que reconhecem e clivam dentro desses 23 pb que delimitam a região-T.

Ao que tudo indica, VirD1 reconhece as extremidades da região-T e converte o DNA para a forma relaxada, através de sua atividade topoisomerase, expondo as seqüências específicas de clivagem para a proteína VirD2, uma proteína com atividade endonucleásica, que também reconhece de forma específica os 23 pb de cada extremidade da região-T (Yanofsky et al., 1986).

Após a clivagem, a proteína VirD2 mantém-se covalentemente ligada à extremidade 5' da região-T (Herrera-Estrella et al., 1988; Pansegrau et al., 1993), enquanto uma segunda clivagem ocorre na extremidade 3' esquerda, levando a liberação da fita inferior da região-T. Enquanto isso, uma cópia da mesma é sintetizada a partir da extremidade direita na direção 5' → 3', utilizando a fita de DNA superior da região-T como molde, mantendo assim a fita superior em forma duplex. A

síntese da fita inferior continua até atingir o sítio de clivagem da extremidade 3' esquerda. A molécula de DNA linear, fita simples, gerada a partir do deslocamento da fita inferior da região-T foi denominada de fita-T. Desta forma, o deslocamento da fita-T ocorre na direção 5' → 3' da inferior da região-T, iniciando na extremidade direita e terminando na extremidade esquerda, indicando a existência de polaridade no processamento da fita-T (Zambryski et al., 1989).

As proteínas VirC1 e VirC2, codificadas pelo operon VirC, ligam-se a uma seqüência conservada localizada próxima à extremidade direita, denominada *overdrive* (ou região *ode*). Acredita-se que esta ligação favoreça a correta orientação do complexo protéico VirD1/VirD2 para o reconhecimento dos sítios de clivagem, aumentando desta forma a eficiência no processo de clivagem e transferência da fita-T (Toro et al., 1989).

Após sua formação, a fita-T deixa a célula bacteriana, penetra na célula vegetal, atravessa a membrana interna bacteriana, seu periplasma e a membrana externa bacteriana e se integra ao DNA nuclear da planta. Supõe-se que a fita-T é transportada da bactéria para a célula vegetal, como um complexo nucleoprotéico, conhecido como complexo-T imaturo e formado pela fita-T protegida na extremidade 5' pela VirD2 (Citovsky et al., 1989).

O transporte do complexo-T da agrobactéria para o citoplasma da célula vegetal indica a necessidade de se formar uma estrutura funcionalmente similar a um pilus, ou poro celular, e ocorreria através da interação das proteínas do operon *virB* com o complexo-T (Ward et al., 1988; Zupan et al., 1998). O operon *virB* contém 11 genes, sendo que a maioria das proteínas VirB está localizada nas membranas interna e externa da bactéria e está diretamente ligada à formação do canal VirB ou ao fornecimento de energia (atividade ATPase) necessária para a formação do canal VirB e para o processo de exportação das moléculas (Cascales & Christie, 2004; McCullen & Binns, 2006).

A proteína VirD4, uma proteína ancorada na membrana interna da bactéria, seria o produto que intermediaria a ligação do complexo-T ao canal VirB, auxiliando na translocação entre a bactéria e a célula hospedeira. O complexo protéico formado por VirB e VirD4, associado às membranas da bactéria, vai permitir a translocação do complexo-T imaturo para o citoplasma da célula vegetal através de um sistema secretório do tipo IV (T4SS) (Christie, 2004). As proteínas VirB2, VirB5 e,

provavelmente, VirB7 formam o pilus-T, que é um filamento extracelular que intermedeia a ligação do canal VirB/VirD4 à parede (ou membrana) da célula vegetal (McCullen & Binns, 2006).

Sabe-se que, uma vez no citoplasma, a maturação do complexo-T é finalizada por sua associação com proteínas efetoras exportadas pela bactéria, em particular com VirE2 (Gelvin, 2003). A proteína VirE2 é uma *Single Strand Binding Protein* e liga-se covalentemente e de maneira não-específica à fita-T (Christie et al., 1988; Gietl et al., 1987). Por ocorrer com certa abundância e apresentar alta afinidade por DNA fita simples é sugerido que a ligação da proteína VirE2 à fita inferior do T-DNA, além de evitar o dobramento da mesma, poderia protegê-la da degradação de nucleases durante seu transporte através dos poros nucleares (Citovsky et al., 1989).

Uma vez superada a membrana da agrobactéria, a segunda etapa da transferência do complexo-T é atravessar os espaços intercelulares, parede celular e a membrana plasmática vegetal até o nucleoplasma. Provavelmente existam receptores na membrana celular vegetal que possam auxiliar na entrada do complexo-T no citoplasma da célula vegetal, que é feito de forma ativa (Citovsky & Zambryski, 1993; Howard et al., 1992). Esta ativação é mediada por uma seqüência-sinal de localização nuclear, presente na própria molécula a ser transportada ou em moléculas associadas a ela. Como a fita-T não possui sinais de direcionamento, sua importação para o núcleo da célula vegetal é provavelmente mediada pelas proteínas da agrobactéria que a acompanham, as proteínas VirD2 e VirE2 (Ziemenowicz et al., 2001).

Dentro do citoplasma, o complexo-T percorre um caminho para atingir o núcleo da célula hospedeira. A densa estrutura do citoplasma, composta por microtúbulos encruzilhados, actina e rede de filamentos intermediários, impede a difusão Brownian de macromoléculas, indicando um mecanismo ativo de transporte intracelular do complexo-T (Tzfira, 2006). O grande tamanho do complexo-T (estimado em 50 kD) e sua estrutura solenoidal reforçam a hipótese do envolvimento de proteínas motoras associadas aos microtúbulos durante seu transporte intra-citoplasmático (Abu-Arish et al., 2004; Suh et al., 2003).

A última etapa no processo de importação e transferência da fita-T culmina com sua integração no genoma nuclear da célula hospedeira. Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos nas etapas de passagem pela membrana nuclear, transporte intranuclear e de direcionamento para a cromatina ainda são poucos

conhecidos. O diâmetro do complexo-T (15 nm) excede o tamanho limite do complexo do poro nuclear (*Nuclear Pore Complex* – NPC) de 9 nm, indicando que o complexo-T entra no núcleo por um mecanismo ativo, mediado pela maquinaria de importação nuclear da célula hospedeira envolvendo também as proteínas VirD2, VirE2 e VirE3 (Citovsky et al., 2006).

Enquanto muitas proteínas de *Agrobacterium* envolvidas no processo de transferência do complexo-T já foram caracterizadas, pouco é conhecido sobre os fatores celulares vegetais que participam deste processo. Proteínas vegetais pertencentes às famílias das carioferinas, das cicloferinas, as importinas e as proteínas VIP (*VirE-interacting protein*) podem atuar como mediadoras do transporte e protetoras do transporte do complexo-T (Gelvin, 2003).

A fita-T não codifica nenhuma proteína requerida para sua integração, diferentemente de outros elementos móveis como transposons e retrovírus. Assim, a integração da fita-T no genoma da planta pode ser mediada pelas proteínas VirD2 e VirE2, em combinação com vários fatores e mecanismos moleculares da própria célula hospedeira (Tzfira & Citovsky, 2000; Tzfira et al., 2004). Os fatores da planta são necessários para a complementação da molécula de fita-T para DNA dupla fita (dsDNA), para a produção de quebras no genoma do hospedeiro e para a ligação da molécula do T-DNA nessas quebras.

Estudos realizados em plantas transgênicas de *Arabidopsis* indicam que os sítios de integração da fita-T ocorrem geralmente dentro das regiões transcricionalmente ativas do genoma e de descondensação da cromatina, não havendo, entretanto, nessas regiões, uma preferência por cromossomo ou sequência (Lacroix et al., 2006a). A integração da fita-T geralmente ocorre em quebras da fita dupla (*double strand breaks* – DSBs) no DNA do genoma eucariota por dois caminhos: via recombinação ilegítima ou não-homóloga (NHR) ou via recombinação homóloga (HR) que necessita homologia entre o DNA integrante e o DNA-alvo. No sistema NHR, o DNA integrante está geralmente em forma de fita dupla e sua integração envolve enzimas de junção de pontas não-homólogas (*nonhomologous end-joining* – NHEJ), enquanto que o sistema HR necessita de uma DNA integrante que esteja, pelo menos parcialmente, em forma de fita simples e, geralmente, envolve um mecanismo de reparo de lacuna de fita simples (*single-strand gap repair* – SSGR) (Lacroix et al., 2006a).

Uma vez transferida e integrada no genoma da célula vegetal, a fita-T passa a ser denominada T-DNA ou DNA transferido. Essa integração é estável e o T-DNA é transmitido para as células-filha após a divisão mitótica e durante a meiose e a singamia. Os genes presentes no T-DNA, embora apresentem origem procariota, possuem seqüências regulatórias que são reconhecidas pelo sistema eucarioto vegetal e que permite sua expressão após a integração. Um grupo destes genes, também conhecidos como oncogenes, codifica para a síntese de enzimas envolvidas na via de biosíntese de hormônios vegetais (auxinas e citocininas), e também na regulação do balanço auxina/citocinina. A expressão destes genes causa um desequilíbrio hormonal nas células transformadas resultando na proliferação desordenada das mesmas, levando assim, à formação de tumores nos sítios infectados da planta (Andrade et al., 2003; Zupan et al., 2000). Desta forma, a produção endógena de hormônios pelas células transformadas explica porque esses tumores, uma vez isolados da planta, são capazes de crescer indefinidamente em meio de cultura, mesmo na ausência de reguladores de crescimento (Hooykaas & Schilperoort, 1992).

Outros genes presentes na região-T codificam enzimas envolvidas na via de biosíntese de opinas. As opinas produzidas nas células transformadas (tumor) são secretadas nas regiões intercelulares do tumor e metabolizadas especificamente pela linhagem de *Agrobacterium* indutora do tumor (Petit et al., 1983). Porém, como somente a linhagem indutora é capaz de catabolizar essa opina como fonte de energia, carbono e nitrogênio, as células transformadas pelo T-DNA continuam dividindo-se incontroladamente devido à produção de citocininas e auxinas e quanto mais elas se dividem, mais elas produzem opinas que vão sendo utilizadas pela bactéria. Criando desta forma um nicho favorável para o seu desenvolvimento (Dessaux et al., 1993).

O sistema de infecção de plantas pelas agrobactérias representa, assim, uma situação única na natureza: a transferência de um elemento genético, o T-DNA, de um organismo procariota para um organismo eucariota superior, com sua subsequente integração e expressão no genoma hospedeiro. A demonstração de que a causa da proliferação celular da galha é a transferência de informação genética da bactéria para a célula vegetal (Chilton et al., 1977) foi o ponto de partida para pesquisas intensivas visando a utilização desse sistema natural de transferência de genes para a obtenção de plantas transgênicas (Zambryski, 1992).

1.3.4. *Agrobacterium* como vetor de transformação de plantas

O conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos no processo de infecção de uma planta hospedeira por *Agrobacterium* permitiu a utilização desta bactéria como vetor natural de transformação genética de plantas. O ponto de partida para pesquisas intensivas nesta área foi a demonstração de que nenhum gene presente na região-T, exceto os 23 pb de suas extremidades, é necessário ao processo de transferência e integração da fita-T no genoma da planta infectada (Hoekema et al., 1983; Zambryski et al., 1983). Assim, os genes presentes na região-T podem ser eliminados e substituídos por genes de interesse, com sinais para expressão e regulação em plantas, sem que isto afete o processo de transferência.

Além das extremidades da região-T, a região *vir* do plasmídio Ti é fundamental para o processo de transferência. Entretanto, a remoção dos oncogenes do T-DNA se faz necessária, pois a expressão destes genes interfere no balanço hormonal de auxinas e citocininas nas células transformadas induzindo sua multiplicação descontrolada. Por este motivo, as células transformadas pelo T-DNA selvagem não são capazes de regenerar plantas normais. Uma linhagem de *Agrobacterium*, cujo oncogenes foram removidos do seu plasmídio Ti, é denominada “linhagem desarmada”, pois não é mais capaz de induzir a formação de galhas em plantas.

Conclui-se então, que o desenvolvimento de vetores baseados no sistema *Agrobacterium* requer que as extremidades, direita e esquerda, da região-T sejam conservadas, mantendo também intacta a região *vir*, e que os oncogenes sejam removidos. Desta maneira, qualquer outra nova seqüência de DNA, inserida entre as extremidades da região-T, pode ser transferida e integrada no genoma vegetal, sem afetar a regeneração da célula transformada em uma planta.

Após a obtenção de uma linhagem desarmada de *Agrobacterium*, a próxima etapa é a clonagem na região-T do gene a ser transferido para a planta. Entretanto, o grande tamanho do plasmídio Ti (aproximadamente 200 kb) dificulta sua manipulação. Assim, o sistema binário foi desenvolvido, onde os genes presentes na região *vir* do plasmídio Ti funcionam *in trans* para processar e transferir a região-T (Hoekema et al., 1983). A região-T, contendo os genes de interesse entre suas extremidades, deverá estar clonada em pequenos plasmídios (de 10 a 30 kb), denominados vetores binários. Estes vetores são capazes de se replicar

autonomamente tanto em *Escherichia coli* como em *Agrobacterium* (Brasileiro & Carneiro, 1998).

1.3.5. Sistema de transformação

A partir do desenvolvimento de vetores binários e sua introdução em linhagens desarmadas de *Agrobacterium*, foi possível a transferência de genes exógenos para plantas, utilizando esta bactéria como vetor natural de transformação. Os primeiros estudos de transformação genética de plantas envolveram a inoculação de tecidos de fumo (*Nicotiana tabacum*) com linhagens engenheiradas de *Agrobacterium* (Herrera-Estrella et al., 1983; Zambryski et al., 1983). A partir de então, o sistema de transformação via *Agrobacterium* vem sendo utilizado para transformar um grande número de plantas. A alta eficiência de transformação, o baixo custo operacional, assim como a simplicidade dos protocolos de transformação e de seleção são as principais razões para a universalidade do uso do sistema *Agrobacterium* (Brasileiro & Lacorte, 2000; Tzfira & Citovsky, 2006).

Atualmente diferentes características de interesse sócio-econômico já foram introduzidas em diferentes espécies vegetais por transformação genética, principalmente através do sistema *Agrobacterium* e do método biobalístico (Brasileiro, 2001; Brasileiro & Cançado, 2000; Guimarães et al., 2003). Essas características visam principalmente o melhoramento do desempenho em campo das plantas cultivadas, através da resistência a estresses bióticos e abióticos. Características relacionadas ao desenvolvimento da planta e à qualidade do produto também podem ser modificadas em plantas transgênicas. A tendência é que cada vez um maior número de características possa ser manipulado via engenharia genética, aumentando a gama de produtos a serem disponibilizados para o agricultor e o consumidor. Em um futuro breve, as plantas transgênicas desempenharão também o papel de biofábricas, desenvolvidas para a produção de produtos de interesse para as indústrias de medicamentos, de alimentos e de rações.

Além de todas as implicações para a agricultura e outros setores da economia, as plantas transgênicas constituem também um excelente sistema para estudos básicos em diferentes campos da biologia, como fisiologia, genética, botânica, biologia molecular e celular.

1.4. Método de transformação genética mediado pelo processo biobalístico

O processo biobalístico (do inglês *biolistic*), foi desenvolvido inicialmente por J. Sanford, N. Allen, T. Klein e E. Wolf da Cornell University (USA) (Sanford, 2000; Sanford et al., 1987; Sanford et al., 1993) e é também conhecido por aceleração ou bombardeamento de partículas. Foi desenvolvido como uma alternativa para a introdução direta de material genético no genoma nuclear de plantas superiores. Desde então, sua universalidade de aplicações tem sido avaliada, demonstrando ser um processo efetivo e simples para a introdução e expressão de genes em bactérias, protozoários, fungos, algas, insetos, tecidos vegetais e animais e organelas isoladas, como cloroplastos e mitocôndria (Aragão et al., 1992; Aragão et al., 1993; Bailey et al., 1993; Barreto et al., 1997; Bogo et al., 1996; Boynton et al., 1988; Daniell et al., 1991; Harrier & Millam, 2001; Johnston et al., 1988; Klein & Fitzpatrick-Mcelligott, 1993; Rech et al., 1996; Sanford, 2000; Sanford et al., 1993; Vainstein et al., 1994).

O método consiste na aceleração de partículas com 0,2 a 3 µm de diâmetro, que atravessam de forma não letal a parede celular e a membrana plasmática carreando substâncias adsorvidas para o interior da célula (Klein et al., 1987; Sanford, 1988). O processo biobalístico tem sido mais empregado para introduzir moléculas de DNA, no citoplasma, núcleo e cloroplasto, embora moléculas de RNA e proteínas possam ser carregadas. Várias modificações têm sido realizadas, aumentando a eficiência e possibilitando a obtenção de plantas transgênicas de diversas espécies, que até então não haviam sido transformadas com o uso de outras metodologias (Aragão et al., 1996; Aragão et al., 2000; Birch & Franks, 1991; Christou, 1995; Luthra et al., 1997; Rech et al., 2008).

Nos casos em que os sistemas de transformação mediados por *Agrobacterium* não podem ser utilizados, devido aos sistemas de cultura de tecidos existentes, a técnica de biobalística deve ser empregada, uma vez que pode transformar diferentes tipos de tecidos e células. Além disso, é uma técnica rápida, que envolve menos manipulação das células em cultura, quando comparados com outros métodos. Vários tipos de explantes e células podem ser utilizados para a transformação por biobalística, tais como folhas, calos e caule.

A biobalística pode também ser utilizada juntamente com a inoculação com *Agrobacterium*, em tecidos bombardeados cujos microferimentos ampliam a área de

infecção, aumentando a eficiência de transformação (Bidney et al., 1992; Brasileiro et al., 1996). Neste caso, o tecido pode ser bombardeado com partículas nuas e depois submetido a uma co-cultura com *Agrobacterium*, ou as bactérias podem ser previamente misturadas às partículas que são então bombardeadas.

Outra aplicação da técnica de biobalística é no estudo da expressão gênica transiente. Uma seqüência de DNA introduzida em uma célula pode vir a ser transcrita, mesmo sem ser integrada ao genoma. A maior expressão gênica transiente é observada de 24 a 72 horas após a transferência, não sendo praticamente detectada após uma semana. A análise da expressão transiente foi e ainda é bastante utilizada para otimização dos parâmetros envolvidos no processo de bombardeamento. No entanto, tem sido mais utilizada em estudos de regulação gênica e para a avaliação de promotores (seqüências regulatórias). Nestes casos, genes quiméricos são construídos, como as seqüências regulatórias ligadas a genes marcadores (principalmente *gus* e *gfp*), e as construções são utilizadas para o bombardeamento de tipos celulares específicos. Para esse tipo de estudo a biobalística apresenta vantagens sobre as técnicas que utilizam protoplastos (eletroporação ou transformação mediada por PEG), uma vez que os tipos celulares são transformados sem necessidade de manipulações mais sofisticadas *in vitro*. A expressão gênica pode ser analisada em células intactas e tecidos organizados, o que é essencial para o estudo de promotores tecido-específicos e a técnica é simples e mais rápida.

1.4.1. Os sistemas

Foram desenvolvidos e construídos diferentes sistemas capazes de acelerar micropartículas cobertas com ácidos nucléicos, a velocidades superiores a 1.500 km/h. Todos estes sistemas baseiam-se na geração de uma onda de choque com energia suficiente para deslocar uma membrana carreadora contendo as micropartículas cobertas com DNA (Rech et al., 1996; Rech et al., 2008) (fig. 6 - A e B), outros sistemas não exigem a utilização de uma membrana carreadora (Aragão et al., 1995; Finer et al., 1992; Sautter et al., 1991; Takeuchi et al., 1992; Vain et al., 1993) (fig. 6 - C e D).

A onda de choque pode ser gerada através de uma explosão química de pólvora seca (Sanford et al., 1987), por uma descarga de hélio a alta pressão (Aragão et al., 1996; Aragão et al., 2000; Sanford et al., 1991), por uma descarga de ar

comprimido (Morikawa et al., 1989), pela vaporização de uma gota de água através da descarga elétrica com alta voltagem e baixa capacitância (Christou, 1993; McCabe & Christou, 1993; McCabe et al., 1988) ou baixa voltagem a alta capacitância (Aragão et al., 1992; Aragão et al., 1993; Rech et al., 1991). Os sistemas que utilizam alta pressão de gás hélio e descarga elétrica têm demonstrado possuírem um amplo espectro de utilização e serem mais eficientes para a obtenção de altas frequências de transformação.

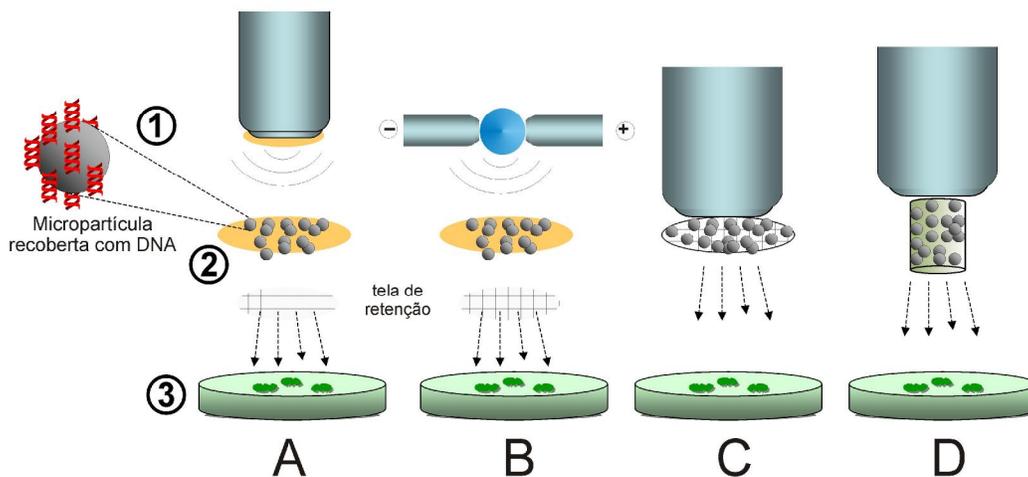


Fig. 6 – Esquema básico dos principais sistemas biobalísticos para transformação genética de plantas. Nestes sistemas temos em comum que (1) as micropartículas (em geral de ouro ou tungstênio) são recobertas com o DNA contendo os genes a serem inseridos. As partículas são aceleradas a altas velocidades (2) e penetram nas células vegetais de forma não destrutiva (3). Os sistemas diferem basicamente na geração de energia para movimentar as partículas e no suporte em que elas são depositadas que pode ser (A) gás hélio com alta pressão com as partículas depositadas sobre um suporte plástico (membrana carreadora de kapton ou mylar), (B) descarga elétrica para vaporização de uma gota de água com as partículas depositadas sobre um suporte plástico, (C) gás hélio com baixa pressão e as partículas presas por capilaridade (em suspensão em um meio líquido) sobre uma tela de metal (PIG), (D) gás hélio com baixa pressão e as partículas secas depositadas no interior de um tubo fino de plástico. Nos sistemas A e B a membrana carreadora fica retida em uma tela, pela qual as partículas atravessam em direção às células-alvo (Aragão & Brasileiro, 2009).

Os equipamentos desenvolvidos originalmente possuem uma câmara selada com vácuo parcial, o que limita muito sua utilização em amostras grandes ou pouco resistentes a danos provocados pela exposição ao vácuo. Assim, foram desenvolvidos equipamentos mais sofisticados que não requerem câmaras de vácuo e podem ser utilizados *in vivo*, em amostras grandes e em condições de campo (Rech et al., 1996; Rinberg et al., 2005; Roizenblatt et al., 2006; Shefi et al., 2006). Equipamentos manuais (*hand-held gene guns*) têm sido utilizados com sucesso para transfectar diversos tipos celulares e organismos, como bactérias e levedura, e especialmente

para introduzir genes em plantas e animais no campo ou casa de vegetação, e para inoculação de vírus em plantas (Burkhalter & Bernardo, 1989; Grutzendler et al., 2003; O'Brien & Lummis, 2004; Rech et al., 1996; Sambrook & Russell, 2006).

1.4.2. As micropartículas

Micropartículas de distintas naturezas podem ser empregadas como carreadoras de DNA, desde que não degradem ou causem quebras em ácidos nucléicos, tenham alta densidade, tamanho e formato adequados. No início do desenvolvimento da tecnologia biobalística foram testadas micropartículas de vários materiais, tais como metais com alta densidade como platina e irídio, além de vidro, sílica e outras, resultando em baixa frequência de transformação genética (Sanford et al., 1993). Recentemente a prata tem sido utilizada em uma técnica chamada de diolística (Roizenblatt et al., 2006). Atualmente, os microprojéteis mais empregados como microcarreadores têm sido partículas de tungstênio ou ouro. As de tungstênio têm formato irregular e tamanho entre 0,2 e 3,0 μm , são potencialmente tóxicas para alguns tipos de células (Armaleo et al., 1990; Russell et al., 1992) e sujeitas à oxidação rápida com conseqüente efeito negativo sobre o DNA, seu custo é bastante reduzido. As de ouro são biologicamente inertes, de formato esférico e diâmetro de 1,0 a 7,5 μm , mais uniforme que as de tungstênio, têm um custo mais elevado. Experimentos com células animais têm demonstrado que partículas de ouro maiores são mais adequadas (Cheng & Joho, 1994; Rech et al., 1996). Células desidratadas de *Escherichia coli* e *Agrobacterium tumefaciens*, funcionando como uma forma natural de encapsulação de DNA, foram utilizadas com sucesso no lugar das micropartículas cobertas de DNA, para a transferência de genes em suspensão celular de fumo e milho (Rasmussen et al., 1994).

O tipo apropriado de micropartículas varia em função do tamanho das células a serem transformadas. Como uma regra geral, as micropartículas devem possuir um tamanho aproximado de 1/10 do tamanho da célula-alvo. Portanto, para células de microrganismos (células bacterianas e esporos fúngicos), micropartículas com diâmetro em torno de 0,2 μm (M5, Sylvania) são mais apropriadas. Para células de plantas, partículas com diâmetro em torno de 0,2 a 1,5 μm (M10, Sylvania) são as mais indicadas. Mazus et al. (2000) mostraram evidências de que partículas de tungstênio podem interagir com plasmídios e gerar quebras na molécula de dsDNA

gerando moléculas lineares. Partículas de ouro de 1 a 3 μm , que não apresentam toxicidade são recomendadas para células animais, que apresentam maior tamanho e também podem ser utilizadas para determinados tipos de células vegetais (Aragão et al., 1993).

Diversas características relativas às micropartículas influem na eficiência de transformação, pela interação com o DNA ou com a célula. Dessa forma, estudos visando avaliar o efeito de diferentes tamanhos, formatos, homogeneidade e tipo de material das partículas podem contribuir para a otimização do processo de biobalística. Recentemente micropartículas com formatos de rosca, em forma de tubos e com cavidades têm sido desenvolvidas e podem ser bastante úteis.

Diversos protocolos de precipitação de DNA sobre as partículas têm sido descritos (Sanford et al., 1993). O método mais utilizado, desenvolvido inicialmente por Klein et al. (1987), emprega cloreto de cálcio e espermidina. As partículas com o DNA adsorvido são lavadas e ressuspensas em etanol absoluto, e distribuídas sobre a membrana carreadora. O etanol evapora rapidamente e as partículas com o DNA permanecem secas sobre o macrocarreador. Como o etanol absoluto e a espermidina são muito higroscópicos, as partículas com o DNA tendem a absorver umidade, formando agregados. Estes agregados de micropartículas danificam as células quando as atingem, resultando em baixa frequência de transformação. O experimento de Smith et al. (1992) mostrou claramente que a umidade relativa do ar no momento da deposição das micropartículas na membrana é um fator muito importante. Esse fator é tanto mais importante quanto menor for o diâmetro das partículas utilizadas e menor for a célula-alvo. DNA em excesso ou preparações impuras também causam a aglomeração das partículas (Aragão et al., 1993; Klein et al., 1988). Variações nas metodologias de precipitação de DNA sobre as micropartículas, bem como protocolos alternativos, podem diminuir os problemas associados aos métodos disponíveis, principalmente pela redução da formação de agregados, e na reprodutibilidade dos experimentos.

1.4.3. Parâmetros físicos importantes

As micropartículas são rapidamente desaceleradas em consequência do atrito com o ar, devido a sua massa reduzida. Para que haja uma minimização desse efeito nos principais sistemas de biobalística descritos (com exceção dos sistemas *hand-*

held), a quantidade de ar na câmara deve ser reduzida com auxílio de uma bomba de vácuo. O vácuo deve ser mantido a uma pressão em torno de 710 mm de Hg. Vácuo acima desse nível não conduz a uma melhor frequência de expressão do gene introduzido, provavelmente por causa da redução do vapor residual de água da própria amostra biológica. Para certas aplicações o vácuo deve ser reduzido, como no caso do bombardeamento de células animais em cultura e animais *in vivo* (Johnston et al., 1991). Em alguns casos, gás hélio é injetado na câmara de vácuo, de forma que substitua o ar residual. A adição do gás hélio, de baixo peso molecular e baixa densidade, aumenta a eficiência de transformação, provavelmente pela redução do atrito e conseqüente diminuição da desaceleração. Esse fato tem sido observado principalmente em microrganismos, onde se utilizam micropartículas menores (0,2 μm). Em bactérias, o aumento da eficiência pode chegar a 6 vezes e, em leveduras, a até 4 vezes (Sanford et al., 1993; Smith et al., 1992). No caso de plantas, onde se empregam partículas até cinco vezes maiores (1,0 μm), a injeção de hélio na câmara de bombardeamento não apresenta efeito significativo na eficiência de transformação (Sanford et al., 1993).

Outro parâmetro muito importante que deve ser otimizado para cada tipo celular são as distâncias entre as células-alvo e o ponto de origem das partículas ou da fonte geradora de energia para movê-las. No caso dos equipamentos de gás hélio a alta pressão, deve-se otimizar a distância entre a membrana de ruptura e a membrana carreadora de partículas (macrocarreador), a distância entre a membrana carreadora até a tela de retenção e desta até o tecido-alvo. Isto é importante devido ao fato de ondas de choque e acústica se propagarem pelo interior do equipamento no momento do disparo. Estas, necessárias para a aceleração do macrocarreador, podem causar danos às células-alvo (Russell et al., 1992). A intensidade e forma dessas ondas variam conforme as distâncias entre a fonte geradora da onda de choque (membrana de ruptura) e o macrocarreador, entre o macrocarreador e a tela de retenção, e desta até as células-alvo. Esses parâmetros também influem na velocidade final das micropartículas, sua capacidade de penetração e, conseqüentemente, na eficiência da transferência e expressão gênica (Kemper et al., 1995; Kikkert, 1993; Sanford et al., 1993).

Outro parâmetro importante é a pressão do gás hélio. Na maioria dos casos essa pressão é de 1.200 psi, entretanto, deve ser ajustada para cada tecido a ser bombardeado. Uma pressão muito alta pode acarretar dano aos tecidos enquanto

pressões mais baixas podem levar a uma baixa penetração das partículas, que podem não atingir os tipos celulares desejados em cada tecido-alvo.

1.4.4. Os vetores

O processo biobalístico é bastante influenciado por algumas das características dos vetores empregados, com efeitos marcantes sobre a introdução e integração dos genes exógenos nas células. O DNA plasmidial pode ser precipitado sobre micropartículas, acelerado e introduzido, tanto na forma circular quanto linear. O tamanho do vetor aparentemente não é um fator limitante (Lacorte et al., 1997; Sanford et al., 1993). Entretanto, há uma limitação da massa de DNA que poderá ser adsorvida às micropartículas. Grandes quantidades de DNA tendem a gerar aglomerados de micropartículas (Aragão et al., 1993; Lacorte et al., 1997). Teoricamente, 400 a 800 cópias de um plasmídeo de 10 kb são adsorvidas em uma micropartículas com 1,2 μm de diâmetro médio. Estes aglomerados causam danos às células devido às suas dimensões e massa. O número de cópias dos genes introduzidos é um fator importante para sua expressão transiente (Lacorte et al., 1997), no entanto, a influência sobre a integração ainda necessita ser investigada. Finalmente, como o tamanho do vetor (DNA plasmidial) é diretamente proporcional à sua massa e inversamente proporcional ao número de cópias possível de ser precipitado sobre as micropartículas, deve-se então dar preferência a vetores pequenos, entre 2-15 kb. A frequência de transformação estável, isto é, a obtenção de plantas transformadas, parece ser um pouco reduzida quando da utilização de vetores lineares (Bonfim et al., 2007; Vianna et al., 2004). Entretanto, devido a questões de biossegurança pode-se optar pela utilização de vetores lineares. Esses vetores são produzidos após a remoção (pela digestão com enzimas apropriadas) de seqüências gênicas que conferem resistência a antibióticos, presentes nos vetores circulares. É recomendável que o vetor circular possua um sítio para uma enzima que permita a digestão e eliminação de genes desnecessários para o processo de transformação genética. É possível a co-transformação, com a utilização de dois ou três vetores simultaneamente. Isto permitirá a segregação dos transgenes nas gerações seguintes. As frequências de co-transformação para genes presentes em um único vetor são de cerca de 100%

enquanto que para genes presentes em vetores distintos é de cerca de 50% (Aragão et al., 1996).

Os plasmídios utilizados no processo biobalístico não necessitam de nenhuma seqüência moduladora da sua integração no genoma vegetal, ao contrário dos vetores de *Agrobacterium*. Em levedura (Orr-Weaver et al., 1981) e algumas espécies de *Synechococcus* (Williams & Szalay, 1983), a integração do DNA exógeno ocorre devido a seqüências homólogas ao DNA cromossomal (recombinação homóloga). A integração do DNA exógeno, introduzido por métodos diretos no genoma de células vegetais parece ser diferente. Aparentemente sua integração independe de presença de seqüências homólogas no genoma vegetal (Iida et al., 1990; Morikawa et al., 1994). Entretanto, o mecanismo de integração ainda necessita ser mais bem compreendido.

1.4.5. Transformação de meristemas apicais

Com o surgimento dos processos biobalísticos abriu-se a possibilidade de transformação direta *in situ* das células do meristema apical. Desta forma vislumbrou-se a possibilidade de obtenção de plantas transgênicas através da transformação de células-mãe do meristema apical. No final dos anos 80, a soja, a primeira planta transgênica pelo processo biobalístico foi obtida a partir de células transformadas do meristema apical (McCabe et al., 1988).

O meristema apical vem sendo alvo de um grande número de estudos. A maioria destes tem investigado a função das diferentes células que o compõem. A região apical é constituída do meristema apical propriamente dito, dos primórdios dos órgãos laterais e da região de maturação, onde a diferenciação se torna aparente (Cutter, 1965). A região apical de meristemas apicais de feijão é composta basicamente pelo meristema apical, primórdios foliares e folhas primárias.

A transformação destas células meristemáticas através do processo biobalístico tem-se mostrado bastante eficiente. Em cultivares de algodão, a eficiência de transformação ficou entre 0,027 e 0,71%, com relação ao número de plantas transgênicas obtidas e o número de embriões bombardeados (Aragão et al., 2005; McCabe & Martinell, 1993). A freqüência de transformação, no entanto, pode ser significativamente aumentada através da indução de organogênese na região do meristema apical. Em feijoeiro, a freqüência de transformação foi de 0,9% com a

utilização de vetores circulares (Aragão et al., 1996) e entre 0,2 e 0,8 com o uso de vetores lineares (Bonfim et al., 2007; Vianna et al., 2004).

Com relação aos fatores biológicos que influenciam o processo, vão desde aqueles relacionados à integração do DNA exógeno no genoma vegetal até a neoformação de brotos a partir das células meristemáticas apicais. Além da fisiologia das células, a morfologia da região apical e sua resposta a citocininas são fatores muito importantes. Algumas variedades de feijão apresentam os meristemas apicais encobertos total ou parcialmente pelos primórdios foliares, o que dificulta sua transformação, sendo necessário encontrar variedades cujo domo apical seja completamente exposto ao bombardeamento (Aragão & Rech, 1997; Bonfim et al., 2007). Em caupi, não foi possível encontrar variedades com o domo apical exposto. No entanto foi possível realizar a transformação pelo bombardeamento de células meristemáticas apicais após a remoção das folhas primárias e primórdios foliares (Ivo et al., 2008). Estes pontos são extremamente importantes para o desenvolvimento de uma metodologia de transformação que seja independente da cultivar.

1.4.6. Transformação cloroplasmática

A transformação cloroplasmática, inserção do transgene no genoma do cloroplasto, em alguns casos tem algumas vantagens em relação à transformação do genoma nuclear. As principais vantagens apontadas são: altos níveis de expressão heteróloga (De Cosa et al., 2001; Tregoning et al., 2003), contenção do transgene devido ao fato de que para a maioria das plantas superiores o genoma cloroplasmático tem herança materna (Birky, 2001; De Cosa et al., 2001; Ruf et al., 2001; Svab & Maliga, 1993), ausência do efeito de posição devido ao fato de que é possível direcionar a integração para uma região específica (Staub & Maliga, 1992), e diminuição dos problemas de silenciamento gênico quando múltiplos genes devem ser inseridos, devido ao fato de que a maquinaria traducional dos cloroplastos tem a capacidade de traduzir transcritos policistrônicos, onde há um promotor para um ou mais genes (De Cosa et al., 2001; Kanamoto et al., 2006; Staub & Maliga, 1995). Com o advento da biobalística foi possível inicialmente transformar uma alga verde (*Chlamydomonas*) (Boynton et al., 1988). Entretanto, apesar de todas estas vantagens, quase uma década foi necessária até que essa tecnologia tenha sido desenvolvida para plantas superiores (Svab et al., 1990; Ye et al., 1990). Apesar de ser possível

transformar cloroplastos com outras metodologias (eletroporação e mediada por PEG), o processo de biobalística tem sido mais presente na literatura.

1.4.7. Inoculação de vírus e viróides

A biobalística também tem sido utilizada para a inoculação de vírus e viróides em plantas. O genoma viral clonado, ou mesmo DNA ou RNA de uma planta infectada, é transferido para a célula, possibilitando a infecção. Este método tem sido empregado, principalmente em vírus, nos casos em que os métodos para inoculação mecânica não são eficientes, como os geminivírus (Aragão et al., 1995; Gal-On et al., 1997; Garzón-Tiznado et al., 1993; Gilbertson et al., 1991). Também tem sido usado para inoculação com viróides (Matoušek et al., 2004). Ultimamente, tem sido utilizado por vários grupos como o método preferido para inoculação em estudos básicos de fitopatologia e teste de plantas transgênicas resistentes (Calegario et al., 2007; Helloco-Kervarrec et al., 2002; Makwarela et al., 2006).

1.4.8. Diolística

O processo de biobalística tem também sido utilizado para introduzir substâncias fluorescentes ou coloridas (corantes) em células. Essa técnica é chamada de diolística (O'Brien & Lummis, 2004; 2007). Os corantes são aderidos às micropartículas ou filtros e então são bombardeados para penetrarem nas células. A utilização destes corantes não tóxicos, como a carbocianina, que podem ser transportados pela célula, tem permitido a marcação de muitos tipos celulares e permanecem funcionais por um longo período (O'Brien & Lummis, 2007). A diolística tem vantagens sobre outras técnicas, como a microinjeção e eletroporação, por ser mais simples, rápida, e poder marcar um maior número de células ao mesmo tempo. Além disso, a técnica de microinjeção pode dialisar o conteúdo celular, causar ruptura em componentes celulares vitais, afetando o funcionamento da célula. A técnica de diolística tem sido muito útil para estudos da arquitetura e morfologia em células animais (O'Brien & Lummis, 2007) porém ainda é pouco utilizada para o estudo de células vegetais.

1.5. Método de transformação genética por eletroporação de protoplasto

A eletroporação de protoplastos é um método utilizado para introduzir macromoléculas (RNA, proteínas, corantes e drogas) em células vegetais.

Protoplastos são células vegetais desprovidas de parede celular e, teoricamente, podem ser isolados de qualquer tecido vegetal. Em cultura de tecidos com condições bem-estabelecidas, os protoplastos reconstituem suas paredes, dividem-se, formam colônias, calos e regeneram plantas, por embriogênese ou organogênese (Abdullah et al., 1985; Panis et al., 1993).

Para se obter os protoplastos é necessário a incubação do tecido vegetal em meio de digestão composto de enzimas pectocelulolíticas, e enzimas que digerem os principais componentes da parede celular: celulose, lignina e pectina. Outros parâmetros importantes, que devem ser determinados para cada tecido e genótipo diferente, são (1) o pH, que deve favorecer a atividade enzimática e não comprometer a viabilidade das células, (2) a pressão osmótica, que deve favorecer a estabilidade dos protoplastos recém formados, (3) a composição do meio de digestão, (4) o tempo de permanência do tecido nesse meio e (5) o estado fisiológico da planta doadora.

Após a digestão da parede celular, os protoplastos devem ser purificados, e o número de protoplastos intactos determinado, utilizando-se um hemacitômetro. Após esta purificação e quantificação, realiza-se imediatamente a eletroporação que consiste na indução de poros reversíveis nas membranas celulares, resultando em fluxo de íons e moléculas através da membrana deformada (Chang, 1989).

Adiciona-se à suspensão de protoplastos, o plasmídeo no qual estão clonados os genes de interesse e os genes marcadores, que facilitam a recuperação das células transformadas. Pode-se também adicionar DNA carreador (DNA de timo de boi ou DNA de esperma de salmão fragmentado), com a finalidade de aumentar a eficiência de transformação. No momento da eletroporação o grande número de células encontra-se individualizado e homogêneo, o que favorece a obtenção de transformantes independentes e facilita a seleção. A seleção é feita no início da cultura, quando a maioria das células derivadas dos protoplastos está na segunda divisão. Esta seleção precoce é bastante eficiente, evita o aparecimento de falsos transformantes ou quimeras, o que é um problema em outras técnicas de transformação, nas quais a seleção é realizada em tecidos ou órgãos intactos.

Introduziram pela primeira vez DNA exógeno em células de camundongo, desta maneira. Adaptaram a técnica de eletroporação a protoplastos de milho e fumo, oferecendo, assim, uma alternativa de transformação de cereais, pois o sistema de transformação via *Agrobacterium* era considerado ineficiente em monocotiledôneas Fromm et al. (1985).

Assim, por meio da eletroporação de protoplastos diferentes genes foram incorporados ao genoma de diversas plantas, de forma estável, conferindo-lhes novas características. Os genes exógenos geralmente se mantêm de forma estável segregando na progênie, de acordo com as leis de Mendel. Nos últimos anos, a eletroporação tem sido particularmente útil em estudos de expressão transiente, que é a expressão do gene exógeno sem necessária integração ao genoma da planta hospedeira. Esse tipo de experimento possibilita a análise rápida da funcionalidade de construções e permite o estudo de promotores e de outros fatores envolvidos no controle da expressão gênica, livres do efeito de posição observadas na transformação estável.

A maioria dos aparelhos de eletroporação, os eletroporadores, utiliza descarga de capacitores para produzir pulsos de alta voltagem. A intensidade do pulso é determinada pela voltagem aplicada e condutividade do meio. Quando não se conhecem os parâmetros para a eletroporação de uma espécie ou tecido vegetal, é sempre necessário otimizar: a intensidade da voltagem e a capacitância, a duração do pulso, a condutividade do meio, a concentração dos protoplastos e a quantidade de DNA (plasmídeo e carreador), entre outros. O grau de permeabilidade da membrana dependerá do campo elétrico aplicado e do tipo celular. Altos níveis de permeabilização facilitam a entrada de DNA, entretanto, diminuem a viabilidade da célula. Portanto, é necessário estabelecer uma curva de viabilidade da célula em relação aos parâmetros aplicados. O campo elétrico ótimo para uma expressão transiente máxima varia com a espécie e, geralmente, corresponde a uma viabilidade dos protoplastos inferior a 50%.

A eficiência de transformação mediado pela eletroporação é dada de duas maneiras: (1) frequência absoluta de transformação (FAT), que representa o número de colônias transformadas dividido pelo número inicial de protoplastos, e (2) frequência relativa de transformação (FRT), dada em porcentagem, que representa o número de colônias transformadas dividido pelo número total de colônias obtidas sem seleção, multiplicado por 100. A eficiência de transformação varia significativamente

entre diferentes espécies e mesmo entre cultivares da mesma espécie. Quanto ao tipo de plasmídeo utilizado, alguns trabalhos demonstram que o plasmídeo linearizado favorece a transformação, entretanto, altas frequências de transformação têm sido obtidas utilizando-se plasmídeos circulares. A transformação com dois plasmídeos (co-transformação) também é viável.

Em um estudo inicial com alface (*Lactuca sativa* L.), protoplastos de folhas adultas de alface foram eletroporadas em soluções tampão ajustadas osmoticamente contendo o DNA plasmidial com pCAMV CAT ou pABD1. Os protoplastos de alface se mostraram possíveis de sofrer transformação direta sob as condições gerais empregadas nos protoplastos de tabaco. A integração do DNA exógeno ao DNA genômico da alface de plantas resistentes foi demonstrado por análise de Southern blot. A transformação direta permite novas oportunidades em estratégias específicas para o desenvolvimento de novas cultivares de alface (Michelmore et al., 1987a) e de outras plantas superiores.

1.6. Engenharia genética de alface

A engenharia genética é uma importante ferramenta no auxílio ao melhoramento de plantas. Dessa forma, diversas pesquisas e estudos utilizando a engenharia genética, têm sido realizados em plantas de alface com o objetivo de melhorar sua tolerância a herbicidas, aumentar sua resistência a patógenos, para supressão da formação de certas substâncias que iniciam o processo de escurecimento de suas folhas, para modificação da forma das folhas, dentre outros.

Como exemplo, Dias et al. (2006) expressaram o gene da oxalato decarboxilase (*oxdc*) de *Flammulina* sp. em plantas de alface transgênicas para conferir resistência ao fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, que produz ácido oxálico, degrada as paredes celulares das células da folha e causa o apodrecimento de plantas como alface, soja, feijão e tomate. Com o uso da transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foram produzidas plantas contendo o gene *oxdc* que ao clivarem o ácido oxálico não apresentaram sintomas quando folhas isoladas foram inoculadas com uma cultura de *S. Sclerotiorum*.

Santos et al. (2008) produziram linhagens transgênicas de alface objetivando silenciar o gene *serk* (*somatic embryogenesis receptor-like kinase*) endógeno usando RNA antisense. O gene *serk* tem um papel importante na indução de embriogêneses

somáticas e zigóticas em plantas. As plantas transgênicas obtidas apresentaram uma redução no número de sementes viáveis e redução em sua habilidade de formar estruturas embriogênicas somáticas *in vitro*. Além disso, as linhagens transgênicas apresentaram uma maior suscetibilidade ao fungo *S. sclerotiorum* (estes resultados corroboram a idéia de que o gene *serk* pode estar envolvido não apenas no crescimento e desenvolvimento das plantas, como provavelmente no mecanismo geral da percepção de estresse biótico e abiótico).

Nagata et al. (2000) obtiveram plantas transgênicas de alface resistentes ao herbicida glifosato (N-(fosfonometil) glicina), pela superexpressão da enzima 5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase (*epsps*).

Plantas de alface também têm sido utilizadas para expressão de biofármacos. Usando o sistema *Agrobacterium*, Young-Sook et al. (2006) expressaram um gene para produção da subunidade β da toxina do cólera (CTB), uma toxina usada como vacina contra o cólera, infecção intestinal aguda causada pela bactéria *Vibrio cholerae* que é capaz de produzir uma enterotoxina que causa diarreia. O gene CTB sintético, com otimização de códons comuns nas plantas de alface foi fusionado com um peptídeo sinal de retenção no retículo endoplasmático. A expressão nas plantas transgênicas alcançou o nível de 0,24% de CTB em relação à proteína total solúvel.

Em outro trabalho recente, houve transformação de cloroplastos de folhas de tabaco e obtiveram linhagens destas plantas transgênicas com a expressão das proteínas fusionadas da subunidade β da toxina do cólera e da proinsulina humana (CTB-Pins, em inglês *cholera toxin B subunit-human proinsulin*). CTB-Pins acumulou mais de 16% da proteína total solúvel (PTS) em tabaco e mais de 2,5% de PTS em alface. Oito miligramas de folhas de tabaco em pó expressando CTB-Pins ou, como controle negativo, CTB-proteína verde fluorescente (CTB-GFP) ou interferon-GFP (IFN-GFP), ou folhas não transformadas foram administradas oralmente, semanalmente por um período de 7 semanas, para fêmeas diabéticas de camundongos não obesas de 5 semanas de idade. O pâncreas de camundongos tratados com CTB-Pins mostrou uma diminuição na infiltração das células características de linfócitos (insulitis), produção de insulina nas células β das ilhas pancreáticas dos camundongos tratados com CTB-Pins foram significativamente preservadas, com baixos níveis de glicose sanguíneo ou na urina, em contraste com as poucas células β restantes nas ilhotas pancreáticas dos controles negativos (Ruhlman et al., 2007). Segundo os autores, este é o primeiro anúncio de expressão de proteína terapêutica em

cloroplastos transgênicos de uma cultivar comestível. Plantas de alface transplastônicas, isto é, com todos os cloroplastos da planta transformados com o gene de interesse, no caso CTB-Pins, cresceram normalmente e, como esperado, os transgenes foram maternoalmente herdados na progênie T₁. Estes resultados abrem a possibilidade de produção de baixo custo de proteínas terapêuticas para humanos, e de desenvolvimento de uma estratégia para o tratamento de várias outras doenças auto-imunes (Ruhlman et al., 2007).

Vários trabalhos têm sido realizados para se produzir em alface subunidades de vacinas recombinantes o que se refere ao uso de proteína derivada de patógeno, ou apenas o domínio imunogênico da proteína, chamado epitopo, ou o próprio patógeno morto ou atenuado para estimular a proteção imunológica. O conceito original do uso de plantas para a produção de vacinas foi baseado na idéia que o tecido vegetal pode servir de alimento aos humanos e animais comercialmente importantes. Este método de vacinação dispararia uma resposta imune na mucosa, o que representa o primeiro passo de defesa contra a maioria dos patógenos. A expressão de proteínas de uma variedade de patógenos microbiano e viral possibilitou a expressão de sistemas de produção de subunidades de vacinas em plantas transgênicas, incluindo a expressão da proteína de superfície do antígeno da hepatite B (HbsAg) em alface (Kapusta et al., 2001). Outra proteína expressa em alface é a glicoproteína viral E2 recombinante de cólera dos porcos ou peste suína clássica, uma doença altamente contagiosa e frequentemente fatal nos suínos, bastante importante para a economia da suinocultura, já que a doença permanece endêmica ou recorrente em outras áreas (Legocki et al., 2005).

1.7. Engenharia genética para biofortificação de plantas

Humanos necessitam de mais de 22 elementos minerais, os quais podem ser conseguidos com uma dieta apropriada, no entanto, populações que subsistem de dietas a base de cereais, ou que subsistem do plantio em regiões com desbalanço de minerais no solo, principalmente ferro (Fe), zinco (Zn), cálcio (Ca), magnésio (Mn), cobre (Cu), iodo (I) e selênio (Se) sofrem de carência de um ou mais destes minerais essenciais (White & Broadley, 2005). Estratégias tradicionais para aumentar estes minerais nas dietas das populações carentes levaram a programas de suplementação ou fortificação de alimentos. Infelizmente, estas intervenções nem sempre foram bem

sucedidas. Uma solução alternativa é aumentar a concentração de minerais ou vitaminas em plantas comestíveis, isto é chamado “biofortificação”. Este processo pode ser conseguido pela fertilização mineral ou melhoramento gênico de plantas. Existe considerável variação genética em espécies cultivadas que podem ser manipuladas para estratégias de biofortificação sustentável. Variedades com aumento na concentração de minerais em suas porções comestíveis já estão disponíveis e novos genótipos com maiores densidades de minerais estão sendo desenvolvidos (White & Broadley, 2005).

Durante a última década, têm havido consideráveis progressos na elucidação das vias biossintéticas de plantas importantes para a saúde do ser humano. Esse avanço possibilitou o uso de técnicas de modificações gênicas para desenvolver variedades cultiváveis com aumento nas quantidades de minerais e vitaminas essenciais, e melhorou as características dos componentes nutracêuticos. Muitas pesquisas com vitaminas e minerais têm focado em gerar novas variedades de plantas cultivadas para melhorar a dieta da população dos países em desenvolvimento.

A biotecnologia de plantas pode contribuir muito para a segurança alimentar e nutricional. Por exemplo, o desenvolvimento do “Golden Rice” ou arroz dourado (rico em provitamina A) gerado pelo grupo do prof. Ingo Potrykus. Esse trabalho deu início à aplicação de tecnologia genética para se obter tanto melhoria na qualidade nutricional quanto na saúde da população humana (Potrykus, 2001). Deficiências de minerais e proteínas, bem como segurança alimentar continuam sendo os maiores desafios para países em desenvolvimento.

Atualmente projetos de pesquisa estão direcionando seus esforços sobre dois produtos: mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e arroz (*Oryza sativa* L.). A raiz tropical mandioca é a maior fonte de alimento para aproximadamente 600 milhões de pessoas no mundo (Sautter et al., 2006). Na África sub-Sahariana mais de 200 milhões de pessoas utilizam a mandioca como sua maior fonte de energia alimentar. A qualidade nutricional da raiz da mandioca não é suficiente para suprir todas as necessidades dietéticas diárias (Sautter et al., 2006). Ainda neste contexto, o arroz constitui-se no principal alimento de metade da população do mundo, fornecendo aproximadamente 20% da energia per capita e 13% da proteína para consumo humano do mundo (Sautter et al., 2006). Por isso, o desenvolvimento de novas linhagens de arroz com aumento na quantidade de provitamina A e Fe é importante, pois representam deficiências mundiais.

A pesquisa na produção de nutracêuticos tem geralmente sido induzida a gerar novas cultivares para mercados nas nações desenvolvidas, com o objetivo de fornecer cultivares elite exibindo grande apelo de consumo. Os grandes progressos com nutracêuticos têm sido feitos com apenas alguns tipos de metabólitos até o momento, em particular na produção de novos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa em sementes oleaginosas e para aumentar as quantidades de flavonóides e carotenóides em tomate e batata (Davies, 2007). No entanto, devido ao rápido progresso na elucidação de vias de biossíntese de metabólitos vegetais, espera-se em um futuro próximo grande sucesso com o aumento dos níveis de componentes das plantas para a saúde dos seres humanos, por meio da biotecnologia (Davies, 2007).

Arroz, o principal produto agrícola do mundo, é uma fonte pobre em micronutrientes essenciais, incluindo folato. A fortificação de sementes dessa cultura foi alcançada por intermédio da superexpressão de um locus simples contendo dois genes de *Arabidopsis thaliana* dos ramos da pterina e pABA na via de biossíntese de folato. Esse trabalho propiciou um aumento de 100 vezes na quantidade de folato quando comparado com linhagens selvagens. A partir de 100g de grãos crus polidos foram obtidos quatro vezes o requerimento diário para um adulto, que é de 200µg de folato por dia (Storozhenko et al., 2007).

Outros grupos trabalharam na via metabólica de produção de folato envolvendo a superexpressão do GTP ciclohidrolase I (*gchI*), que catalisa o primeiro passo da síntese de pterinas, em *A. thaliana* e tomate (*Solanum lycopersicum*) (De La Garza et al., 2004; Hossain et al., 2004). Apesar de terem conseguido um aumento de 2 a 4 vezes no fluxo de pterinas, os pesquisadores notaram um severo decréscimo nos níveis de ácido para-aminobenzóico (pABA) nas plantas transformadas, sugerindo que o suprimento de pABA tinha se tornado limitante para a síntese de folato. Para solucionar este problema, De La Garza et al. (2007) combinaram as duas vias metabólicas no tomate, a de síntese de pABA e a de síntese de pterinas, conseguindo ainda uma produção de folato pelo fruto suficiente para suprir as recomendações diárias de folato para um adulto com apenas 100g de tomate. Os tomates acumularam sete vezes mais folato do que qualquer outro vegetal verde considerado rico em folato.

Diversos trabalhos têm sido realizados em arroz com o objetivo de aumentar os teores de Fe, normalmente baixos neste produto. Nandi et al. (2002) e Suzuki et al. (2003) expressaram lactoferrina humana, a maior proteína ligada a Fe do leite humano em arroz. Usando a tecnologia da biobalística com um promotor específico do

endosperma de arroz (glutelina), foram obtidas altas concentrações de lactoferrina, 5g a cada kg de grãos, 6% das proteínas totais. Vale ressaltar que a expressão permaneceu estável por mais de cinco gerações. Contudo, apesar de ter havido um aumento de 120% no conteúdo de Fe, este incremento foi modesto, e não proveria um aumento substancial na quantidade de Fe diário de um adulto (Nandi et al., 2002; Suzuki et al., 2003). Com o objetivo de se conseguir um maior aumento da expressão de ferritina, Goto et al. (1999) e Murray-Kolb et al. (2002) introduziram o gene da ferritina de soja em arroz, uma vez que cada molécula de ferritina pode estar ligada a 4.500 átomos de Fe. Os resultados demonstraram um aumento de 2 a 3 vezes na quantidade de Fe quando compararam linhagens transformadas com linhagens não transformadas.

Outro grupo de pesquisa inseriu o gene da ferritina de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em arroz, usando a transformação mediada por *Agrobacterium* e o promotor de arroz da glutelina. Os resultados exibiram um aumento de duas vezes na quantidade de Fe (Lucca et al., 2001a). Uma preocupação neste tipo de experimento é a mudança de cor do arroz conforme o aumento na quantidade de Fe. A alteração na cor pode ocorrer mesmo com uma pequena variação na concentração de Fe. Além disso, outros aspectos precisam ser avaliados, tais como a possibilidade de alergenicidade e a receptividade do consumidor (Lönnerdal, 2003).

O aumento de Fe em solos deficientes neste mineral podem ser contornados aumentando em plantas não gramíneas a expressão de genes codificando Fe(III) redutases (Connolly et al., 2003; Samuelsen et al., 1998), ou ainda pelo incremento a partir de gramíneas da síntese e exudação de substâncias quelantes (Takahashi et al., 2001).

Mutantes de pêssogo (*brz* e *dgl*) e *Arabidopsis* (*frd3*, também conhecido como *man1*), com atividade constitutiva de Fe(III) redutase, acumulam não somente Fe mas também Zn, Ca, Mn, Cu e Mg em brotações jovens, no entanto, quelantes de Fe são necessários para o transporte do floema para as sementes (Grusak, 2000; Rogers & Guerinot, 2002; Wang et al., 2003). Todos estes mutantes expressam constitutivamente a Fe(III) redutase, transportadores de Fe²⁺ e atividade HC-ATPase em células de raiz e contém altas concentrações de nicotianamina (Grusak, 2000; Rogers & Guerinot, 2002; Wang et al., 2003). Interessante, a superexpressão de nicotianamina sintase também resultou em um aumento nas concentrações de Fe, Zn e Mn em brotações de tabaco transgênico (Douchkov et al., 2005). A superexpressão do

transportador Zn2C de *Arabidopsis* em raiz de cevada (*Hordeum vulgare*) aumentou a concentração de Fe e Zn na semente (Ramesh et al., 2004).

Outras estratégias transgênicas para aumentar a biodisponibilidade de Fe e Zn em porções comestíveis têm focado no aumento das concentrações de proteínas ligadas a metais, como ferritina e lactoferritina, aumentando componentes promotores, como ácido ascórbico, β -caroteno e peptídios contendo cisteína, e reduzindo componentes antinutricionais, como fitato e taninos (Holm et al., 2002; Lönnerdal, 2003). Estas estratégias têm obtido certo sucesso.

A expressão de ferritina de planta ou lactoferritina humana no endosperma de arroz aumentou a concentração de Fe, Zn e Cu nas sementes (Lucca et al., 2001b; Nandi et al., 2002; Vasconcelos et al., 2003), e a superexpressão de ferritina de planta aumentou a concentração de Fe em folhas de alface (Goto & Yashihara, 2001).

Concentrações de ácido ascórbico foram aumentadas em alface (Jain & Nessler, 2000), altas concentrações de β -caroteno e α -tocoferol foram conseguidas em arroz e outras plantas (Beyer et al., 2002; Paine et al., 2005; Shintani & DellaPenna, 1998) e tanto concentrações de lisina quanto de cisteína têm sido aumentadas em sementes e grãos de várias espécies vegetais (Bouis et al., 2003; Lucca et al., 2001a; Welch & Graham, 2004).

Ácido fítico é um inibidor da absorção de Fe e Zn em humanos e animais e acredita-se ser o maior fator contribuinte para o problema mundial de deficiência destes minerais. A redução do conteúdo de fitato na dieta mostrou ser fortemente correlacionado ao aumento da absorção de Fe e Zn, portanto, qualquer redução no conteúdo de fitato nos alimentos deve resultar em um aumento no *status* destes minerais. Mutantes espontâneos com baixos níveis de ácido fítico foram encontrados em milho, cevada e arroz e resultaram em sementes com redução de 50 a 90% deste ácido quando comparado aos controles (Raboy, 2002; Raboy et al., 2001).

Nunes et al. (2006) usando a técnica de RNA interferente, construíram um vetor de silenciamento do gene mio-inositol-1-fosfato sintase (*GmMIPS1*) que foi utilizado para transformação de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) por biobalística e obtiveram linhagens transgênicas apresentando redução de mais de 94% no teor de fitato em soja, quando comparadas às plantas não transformadas (controle).

Para reduzir a concentração de fitato em alimentos humanos e de animais, duas estratégias transgênicas têm sido adotadas. A primeira bloqueia enzimas na via de biossíntese de inositol hexafosfato (Hitz et al., 2002; Pilu et al., 2003; Shi et al.,

2005; Shi et al., 2003; Shukla et al., 2004) e produz pouco fitato e alta quantidade de fósforo inorgânico (Pi). A segunda estratégia se baseia na superexpressão de fitases, enzimas que degradam o fitato, em porções comestíveis em várias cultivares, incluindo alfafa, soja, canola, arroz e trigo (Brinch-Pedersen et al., 2003; Chiera et al., 2004; Goto & Yashihara, 2001; Holm et al., 2002) porém igualmente reduz a concentração de fitato e aumenta a de Pi nas sementes (White & Broadley, 2005).

1.8. Objetivo geral

Aumentar a concentração de folato em plantas geneticamente modificadas de alface pela superexpressão dos genes de duas enzimas da via metabólica do folato, *GTP ciclohidrolase I (gchI)* e *Lycopercicon esculentum corismato sintase (lecs)*.

1.8.1. Objetivos específicos

- 1) Construção de um vetor para transformação de alface mediada por *A. tumefaciens* com a finalidade de expressar o gene da GTP ciclohidrolase I (*gchI*) de galinha (*Gallus gallus*) (com os códons otimizados) em plantas de alface geneticamente modificadas.
- 2) Clonagem do gene da corismato sintase (CS) de tomate e construção de um vetor para transformação cloroplasmática de alface.
- 3) Otimização de parâmetros para transformação genética do genoma cloroplasmático de alface por biobalística.
- 4) Adaptação para a alface de um sistema microbiológico para quantificação de folatos totais nesta hortaliça.

Capítulo 2

Aumento da expressão de *GTP ciclohidrolase I* em plantas de alface

2.1. Introdução

A alface foi escolhida para ter seu nível de folato aumentado, por ser uma hortaliça consumida em todo o mundo, ser a mais plantada e consumida no Brasil, na forma de saladas, logo, sem tratamento, crua, o que reduz as perdas por manipulação e processamento e ter baixo teor de folato. Por ser um produto perecível, os centros de plantio devem ser próximos aos centros consumidores, o que também reduz o tempo de armazenamento e conseqüentemente as perdas de folatos.

Os folatos são parte de uma grande família de poliglutamatos (com até 8 resíduos de glutamyl) de ácido pteróico e análogos, e são cofatores essenciais para as reações de transferência de um carbono necessários para a biosíntese de purinas, pirimidinas, formilmetionil-tRNA e timidilato e no metabolismo de vários aminoácidos, incluindo metionina, serina e glicina (Cossins & Chen, 1997; Storozhenko et al., 2005). Em plantas, os precursores das pterinas são sintetizados de GTP no citosol (ramo da pterina), enquanto ácido para-aminobenzóico (pABA) é sintetizado de corismato nos plastídios (ramo do pABA). A biosíntese de pterinas é regulado pela GTP ciclohidrolase I (*gchl*), a primeira enzima desta via metabólica. Ambos os precursores das pterinas e de pABA são importados para dentro da mitocôndria para participar na condensação de folatos pela adição de glutamatos (Cossins, 2000).

O gene sintético baseado no gene de galinha (*Gallus gallus*) foi escolhido por seu produto não apresentar *feedback negativo*, quando produzido em plantas, evitando assim que seu produto iniba a formação de mais substrato e assim não atinja todo o potencial de expressão desejado (De La Garza et al., 2004). A técnica de transformação mediada por *A. tumefaciens* foi escolhida por ser um protocolo estabelecido e conhecido e por ser direcionado para a transformação nuclear, como é o caso do gene *gchl*. Esta técnica foi primeiramente utilizada em alface em 1987

(Michelmore et al.) e na cultivar Verônica pela primeira vez no Brasil em 1998 (Lovato et al.).

2.2. Materiais & Métodos

2.2.1. Construção do vetor para transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

O gene *GTP ciclohidrolase I (gchl)* foi sintetizado pela empresa Epoch Biolabs Inc (Sugar Land, TX, USA) de acordo com a sequência de *Gallus gallus* (Genebank acesso n.º Z49267), substituindo 10 códons raros em alface do gene de galinha (*Gallus gallus*): TGT para TGG, CCA para CCG, GGT para GGC, AGA para CGT, GCA para GCG, AGA para AGG, ACA para ACG, CCT para CCC, GGT para GGC e CAT para CAC. O DNA sintético foi inserido entre os sítios de *NcoI* e *SacI* do vetor pBI426 (Datla et al., 1991), substituindo o gene fusionado *gus:nptII*.

O cassete de expressão foi então transferido para o vetor pCAMBIA1300 usando *EcoRI* e *HindIII* para gerar o vetor pCGCHI que foi transferido para *A. tumefaciens* estirpe EHA105 (Hood et al., 1993) por eletroporação, que consiste no uso de um pulso elétrico de alta voltagem para criar poros na membrana celular e permitir a entrada do DNA exógeno nas células alvo. Foi usado como agente seletivo das plantas a higromicina. O vetor pCGCHI (fig. 7) foi utilizado na transformação de alface (cv. Verônica) mediado por *A. tumefaciens* de acordo com Dias et al. (2006).

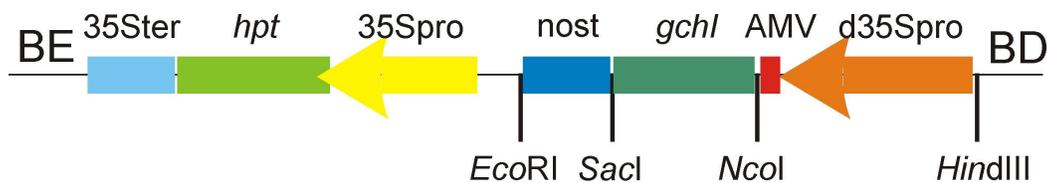


Fig. 7 - Representação esquemática do T-DNA presente no vetor pCGCHI utilizado para transformar folhas de alface mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Borda esquerda (BE), terminador 35S do vírus do mosaico dourado da couve-flor (35Ster), gene marcador da higromicina fosfotransferase (hpt) que confere resistência à higromicina, promotor 35S do vírus do mosaico dourado da couve-flor (35Spro), terminador do gene de síntese da nopalina (nost), cassete de expressão do gene *gchl* (*gchl*), vírus do mosaico da alfafa (AMV), promotor 35S duplicado do vírus do mosaico dourado da couve-flor (d35Spro), borda direita (BD).

2.2.2. Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

2.2.2.1. Preparo de *Agrobacterium tumefaciens* sepa EHA105

uma colônia de agrobactéria sepa EHA105 foi retirada com o auxílio de uma alça e colocada em tubo falcon de 50 mL contendo 5 mL de meio Luria-Bertani (ou meio LB) (1% triptona, 0,5% extrato de levedura e 1% de cloreto de sódio, ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5N e autoclavar à 121°C por 20 min.) e 50 mg/L de rifampicina. A cultura foi incubada durante 12 h a 28°C com agitação. No dia seguinte, o inóculo foi transferido para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de novo meio LB com 50 mg/L de rifampicina e 100 µL do pré-inóculo. A cultura foi incubada novamente com agitação e temperatura de 28°C até uma OD_{600nm} de 0,6 (aproximadamente 14 h) e deixada no gelo por 15 minutos. A cultura foi então centrífuga (Centrifuga refrigerada 5810R da Eppendorf) por 5 min. a 5000g (ou 8000 rpm no rotor SS35). O sobrenadante foi descartado e secado em papel-filtro autoclavado. Em seguida foi ressuscitado em 300 µL de água milli-Q com 20 mM de cloreto de cálcio (CaCl₂), misturado no gelo e distribuído em alíquotas de 100 µL de bactéria por tubo de microcentrifuga e após congelá-las no nitrogênio líquido foram guardados no freezer -80°C até o uso.

2.2.2.2. Transformação da *Agrobacterium* EHA105 com o gene de interesse (pCGCHI)

5 µL de DNA (pCGCHI) foram pipetados, colocados no tubo da bactéria EHA105 e deixados no gelo por 30 minutos. Foi colocado no nitrogênio líquido até solidificar (aproximadamente 2 min.) e transferidos para banho-maria à 37°C por 5 min., após o choque térmico, foi adicionado 1 mL de meio LB, homogeneizado com pipeta e incubado em estufa à 28 °C por 2 h. Após este tempo, 100 µL de EHA105 transformada foi plaqueada em meio LB sólido (1% triptona, 0,5% extrato de levedura e 1% de cloreto de sódio, ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5N, 1,6% de ágar e autoclavado à 121°C por 20 min.) com os antibióticos (50 mg/L de rifampicina e 50 mg/L de canamicina). A placa foi então incubada em estufa à 28°C até crescerem as colônias (2 a 3 dias). As colônias que crescerem foram testadas por reações em cadeia da polimerase (PCR), com primers específicos (sequencias de DNA presente do gene

introduzido) e programa AHAS no termociclador. O programa AHAS consiste em ciclos de: 95°C por 5 min., 35 ciclos de (95°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min.), 72°C por 7 min. e 4°C.

2.2.2.3. Desinfestação e germinação de sementes

0,1 g de sementes (aproximadamente 100 sementes) foram desinfestadas. A tensão superficial das sementes foi reduzida colocando-as em uma seringa e adicionando aos poucos 20 mL de água destilada autoclavada com 2 gotas de *tween* 20 e descartando a água a cada lavagem. Para a desinfestação 1% de hipoclorito de sódio foi colocado na seringa e deixado por 15 min. mexendo a seringa de vez em quando. Novamente as sementes foram lavadas com água destilada autoclavada pura por 4 a 5 vezes. Após as lavagens, ágar 0,2% autoclavado foi colocado na seringa e bem misturado para as sementes se expalharem. Três magentas foram preparadas e autoclavadas com papel-toalha em forma de “U” invertido e água da torneira até a metade da altura do papel-toalha. As sementes foram distribuídas sobre o papel-toalha e colocadas para germinar em sala de crescimento por 2 dias.

2.2.2.4. Co-cultura alface-*Agrobacterium*

Em fluxo laminar, as sementes germinadas (aproximadamente 100 sementes) de alface foram organizadas em placa de Petri autoclavada, as cascas marrons foram removidas, e as raízes cortadas para separar os 2 cotilédones (aproximadamente 200 cotilédones) e ferir a planta para a penetração das Agrobáctérias.

Em outra placa de Petri autoclavada, foi colocado o inóculo de *Agrobacterium* EHA105 transformado com o vetor pCGCHI e 2/3 dos cotilédones (aproximadamente 130 cotilédones). Esta mistura ficou em contato por 15 minutos, mexendo a placa de vez em quando. Após este tempo, os cotilédones foram retirados da placa e colocados em placa contendo meio MS (0,44 g de meio MS com vitaminas, 3 g de sacarose) com 0,1 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,1 mg/L de ácido indol-3-butírico (AIB), 0,1 mg/L de canamicina e 0,1 mg/L de rifampicina). Os cotilédones foram arrumados de forma circular na placa. Em outra placa de Petri, o restante dos cotilédones (1/3 ou 70 cotilédones) foram da mesma forma arrumados porém estes

sem haver contato com a *Agrobacterium* (controle). As placas foram deixadas na sala de crescimento por 48h.

2.2.2.5. Seleção e crescimento das plantas

Após 2 dias na sala de crescimento, metade dos cotilédones controle (não transformados) foram transferidos para novo meio MS com 50 mg/L de cloranfenicol e a outra metade para meio MS com 50 mg/L de cloranfenicol e 50 mg/L de higromicina. Os cotilédones transformados foram igualmente transferidos para novo meio MS com 50 mg/L de cloranfenicol e 50 mg/L de higromicina. O crescimento de plântulas foi então observado a partir das células transformadas e resistentes aos antibióticos.

2.2.3. Análise das plantas por reações em cadeia da polimerase (PCR)

2.2.3.1. Extração de DNA genômico das plantas para análise por PCR

O DNA foi isolado de discos foliares de acordo com Doyle & Doyle (1987). Um disco foliar das plantas a serem testadas foi retirado e macerado com bastões autoclavados, foi acrescentado a cada amostra 0,4 mL de tampão CTAB 2X [1,4 M de cloreto de sódio, 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 2% de brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB), 2% de polivinilpirrolidona (PVP)]. As amostras foram agitadas por 20 min. à 60°C e em seguida foram adicionados 0,4 mL de cloroformio. As suspensões foram homogeneizadas em agitador do tipo vórtex por 6 seg. e centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min. Foram retirados 0,2 mL do sobrenadante e transferidos para novo tubo de microcentrífuga. Foram adicionados 0,2 mL de isopropanol e os tubos foram invertidos 8 vezes. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi excluído por sucção com a pipeta e as amostras foram deixadas secar por aproximadamente 30 min. com o tubo invertido sobre papel-filtro. O DNA foi ressuspendido em 20 µL de água mili-Q e guardados a -20°C até posterior uso.

2.2.3.2. A PCR

As PCR foram realizadas de acordo com Bonfim et al. (2007). Os primers CHMUT591C (5' ATGTGTAGCTTCGATCACCACTCC-3') e CHMUT130 (5'-AGACCAAGA AGCGAGGAGGACAAC-3') foram utilizados para amplificar uma seqüência de 461 pb correspondente ao gene *gchI*. A mistura foi colocada no termociclador onde foi tratada a 95°C por 5 minutos e 35 ciclos de amplificação (95°C por 1 min, 55°C por 1 min., 72°C por 1 min.) com um ciclo elongador final de 7 min. a 72°C, terminando a 4°C. A mistura foi então aplicada em gel de agarose 1% e visualizada sob luz UV com *blue green dye* (LGC Biotecnologia, Brazil)

2.2.4. Análise de western blot

2.2.4.1. Expressão de *gchI* em *E. coli*

O gene *gchI* foi expresso em *Escherichia coli* para ser usado como controle positivo. A seqüência codante do *gchI* foi inserida no vetor de expressão de *E. coli* pDEST17 (Invitrogen) gerando o vetor pDESTGCHI. Meio LB (0,5 L) com adição de 50 mg de ampicilina (antibiótico de seleção) foi inoculado com uma cultura celular crescida durante 12 horas de células BL21-Lys transformadas contendo o plasmídeo pDESTGCHI. As células cresceram com agitação a 37°C até uma OD_{600nm} entre 0,7 e 0,9, com a expressão do gene *gchI* induzido por IPTG 1mM (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida). A cultura cresceu por mais 5 horas a 37°C. As células foram aliqüotadas e armazenadas a -80°C. A proteína GCHI foi purificada em coluna de níquel e foi analisada por SDS-PAGE. O His₆-tag *gchI* foi usado como um controle positivo.

2.2.4.2. Extração protéica de folhas de alface para western blot

A extração protéica foi realizada pela mistura de 0,1 g de folha de alface macerada no nitrogênio líquido e 30 µL de tampão de amostra (125 mM Tris pH 6,8, 4% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 20% glicerol, 0,04% azul de bromofenol). A mistura foi fervida por 5 min. e aplicada no gel de poliacrilamida 12%. Uma nova extração foi realizada pela mistura de 0,1g de folha de alface macerada no nitrogênio líquido e 30

μL de tampão de extração (50mM Tris-HCl pH 6,8, 1% β-mercaptoetanol, 0,2% PVP). A proteína total foi quantificada usando o Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

2.2.4.3. SDS-PAGE e western blot

As proteínas foram aplicadas em um mini gel SDS-PAGE 12%, eletrotransferido para a membrana Immobilon-P PVDF (Millipore) sob 100 mA por 70 min., ficando 12h a 4°C bloqueando em solução salina de tampão Tris (20 mM Tris base, 137 mM NaCl, pH 7,6), contendo 5% (p/v) de leite desnatado e 0,1% (v/v) de *tween* 20. A membrana foi incubada com anticorpo primário policlonal IgG de camundongo anti-GCHI (NP000152, Human GCHI epitopo a.a. 84–173, Novus Biologicals Inc, Littleton, CO, USA) diluído 1:4.000 em tampão de bloqueio por 4h a 25°C. O anticorpo secundário foi incubado por 4h a 25°C com antimouse IgG de cabra conjugado com fosfatase alcalina (Bio-Rad) em uma diluição de 1:7.000 em solução de bloqueio. Blots foram revelados com o substrato CSPD quimiluminescente (Applied Biosystems) de acordo com instruções do fabricante e expostos ao filme Kodak Standard.

2.2.5. Análise de folato em plantas pelo método microbiológico

As plantas positivas para o transgene *gchI* tiveram o seu teor de folato quantificado pelo método microbiológico, mediado por *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469).

2.2.5.1. Crioproteção da cultura de *Lactobacillus rhamnosus*

Para ser utilizada na quantificação de folato em extratos de folha de alface, a cultura de *L. rhamnosus*, a partir de uma cultura liofilizada, foi crioprotegida para maior durabilidade e estabilidade, de acordo com Wilson e Horne (1982) da seguinte forma: 1 mL de meio FAAM (*Folic Acid Assay Medium*, Sigma) foi adicionada à cultura liofilizada e foi hidratada por 10 minutos. O meio continha 47 mg do meio FAAM por litro de meio final, contendo 0,3 μg/L de ácido fólico e 250 mg/L de ácido ascórbico, autoclavado a 121°C por 10 minutos e após frio foi utilizado.

Um volume de 0,5 mL desta suspensão bacteriana foi inoculado em 10 mL de meio FAAM e incubou-se a 37°C por 7 horas. Depois, 0,5 mL da cultura bacteriana foi retirada e juntada a 189 mL de meio FAAM, incubando o inóculo a 37°C por 18 horas. O recipiente contendo a cultura bacteriana foi retirado da estufa e resfriado imediatamente em gelo. O mesmo volume de glicerol 80% gelado e estéril foi adicionado à cultura. Toda a solução foi alíquotada em tubos de 2 mL, que foram guardados a -80°C até o uso.

2.2.5.2. Extração de folato de folhas de alface

O método microbiológico foi usado para a determinação de folato em folhas de alface seguindo o protocolo AACC Method 86-47 (DeVries et al., 2001; Hyun & Tamura, 2005) com modificações. Para a extração de folato, cinco gramas de folha de alface foram macerados com nitrogênio líquido em um cadinho de porcelana com a ajuda de um pistilo. O pó resultante foi ressuspense em 25 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 4,1) com 114 mM de ácido ascórbico, em um tubo falcon. A mistura foi aquecida em banho-maria por 10 minutos a 100°C, resfriada rapidamente em gelo e armazenada até o uso no freezer -80°C (Tamura, 1990).

2.2.5.3. Tratamento bi-enzimático dos extratos de folato

O tratamento bi-enzimático foi seguido conforme proposto por Pandrangi e LaBorde (2004). Foi misturado 250 µL do extrato vegetal contendo folato a 250 µL de tampão citrato 0,3 M (pH 4,0) e 500 µL de protease (Protease, Tipo XIV: bacteriana, de *Streptomyces griseus*; Sigma) e incubado a 37°C por 8 horas. Após este tempo a amostra foi fervida por 5 minutos para inativar a enzima. 200 µL deste extrato resfriado foi adicionado a 950 µL de tampão fosfato 0,3 M (pH 7,0) e 50 µL de conjugase, que foi novamente incubada a 37°C, desta vez por 3 horas.

A conjugase foi preparada de acordo com Wilson e Horne (1982). Sangue de bovino foi coletado e deixado coagular. Em seguida foi centrifugado a 5.000 g por 10 min. O soro (16 mL) foi dializado a 4°C por 18 h em um litro de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0) contendo 2 g de carvão ativado para remoção de folatos endógenos. O dializado foi então estocado a -20°C em alíquotas de 0,5 mL até o uso.

2.2.5.4. Quantificação de folato em folhas de alface

Para a quantificação de folato placas de ELISA de 96 poços foram utilizadas para o acondicionamento do meio de crescimento da bactéria. O meio FAAM sem adição de ácido fólico foi utilizado, sendo este último adicionado nos pontos da curva, e presente naturalmente no extrato da planta que se deseja quantificar. No ensaio foi utilizado o tampão fosfato 50 mM (pH 6,1). Fez-se uma curva, adicionada de ácido fólico sintético, ácido pteroil-L-glutâmico (Sigma), para servir de referência na quantificação, e as amostras de plantas, que serviriam como fonte de folato para o crescimento da bactéria também foram preparadas. Todos os pontos da curva e todos os extratos de plantas a serem quantificados foram preparados em triplicata.

No preparo das amostras de planta, foi preparada uma mistura (mistura A), contendo 100 µL de FAAM, 25 µL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,1) e 5 µL da bactéria crioprotegida. Foi distribuída então 130 µL da mistura A em cada poço da placa de ELISA. Em seguida, foi adicionado a cada poço 2,5 µL do extrato tratado bi-enzimaticamente de cada planta a ser analisada, mais 167,5 µL do meio FAAM (autoclavado por 10 minutos a 121°C e adicionado de ácido ascórbico, sem ácido fólico).

No preparo da curva, foi feita uma diluição seriada: primeiramente foi adicionado 170 µL de meio FAAM a cada poço da placa; acrescentado ao primeiro poço 60 µL de solução de ácido fólico na concentração de 100 ng/mL, e mais 170 µL de meio FAAM. Após misturar com o auxílio da pipeta, foram retirados 170 µL da solução e colocados no poço seguinte, que já continha 170 µL de meio FAAM, e assim foi repetido por 7 vezes, o ácido fólico também foi diluído por 7 vezes, gerando as seguintes concentrações: 0,2 ng, 0,1 ng, 0,05 ng, 0,025 ng, 0,0125 ng, 0,00625 ng e 0,003125 ng de ácido fólico. Após a diluição seriada feita para todos os sete pontos da curva, cada ponto foi repetido mais duas vezes e foi adicionado também a cada poço 130 µL da mistura A. Ao final de cada diluição seriada, foi feito um branco: um poço contendo apenas 130 µL da mistura A e mais 170 µL de meio FAAM, ou seja, um ponto da curva foi feito sem adição de ácido fólico.

Após o preparo de toda a placa, esta foi lacrada com filme adesivo plástico estéril para microplacas de ELISA (Axygen Scientific Inc.) e incubada a 37°C, sem agitação, por 48 horas. Transcorrido esse tempo, a placa foi levada a um

espectrofotômetro de densidade ótica, onde a turbidez (o crescimento bacteriano) do meio foi medida a 595 nm.

Uma regressão polinomial, com auxílio do programa Excel, permitiu cruzar os dados obtidos na curva com os dados das plantas, para obter a quantidade de folato equivalente nas plantas de acordo com o crescimento da bactéria observado. Os dados da concentração de folato foram normalizados usando o valor de proteína total e os resultados foram expressos em ng de folato por mg de proteína total.

As análises de variância foram realizadas com o *SAS System for Windows* (versão 8.02, SAS Institute, Cary, NC).

2.3. Resultados & Discussão

Em 45 experimentos de transformação por *A. tumefaciens*, com 130 explantes cada experimento, 57 plantas regeneradas foram obtidas a partir de calos individuais, e destas, 29 plantas positivas para o transgene *gchI* quando testadas por PCR com primers específicos.

As plântulas positivas foram aclimatadas e cada linhagem avançada até a terceira geração (T_3). Não foi observada qualquer diferença fenotípica entre as plantas geneticamente modificadas e os controles (plantas não transgênicas). As folhas das plantas foram analisadas por PCR em cada geração para avaliar a presença do transgene *gchI* (fig. 8).

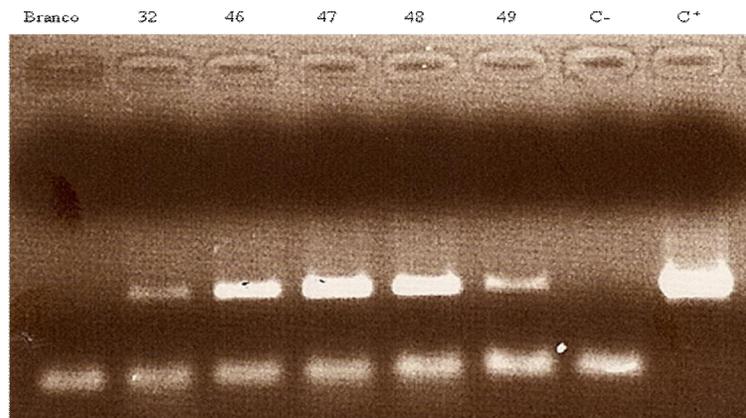


Fig. 8 - Eletroforese em gel de agarose 12% mostrando os fragmentos de 461 pb amplificados por PCR do gene *gchI* de algumas plantas T_0 . Linha 1: branco, linha 2 a 6: linhagens de plantas de alface transgênicas, linha 7: controle negativo (planta não transgênica) e linha 8: controle positivo, vetor utilizado na transformação diluído 1.000 vezes.

Para confirmar a expressão do gene *gchl*, a proteína de folhas das plantas T₃ foram extraídas e analisadas por SDS-PAGE e Western blot. O produto do transgene *gchl* foi detectado nas linhagens transgênicas (fig. 9).

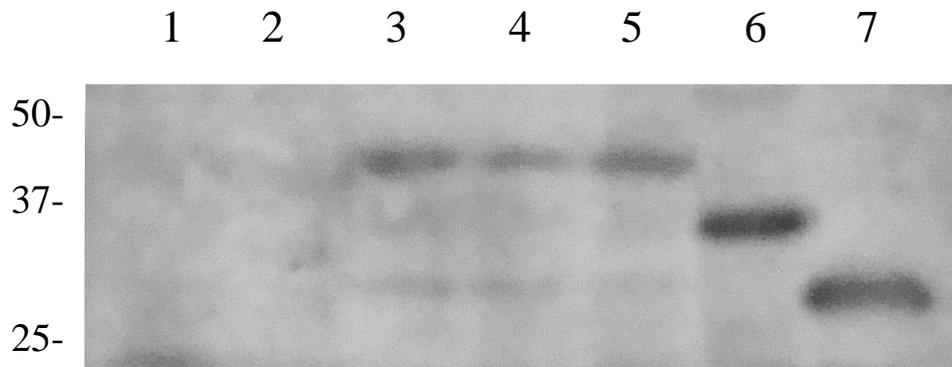


Fig. 9 - Expressão de GgGCHI em folhas de alface transgênicas. Western blot da expressão de GgGCHI em folhas de plantas transgênicas, fígado de galinha e *E. coli* detectados pelo uso de anticorpo anti-hGCHI. Linha 1-2: folhas de alface não transgênicas; linhas 3-5: linhagens transgênicas de alface; linha 6: 30µg de proteína total isolada de fígado de galinha; linha 7: GCHI-6His de células de *E.coli* transformadas com o plasmídeo pDEST-GCHI. Marcadores de massa molecular indicados à esquerda (em kDa).

Nenhuma reação cruzada com a proteína GCHI endógena foi detectada e nenhuma banda foi observada nas plantas não transgênicas (fig. 9). Como esperado, uma banda imunoreativa foi observada, correspondendo em tamanho à massa molecular predeterminada de 30kDa (incluindo as extensões N- e C-terminais) do produto do gene *gchl* expresso em *E. coli* (fig. 9). O uso de anticorpo anti-GCHI contra o epítipo de GCHI humano correspondente aos aminoácidos de posição 84 a 173 mostraram que o gene de *G. gallus* com os códons otimizados foram expressos em folhas de alface. Nenhum sinal foi observado nas linhagens não transgênicas. Na verdade, a GCHI de *G. gallus* é muito divergente da GCHI de plantas, apresentando uma identidade de apenas 39% com GCHI de *S. lycopersicum* ($E=1e^{-26}$) e *Arabidopsis thaliana* ($E=3e^{-26}$). Além disso, o epítipo humano GCHI tem alta identidade com o GCHI de galinha (94%) e baixa identidade com o epítipo de plantas (<41%).

Uma banda GCHI imunoreativa maior e outra menor foram observadas nas linhagens transgênicas. A proteína GCHI de galinha detectadas em ambas folhas de alface transgênicas e fígado de galinha mostraram uma massa molecular maior quando comparadas com a GCHI de galinha expressado em *E. coli*. Esta enzima é um multímero composto de subunidades idênticas, mas seu número exato de subunidades ainda não foi determinado para a maioria das espécies. Diferenças nos padrões de

eletroforese, relativas à massa molecular esperada *in silico*, tem sido observada em GCHI de plantas e animais (Cha et al., 1991; Yoneyama & Hatakeyama, 1998). Esta diferença no tamanho da proteína pode também ser atribuída às modificações pós-traducionais, como a glicosilação e fosforilação. Hesslinger et al. (1998) mostraram que GCHI está sujeita a modificações pós-traducionais. Adicionalmente, uma análise *in silico* usando o algoritmo YinOYang 1.2 (Gupta & Brunak, 2002) previu 5 resíduos de Ser/Thr na GCHI de galinha com alto potencial (0,77 a 0,99; limiar = 0,5) para glicosilação N-acetilglucosamina bem como fosforilação.

Em folhas de alface transgênicas, GCHI de galinha parece ser eletroforeticamente superior que a proteína encontrada no fígado de galinha. Apesar de as plantas possuírem um sistema endomembrana e uma via secretora similar aos das células de animais, diferenças nos padrões de glicosilação entre plantas e animais têm sido observadas (Balen & Krsnik-Rasol, 2007; Ma et al., 2003; Streatfield, 2007). Porém, outros experimentos são necessários para confirmar se estas diferenças podem influenciar na atividade enzimática.

A fim de determinar se a expressão do *gchI* exógeno aumentou a quantidade de folato, foi quantificado pelo método microbiológico mediado por *L. rhamnosus* o folato total das linhagens transgênicas e não transgênicas (controle) (fig. 10).

Por meio da equação gerada ($y = -3,6139x^3 + 4,4752x^2 - 1,1239x + 0,0815$; $R^2 = 0,9999$), foram calculados os valores equivalentes de cada medida observada nas plantas, para se obter os valores correspondentes em ng/μg de tecido fresco. Em seguida, o valor foi dividido pela quantidade de proteína existente em cada poço da placa de ELISA (quantificado por Bradford). A partir destas quantificações foram verificadas que a linhagens transgênicas mostraram um aumento no teor de folato de até 8,5 vezes quando comparadas com plantas não transformadas (controle) (fig. 10).

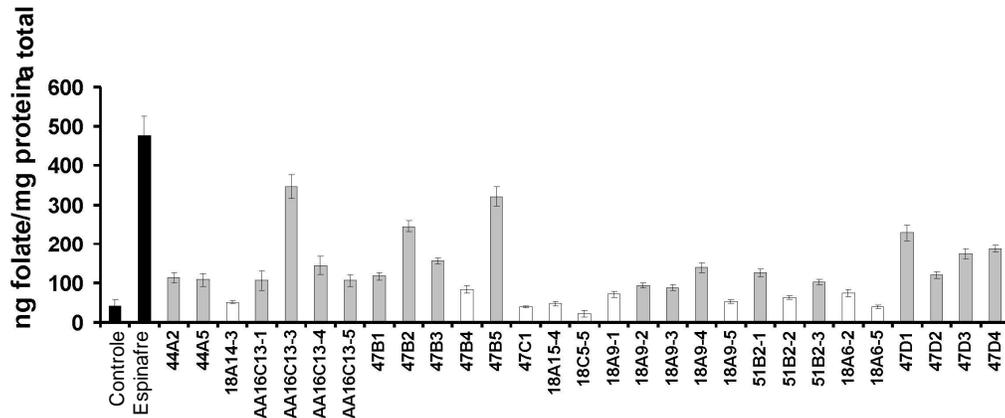


Fig. 10 - Quantificação de folato total em linhagens de alface transgênicas T_3 e não transgênicas (controle). Valores de folato de 19 linhagens transgênicas foram significativamente diferentes (barras cinzas) das plantas não transformadas (controle). Valores de folato de 10 linhagens transgênicas não foram significativamente diferentes (barras brancas) das plantas não transformadas (controle). O controle e o espinafre estão representados por barras pretas. As barras representam as médias \pm SD (Student's t-test; $P > 0,05$ versus controle). Espinafre também foi analisado por ser considerado rico em folato.

Os resultados revelaram que 19 linhagens apresentaram aumento significativo na quantidade de folato ($P=0,05$), apresentando um aumento de 2,1 a 8,5 vezes quando comparado às linhagens não transgênicas (fig. 10). Além disso, o espinafre (*Spinacea oleracea*), uma planta rica em folatos, foi analisado. Os resultados revelaram que algumas linhagens transgênicas, como a AA16-C3-3, 47B5, 47B2 tiveram 72,6; 67,4 e 51,5%, respectivamente do total de folato encontrado no espinafre.

As plantas expressando o gene *gchl* de galinha apresentaram uma aumento de até 8,5 vezes mais folatos que os controles. Uma estratégia similar, porém usando *gchl* de bactéria, foi similarmente bem sucedida no aumento de síntese de pterinas e folato em folhas de *A. thaliana* (Hossain et al., 2004) e tomate (De La Garza et al., 2004). Apesar do aumento no teor de folato em tomate em duas e até três vezes, as frutas amadurecidas após colheita das plantas continham níveis de folato similares às frutas controle que amadureceram nas plantas (De La Garza et al., 2004). Em *Arabidopsis*, a expressão do gene *gchl* de *E. coli* resultou em um aumento de duas a quatro vezes no teor de folatos. Em todos os casos, a expressão do gene *gchl* gerou altos níveis de pterina quando comparados com o aumento de folato total (De La Garza et al., 2004; Hossain et al., 2004). Estes resultados sugerem a existência de um gargalo no fluxo da via de síntese de folato, provavelmente no suprimento de pABA. Recentemente, De La Garza et al. (2007) cruzou linhagens de tomate

superexpressando tanto pABA quanto pterina e produziu plantas com acúmulo de 25 vezes mais folato nas frutas.

A quantidade de folato obtida nas folhas de alface foi de 188,5 µg/100 g de peso fresco (346,5ng de folato/mg de proteína total), o que representa 5,4 vezes mais folato do que o observado em folhas verdes de alface cruas var. críspa (*USDA National Nutrient Database for Standard Reference*, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>). Com estes resultados plantas de alface fortificadas obtidas neste trabalho fornecerão 26% da IDR de folato para adultos (400 µg/dia para um adulto) pela ingestão diária de uma porção regular (56g ou uma xícara de chá, de acordo com *USDA National Nutrient*) de folhas destas alfaves.

Anexo

Nunes, A.C.S.; Kalkmann, D.C.; Aragão, F.J.L. (2009) Folate Biofortification of Lettuce by expression of a codon optimized chicken GTP cyclohydrolase I gene. *Transgenic Research (in press)*

Capítulo 3

Aumento da expressão de *corismato sintase* em plantas de alface

3.1. Introdução

O aumento da expressão do gene da *corismato sintase* (*cs*) foi escolhido por ser o primeiro passo da via metabólica do pABA, um precursor para a formação de folatos. Como já mencionado anteriormente no capítulo 2, estudos mostram que mesmo havendo um aumento no teor de folato pela superexpressão do gene *gchl*, esta superexpressão gera altos níveis de pterina quando comparados com o aumento de folato total (De La Garza et al., 2004; Hossain et al., 2004). Estes resultados sugerem a existência de um gargalo no fluxo da via de síntese de folato, possivelmente no suprimento de pABA. No entanto, isso não foi observado quando De La Garza et al. (2007) cruzaram linhagens de tomate tanto com aumento da expressão de pABA quanto de pterinas e produziram plantas com acúmulo de 25 vezes mais folato nestas frutas quando comparadas com as frutas não transformadas. A técnica de transformação por biobalística foi escolhida por ser um protocolo estabelecido, conhecido e por poder ser direcionado para a transformação plastidial, como é o caso do gene da *cs*.

A transformação cloroplasmática é mediada por biobalística e tem algumas vantagens em relação à transformação do genoma nuclear. As principais vantagens apontadas são: altos níveis de expressão heteróloga (De Cosa et al., 2001; Tregoning et al., 2003), contenção do transgene devido ao fato de que para a maioria das plantas superiores o genoma cloroplasmático tem herança materna (Birky, 2001; Ruf et al., 2001; Svab & Maliga, 1993), ausência do efeito de posição devido ao fato de que é possível direcionar a integração para uma região específica (Staub & Maliga 1992), e diminuição dos problemas de silenciamento gênico quando múltiplos genes devem ser inseridos, devido ao fato de que a maquinaria traducional dos cloroplastos tem a capacidade de traduzir transcritos policistrônicos, onde há um promotor para um ou mais genes (De Cosa et al., 2001; Kanamoto et al., 2006; Staub & Maliga, 1995).

Desde 1990 é possível transformar plantas superiores com o processo de transformação de cloroplastos por biobalística (Svab et al., 1990; Ye et al., 1990).

3.2. Materiais & Métodos

3.2.1. Construção do vetor para transformação plastidial por bombardeamento

O vetor pRL1000 utilizado na construção do vetor final para transformação de plastídio de alface por bombardeamento foi gentilmente cedido pelo Dr. Hirosuke Kanamoto (*Research Institute of Innovative Technology for the Earth*, Kyoto, Japan). O pRL1000 (Kanamoto et al., 2006) consiste de um sítio de integração plastidial por recombinação e um cassete de seleção que confere resistência a espectinomicina (*aadA*) (fig. 11).

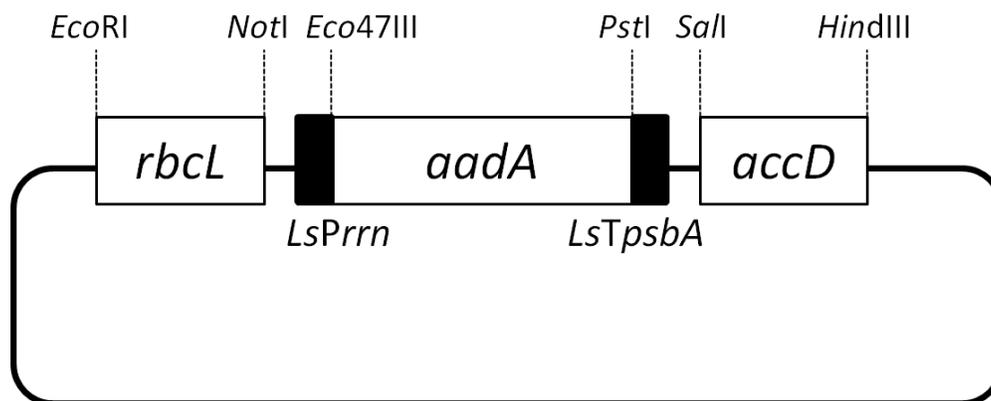


Fig. 11 - Cassete de expressão do vetor pRL1000 usado na construção do vetor de transformação plastidial de alface (Kanamoto et al., 2006).

O gene da *corismato sintase* de tomate (*lecs*) foi clonado de *Solanum lycopersicum* L. (= *Lycopersicon esculentum* Mill.). Para isso inicialmente flores de tomate foram retiradas da planta e imediatamente o RNA total foi extraído em nitrogênio líquido seguindo-se o protocolo do *kit micro-to-midi total RNA purification system* da Invitrogen (Carlsbad, California, USA), conforme indicação do fabricante.

A partir do RNA total obtido, cDNA foi sintetizado com o uso do kit Superscript II RNase H- Reverse Transcriptase da Invitrogen (Carlsbad, California, USA), conforme indicação do fabricante.

Com o cDNA, foram feitas então reações em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) usando-se *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* da Invitrogen (Carlsbad, California, USA). A fim de se obter o gene *lecs1-2* de aproximadamente 1.100 pb, e também substituir um sítio da enzima de restrição *SacI* por um sítio de *KpnI* na mesma posição. Estas reações foram realizadas em duas partes *lecs1* e *lecs2*. Para isso 2 pares de primers: LeCSPSTF (GCTGCAGTTGTAGGGAGGGATTTATGGCTGGTAGTACATTTGG) e LeCSKPNR (GCGGTACCTGATGAAATTTTGCAAG) foram usados visando a amplificação do gene *lecs1* (de aproximadamente 200 pb) e, LeCSKPNF (CAGGTACCGCAGATGGGC TGACTAC) e LeCSPSTSACR (CGAGCTCTGCAG TCAGAGGGTAACCTC) para amplificar o gene *lecs2* (de aproximadamente 900 pb). Todas as reações foram colocadas em um termociclador PTC-100 (MJ Researcher) em 50 µL de solução contendo 40 ng de cDNA, 60 mM Tris-SO₄ (pH 8,9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 250 nM de cada dNTP, 200 nM de cada primer e 5 U de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen). A reação ocorreu nas seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 5 min., 35 ciclos (95°C por 1 min., 55°C por 1 min, 68°C por 1 min.) e um ciclo de elongação final (68°C por 5 min.). Os fragmentos foram clonados separadamente no vetor pGEM-T-Easy (Promega) e seqüenciados com os primers universais M13 e T7 em um seqüenciador automático (ABI Prism 3700).

Após verificados no seqüenciamento, cada fragmento foi então digerido com enzimas de restrição específicas: LeCS1 com as enzimas *KpnI* e *NcoI* e LeCS2 com *KpnI* e *SacI*. Ambos os fragmentos foram ligados com T4 DNA ligase para se obter o inserto LeCS1-2.

O vetor pRL1000 e o inserto LeCS1-2 foram então digeridos com a enzima de restrição *PstI* e ambos foram ligados, sendo obtido assim o vetor policistrônico de transformação por bombardeamento pLeCS (fig. 12). No vetor policistrônico um promotor (*LsPrnn*) é capaz de codificar a síntese de uma molécula de RNAm, que possui a informação para a produção de duas ou mais proteínas (AadA e LeCS), que poderão ser geradas ao mesmo tempo.

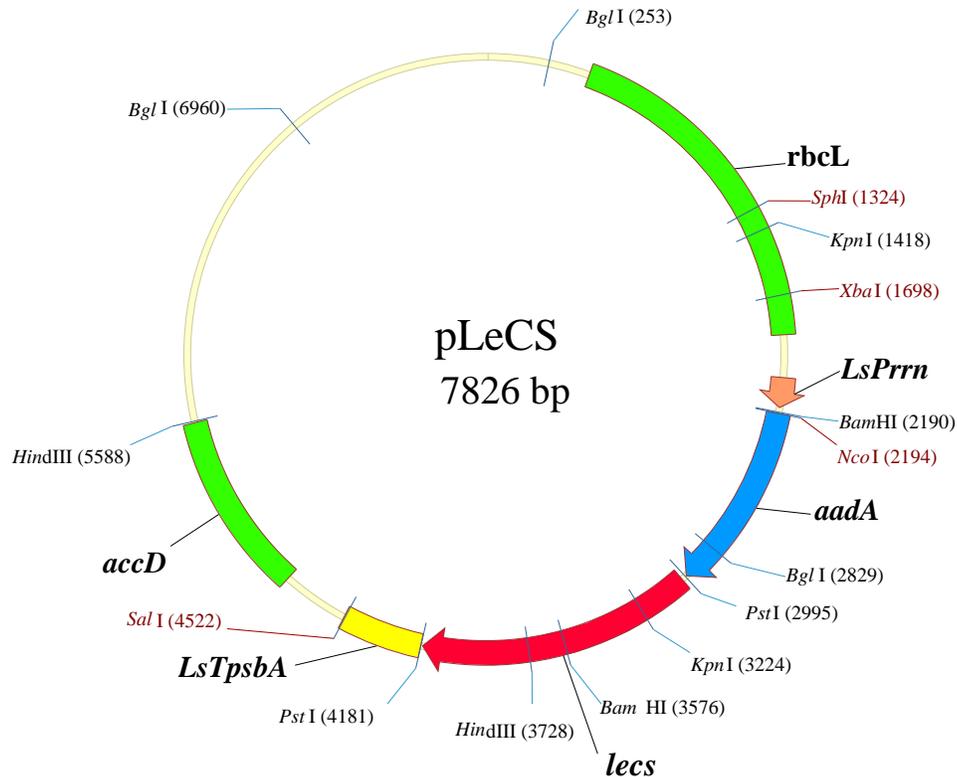


Fig. 12 - Vetor de transformação plastidial pLeCS para bombardeamento de folhas de alface. Contém cassete de expressão do gene *aadA* que confere resistência ao antibiótico espectinomicina, sob o controle de elementos regulatórios de plastídio de alface, especialmente o promotor do operon RNA ribossomal 16S (*LsPrrn*) fusionado e o terminador do gene *psbA* de alface (*LsTpsbA*).

3.2.2. Otimização dos parâmetros de transformação cloroplasmática por biobalística

Folhas jovens de alface (3 a 4 semanas de idade) crescidas em meio estéril, foram organizadas, de 6 em 6, em placa de Petri de bombardeamento (pequenas), com o lado adaxial para cima, contendo meio de regeneração (meio MS 3% de sacarose suplementado com 0,1 mg/L de ácido naftaleno acético (NAA), 0,1 mg/L de BAP e 0,6% de ágar, pH 5,8 e autoclavado a 121°C por 20 minutos). Após um dia de incubação no meio de regeneração, as folhas foram bombardeadas usando micropartículas cobertas com DNA do vetor pBI 426 com o uso de um acelerador de micropartículas que utiliza alta pressão de gás hélio.

Foram realizados 4 experimentos diferentes, sendo 3 bombardeamentos em cada, com 6 explantes por bombardeamento, conduzidos em condições controladas: umidade relativa do laboratório em 40%, distância de 8 milímetros (mm) entre a

câmara de gás a alta pressão (gerador de onda de choque) e a membrana carreadora contendo as micropartículas cobertas de DNA, distância de 13 mm entre a membrana carreadora e a tela de retenção, distância de 80 mm entre a tela de retenção e o material a ser bombardeado, pressão de vácuo de 27 polegadas de mercúrio.

No primeiro experimento utilizou-se uma pressão de gás hélio de 800 psi, com partículas de tungstênio de 0,2 µm de diâmetro (M5). No segundo, utilizou-se uma pressão de 800 psi e partículas de tungstênio de 1 µm de diâmetro (M10). No terceiro experimento, utilizou-se pressão de 1200 psi, com partículas M5, e no quarto, pressão de 1200 psi com partículas M10 de tungstênio.

Após o bombardeamento, os explantes foram levados à sala de cultivo, onde ficaram por 24 horas. Transcorrido este tempo, foram transferidos para placa de ELISA com 2 mL de tampão de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurônico (X-gluc) [100 mM NaH₂PO₄.H₂O, 0,5 mM K₄Fe(CN)₆.3H₂O, 10 mM Na₂EDTA.2H₂O, 0,1% Triton X-100, 0,1% de X-gluc a 50 mg/mL diluído em dimetilsulfóxido (DMSO)] para cada grupo de folhas bombardeadas (6 folhas bombardeadas por tiro). Os explantes foram colocados no escuro a 37°C por 16 horas. O tampão de reação foi retirado e 3 mL de etanol 70% foi adicionado em cada grupo de folhas, para interromper a reação, retirar a clorofila e permitir melhor visualização da cor azul, colocados por 16 horas à temperatura ambiente. Após este tempo o etanol foi retirado e água foi adicionada. Os explantes foram analisados em uma lupa marca Zeiss modelo Stemi SV11 (Alemanha) com um aumento de 40 vezes e a quantidade de pontos azuis gerados em cada tiro foram contados.

3.2.3. Transformação cloroplasmática por bombardeamento e regeneração das plantas

As sementes de alface da cv. Verônica tiveram sua tensão superficial reduzida pela lavagem em solução de *tween* 20 em água destilada autoclavada. Em seguida as sementes foram desinfestadas por 15 minutos em solução de 1% de hipoclorito de sódio. Foram realizadas ainda três lavagens sucessivas com água autoclavada, e a semeadura foi feita em placa de Petri contendo 25 mL do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com 3% de sacarose e 0,6% de ágar (pH 5,8). O meio foi então esterilizado em autoclave a 1 atmosfera de pressão e 121°C por 20 minutos. A

germinação se deu em sala de crescimento com lâmpadas fluorescentes, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25°C.

Com os parâmetros estabelecidos, folhas jovens (3 a 4 semanas de idade) foram organizadas em novas placas de Petri de bombardeamento, com o lado adaxial para cima, contendo meio de regeneração (meio MS com 3% de sacarose suplementado com 0,1 mg/L de NAA, 0,1 mg/L de BAP e 0,6% de ágar, pH 5,8 e autoclavado). Após um dia de incubação no meio de regeneração, grupos de 6 folhas foram bombardeadas usando micropartículas de tungstênio WP-100 (Atlantic Equipment Enginners, Bergenfield, NJ, USA) de 1 µm de diâmetro cobertas com o vetor pLeCS com o uso de um acelerador de micropartículas que utiliza alta pressão de gás hélio.

Foram feitos 18 experimentos, de 12 bombardeamentos cada, com 6 explantes em cada bombardeamento, sendo que os bombardeamentos foram conduzidos em condições controladas de umidade relativa do laboratório inferior a 40%, distância de 8 mm entre a câmara de gás a alta pressão (gerador de onda de choque) e a membrana carreadora contendo as micropartículas com DNA, distância de 13 mm entre a membrana carreadora e a tela de retenção, distância de 80 mm entre a tela de retenção e o material a ser bombardeado, pressão de vácuo de 27 polegadas de Hg e pressão do gás hélio de 1200 psi.

Dois dias após o bombardeamento, as folhas foram cortadas em pequenos pedaços (4 x 4 mm) e colocadas com o lado adaxial para baixo, em contato com novo meio de regeneração, contendo desta vez 50 mg/L de espectinomicina (antibiótico seletivo), 500 mg/L de PVP para evitar o escurecimento do meio pela oxidação de compostos fenólicos, 3% de sacarose, 0,6% de ágar, 0,1 mg/L de NAA, 0,1 mg/L de BAP e pH 5,8.

Após o início do aparecimento das radículas, cerca de dois meses após a transformação, as plantas regeneradas foram transferidas para o meio com a metade de sais do meio MS e metade da concentração de sacarose, contendo ainda 0,6% de ágar, 0,1 mg/L de NAA e 50 mg/L de espectinomicina, para induzir o enraizamento.

Depois de devidamente enraizadas, as plantas foram transplantadas para vermiculita e foram levadas à casa de vegetação por 7 dias. Após esse período as mudas foram transferidas para vaso com terra, mantidas na casa de vegetação, onde permaneceram com irrigações diárias até o florescimento e produção das sementes.

3.2.4. Confirmação da inserção do transgene

Durante o período de aclimação das plantas, análises para confirmação da integração do transgene no cloroplasto da planta e para quantificação de folato no tecido vegetal foram realizados.

3.2.4.1. Extração de DNA genômico das plantas para análise por PCR

O DNA foi isolado de discos foliares de acordo com Doyle e Doyle (1987). Descrito no Capítulo 2, ítem 2.2.2.1. Extração de DNA genômico das plantas para análise por PCR.

3.2.4.2. A PCR

A PCR foi realizada de acordo com Bonfim et al. (2007), para a confirmação da inserção dos transgenes. Os primers específicos LeCSPSTF (5'GCTGCAGTTGTAGGGAGGGATTTATGGCTGGTAGTACATTTGG-3') e LeCSPSTSACR (5'-CGAGCTCTGCAG TCAGAGGGTAACCTC-3') foram utilizados para amplificar uma seqüência de aproximadamente 1.100 pb correspondente ao gene *LeCS*. As amostras foram colocadas no termociclador onde foram tratadas a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de amplificação (95°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min.) com um ciclo final de 72°C por 7 min., terminando a 4°C.

Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) preparado com tampão TBE 1X (10,8 g de Tris base, 5,5 g de ácido bórico e 4 mL de EDTA 500 mM, pH 8,0, em q.s.p. 1 L de água destilada) e corado com 1 mg/100 mL de brometo de etídeo. As bandas foram visualizadas e fotografadas com o auxílio do Gel Doc 2000™ (Biorad).

3.2.5. Análise de folato em plantas pelo método microbiológico

A quantificação de folato foi realizada nas linhagens ABD12-1, ABD12-2 e ABD18, plantas positivas para o transgene *LeCS* que tiveram o seu teor de folato quantificado pelo método microbiológico, mediado por *L. rhamnosus* (ATCC 7469),

conforme descrito no Capítulo 2 (ítem 2.2.4 Análise de folato em plantas pelo método microbiológico).

Os dados foram comparados sempre aos dos controles (plantas não transformadas) e espinafre, por conter altas concentrações da vitamina. Os dados foram então cruzados com os dados da curva de crescimento do microorganismo, obtida por diluição seriada de ácido fólico como descrito no Capítulo 2 (ítem 2.2.4.4. Quantificação de folato em folhas de alface).

Uma regressão polinomial, com auxílio do programa Excel, permitiu cruzar os dados obtidos na curva com os dados das plantas, para obter a quantidade de folato equivalente nestas plantas de acordo com o crescimento da bactéria observado.

3.3. Resultados & Discussão

No experimento para otimização dos parâmetros de bombardeamento das folhas de alface, os dados gerados podem ser visualizados na tabela 2, onde estão representados os ensaios usando pressões de 800 ou de 1.200 psi, com micropartículas de tungstênio de 0,2 μm de diâmetro (M5) ou de 1 μm de diâmetro (M10). Os dados foram conseguidos por meio da contagem dos pontos azuis existentes nas folhas de alface após o bombardeamento com o vetor pBI 426. Em cada experimento, realizado em triplicata, 6 explantes foram bombardeados, dando um total de 18 explantes por experimento. Entre 9 e 105 pontos de expressão do gene *gus* puderam ser visualizados por experimento nas folhas de alface (fig. 13).

Tabela 2. Números de pontos azuis obtidos na expressão transiente do gene *gus* em folhas de alface, foram usadas pressões de 800 e 1200 psi e partículas M5 e M10.

	Número de pontos azuis			
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Triplicata	800 psi / M5	800 psi / M10	1200 psi / M5	1200 psi / M10
1	4	7	1	64
2	8	28	2	41
3	5	66	6	0

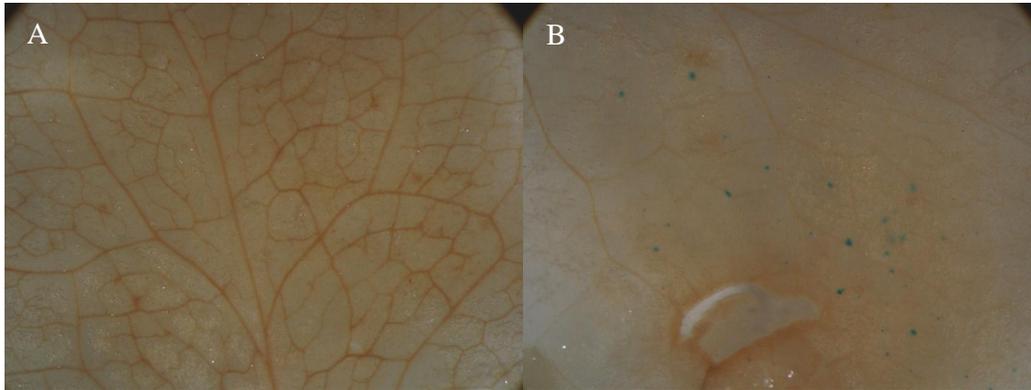


Fig. 13 - Folhas de alfaca após o experimento com gene *gus*. (A) não há expressão do gene *gus* (B) há uma grande concentração de pontos azuis, onde ocorreu a reação histoquímica.

Conforme descrito na tabela 2, os experimentos utilizando partículas de tungstênio de 1 μm (M10) e pressões de gás hélio de 800 e 1200 psi apresentaram os valores mais elevados de número de pontos azuis. Kanamoto et al. (2006) usaram para a cultivar de alfaca var. Cisco uma pressão de 900 psi, com partículas de ouro de 0,6 μm de diâmetro, indicando que maiores diâmetros de partículas têm tido melhores resultados para folhas de alfaca, não se podendo afirmar o mesmo quanto à pressão usada, que parece não surtir diferenças significativas na eficiência do sistema. É importante notar também uma relação entre a espécie da planta e o tamanho de partícula a ser utilizada, uma vez que Svab e Maliga (1993) obtiveram alta frequência de transformação de tabaco (*Nicotiana tabacum*) utilizando partículas de tungstênio de apenas 0,1 μm de diâmetro. Por isso, foram escolhidas as condições de bombardeamento de 1200 psi e partículas M10 para a transformação de folhas de alfaca. Portanto, os demais experimentos visando inserir o gene de interesse foram conduzidos nessas condições (tabela 2).

Uma semana após a transferência dos explantes para meio seletivo, estes formaram um calo esbranquiçado. De 4 a 6 semanas após a passagem para o meio de seleção, começaram a surgir pequenos brotos verdes (fig. 14), que foram então transferidos para meio de enraizamento. Depois da planta formada, esta foi transferida para vermiculita e finalmente para o solo.

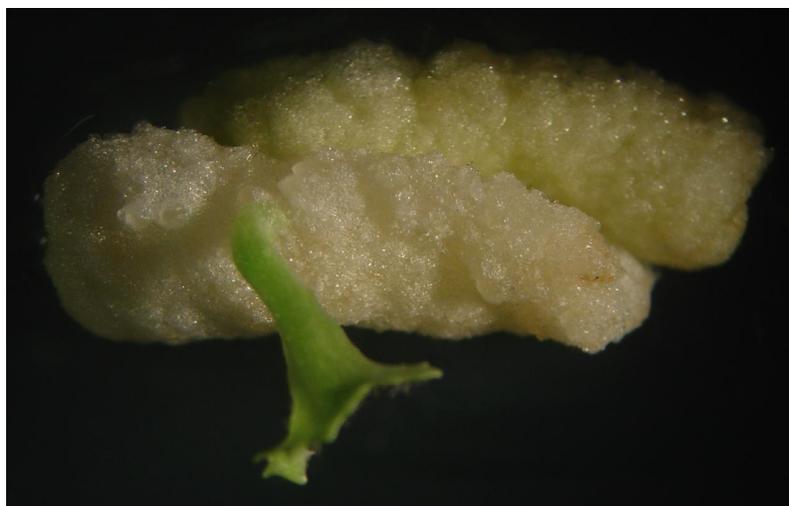


Fig. 14 - Broto da planta ABD8, 5 semanas após o bombardeamento, saindo de uma intensa massa branca de células.

Nos 18 experimentos realizados, com 12 bombardeamentos cada, foram dados 216 tiros, e bombardeados 1.296 explantes, sendo obtidas 4 linhagens de plantas (uma linhagem transgênica em 54 tiros). A primeira foi regenerada do oitavo experimento (ABD8). Depois, mais duas plantas do experimento 12 foram obtidas (ABD12-1 e ABD12-2). No último experimento, mais uma planta foi gerada (ABD18). Apesar da baixa frequência de produção em alface, o baixo número de transformantes por experimento não é incomum. Na transformação de plastídeos de tabaco (*Nicotiana tabacum*), Svab & Maliga (1993) obtiveram 1-15 linhagens transgênicas por bombardeamento. Porém, na transformação de folhas de *Arabidopsis* uma linhagem transgênica foi obtida em 100 tiros (Sikdar et al., 1998), uma linhagem foi obtida em 35 tiros de batata (*Solanum tuberosum*) (Sidorov et al., 1999) e uma planta transgênica a cada 20 tiros de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Ruf et al., 2001). Logo, entre as plantas superiores a transformação de plastídeos seria viável habitualmente apenas para o tabaco, que é a planta que apresenta maior eficiência na transformação, por isso, há ainda a necessidade de se desenvolver métodos mais eficientes de transformação de cloroplastos de alface.

Durante a regeneração das plantas não se notou o escurecimento do meio de cultura, como relatado por Kanamoto et al. (2006), porque foram adicionados ao meio 500 mg/L de PVP. Já foi notório o escurecimento dos calos não transformados após 2 meses no meio de cultura; primeiramente todos se tornavam brancos, e aqueles que não se desenvolveram tornaram-se marrons, momento em que foram eliminados.

As plantas ABD positivas para o transgene *lecs* apresentaram um desenvolvimento normal na casa de vegetação, sementes foram geradas, e as progênies avaliadas se mostraram também positivas quanto à integração do gene exógeno. Testes quanto à segregação do gene continuam sendo efetuados no laboratório; toda a progênie tem sido avaliada por PCR (fig. 15).

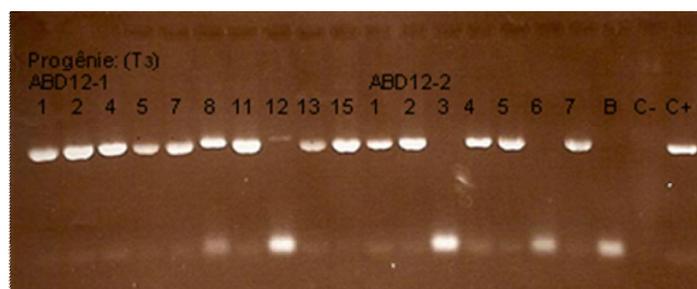


Fig. 15 - Eletroforese em gel de agarose 12% mostrando os fragmentos de 1.100 pb amplificados por PCR do gene *lecs* de algumas plantas T₃. Linha 1 a 10: fragmento do DNA amplificado por PCR das plantas filhas da ABD12-1; linha 11 a 17: fragmento das plantas filhas da ABD12-2, linha 18: branco, linha 19: controle negativo (planta não transgênica) e linha 20: controle positivo, vetor utilizado na transformação diluído 1.000 vezes.

Algumas plantas filhas, porém, demonstraram quantidade anormal de flores e sementes, além de um crescimento pronunciado. Três linhagens apresentaram um número muito superior de flores por planta (cerca de 3 a 5 vezes). Quanto a essas anomalias têm-se realizado outras análises, como a quantificação de AIA (ácido indol acético), pois possivelmente esteja ocorrendo um desvio do corismato para a via metabólica do triptofano, que é um precursor do hormônio AIA, uma auxina envolvida com a regulação do crescimento da planta, dominância apical, formação de raízes adventícias e florescimento (Altamura & Tomassi, 1998; Salisbury, 1955).

Para a quantificação de folato, calcularam-se os valores equivalentes de cada medida observada nas plantas usando a equação gerada no programa Excel ($y = -3,6139x^3 + 4,4752x^2 - 1,1239x + 0,0815$; $R^2 = 0,9999$). Estes valores foram então transformados para ng/μg de tecido fresco. Em seguida, dividiu-se pela quantidade de proteína existente em cada poço da placa de ELISA (quantificado por Bradford). Por intermédio destas quantificações, as linhagens transgênicas mostraram um aumento no teor de folato de até 77,8% (fig. 16). Entretanto, esses aumentos não são estatisticamente significativos quando os dados são analisados com um teste t de Student ($P > 0,05$ versus controle).

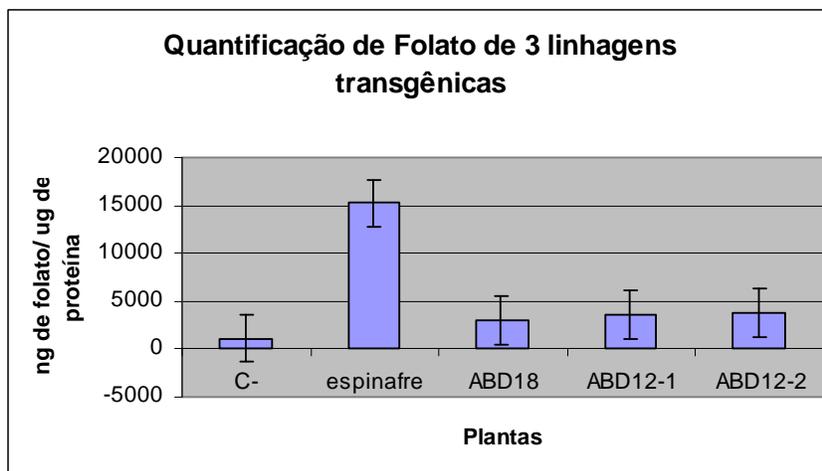


Fig. 16 - Quantificação de folato de três linhagens transgênicas (ABD18, ABD12-1 e ABD12-2), de planta de alface não transformada (controle negativo) e de planta de espinafre, por conter alto teor de folato, os valores são fornecidos em ng de folato/ μ g de proteína total. As respectivas barras de erro estão representadas.

De La Garza et al. (2004), ao transformarem tomate, conseguiram um aumento de duas a três vezes nas concentrações de folato em relação ao controle, após a alteração da via das pterinas. Os autores sugeriram que o baixo aumento deveu-se principalmente à diminuição nos níveis de pABA verificado nas plantas transformadas, sendo este um fator limitante à expressão eficaz do *gchl* (*GTP ciclohidrolase I*).

De la Garza et al. (2004) reportaram um aumento de até 20 vezes em relação ao controle nos níveis de pABA em tomate, ao superexpressarem *adcs*. Porém, este aumento de pABA não repercutiu em aumento significativo nos níveis de folato dos frutos. Quando duas linhagens modificadas foram cruzadas (as que expressaram *adcs* e as que expressaram *gchl*), o nível de folato nos frutos aumentou em cerca de 25 vezes em relação ao controle (De La Garza et al., 2007).

Os níveis de folato quantificados para as plantas transformadas com o vetor *lecs* foram inferiores ao esperado, mas não se pode compará-los a outros estudos, pois estes foram conduzidos com outras vias metabólicas e visando um aumento nos níveis de folato em frutos e não em folhas. A hipótese de que parte do aumento ocasionado pela transformação nos níveis de corismato esteja sendo usado para a formação de alcalóides e outros compostos aromáticos ainda deverá ser avaliada. Como comentado anteriormente, em plantas, resíduos de aminoácidos aromáticos produzidos pela via metabólica do *lecs* servem como precursores para vários metabólitos secundários, como AIA, indol alcalóides, fenilpropanóides e flavonóides (Herrmann, 1995). Mais

de 90% destes resíduos de aminoácidos são usados pelas bactérias para síntese de proteínas (Dixon & Paiva, 1995). A caracterização da via metabólica do chiquimato (via do pré-corismato) e do corismato é, portanto importante na elucidação e engenharia genética de metabolismos secundários em plantas (Pascal et al., 2004). Certos metabólitos secundários, incluindo fenilpropanóides e flavonóides, têm importante papel no sistema de defesa das plantas (Dixon & Paiva, 1995; Dixon & Steele, 1999) e o AIA é importante na produção de flores e conseqüentemente, sementes. Por isso, há a possibilidade da via do *lecs* para a síntese de folato estar sendo desviada para a síntese de auxina, com efeito no desenvolvimento de meristemas florais, o que explicaria em parte a baixa quantificação de folato nas plantas ABD e o alto número de flores. Caso este dado venha a ser confirmado nos ensaios que estão em andamento, há um grande interesse na inserção deste vetor em plantas produtoras de flores ornamentais e plantas produtoras de sementes importantes para a alimentação humana e animal, ou com interesse agronômico.

Capítulo 4

Conclusões & Perspectivas

Como esperado um aumento no teor de folato foi obtido nas plantas geneticamente modificadas expressando o gene *gchl*. Com este resultado plantas de alface fortificadas obtidas neste trabalho fornecerão 26% da IDR de folato para adultos (400 µg/dia para um adulto) pela ingestão diária de uma porção regular (56 g ou uma xícara de chá, de acordo com *USDA National Nutrient*) de folhas destas alfaces.

As linhagens geradas poderão ser inseridas em um programa de melhoramento genético para que essa característica seja transferida para outras variedades. Além disso, linhagens com alto teor de folato devem ser submetidas as análises de biossegurança para que, no futuro, seja possível a avaliação de liberação de um produto comercial que certamente teria um impacto positivo na saúde humana.

Ainda, o aumento de folato obtido poderá ser maior com a manipulação da via de síntese de pABA. Nesse trabalho, essa via foi manipulada pela expressão do gene de uma corismato sintase nos cloroplastos. Entretanto, não se obteve o aumento esperado nas linhagens obtidas. Isto pode ocorrer devido ao desvio da via metabólica de síntese de corismato para síntese de auxinas (por exemplo, AIA) e não para a síntese de folato, como se esperava. Novos estudos deverão ser realizados para que se possa compreender o que foi observado nesse trabalho. Essa compreensão ainda depende de um maior conhecimento do controle das rotas metabólicas do chiquimato e pABA em cloroplastos. Se for comprovado o desvio da via metabólica do corismato para AIA haverá o interesse na inserção deste vetor, com as modificações necessárias, para o aumento da produção de flores, no caso de plantas ornamentais ou na produção de sementes e grãos em cultivares de interesse agrônomico ou consumidos por humanos e animais.

Provalmente um maior teor de folato poderá ser obtido com a expressão de um gene de uma *aminodeoxicorismato sintase (adcs)*. Essa deverá ser a etapa seguinte nesse trabalho. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com aqueles

observados na literatura, os quais estabelecem uma necessidade de síntese tanto da via do pABA quanto da via das pterinas, simultaneamente, para se ter plantas com maior quantificação de folatos se comparado ao aumento obtido com a superexpressão de cada substrato da via metabólica isoladamente. Em tomates houve um aumento de apenas duas vezes quando superexpressou-se apenas um gene da via metabólica das pterinas, e pABA mostrou-se um fator limitante para uma maior quantificação nos níveis de folato (De La Garza et al., 2004). No entanto, um aumento de 25 vezes mais folato foi observado em plantas expressando os genes *gchI* e *AtADCS* quando comparado com plantas não transformadas, o que proveria a IDR total em menos de uma porção padrão de tomate para mulheres grávidas. Nestas frutas uma quantidade sete vezes superior de folato foi obtida em relação à plantas consideradas com alto teor de folato (De La Garza et al., 2007).

Com estes resultados será possível produzir plantas convencionalmente, cruzando as plantas que mais produzirem pABA (*lecs* ou *adcs*) com as que mais produzirem pterinas (*gchI*) para se obter uma planta elite, com maior quantidade de folato e então realizar um teste nutricional comparativo com a planta de alface elite e uma planta de alface não transformada para avaliação da biodisponibilidade de folato em animais (camundongos e/ou coelhos). Além disso, haverá a necessidade de quantificar os vários metabólitos da via de síntese de pterinas e pABA. Isso poderia lançar luz sobre como essas rotas são processadas em plantas, tanto no citoplasma quanto nas mitocôndrias e cloroplastos, além de possivelmente terem alguma relevância do ponto de vista de biossegurança. Já que níveis elevados de pterinas foram observados em plantas transformadas como tomate (aumento de 10 vezes no teor de pterinas) (De La Garza et al., 2004), arroz (25 vezes) (Storozhenko et al., 2007) e *Arabidopsis* (1.000 vezes) (Hossain et al., 2004) quando se objetivou aumentar o teor de folato. Este acúmulo não é interessante já que os efeitos do acúmulo de pterinas no organismo humano não são conhecidos e podem ter consequências para a saúde humana, devido ao importante papel das pterinas na fisiologia humana (De La Garza et al., 2004; Storozhenko et al., 2007).

Referências Bibliográficas

- Abdullah, R., E.C., C. & Thompson, J. A. (1985). Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. *Bio/Technology* **4**, 1087-1090.
- Abramsky, L., Botting, B., Chapple, J. & Stone, D. (1999). Has advice on periconceptional folate supplementation reduced neural-tube defects? *The Lancet* **354**, 998-999.
- Abu-Arish, A., Frenkiel-Krispin, D., Fricke, T., Tzfira, T., Citovsky, V., Wolf, S. G. & Elbaum, M. (2004). Three-dimensional Reconstruction of *Agrobacterium* VirE2 Protein with Single-stranded DNA. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 25359-25363.
- Allardet-Servent, A., Michaux-Charachon, S., Jumas-Bilak, E., Karayan, L. & Ramuz, M. (1993). Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *Journal of Bacteriology* **175**, 7869-7874.
- Altamura, M. M. & Tomassi, M. (1998). Auxin, photoperiod and putrescine affect flower neof ormation in normal and rolB-transformed tobacco thin cell layers. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**, 441-448.
- Amorin, L. (1995). Sobrevivência do inóculo. In "Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos" (A. Bergamin Filho, H. Kimati, e L. Amorin, Eds.), Vol. 1, pp. 246-267. Ed Agronômica Ceres, São Paulo.
- Andrade, G. M., Sartoretto, L. M. & Brasileiro, A. C. M. (2003). Biologia Molecular do Processo de Infecção por *Agrobacterium* spp. . *Fitopatologia Brasileira* **28**, 465-476.
- ANVISA (acessado em 01/04/2009). <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1679&word=fortifica%C3%A7%C3%A3o>.
- Aragão, F. J. L., Barros, L. M. G., Brasileiro, A. C. M., Ribeiro, S. G., Smith, F. D., Sanford, J. C., Faria, J. C. & Rech, E. L. (1996). Inheritance of foreign genes

- in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics* **93**, 142-150.
- Aragão, F. J. L. & Brasileiro, A. C. M. (2009). Introdução de genes em células vegetais mediada pelo processo biobalístico. In "Cultura in Vitro de Plantas" (L. Barrueto, Ed.). Embrapa, Brasília (*in press*).
- Aragão, F. J. L., Brasileiro, A. C. M., Ribeiro, S. G., Faria, J. C. & Rech, E. L. (1995). Inoculation of bean and soybean with cloned bean golden mosaic virus (BGMV) DNA using particle acceleration. *Fitopatologia Brasileira* **20**, 642-644.
- Aragão, F. J. L., Grossi de Sá, M., de Almeida, E. R., Gander, E. S. & Rech, E. L. (1992). Particle bombardment-mediated transient expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Molecular Biology* **20**, 357-359.
- Aragão, F. J. L., M.F., G. d. S., Davey, M. R., Brasileiro, A. C. M., Faria, J. C. & Rech, E. L. (1993). Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an electrical particle acceleration device. *Plant Cell Reports* **2**, 483-490.
- Aragão, F. J. L. & Rech, E. L. (1997). Morphological factors influencing recovery of transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of a carioca cultivar. *International Journal of Plant Sciences* **158**, 157-167.
- Aragão, F. J. L., Sarokin, L., Vianna, G. R. & Rech, E. L. (2000). Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theoretical and Applied Genetics* **101**, 1-6.
- Aragão, F. J. L., Vianna, G. R., Carvalheira, S. B. R. C. & Rech, E. L. (2005). Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule. *Plant Science* **168**, 1227-1233.
- Armaleo, D., Ye, G. N., Klein, T. M., Shark, K. B. & Sanford, J. C. (1990). Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Current Genetics* **17**, 97-103.
- Bailey, A. M., Mena, G. L. & Herrera-Estrella, L. (1993). Transformation of four pathogenic *Phytophthora* spp. by microparticle bombardment on intact mycelia. *Current Genetics* **23**, 42-46.

- Balen, B. & Krsnik-Rasol, M. (2007). N-Glycosylation of recombinant therapeutic glycoproteins in plant systems. *Food Technology and Biotechnology* **45**, 1-10.
- Barkai, G., Arbusova, S., Berkenstadt, M., Heifetz, S. & Cuckle, H. (2003). Frequency of Down's syndrome and neural-tube defects in the same family. *The Lancet* **361**, 1331-1335.
- Barreto, C. C., Alves, L. C., Aragão, F. J. L., Rech, E. L., Schrank, A. & Vainstein, M. H. (1997). High frequency gene transfer by microprojectile bombardment of intact conidia from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *FEMS Microbiology Letters* **156**, 95-99.
- Barros, L. M. G., Vianna, A. A. B. & Carneiro, M. (2004). Aprendendo com as Agrobactérias. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento* **32**, 15-27.
- Basset, G., Quinlivan, E. P., Ziemak, M. J., De La Garza, R. D., Fischer, M., Schiffmann, S., Bacher, A., Gregory III, J. F. & Hanson, A. D. (2002). Folate synthesis in plants: The first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**, 12489–12494.
- Basset, G. J. C., Ravel, S., Quinlivan, E. P., White, R., Giovannoni, J. J., Rébeillé, F., Nichols, B. P., Shinozaki, K., Seki, M., Gregory III, J. F. & Hanson, A. D. (2004). Folate synthesis in plants: the last step of the p-aminobenzoate branch is catalyzed by a plastidial aminodeoxychorismate lyase. *The Plant Journal* **40**, 453-461.
- Beriam, L. O. S., Malavolta Jr., V. A. & Robbs, C. F. (1996). Considerações sobre o gênero *Agrobacterium*. In "Revisão Anual de Patologia de Plantas" (W. C. Luz, e J. M. C. Fernandes, Eds.), Vol. 4. EMBRAPA - CNPTrigo, Passo Fundo.
- Beyer, P., Al-Babili, S., Ye, X., Lucca, P., Schaub, P., Welsch, R. & Potrykus, I. (2002). Golden rice: introducing the b-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *The Journal Nutrition* **132**, 506S–510S.
- Bidney, D., Scelonge, C., Martich, J., Burrus, M., Sims, L. & Huffman, G. (1992). Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology* **18**, 301-313.

- Birch, R. G. & Franks, T. (1991). Development and optimisation of microprojectile systems for plant genetic transformation. *Australian Journal of Plant Physiology* **18**, 453-469.
- Birky, C. W. (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics* **35**, 125-148.
- Bogo, M. R., Vainstein, M. H., Aragão, F. J. L., Rech, E. L. & Schrank, A. (1996). High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters* **142**, 123-127.
- Bonfim, K., Faria, J. C., Nogueira, E. O. P. L., Mendes, E. A. & Aragão, F. J. L. (2007). RNAi-mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 717-726.
- Bouis, H. E., Chassy, B. M. & Ochanda, J. O. (2003). Genetically modified food crops and their contribution to human nutrition and food quality. *Trends in Food Science and Technology* **14**, 191-209.
- Boushey, C. J., Beresford, S. A., Omenn, G. S. & Motulsky, A. G. (1995). A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: Probable benefits of increasing folic acid intakes. *Journal of the American Medical Association* **274**, 1049-1057.
- Boynton, J. E., Gillham, N. W., Harris, E. H., Hosler, J. P., Johnson, A. M., Jones, A. R., Randolph-Anderson, B. L., Robertson, D., Klein, T. M., Shark, K. B. & Sanford, J. C. (1988). Chloroplast transformation of *Chlamydomonas* using high velocity microprojectiles. *Science* **240**, 1534-1538.
- Brasileiro, A. C. M. (2001). Plantas Transgênicas: as Novas Ferramentas para a Agricultura. *Humanidades* **48**, 100-109.
- Brasileiro, A. C. M. & Aragão, F. J. L. (2009). O Sistema Agrobacterium: do solo para o laboratório. In "Cultura in Vitro de Plantas" (L. Barrueto, Ed.). Embrapa, Brasília (*in press*).
- Brasileiro, A. C. M., Aragão, F. J. L., Rossi, M. S., Dusi, D. M. A., Barros, L. M. G. & Rech, E. L. (1996). Suceptibility of common and therapy beans to Agrobacterium spp. atrais and improvement of Agrobacteriummediated transformation using microprojetele bombardment. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **121**, 810-815.

- Brasileiro, A. C. M. & Cançado, G. M. A. (2000). Plantas transgênicas. *Informe Agropecuário* **21**, 28-35.
- Brasileiro, A. C. M. & Carneiro, V. T. C. (1998). "Manual de transformação genética de plantas." (Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Ed.) Brasil, Brasília.
- Brasileiro, A. C. M. & Lacorte, C. (2000). *Agrobacterium*: um sistema natural de transferência de genes para plantas. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento* **15**, 12-15.
- Braun, A. C. (1958). A physiological basis for autonomous growth of the crown-gall tumor cell. *Proc Natl Acad Sci USA* **44**, 344–349.
- Brinch-Pedersen, H., Hatzack, F., Sørensen, L. D. & Holm, P. B. (2003). Concerted action of endogenous and heterologous phytase on phytic acid degradation in seed of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Transgenic Research* **12**, 649–659.
- Brouwer, I. A., Dusseldorp, M. v., Thomas, C. M. G., Duran, M., Hautvast, J. G. A. J., Eskes, T. K. A. B. & Steegers-Theunissen, R. P. M. (1999). Low-dose folic acid supplementation decreases plasma homocysteine concentrations: a randomized trial. *American Journal of Clinical Nutrition* **69**, 99-104.
- Buchanan, B., Gruissem, W. & Jones, R. L. (2002). "Biochemistry & Molecular Biology of plants." first ed. Wiley.
- Bulgakov, V. P., Kiselev, K. V., Yakovlev, K. V., Zhuravlev, Y. N., Gontcharov, A. A. & Odintsova, N. A. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of sea urchin embryos. *Biotechnology Journal* **1**, 454-461.
- Burkhalter, A. & Bernardo, K. L. (1989). Organization of corticocortical connections in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 1071-1075.
- Buysschaerta, M., Galab, J. L., Bessomoa, A. & Hermans, M. P. (2004). C677T methylene-tetrahydrofolate reductase mutation in type 2 diabetic patients with and without hyperhomocysteinaemia. *Diabetes & Metabolism* **30**, 349-354.
- Calegario, R. F., Ferreira, S. S., Andrade, E. C. & Zerbini, F. M. (2007). Characterization of Tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **42**, 1335-1343.
- Cantu, C., Alonso, E., Jara, A., Martínez, L., Ríos, C., Fernández, M. d. I. A., Garcia, I. & Barinagarrementeria, F. (2004). Hyperhomocysteinemia, Low Folate and Vitamin B12 Concentrations, and Methylene Tetrahydrofolate Reductase Mutation in Cerebral Venous Thrombosis. *Stroke* **35**, 1790-1794.

- Cascales, E. & Christie, P. J. (2004). *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 17228-17233.
- Cavara, F. (1897). Tubercolosi della vite. Intorno alla eziologia de alcune malattie di piante coltivate. *Stazioni Sperimentale Agrarie Italiane* **30**, 483-487.
- Cha, K. W., Jacobson, K. B. & Yim, J. J. (1991). Isolation and Characterization of GTP Cyclohydrolase I from Mouse Liver – Comparison of normal and the hph-1 mutant. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 12294-12300.
- Chang, D. C. (1989). Cell poration and cell fusion using an oscillating electric field. *Biophysics Journal* **56**, 641-652.
- Cheng, F. M. & Joho, K. E. (1994). Effect of Biolistic particle size on the efficiency of transfection of oocytes in *Xenopus* ovary tissue. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3265-3266.
- Chiera, J. M., Finer, J. & Grabau, E. (2004). Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability. *Plant Mol. Biol.* **56**, 895-904.
- Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* **11**, 263-271.
- Christie, P. J. (2004). Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochimica et Biophysica Acta* **1694**, 219-234.
- Christie, P. J., Ward, J. E., Winans, S. C. & Nester, E. W. (1988). The *Agrobacterium tumefaciens* virE2 gene product is a single-stranded-DNA-binding protein that associates with T-DNA. *Journal of Bacteriology* **170**, 2659-2667.
- Christou, P. (1993). Philosophy and practice of variety-independent gene transfer *Biobalística 778* into recalcitrant crops. *In vitro Cellular and Developmental Biology* **29**, 119-124.
- Christou, P. (1995). Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. *Euphytica* **85**, 13-27.
- Citovsky, V., Lee, L.-Y., Vyas, S., Glick, E., Chen, M.-H., Vainstein, A., Gafni, Y., Gelvin, S. B. & Tzfira, T. (2006). Subcellular localization of interacting proteins by bimolecular fluorescence complementation in planta. *Journal of Molecular Biology* **362**, 1120-1131.

- Citovsky, V., Wong, M. L. & Zambryski, P. (1989). Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA: Implications for the T-DNA transfer process. *Biochemistry* **86**, 1193-1197.
- Citovsky, V. & Zambryski, P. (1993). Transport of nucleic acids through membrane channels: snaking through small holes. *Annual Review of Microbiology* **47**, 167-197.
- Clarke, R., Smith, A. D., Jobst, K. A., Refsum, H., Sutton, L. & Ueland, P. M. (1998). Folate, vitamin B12 and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* **55**, 1449–1455.
- Connolly, E. L., Campbell, N. H., Grotz, N., Prichard, C. L. & Guerinot, M. L. (2003). Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiology* **133**, 1102–1110.
- Cossins, E. A. (2000). The fascinating world of folate and one-carbon metabolism. *Canadian Journal of Botany* **78**, 691-708.
- Cossins, E. A. & Chen, L. (1997). Foliates and one-carbon metabolism in plant and fungi. *Phytochemistry* **45**, 437-452.
- Couto, E., Barini, R., Nomura, M. L. & Annichino-Bizzacchi, J. M. (2002). Methylene tetrahydrofolate reductase gene mutation together with anticardiolipin antibody during pregnancy: a case report. *São Paulo Medical Journal* **120**, 152-153.
- Cuskelly, G. J., McNulty, H. & Scott, J. M. (1999). Fortification with low amounts of folic acid makes a significant difference in folate status in young women: implications for the prevention of neural tube defects. *American Journal of Clinical Nutrition* **70**, 234-239.
- Cutter, E. G. (1965). Recent experimental studies of the shoot apex and shoot morphogenesis. *Botanical Review* **31**, 7-113.
- Dafny-Yelin, M., Levy, A. & Tzfira, T. (2008). The ongoing saga of *Agrobacterium*-host interactions. *Trends in Plant Science* **13**, 102-105.
- Dang, J., Arcot, J. & Shrestha, A. (2000). Folate retention in selected processed legumes. *Food Chemistry* **68**, 295-298.
- Daniell, H., Krishnan, M. & McFadden, B. F. (1991). Transient expression of beta-glucuronidase in different cellular compartments following biolistic delivery of foreign DNA into wheat leaves and calli. *Plant Cell Reports* **9**, 615-619.

- Datla, R. S. S., Hammerlindl, J. K., Pelcher, L. E., Crosby, W. L. & Selvaraj, G. (1991). A bifunctional fusion between b-glucuronidase and neomycin phosphotransferase: a broad-spectrum marker enzyme for plants. *Gene* **101**, 239-246.
- Davies, K. M. (2007). Genetic modification of plant metabolism for human health benefits. *Mutation Research-fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis* **622**, 122-137.
- De Cleene, M. & De Ley, J. (1976). The host range of crown gall. *Botanical Review* **42**, 389-464.
- De Cosa, B., Moar, W., Lee, S.-B., Miller, M. & Daniell, H. (2001). Overexpression of Bt Cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnology* **19**, 71-74.
- De La Garza, R. D., Quinlivan, E. P., Klaus, S. M. J., Basset, G. J. C., Gregory III, J. F. & Hanson, A. D. (2004). Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch of folate synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 13720-13725.
- De La Garza, R. I. D., Gregory III, J. F. & Hanson, A. D. (2007). Folate biofortification of tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**, 4218-4222.
- Dessaux, Y., Petit, A. & Tempé, J. (1993). Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism. *Phytochemistry* **34**, 31-38.
- DeVries, J. W., Keagy, P. M., Hudson, C. A. & Rader, J. I. (2001). AACC collaborative study of a method for determining total folate in cereal products - microbiological assay using trienzyme extraction (AACC method 86-47). *Cereal Foods World* **46**, 216-219.
- Dias, B. B. A., Cunha, W. G., Morais, L. S., Vianna, G. R., Rech, E. L., Capdeville, G. & Aragão, F. J. L. (2006). Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina sp.* in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* **55**, 187-193.
- Dixon, R. A. & Paiva, N. L. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell* **7**, 1085-1097.
- Dixon, R. A. & Steele, C. L. (1999). Flavonoids and isoflavonoids—a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science* **4**, 394-400.

- Douchkov, D., Gryczka, C., Stephan, U. W., Hell, R. & Bäumlein, H. (2005). Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Environment* **28**, 365–374.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* **19**, 11-15.
- Escobar, M. A. & Dandekar, A. M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science* **8**, 380-386.
- Eskes, T. K. A. B. (2000). From anemia to spina bifida – the story of folic acid – A tribute to Professor Richard Smithells. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology* **90**, 119-123.
- FAOSTAT (acessado em 15/02/2009). <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor>.
- Fava, M., Borus, J. S., Alpert, J. E., Nierenberg, A. A., Rosenbaum, J. F. & Bottiglieri, T. (1997). Folate, vitamin B12 and homocysteine in major depressive disorders. *American Journal Psychiatry* **154**, 426–428.
- Faßbender, K., Mielke, O., Bertsch, T. & Hennerici, M. (1999). Homocysteine in cerebral macroangiopathy and microangiopathy. *The Lancet* **353**, 1586–1587.
- Fernandes, G. W. A. & Martins, R. P. (1985). As galhas. *Ciência Hoje* **4**, 58-64.
- Filgueira, F. A. R. (2000). "Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças." third ed. UFV, Viçosa.
- Finer, J. J., Vain, P., Jones, M. W. & McMullen, M. D. (1992). Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Reports* **11**, 323-328.
- Fitzpatrick, A. (2003). Folate (folic acid): Implications for health and disease. *Agrofood industry Hi-tech Special highlight: Folic Acid*, 4545-4548.
- Fromm, M. E., Taylor, L. P. & Walbot, V. (1985). Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cell by electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 5824-5828.
- Gal-On, A., Meiri, E., Elman, C., Gray, D. & Gaba, V. (1997). Simple hand-held devices for the efficient infection of plants with viral encoding constructs by particle bombardment. *Journal of Virological Methods* **64**, 103-110.

- Gallucci, M., Zanardo, A., De Valentin, L. & Vianello, A. (2004). Homocysteine in Alzheimer disease and vascular dementia. *Archives of Gerontology and Geriatrics* **38**, 195-200.
- Garzón-Tiznado, J. A., Torres-Pacheco, I., Ascencioibañez, J. T., Herrera-Estrella, L. & Riverabustamente, R. F. (1993). Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology* **83**, 514-521.
- Gelvin, S. B. (2000). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 223-256.
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 16-37.
- George, L., Mills, J. L., Johansson, A. L. V., Nordmark, A., Olander, B., Granath, F. & Cnattingius, S. (2002). Plasma Folate Levels and Risk of Spontaneous Abortion. *The Journal of the American Medical Association* **288**, 1867-1873.
- Gietl, C., Koukolikova-Nicola, Z. & Hohn, B. (1987). Mobilization of T-DNA from *Agrobacterium* to plant cells involves a protein that binds single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 9006-9010.
- Gilbertson, R. L., Farias, J. C., Hanson, S. F., Morales, F. J., Ahlquist, P., Maxwell, D. & Russell, D. R. (1991). Cloning of the complete DNA genomes of four bean-infecting geminiviruses and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration. *Phytopathology* **81**, 980-985.
- Gomes, A. M. A., Michereff, S. J., Mariano, R. d. L. R. & Rodrigues, V. J. L. B. (2006). Intensidade da cercosporiose da alface em cultivos convencionais e orgânicos em Pernambuco. *Summa phytopathologica* **32**, 384-385.
- Gomes, A. M. A., Silveira, E. B. & Mariano, R. L. R. (1998). O gênero *Agrobacterium* no Brasil. *Summa Phytopathologica* **24**, 197-203.
- Goto, F. & Yashihara, T. (2001). Improvement of micronutrient contents by genetic engineering. Development of high iron content crops. *Plant Biotechnology* **18**, 7-15.
- Goto, F., Yoshihara, T., Shigemoto, N., Toki, S. & Takaiwa, F. (1999). Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology* **17**, 282-286.

- Goto, R. & Tivelli, S. W. (1998). "Produção de hortaliças em ambiente protegido: Condições Subtropicais." first ed. Fundação Editora da UNESP, São Paulo.
- Grangeiro, L. C., Costa, K. R. d., Medeiros, M. A. d., Salviano, A. M., Negreiros, M. Z., Bezerra Neto, F. & Oliveira, S. L. d. (2006). Acúmulo de nutrientes por três cultivares de alface cultivadas em condições do Semi-Árido. *Horticultura Brasileira* **24**, 190-194.
- Gregory III, J. F., Sartain, D. B. & Day, B. P. F. (1984). Fluorometric Determination of Folic Acid in Biological Materials Using High Performance Liquid Chromatography. *The Journal of Nutrition* **114**, 341-353.
- Gregory, J. F., Engelhardt, R., Bhnadari, S. D., Sartain, D. B. & Gustafson, S. K. (1990). Adequacy of extraction techniques for determination of folate in foods and other biological materials. *Journal of Food Composition and Analysis* **3**, 134-144.
- Grusak, M. A. (2000). Strategies for improving the iron nutritional quality of seed crops: lessons learned from the study of unique ironhyperaccumulating pea mutants. *Pisum Genet* **32**, 1-5.
- Grutzendler, J., Tsai, J. & Gan, W.-B. (2003). Rapid labelling of neuronal populations by ballistic delivery of fluorescent dyes. *Methods in Cells Biology* **30**, 79-85.
- Guimarães, C. S., Lacorte, C. & Brasileiro, A. C. M. (2003). Transformação genética em espécies florestais. *Ciência Florestal* **13**, 167-178.
- Gupta, R. & Brunak, S. (2002). Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symposium on Biocomputing* **7**, 310-322.
- Hanson, A. D. & Gregory III, J. F. (2002). Synthesis and turnover of folates in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 244-249.
- Harrier, L. A. & Millam, S. (2001). Biolistic transformation of arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Biotechnology* **18**, 25-33.
- Helloco-Kervarrec, C., Riault, G. & Jacquot, E. (2002). Biolistic-mediated inoculation of immature wheat embryos with Barley yellow dwarf virus-PAV. *Journal of Virological Methods* **102**, 161-166.
- Herrera-Estrella, L., De Block, M., Messens, E., Hernalsteens, J. P., van Montagu, M. & Schell, J. (1983). Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO Journal* **2**, 987-995.

- Herrera-Estrella, L., Teeri, T. H. & Simpson, J. (1988). Use of reporter genes to study gene expression in plant cells. *In* "Plant Molecular Biology Manual" (S. B. G. R. A. Schilperoort, Ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Herrmann, K. M. (1995). The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic compounds. *The Plant Cell* **7**, 907-919.
- Herrmann, K. M. & Weaver, L. M. (1999). The Shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 473-503.
- Hess, S. Y., Zimmermann, M. B., Brogli, S. & Hurrell, R. F. (2001). A national survey of iron and folate status in pregnant women in Switzerland. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **71**, 268-273.
- Hesslinger, C., Kremmer, E., Hültner, L., Ueffing, M. & Ziegler, I. (1998). Phosphorylation of GTP cyclohydrolase I and modulation of its activity in rodent mast cells: GTP cyclohydrolase I hyperphosphorylation is coupled to high affinity IgE receptor signaling and involves protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 21616-21622.
- Hitz, W. D., Carlson, T. J., Kerr, P. S. & Sebastian, S. A. (2002). Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. *Plant Physiology* **128**, 650-660.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. & Schilperoort, R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**, 179-180.
- Holasová, M., Fiedlerová, V. & Vavreinová, S. (2008). Determination of folates in vegetables and their retention during boiling. *Czech Journal of Food Sciences* **26**, 31-37.
- Holm, P. B., Kristiansen, K. N. & Pedersen, H. B. (2002). Transgenic approaches in commonly consumed cereals to improve iron and zinc content and bioavailability. *The Journal of Nutrition* **132**, 514S-516S.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. & Williams, S. T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. *Baltimore: Williams & Wilkins*.
- Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S. & Hoekema, A. (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* **2**, 208-218.

- Hooykaas, P. J. J. & Beijersbergen, A. G. M. (1994). The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annual Review of Phytopathology* **32**, 157-179.
- Hooykaas, P. J. J. & Schilperoort, R. A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* **19**, 15-38.
- Hossain, T., Rosenberg, I., Selhub, J., Kishore, G., Beachy, R. & Schubert, K. (2004). Enhancement of folates in plants through metabolic engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 5158-5163.
- Howard, E. A., Zupan, J. R., Citovsky, V. & Zambryski, P. C. (1992). The VirD2 protein of *A. tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: implications for nuclear uptake of DNA in plant cells. *Cell* **68**, 109-118.
- Hyun, T. H. & Tamura, T. (2005). Trienzyme extraction in combination with microbiologic assay in food folate analysis: an updated review. *Society for Experimental Biology and Medicine* **230**, 444-454.
- Iida, A., Morikawa, H. & Yamada, Y. (1990). Stable transformation of cultured tobacco cells by DNA-coated gold particles accelerated by gas-pressure-driven particle gun. *Applied Microbiology and Biotechnology* **33**, 560-563.
- Ivo, N. L., Nascimento, C. P., Vieira, L. S., Campos, F. A. P. & Aragão, F. J. L. (2008). Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. *Plant Cell Reports* **27**, 1475-1483.
- Jain, A. K. & Nessler, C. L. (2000). Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Molecular Breeding* **6**, 73-78.
- James, S. J., Pogribna, M., Pogribny, I. P., Melnyk, S., Hine, R. J., Gibson, J. B., Yi, P., Tafoya, D. L., Swenson, D. H., Wilson, V. L. & Gaylor, D. W. (1999). Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *American Journal of Clinical Nutrition* **70**, 495-501.
- Jin, S. G., Roitsch, T., Christie, P. J. & Nester, E. W. (1990). The regulatory VirG protein specifically binds to a cis-acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. *Journal of Bacteriology* **172**, 531-537.

- Johansson, M., Jägerstad, M. & Frølich, W. (2007). Folates in lettuce: a pilot study. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition* **51**, 22-30.
- Johnston, S. A., Anziano, P., Shark, K., Sanford, J. C. & Butow, R. (1988). Transformation of yeast mitochondria by bombardment of cells with microprojectiles. *Science* **240**, 1538-1541.
- Johnston, S. A., Reidy, M., DeVit, M. J., Sanford, J. C., McElligot, S. & Williams, R. S. (1991). Biolistic transformation of animal tissue. *In vitro Cell Developmental Biology* **27**, 11-14.
- Kanamoto, H., Yamashita, A., Asao, I., Okumura, S., Takase, H., Hattori, M., Yokota, A. & Tomizawa, K.-I. (2006). Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Research* **15**, 205-217.
- Kapusta, J., Modelska, A., Pniewski, T., Figlerowicz, M., Jankowski, K., Lisowa, O., Plucienniczak, A., Koprowski, H. & Legocki, A. B. (2001). Oral immunization of human with transgenic lettuce expressing hepatitis B surface antigen. *Advances in experimental medicine and biology* **495**, 299-303.
- Kemper, E. L., Silva, M. J. & Arruda, P. (1995). Effect of microprojectile bombardment parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (*Zea mays* L.) embryos. *Plant Science* **121**, 85-93.
- Kerstens, K. & De Ley, J. (1984). Genus III. *Agrobacterium* Conn 1942. In "Bergey's manual of systemic bacteriology" (N. R. Krieg, e J. G. Holt, Eds.), Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Kikkert, J. R. (1993). The biolistic PDS-1000/He device. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **33**, 221-226.
- Klaus, S. M. J., Wegkamp, A., Subesma, W., Hugenholtz, J., Gregory III, J. F. & Hanson, A. D. (2005). A Nudix Enzyme Removes Pyrophosphate from Dihydroneopterin Triphosphate in the Folate Synthesis Pathway of Bacteria and Plants. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 5274-5280.
- Klein, T. M. & Fitzpatrick-McElligott, S. F. (1993). Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues. *Current Opinion in Biotechnology* **4**, 583-590.
- Klein, T. M., Gradziel, T., Fromm, M. & Sanford, J. C. (1988). Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Bio/Technology* **6**, 559-563.

- Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R. & Sanford, J. C. (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**, 70-73.
- Konings, E. J. M., Roomans, H. H. S., Dorant, E., Goldbohm, R. A., Saris, W. H. M. & van den Brandt, P. A. (2001). Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. *American Journal of Clinical Nutrition* **73**, 765-776.
- Lacorte, C., Aragão, F. J. L., Almeida, E. R., Mansur, E. & Rech, E. L. (1997). Transient expression of GUS and the 2S albumin gene from Brazil nut in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed explants using particle bombardment. *Plant Cell Reports* **16**, 619-623.
- Lacroix, B., Li, J., Tzfira, T. & Citovsky, V. (2006a). Will you let me use your nucleus? How *Agrobacterium* gets its T-DNA expressed in the host plant cell. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **84**, 333-345.
- Lacroix, B., Tzfira, T., Vainstein, A. & Citovsky, V. (2006b). A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. *Trends in Genetics* **22**, 29-37.
- Lawrence, J. M., Bpetitti, D., Watkins, M. & Umekubo, M. A. (1999). Trends in serum folate after food fortification. *The Lancet* **354**, 915-916.
- Legocki, A. B., Miedzinska, K., Czaplínska, M., Plucieniczak, A. & Wedrychowicz, H. (2005). Immunoprotective properties of transgenic plants expressing E2 glycoprotein from SCFV and cysteine protease from *Fasciola hepatica*. *Vaccine* **23**, 1844-1846.
- Lippincott, J. A., Lippincott, B. B. & Starr, M. P. (1981). The genus *Agrobacterium*. In "The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria" (M. P. Starr, e H. Stolp, Eds.), Vol. 1. Springer-Verlag, Berlin.
- Liu, S., West, R., Randell, E., Longerich, L., O'Connor, K. S., Scott, H., Crowley, M., Lam, A., Prabhakaran, V. & McCourt, C. (2004). A comprehensive evaluation of food fortification with folic acid for the primary prevention of neural tube defects. *BMC Pregnancy and Childbirth* **4**, 20-29.
- Lönnerdal, B. (2003). Genetically modified plants for improved trace element nutrition. *The Journal Nutrition* **133**, 1490S-1493S.
- Lopes, M. C., Freier, M., Matte, J. D., Gärtner, M., Franzener, G., Casimiro, E. L. N. & Sevigiani, A. (2003). Acúmulo de nutrientes de alface em cultivo hidropônico no inverno. *Horticultura Brasileira* **21**, 211-215.

- Lovato, F. A., Bezerra, I. C., Resende, R. d. O., Ferreira, A. T. & Torres, A. C. (1998). Transformação genética da alface, cv. Verônica, via *Agrobacterium tumefaciens*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **10**, 219-224.
- Lucca, P., Hurrell, R. & Potrykus, I. (2001a). Approaches to improving the bioavailability and level of iron in rice seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 828-834.
- Lucca, P., Hurrell, R. & Potrykus, I. (2001b). Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theor. Appl. Genet.* **102**, 392-397.
- Lunn, J. E. (2007). Compartmentation in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **58**, 35-47.
- Luthra, R., Dubey, V. R. K., Srivastava, A. K. & Kumar, S. (1997). Microprojectile mediated plant transformation: A bibliographic search. *Euphytica* **95**, 269-294.
- Luz, J. M. Q., Guimarães, S. T. M. R. & Korndörfer, G. H. (2006). Produção hidropônica de alface em solução nutritiva com e sem silício. *Horticultura Brasileira* **24**, 295-300.
- Ma, J. K.-C., Drake, P. M. W. & Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plant. *Nature Reviews Genetics* **4**, 794-805.
- Mabberley, D. J. (1997). "The plant-book: A portable dictionary of the vascular plants." 2 edition ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- MacFarquhar, N. (2003). Bashiqa Journal: A Sect Shuns Lettuce and Gives the Devil His Due. In "The New York Times", Vol. 2008, New York City.
- Makishima, N. (1993). "Cultivo de hortaliças." Instruções Técnicas CNPH EMBRAPA/SPI, Brasília.
- Makwabela, M., Taylor, N. J., Faquet, C. M. & Rey, M. E. C. (2006). Biolistic inoculation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with South African cassava mosaic virus. *African Journal of Biotechnology* **5**, 154-156.
- Matoušek, J., Orctová, L., Steger, G. & Riesner, D. (2004). Biolistic inoculation of plants with viroid nucleic acids. *Journal of Virological Methods* **122**, 153-164.
- Matthysse, A. G. & McMahan, S. (1998). Root colonization by *Agrobacterium tumefaciens* is reduced in cel, attB, attD, and attR mutants. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2341-2345.
- Matthysse, A. G., Yarnall, H., Boles, S. B. & McMahan, S. (2000). A region of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome containing genes required for

- virulence and attachment to host cells. *Biochimica Biophysica Acta* **1490**, 208-212.
- McCabe, D. & Christou, P. (1993). Direct DNA transfer using electric discharge particle acceleration (ACCELL™ technology). *Plant Cell, Tissue Organ Culture* **33**, 227-236.
- McCabe, D. E. & Martinell, B. J. (1993). Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. *Bio/technology* **11**, 596-598.
- McCabe, D. E., Swain, W. F., Martineli, B. J. & Christou, P. (1988). Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* **6**, 923-926.
- McCullen, C. A. & Binns, A. N. (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**, 101-127.
- Menezes Júnior, F. O. G., Martins, S. R. & Fernandes, H. S. (2004). Crescimento e avaliação nutricional da alface cultivada em "NFT" com soluções nutritivas de origem química e orgânica. *Horticultura Brasileira* **22**, 632-637.
- Michelmore, R., Marsh, E., Seely, S. & Landry, B. (1987a). Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* **6**, 439-442.
- Michelmore, R., Marsh, E., Seely, S. & Landry, B. (1987b). Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* **6**, 439-442.
- Morikawa, H., Iida, A. & Yamada, Y. (1989). Transient expression of foreign genes in plant cells and tissues obtained by simple biolistic device (particle-gun). *Applied Microbiology Biotechnology* **31**, 320- 322.
- Morikawa, H., Nishihara, M., Seki, M. & Irifune, K. (1994). Bombardment-mediated transformation of plant cells. *Journal of Plant Research* **107**, 117-123.
- MRC, V. S. R. G. (1991). Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council vitamin study. *The Lancet* **338**, 131-137.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Murray-Kolb, L. E., Takaiwa, F., Goto, F., Yoshihara, T., Theil, E. C. & Beard, J. L. (2002). Transgenic rice is a source of iron for iron-depleted rats. *The Journal Nutrition* **132**, 957-960.

- Nadal, R. d., Guimarães, D. R., Biasi, J., Pinheiro, S. L. G. & Cardoso, V. I. M. (1986). "Olericultura em Santa Catarina: aspectos técnicos e econômicos." EMPASC, Florianópolis.
- Nagai, H. (1993). Alface tipo manteiga. In "O melhoramento de plantas no Instituto Agronômico" (I. Agronômico, Ed.), pp. 204-221, Campinas.
- Nagata, R. T., Dusky, J. A., Ferl, R. J., Torres, A. C. & Cantliffe, D. J. (2000). Evaluation of glyphosate resistance in transgenic lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **125**, 669-672.
- Nandi, S., Suzuki, Y. A., Huang, J., Yalda, D., Pham, P., Wu, L., Bartley, G., Huang, N. & Lönnerdal, B. (2002). Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Science* **163**, 713-722.
- Neuburger, M., Rébeillé, F., Jourdain, A., Nakamura, S. & Douce, R. (1996). Mitochondria are a major site for folate and thymidylate synthesis in plants. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 9466-9472.
- Nunes, A. C. S., Vianna, G. R., Cuneo, F., Amaya-Farfan, J., De Capdeville, G., Rech, E. L. & Aragão, F. J. L. (2006). RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPSI*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta* **224**, 125-132.
- O'Brien, J. A. & Lummis, S. C. R. (2004). Biolistic and diolistic transfection: using the gene gun to deliver DNA and lipophilic dyes into mammalian cells. *Methods in Cells Biology* **33**, 121-125.
- O'Brien, J. A. & Lummis, S. C. R. (2007). Diolistics: incorporating fluorescent dyes into biological samples using a gene gun. *Trends in Biotechnology* **25**, 530-534.
- Oliveira, A. C. B. d., Sedyama, M. A. N., Pedrosa, M. W., Garcia, N. C. P. & Garcia, S. L. R. (2004). Divergência genética e descarte de variáveis em alface cultivada sob sistema hidropônico. *Acta Scientiarum* **26**, 211-217.
- Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W. & Rothstein, R. J. (1981). Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 6354-6358.
- Paine, J. A., Shipton, C. A., Chaggar, S., Howells, R. M., Kennedy, M. J., Vernon, G., Wright, S. Y., Hinchliffe, E., Adams, J. L., Silverstone, A. L. & Drake, R. (2005). Improving the nutritional value of Golden Rice through increased provitamin A content. *Nature Biotechnology* **23**, 482-487.

- Pandurangi, S. & LaBorde, L. F. (2004). Optimization of microbiological assay of folic acid and determination of folate content in spinach. *International Journal of Food Science and Tecnology* **39**, 525-532.
- Panis, B., Wauwe, A. & Swnnen, R. (1993). Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplast of banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Reports* **12**, 403-407.
- Pansegrau, W., Schoumacher, F., Hohn, B. & Lanka, E. (1993). Site-specific cleavage and joining of single-stranded DNA by VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids: Analogy to bacterial conjugation. *Biochemistry* **90**, 11538-11542.
- Pascal, R., Scimemi, C., Dubald, M. & Matringe, M. (2004). Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiology* **134**, 92-100.
- Persad, V. L., Van den Hof, M. C., Dubé, J. M. & Zimmer, P. (2002). Incidence of open neural tube defects in Nova Scotia after folic acid fortification. *Canadian Medical Association Journal* **167**, 241-245.
- Petit, A., David, C., Dahl, G. A., Ellis, J. G., Guyon, P., Casse-Delbart, F. & Tempé, J. (1983). Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Molecular and General Genetics* **190**, 204-214.
- Pfeiffer, C. M., Rogers, L. M. & Gregory III, J. F. (1997). Determination of folate in cereal-grain food products using trienzyme extraction and combined affinity and reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 407-413.
- Pilu, R., Panzeri, D., Gavazzi, G., Rasmussen, S. K., Consonni, G. & Nielsen, E. (2003). Phenotypic, genetic and molecular characterization of a maize low phytic acid mutant (lpa241). *Theoretical and Applied Genetics* **107**, 980-987.
- Potrykus, I. (2001). Golden rice and beyond. *Plant Physiology* **125**, 1157-1161.
- Raboy, V. (2002). Progress in breeding low phytate crops. *The Journal Nutrition* **132**, 503S-505S.
- Raboy, V., Young, K. A., Dorsch, J. A. & Cook, A. (2001). Genetics and breeding of seed phosphorus and phytic acid. *Journal Plant Physiology* **158**, 489-497.

- Radin, B., Reisser Júnior, C., Matzenauer, R. & Bergamaschi, H. (2004). Crescimento de cultivares de alface conduzidas em estufa e a campo. *Horticultura Brasileira* **22**, 178-181.
- Ramesh, S. A., Choimes, S. & Schachtman, D. P. (2004). Over-expression of an Arabidopsis zinc transporter in *Hordeum vulgare* increases short-term zinc uptake after zinc deprivation and seed zinc content. *Plant Mol. Biol.* **54**, 373–385.
- Rasmussen, J. L., Kikkert, J. R., Roy, M. K. & Sanford, J. C. (1994). Biolistic transformation of tobacco and maize suspension cells using bacterial cells as microprojectiles. *Plant Cell Reports* **13**, 212- 217.
- Ravel, S., Cherest, H., Jabrin, S., Grunwald, D., Surdin-Kerjan, Y., Douce, R. & Rébeillé, F. (2001). Tetrahydrofolate biosynthesis in plants: Molecular and functional characterization of dihydrofolate synthetase and three isoforms of folylpolyglutamate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 15360-15365.
- Rech, E. L., De Bem, R. A. & Aragão, F. J. L. (1996). Biolistic mediated gene expression in cattle tissue *in vivo*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **29**, 1265-1267.
- Rech, E. L., Vainstein, M. H. & Davey, M. R. (1991). An electrical particle acceleration gun for gene transfer into cells. *Technique* **3**, 143-149.
- Rech, E. L., Vianna, G. R. & Aragão, F. J. L. (2008). High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols* **3**, 410-418.
- Regland, B., Johansson, B. V., Grenfeldt, B., Hjelmgren, L. T. & Medhus, M. (1995). Homocysteinemia is a common feature of schizophrenia. *Journal Neural Transm. Gen. Sect* **100**, 165–169.
- Rinberg, D., Simonnet, C. & Groisman, A. (2005). Pneumatic capillary gun for ballistic delivery of microparticles. *Applied Physics Letters* **87**.
- Roberts, F., Roberts, C. W., Johnson, J. J., Kyle, D. E., Krell, T., Coggins, J. R., Coombs, G. H., Milhous, W. K., Tzipori, S., Ferguson, D. J., Chakrabarti, D. & McLeod, R. (1998). Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature* **393**, 801–805.

- Rodrigues, A. B., Martins, M. I. E. G. & Araújo, J. A. C. d. (1997). Avaliação econômica da produção de alface em estufa. *Informações Econômicas São Paulo* **27**, 27-33.
- Rodrigues, E., Schwan-Estrada, K. R. F., Fiori-Tutida, A. C. G., Stangarlin, J. R. & Cruz, M. E. S. (2007). Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. *Summa Phytopathologica* **33**, 124-128.
- Rogers, E. E. & Guerinot, M. L. (2002). FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 1787–1799.
- Roizenblatt, R., Weiland, J. D., Carcieri, S., Qiu, G., Behrend, M., Humayun, M. S. & Chow, R. H. (2006). Nanobiolistic delivery of indicators to the living mouse retina. *Journal of Neuroscience Methods* **153**, 154-161.
- Romeiro, R. S. (1995). Bactérias fitopatogênicas. *Viçosa: Imprensa Universitária*, 283 p.
- Ruf, S., Hermann, M., Berger, I. J., Carrer, H. & Bock, R. (2001). Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature Biotechnology* **19**, 870–875.
- Ruhlman, T., Ahangari, R., Devine, A., Samsam, M. & Daniell, H. (2007). Expression of cholera toxin B–proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts – oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 495-510.
- Russell, J. A., Roy, M. K. & Sanford, J. C. (1992). Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiology* **98**, 1050-1056.
- Sahr, T., Ravanel, S. & Rébeillé, F. (2005). Tetrahydrofolate biosynthesis and distribution in higher plants. *Biochemical Society Transactions* **33**, 758-762.
- Salisbury, F. B. (1955). The dual role of auxin in flowering. *Plant Physiology* **30**, 327-334.
- Sambrook, J. & Russell, D. (2006). "DNA transfection by biolistics." CSH Protocols (C. S. H. L. Press, Ed.) Cold Spring Harbor, New York.
- Samuelsen, A. I., Martin, R. C., Mok, D. W. S. & Mok, M. C. (1998). Expression of the yeast FRE genes in transgenic tobacco. *Plant Physiology* **118**, 51-58.

- Sanford, J. C. (1988). The biolistic process. A new concept in gene transfer and biological delivery. *TIBTech* **6**, 299-302.
- Sanford, J. C. (2000). The development of the biolistic process. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **36**, 303-308.
- Sanford, J. C., Devit, M. J., Russell, J. A., Smith, F. D., Harpending, P. R., Roy, M. K. & Johnston, S. A. (1991). An improved, helium-driven biolistic device. *Technique* **3**, 3-16.
- Sanford, J. C., Klein, T. M., Wolf, E. D. & Allen, N. (1987). Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science Technology* **5**, 27-37.
- Sanford, J. C., Smith, F. D. & Russel, J. A. (1993). Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzimology* **217**, 483-510.
- Santos, M. O., Romano, E., Vieira, L. S., Baldoni, A. B. & Aragão, F. J. L. (2008). Suppression of SERK gene expression affects fungus tolerance and somatic embryogenesis in transgenic lettuce. *Plant Biology* **11**, 83-89.
- Sautter, C., Poletti, S., Zhang, P. & Gruissem, W. (2006). Biofortification of essential nutritional compounds and trace elements in rice and cassava. *Proceedings of the Nutrition Society* **65**, 153-159.
- Sautter, C., Waldner, H., Neuhaus-Url, G., Galli, A., Neuhaus, G. & Potrykus, I. (1991). Micro-targeting: high efficiency gene transfer using a novel approach for the acceleration of micro-projectiles. *Bio/Technology* **9**, 1080-1085.
- Scott, J., Rébeillé, F. & Fletcher, J. (2000). Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 795-804.
- Scott, J. M. (1999). Folate and vitamin B12. *Proceedings of the Nutrition Society* **58**, 441-448.
- Selhub, J., Jacques, P. F., Bostom, A. G., D'Agostino, R. B., Wilson, P. W. F., Belanger, A. J., O'Leary, D. H., Wolf, P. A., Schaefer, E. J. & Rosenberg, I. H. (1995). Association between Plasma Homocysteine Concentrations and Extracranial Carotid-Artery Stenosis. *New England Journal of Medicine* **332**, 286-291.
- Setúbal, J. W. & Silva, A. M. R. (1992). Avaliação do comportamento de alface de verão em condições de calor no município de Teresina-PI. *Horticultura Brasileira* **10**, 69.

- Shaw, G. M., Schaffer, D., Velie, E. M., Morland, K. & Harris, J. A. (1995). Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology* **6**, 219-226.
- Shefi, O., Simonnet, C., Baker, M. W., Glass, J. R., Macagno, E. R. & Groisman, A. (2006). Microtargeted gene silencing and ectopic expression in live embryos using biolistic delivery with a pneumatic capillary gun. *Journal of Neuroscience Methods* **26**, 6119-6123.
- Shi, J., Wang, H., Hazebroek, J., Ertl, D. S. & Harp, T. (2005). The maize low-phytic acid 3 encodes a myo-inositol kinase that plays a role in phytic acid biosynthesis in developing seeds. *The Plant Journal* **42**, 708–719.
- Shi, J., Wang, H., Wu, Y., Hazebroek, J., Meeley, R. B. & Ertl, D. S. (2003). The maize low-phytic acid mutant lpa2 is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene. *Plant Physiol.* **131**, 507–515.
- Shintani, D. & DellaPenna, D. (1998). Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science* **282**, 2098–2100.
- Shukla, S., VanToai, T. T. & Pratt, R. C. (2004). Expression and nucleotide sequence of an INS (3) P1 synthase gene associated with low-phytate kernels in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 4565–4570.
- Sidorov, V. A., Kasten, D., Pang, S.-Z., Hajdukiewicz, P. T. J., Staub, J. M. & Nehra, N. S. (1999). Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent as a plastid marker. *Plant Journal* **19**, 209–216.
- Sikdar, S. R., Serino, G., Chaudhuri, S. & Maliga, P. (1998). Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* **18**, 20–24.
- Simoon, F. J. (1991). first ed. In "Food in China: A cultural e historical inquiry", pp. 147-148. CRC press, Inc., Flórida.
- Smith, E. F. & Townsend, C. O. (1907). A plant-tumor of bacterial origin. *Science* **25**, 671-673.
- Smith, F. D., Harpending, P. R. & Sanford, J. C. (1992). Biolistic transformation of prokaryotes: factors that affect biolistic transformation of very small cells. *Journal General Microbiology* **138**, 239-248.
- Sousa, C. S., Bonetti, A. M., Goulart Filho, L. R., Machado, J. R. d. A., Londe, L. N., Baffi, M. A., Ramos, R. G., Vieira, C. U. & Kerr, W. E. (2007). Divergência genética entre genótipos de alface por meio de marcadores AFLP. *Bragantia (Campinas)* **66**, 11-16.

- Sousa, C. S., Kerr, W. E., Santos, M. R., Arruda, A. S., Spini, V. B. M. G., Juliatti, F. C. & Takatsu, A. (2003). Mancha de Septoria da Alface: Isolamento, Inoculação e Avaliação de Cultivares em Condições de Campo e Casa de Vegetação. *Fitopatologia Brasileira* **28**, 555-558.
- Stachel, S. E. & Nester, E. W. (1986). The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO Journal* **5**, 1445-1454.
- Staub, J. M. & Maliga, P. (1992). Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. *Plant Cell* **4**, 39-45.
- Staub, J. M. & Maliga, P. (1995). Expression of a chimeric uidA gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids. *Plant Journal* **7**, 845-848.
- Storozhenko, S., De Brouwer, V., Volckaert, M., Navarrete, O., Blancquaert, D., Zhang, G.-F., Lambert, W. & Van Der Straeten, D. (2007). Folate fortification of rice by metabolic engineering. *Nature Biotechnology* **25**, 1277-1279.
- Storozhenko, S., Ravanel, S., Zhang, G.-F., Rébeillé, F., Lambert, W. & Van Der Straeten, D. (2005). Folate enhancement in staple crops by metabolic engineering. *Trends in Food Science & Technology* **16**, 271-281.
- Streatfield, S. J. (2007). Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 2-15.
- Suh, J., Wirtz, D. & Hanes, J. (2003). Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 3878-3882.
- Suzuki, Y. A., Kelleher, S. L., Yalda, D., Wu, L., Huang, J., Huang, N. & Lönnnerdal, B. (2003). Expression, characterization and biological activity of recombinant human lactoferrin in rice. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **36**, 190-199.
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P. & Maliga, P. (1990). Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 8526-8530.
- Svab, Z. & Maliga, P. (1993). High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 913-917.
- Takahashi, M., Nakanishi, H., Kawasaki, S., Nishizawa, N. K. & Mori, S. (2001). Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nature Biotechnology* **19**, 466-469.

- Takeuchi, Y., Dotson, M. & Keen, N. T. (1992). Plant transformation: a simple Biobalística particle bombardment device based on flowing helium. *Plant Molecular Biology* **18**, 835-839.
- Tamura, T. (1990). Microbiological assay of folates. In "Folic Acid Metabolism in Health and Disease. Contemporary Issues in Clinical Nutrition." (M. F. Picciano, E. L. R. Stokstad, e J. F. Gregory III, Eds.), Vol. 13, pp. 121-137. Wiley Liss, New York.
- Toro, N., Datta, A., Carmi, O. A., Young, C., Prusti, R. K. & Nester, E. W. (1989). The *Agrobacterium tumefaciens* virC1 gene product binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer. *Journal of Bacteriology* **171**, 6845-6849.
- Trani, P. E., Novo, M. d. C. d. S. S., Cavallaro Júnior, M. L., Gonçalves, C., Maggio, M. A., Giusto, A. B. & Vailati, M. L. (2006). Desempenho de cultivares de alface sob cultivo protegido. *Bragantia (Campinas)* **65**, 441-445.
- Tregoning, J. S., Nixon, P., Kuroda, H., Svab, Z., Clare, S., Bowe, F., Fairweather, N., Ytterberg, J., van Wijk, K. J., Dougan, G. & Maliga, P. (2003). Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Research* **31**, 1174-1179.
- Tzfira, T. (2006). On tracks and locomotives: the long route of DNA to the nucleus. *Trends in Microbiology* **14**, 61-63.
- Tzfira, T. & Citovsky, V. (2000). From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology* **1**, 201-212.
- Tzfira, T. & Citovsky, V. (2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* **17**, 147-154.
- Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B. & Citovsky, V. (2004). *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends in Genetics* **20**, 375-383.
- USDA, U. S. D. o. A.-. (2008). National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21 (Agriculture, Ed.), Kansas City.
- Vain, P., Keen, N., Murillo, J., Rathus, C., Nemes, C. & Finer, J. J. (1993). Development of particle inflow gun. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **33**, 237-246.

- Vainstein, M. H., Alves, S. A., Lima, B. D., Aragão, F. J. L. & Rech, E. L. (1994). Stable DNA transfection in a flagellate trypanosomatid by microprojectile bombardment. *Nucleic Acids Research* **22**, 3263-3264.
- van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R. A. & Schell, J. (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**, 169-170.
- Vasconcelos, M., Datta, K., Oliva, N., Khalezuzzaman, M., Torrizo, L., Krishnan, S., Olilveira, M., Goto, F. & Datta, S. K. (2003). Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. *Plant Science* **164**, 371–378.
- Vianna, G. R., Albino, M. M. C., Dias, B. B. A., Rech, E. L. & Aragão, F. J. L. (2004). Fragment DNA as vector for genetic transformation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Scientia Horticulturae* **99**, 371-378.
- Wald, D. S., Bishop, L., Wald, N. J., Law, M., Hennessy, E., Weir, D., McPartlin, J. & Scott, J. (2001). Randomized Trial of Folic Acid Supplementation and Serum Homocysteine Levels. *Archives of Internal Medicine* **161**, 695-700.
- Wald, N. J. & Polani, P. E. (1984). Neural-tube defects and vitamins: the need for a randomized clinical trial. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* **91**, 516–523.
- Wang, T. L., Domoney, C., Hedley, C. L., Casey, R. & Grusak, M. A. (2003). Can we improve the nutritional quality of legume seeds? *Plant Physiology* **131**, 886–891.
- Ward, J. E., Akiyoshi, D. E., Regier, D., Datta, A., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1988). Characterization of the virB operon from an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 5804-5814.
- Watson, B., Currier, T. C., Gordon, M. P., Chilton, M.-D. & Nester, E. W. (1975). Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* **123**, 255-264.
- Weaver, L. M. & Herrmann, K. M. (1997). Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science* **2**, 346-351.
- Welch, R. M. & Graham, R. D. (2004). Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany* **55**, 353–364.

- White, P. J. & Broadley, M. R. (2005). Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends in Plant Science* **10**, 586-593.
- White, P. R. & Braun, A. C. (1941). Crown-gall production by bacteria-free tumor tissues. *Science* **94**, 239-241.
- Williams, J. G. K. & Szalay, A. A. (1983). Stable integration of foreign DNA into the chromosome of the cyanobacterium *Synechococcus* R2. *Gene* **24**, 37-51.
- Wilson, S. D. & Horne, D. W. (1982). Use of glycerol-cryoprotected *Lactobacillus casei* for microbiological assay of folic acid. *Clinical Chemistry* **28**, 1198-1200.
- Winans, S. C., Mantis, N. J., Chen, C.-Y., Chang, C.-H. & Han, D. C. (1994). Host recognition by the VirA, VirG two-component regulatory proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Research on Microbiology* **145**, 461-473.
- Yanofsky, M. F., Porter, S. G., Young, C., Albright, L. M., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1986). The virD operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell* **47**, 471-477.
- Ye, G.-N., Daniell, H. & Sanford, J. C. (1990). Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Molecular Biology* **15**, 809-819.
- Yoneyama, T. & Hatakeyama, K. (1998). Decameric GTP cyclohydrolase I forms complexes with two pentameric GTP cyclohydrolase I feedback regulatory proteins in the presence of phenylalanine or of a combination of tetrahydrobiopterin and GTP. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 20102–20108.
- Young-Sook, K., Bang-Genl, K., Tae-Geum, K., Tae-Jin, K. & Moon-Sik, Y. (2006). Expression of a cholera toxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) using *Agrobacterium*-mediated transformation system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **87**, 203–210.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., van Montagu, M. & Schell, J. S. (1983). Ti plasmid vector for introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO Journal* **2**, 2143-2150.
- Zambryski, P., Tempé, J. & Schell, J. (1989). Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* **56**, 193-201.
- Zambryski, P. C. (1992). Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**, 465-490.

- Ziemienowicz, A., Merkle, T., Schoumacher, F., Hohn, B. & Rossi, L. (2001). Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of VirD2 and VirE2 proteins. *The Plant Cell* **13**, 369-383.
- Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O. & Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant Journal* **23**, 11-28.
- Zupan, J. R., Ward, D. & Zambryski, P. (1998). Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Current Opinion in Microbiology* **1**, 649-655.