



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0720596-1 A2



(22) Data de Depósito: 27/12/2007

(43) Data da Publicação: 25/02/2014

(RPI 2251)

(51) *Int.Cl.:*

C12N 5/00

C12N 5/04

C12N 15/82

(54) Título: MÉTODOS IN VITRO PARA A INDUÇÃO E (57) **Resumo:**
MANUTENÇÃO DE LINHAGENS CELULARES
VEGETAIS EM SUSPENSÃO COMO CÉLULAS
INDIVIDUAIS COM PAREDES CELULARES INTACTAS
E PARA A TRANSFORMAÇÃO DAS MESMAS

(30) Prioridade Unionista: 29/12/2006 US 60/878,028

(66) Prioridade Interna: 860446

(73) Titular(es): Dow Agrosiences LLC

(72) Inventor(es): Frank Burroughs, Jeffrey R. Beringer,
Narasimha Chary Samboju, Paul Schmitzer, Pon Samuel Jayakumar,
Robbi Garisson, William Michael Ainley

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007088970 de
27/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/083233de
10/07/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS *IN VITRO* PARA A INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS CELULARES VEGETAIS EM SUSPENSÃO COMO CÉLULAS INDIVIDUAIS COM PAREDES CELULARES INTACTAS E PARA A TRANSFORMAÇÃO DAS MESMAS"**.

Referência Cruzada a Pedido Relacionado

Este pedido reivindica o benefício do pedido provisório de número de série 60/878.028, protocolado em 29 de dezembro de 2006.

Campo da Invenção

A invenção refere-se em parte ao campo da propagação de linhagens celulares vegetais, incluindo métodos para a propagação de células vegetais em suspensão como células individuais.

Antecedentes da Invenção

Nas duas últimas décadas aconteceu uma rápida emergência da tecnologia de engenharia genética de vegetais acompanhada de grandes avanços no desenvolvimento de processos de cultivo celular vegetal em grande escala para a produção de metabólitos secundários úteis. Desde 1995 (Moffat, 1995; Ma *et al.*, 2003), tais cultivos em suspensões de células vegetais são cada vez mais usados como sistema celular hospedeiro valioso para a expressão de proteínas recombinantes.

Tecidos calosos ou suspensões induzidos pela auxina, a despeito da sua origem em tecidos individuais, em geral contêm células com uma variedade de fenótipos. Assim, linhagens transgênicas desenvolvidas a partir de tais tipos celulares são via de regra altamente heterogêneas e apresentam níveis de expressão inconsistentes. Clones produtores de muitos metabólitos secundários úteis foram obtidos, portanto, de protoplastos individuais, isto é, a um clone celular com grande capacidade de produção de shikonin preparado a partir de protoplastos do *Lithospermum erythrorhizon* (Maeda *et al.*, 1983).

Até o momento, foi necessário formar protoplastos para desagregar células não apenas para a seleção de células, mas também para a transformação mediada por eletroporação/PEG de células vegetais cultiva-

das. A preparação de protoplastos tem sido necessária para o isolamento de clones celulares individuais de tecidos vegetais. Contudo, é em geral difícil os protoplastos regenerarem suas paredes normais, uma vez que protoplastos isolados geralmente têm seu desenvolvimento interrompido e relutam em se dividir (Hahne e Hoffmann, 1984). Em muitos estudos de protoplastos cultivados, o primeiro e maior polissacarídeo gerado foi a calose, que é composta de 1,3-,8-glicopiranoses (Klein *et al.*, 1981).

Plantas feridas ou estressadas frequentemente secretam massas desse glicano nos espaços periplásmicos (Currier, 1957). Durante os estágios iniciais da regeneração da parede, a ligação entre a celulose e os xiloglucanos não é tão forte como em plantas intactas (Hayashi *et al.*, 1986). Uma vez que a organização macromolecular do xiloglucano e da celulose nas paredes celulares primárias parece ser responsável pela força e extensibilidade (Hayashi e Maclachlan, 1984), o acúmulo de xiloglucano assim como de celulose ao redor dos protoplastos parece ser fundamental para a sua divisão e potencial de crescimento. Esse pré-requisito interrompe a divisão do protoplasto, aumentando assim o tempo de regeneração em células normais com as características celulares das linhagens de origem.

Um desafio técnico que perdura, portanto, no campo do cultivo de células vegetais, é isolar células individuais viáveis que possam ser clonadas a partir de tecido vegetal em cultura (Bourgin, 1983; Tabata *et al.*, 1976). Em cultivos em suspensão, agregados celulares não uniformes sempre se formam e cada um de tais agregados contém até centenas de células. Nada se sabe sobre as ligações entre essas células agregadas e não houve relatos identificando uma única enzima que possa dissociar agregados celulares e mantê-los como células individuais *in vitro* com paredes celulares intactas.

O papel da pectina nas propriedades adesivas das células foi sugerido em vários relatos, mas tal conexão foi estabelecida um tanto mais recentemente (Bouton *et al.*, 2002). Além disso, fortes reduções das propriedades adesivas celulares foram relatadas (Sterling *et al.*, 2006).

Os mutantes *qual-1* apresentaram células de raiz individuais

destacadas (Bouton *et al.*, 2002). O teor reduzido de pectina foi corroborado ainda por experimentos de imunofluorescência com anticorpos contra epítopos pécticos específicos. Essas observações sugerem que a enzima codificada pode estar envolvida na síntese de polissacarídeos pécticos e indicaram claramente que a pectina está envolvida nas propriedades adesivas das células vegetais.

Assim, a interrupção da síntese da pectina de maneira a remover as propriedades celulares adesivas pode facilitar a separação das células. Foi relatado que o isolamento de células com tratamentos enzimáticos de dose única de degradação da pectina (Naill, 2005) auxiliam no isolamento de células individuais em cultivos de células de *Taxus* em suspensão. Tais células individuais de *Taxus* são usadas para selecionar linhagens clonais de elite com níveis mais altos de produção de taxol. Este método, entretanto, não é útil na manutenção de células individuais em suspensão na presença contínua da enzima no meio. Além disso, o mais alto rendimento de células individuais com tais tratamentos enzimáticos de tão curta duração foi de apenas 17,1% a 34,4% (Naill, 2005). O tratamento contínuo com pectinase em suspensões de arroz resultou apenas em agregados em solução finos a concentrações de 0,005%, mas não ajudou a manter a suspensão como células individuais (Lee *et al.*, 2004). Tratamentos prolongados com combinação de enzimas, pectinase e celulase por mais do que 8 horas resultaram em lise celular (Naill, 2005).

Relatou-se que a separação celular em culturas de células de soja em suspensão é aumentada na presença da colchicina (Umetsu *et al.*, 1975). Para fins de separação celular, o alcalóide foi adicionado ao meio de cultura a concentrações mais baixas (0,1-1,0 mM) do que aquelas usadas na produção de poliploidia cromossômica (5-20 mM). Apesar disso, a colchicina inibe a mitose em células vegetais e animais (Lewin, 1980). A colchicina se liga à tubulina e impede a montagem dos microtúbulos. Assim, para obter a separação celular, a concentração da colchicina e o tempo de tratamento com ela deveriam ser tão baixos quanto possível.

Alcalóides como a colchicina têm sido usados para a sincroniza-

ção do crescimento em cultivos de células humanas aos quais os alcalóides são geralmente adicionados a 0,5 mM e as células em geral têm seu crescimento no prazo de poucas horas, antes da mitose. Ainda que o efeito morfo-
gênico seja bastante similar àquele visto em células animais, células vege-
tais podem se dividir durante o crescimento na presença de colchicina a 0,1
mM (Umetsu *at al.*, 1975). A viabilidade celular diminuiu após 4 dias de culti-
vo de células de soja em suspensão em 1 mM de colchicina. Além disso,
apenas 44,8% das células eram viáveis nestes tratamentos, mas foi possível
mantê-las se dividindo, ao contrário do ocorrido com células animais.

Foi investigado o uso de inibidores da despolimerização da tubu-
lina ou de oligossacarídeos na manutenção de células individuais em sus-
pensão de cultivos vegetais *in vitro*. A literatura tem algumas informações
desde 1975 sobre o uso de colchicinas para a separação celular; ver a se-
ção de referências, abaixo. Inibidores de tubulina como herbicidas também
foram investigados.

A produção de eventos transgênicos de elite e sua recuperação
dependem intensamente do desenvolvimento tecnologias capacitadoras. Os
métodos atualmente à disposição para a transformação de agregados celu-
lares em suspensão são métodos mediados pelo *Agrobacterium* e pelo
Whiskers. Métodos envolvendo o *Agrobacterium* apresentam uma taxa de
integração basal de até 67-90%, o que torna este processo muito ineficiente,
enquanto a transformação mediada por WHISKERS® não funciona como
processo de alta capacidade de produção (HTP). O método mediado pelo
PEG é sempre usado com protoplastos e os protoplastos do tabaco, ainda
que fáceis de transformar, não são se adéquam facilmente a processos de
transformação HTP devido a problemas com a regeneração das paredes
celulares.

A técnica parece se silenciar no que refere-se a protocolos para
transformações baseadas em cultivos de células individuais em suspensão.
Há diversos relatos de protocolos baseados em protoplastos, mas estes,
diferentemente das suspensões de células individuais de células vegetais,
não possuem paredes celulares, como discutido abaixo.

Breve Sumário

A presente invenção proporciona métodos simples e consistentes para decompor agregados celulares em células individuais com paredes celulares primárias intactas. A revelação a seguir discute a separação celular de agregados celulares em suspensão cultivados em meio contendo enzimas causadoras da degradação da pectina ou compostos despolimerizadores da tubulina, incluindo a colchicina.

A presente invenção também se refere a novos usos de compostos para tais fins.

Um aspecto da presente invenção se refere à transformação das células isoladas em questão. Tais processos simplificam e integram processos de transformação e seleção baseados em células individuais em processos de trabalho de geração de eventos transgênicos e transplastômicos. A presente invenção também elimina restrições técnicas e produz linhagens transgênicas sem marcadores e de expressão uniforme que apresentam alta capacidade de produção para atender a várias necessidades das plataformas de saúde animal, biofarmacêutica e proteção de traços e plantações.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1: isolamento de células JTNT1 individuais com paredes celulares intactas em tratamentos contínuos com pectoliase subcultivadas no meio por 7 dias.

A – suspensão normal de BY2; **B** – mesmo que **A**, mas com as células coloridas com I2KI para demonstrar a agregação das células; **C** e **D** – células separadas após 6 dias de tratamento enzimático contínuo; **E** e **F** – células individuais separadas com e sem coloração com I2KI. Nota-se a divisão celular normal (**F**).

Figura 2: viabilidade das células BY2 após 6 dias de tratamento contínuo com pectoliase (células tratadas com FDA e IP) e a produção de células individuais.

A: agregados de células BY2; **B:** células BY2 em 1 ml de inóculo em pectoliase no meio por 5 dias; **C:** 6 ml de inóculo com enzima no meio no dia 5; **D, E** e **F:** fotos por microscópio de **C**; **G:** aglomerados de controle com

variante da célula BY2 desenvolvida em BAP e sacarose a 12%; **H** e **I**: células individuais de **G** após tratamento enzimático contínuo por 5 dias. Células coloridas em FDA e IP. Note as células mortas em PI coloridas em vermelho.

Figura 3: indução de suspensão de células individuais de tratamentos de 7 dias com adição de colchicina ao meio a partir de suspensões de agregados de células BY2 e de tabaco Xanthi.

A: agregado normal de células BY2 em suspensão (colorido com calcofluor); **B:** suspensão de células BY2 individuais em 1 mM de colchicina por 7 dias; **C:** o mesmo que **B**, mas aumentado para mostrar células individuais com paredes celulares intactas; **D:** agregados celulares de Xanthi; **E:** agregados de Xanthi em suspensão tratados por 7 dias em 0,5 mM de colchicina. Nota-se a liberação parcial de células individuais em 0,5 mM; **F:** células individuais de Xanthi separadas em 1 mM de colchicina.

Figura 4: liberação de células individuais com paredes celulares intactas em tratamentos com colchicina a partir de agregados de células de tabaco BY2 e Xanthi em suspensão.

A: agregados normais de BY2 em suspensão; **B:** suspensão de células BY2 individuais em 1 mM de colchicina por 7 dias; **C** e **D:** recuperação de células de volta em agregados após remoção da colchicina (4 dias após subcultivo com 1 ciclo de cultivo de tratamento com colchicina); **E:** agregados de Xanthi em suspensão; **F:** agregados de Xanthi em suspensão tratados por 7 dias em 1 mM de colchicina. Notam-se as células individuais liberadas nos cultivos de BY2 e Xanthi e a presença da parede celular intacta na presença do alvejante óptico calcoflúor. (Todas amostras tratadas com calcoflúor a 0,1% e examinadas ao microscópio fluorescente Leica).

Figura 5: liberação de células individuais viáveis com paredes celulares intactas em tratamentos com colchicina da variante BY2 do tabaco (aclimatadas em meio com sacarose a 12%) e agregados de Orelha-de-Macado em suspensão.

A: agregados de BY2-V normais em suspensão; **B:** visão aproximada dos agregados não-tratados; **C, D** e **E:** indução de células BY2 individuais em suspensão em 1 mM de colchicina por 7 dias (células sob magni-

5 ficação de 10x, 20x e 40x); **F**: indução de células individuais em suspensão de Orelha-de-Macaco em 1 mM de colchicina, tratamento de 7 dias. Todas as amostras tratadas com FDA e PI e examinadas sob microscópio fluorescente Leica. Nota-se a alta viabilidade das células vistas aqui na coloração com FDA e com pouquíssimas células coloridas em vermelho pelo PI.

10 **Figura 6:** efeito do DAS-PMTI-1, um derivado patenteado do metilindol da Dow Agrosiences (DAS) e potente herbicida inibidor dos microtúbulos sobre o crescimento das células NT1 do tabaco. As células foram cultivadas na ausência ou presença de 25 ou 50 nM de DAS-PMTI-1 em meio NT1B com glicerol a 3% como fonte exclusiva de carbono. Todos os valores de peso úmido representam a média de $\pm 0,18$ das amostras replicadas.

15 **Figura 7:** produção de células individuais e de colônias a partir das linhagens em suspensão DAS GAD1762-034.

20 **Figuras 8A, 8B e 8C:** cultivo por 2-6 semanas de colônias a partir de células DAS GAD1762-034 individuais.

25 **Figura 9:** amostras coletadas a 7 e 13 dias para mais de 4 ciclos de subcultivo e análises de expressão realizadas. Os dados de expressão foram postos em gráfico.

30 **Figura 10:** células BY2 individuais isoladas com o DAS-PMTI-1. Uma concentração de 20-50 nM foi usada para produzir células individuais após 5 dias de subcultivo. Nota-se que as células são células individuais (o par tem extremidades sobrepostas) e que a imagem foi feita sob microscópio de contraste por interferência diferencial acoplado a um sistema de imagens confocal.

35 **Figura 11:** expressão da YFP (plasmídeo Ubi10-YFP) após 72h de tratamento com PEG. Uma das pequenas células filhas (em divisão) no plano de foco mostra a expressão da GFP, indicando que a expressão podia ser estável.

40 **Figura 12: esquerda** – tecido de controle não-tratado inibido por 100 mg/l de canamicina; **direita** – célula individual derivada de provável isolado transplastômico em crescimento no meio de seleção.

Figura 13: produção de linhagens clonais a partir de suspensões de células individuais de cenoura. O crescimento de gramado no meio M plaqueado com agregados em suspensão não tratados (painel A). O crescimento de colônias separadas no meio plaqueado com as células individuais (painel B).

Figura 14: tratamento com 0,5-1 mM de colchicina em meio líquido e cultivos analisados a 14 dias após o início do subcultivo (final do segundo ciclo de subcultivo). **A:** as células individuais são liberadas dos agregados; **B:** agregado com células agrupadas de maneira compacta coloridas com coloração vital FDA; **C e D:** células individuais coloridas com FDA liberadas em tratamento com 1 e 0,5 mM, respectivamente, após filtragem da suspensão (mediante filtros com poros de 100 μm de diâmetro); **E e F:** visão mais aproximada das células de **D**.

Figura 15: curva de crescimento das células JTNT1 individuais em resposta aos IMIs.

Descrição Detalhada

A capacidade de isolar e cultivar células individuais tem numerosas aplicações possíveis. Por exemplo, os métodos aqui descritos têm utilidade no aperfeiçoamento de processos relacionados com a produtividade de culturas de células vegetais para aplicações ligadas à saúde animal.

Dessa maneira, os métodos da presente invenção são úteis para aumentar a eficiência de processos relacionados com produtos baseados em células vegetais ligados à saúde animal e à biofarmacêutica. Modalidades da presente invenção podem auxiliar na seleção de clones de elite de linhagens celulares transgênicas, como na inicialização de cultivos celulares em minissuspensão, na minimização da variação lote a lote, para desenvolver Protocolos de Operação Padrão (POPs) para sistemas de transformação baseados em células individuais para minimizar ou eliminar células não-transgênicas em agregados. Em suma, aspectos desta invenção são úteis na seleção de processos HTP (processos de alta capacidade de produção) ligados à saúde animal e programas de aperfeiçoamento de linhas celulares hospedeiras.

A presente invenção também exemplifica e permite o desenvolvimento posterior de testes baseados em células individuais e processos de seleção de células para identificar células de expressão estável com base na expressão de RNA conjugada com sondas fluorescentes de resfriamento celular.

Tais células individuais também são úteis em análises temporárias de recombinação homóloga sítio-direcionadas no lugar do sistema temporário atual com base em protoplastos. Suspensões de milho Black Mexican Sweet (BMS) e de canola, por exemplo, podem proporcionar sistemas individuais para tais aplicações. Assim, a recombinação homóloga direcionada, por exemplo, pode ser usada em modalidades da presente invenção. Este tipo de tecnologia é o tema, por exemplo, do WO 03/080809 A2 e do pedido publicado correspondente (USPA 20030232410) que se refere ao uso de dedos de zinco para fins de recombinação direcionada. O uso de recombinases (cre-lox e flp-frt, por exemplo) também é conhecido na técnica.

Sistemas de expressão vegetais *in vitro* podem ser usados na produção de proteínas recombinantes úteis nos campos farmacêutico e da saúde animal. Uma vantagem-chave de tais sistemas de expressão vegetais é que eles são eucarióticos por natureza — possuem sistemas endomembranosos e vias de secreção similares aos das células de mamíferos. Portanto, proteínas complexas são em geral dobradas eficientemente e montadas com modificações pós-tradução apropriadas.

Outro benefício de sistemas de produção vegetais é o potencial para aumento da escala. Quantidades virtualmente ilimitadas de proteínas recombinantes podem ser cultivadas seja em tecido verde contido, seja em instalações industriais de grande escala usando-se sistemas de fermentação ou biorreatores após a seleção de clones de expressão de elite e expansão de tais linhagens celulares de expressão homogênea.

Duas estratégias para a produção de células individuais são aqui exemplificadas. Ambas foram bem-sucedidas na separação de células individuais viáveis. Contudo, o método com colchicina é preferido ao método de degradação enzimática na obtenção de um grande volume de suspensão de

células individuais com paredes celulares intactas pelo menos em dois tipos celulares em suspensão. O método enzimático apresentou não apenas inibição do crescimento celular, mas também um grau de mortalidade maior. Além disso, quando células viáveis foram plaqueadas no meio sob a forma de gel sem remoção ou lavagem do meio usado, as células morreram e não foi observado crescimento de colônias. Recomenda-se que o uso de tais suspensões de células individuais produzidas pelo método de degradação enzimática pode ser usado, mas precisa ser mais otimizado.

Em contraste, a adição de inibidores da tubulina, como a colchicina, testados neste estudo, parece ser muito útil na separação das células vegetais e na seleção de células individuais. Este método é simples, na medida em que envolve apenas a adição de um volume apropriado de colchicina ao meio líquido durante o estágio de subcultivo. Isto será uma ferramenta fundamental que será de grande importância para uma dada suspensão em processo tal como a inicialização de cultivos em minissuspensão com inóculo uniforme de células altamente viáveis como células iniciais. A técnica poderia aumentar a eficácia das transformações mediadas por eletroporação, Whiskers[®] e *Agrobacterium*. Tal preparado de células individuais poderia ser usado também para isolar clones de elite de linhagens produtoras de proteínas recombinantes a partir dos agregados transgênicos em suspensão.

Ainda que o método com protoplastos tenha sido usado no isolamento de células individuais, o método com colchicina em questão é mais fácil e mais poderoso. Células individuais obtidas por meio dele são mais estáveis do que os protoplastos devido à presença das paredes e não exigem a regeneração das paredes celulares. As células têm paredes com composição normal da rede de xiloglicanos/celulose (Hayashi e MacLachlan, 1984). Elas não produzem calose durante a expansão e a separação celular, tal como verificado nas observações nas quais células de muda de pinheiro, alongando-se na presença da colchicina, não apresentam espessamento anormal das paredes, mas se alargam radialmente (Itoh, 1976). O crescimento das células é normal após o subcultivo em meio sem colchicina, enquanto a maioria dos protoplastos tem seu desenvolvimento interrompido e

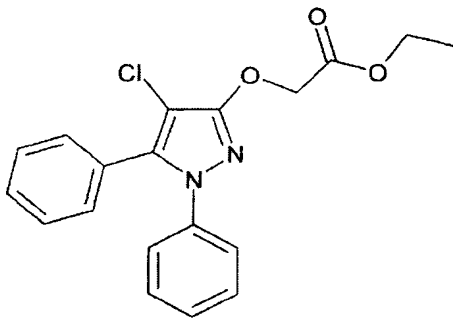
relutam em se dividir (4). As células cultivadas com colchicina podem apresentar certo grau de poliploidia. As concentrações de colchicina usadas neste estudo (0,1-1,0 mM), contudo, foram 10 a 100 vezes menores do que as necessárias (5-20 mM) para a indução da poliploidia. A recuperação de células individuais foi muito melhor com o método com colchicina do que com protoplastos (Hayashi e Yoshida, 1988). As células em questão podem ser submetidas a testes adicionais com citometria de fluxo para avaliação do nível de poliploidia e da estabilidade do genoma. Além disso, níveis aumentados de ploidia poderiam proporcionar o benefício adicional de aumento do nível de proteínas recombinantes mediante os maiores números de cópias das células transformadas.

A atividade da galacturonana apresentou funções biológicas de separação celular em células de soja em suspensão e ela é descrita como oligossacarina, uma vez que apresentou tais funções (Albersheim e Darvill, 1985). Assim, o ácido galacturônico também é testado nessas células em suspensão para se obter separação celular sem qualquer alteração na ploidia caso seja observada qualquer alteração da ploidia induzida pela colchicina nas suspensões de células individuais aqui descritas. Portanto, o uso direto da galacturonana e outras oligossacarinas similares continua a ser avaliado para se comparar a eficiência da separação celular pela eliminação das propriedades adesivas das células. Assim, a presente invenção proporciona métodos simples que são reproduzíveis e consistentes por várias rodadas de ciclos de suspensão celular, enquanto as células mantêm ao mesmo tempo estabilidade genômica.

Um composto preferido aqui exemplificado é o DAS-PMTI-1. Este composto parece ser muito potente (~100-1000X do que a colchicina no que refere-se ao efeito sobre o crescimento dos cultivos). Após 7 dias de tratamento, há considerável morte celular em uma concentração de 0,5 mM, mas quando esses cultivos são subcultivados na ausência do DAS-PMTI-1, as células em suspensão se recuperaram como células individuais com baixa frequência após 2 semanas. Maior otimização pode ser realizada para que sejam determinadas as concentrações preferidas deste composto de-

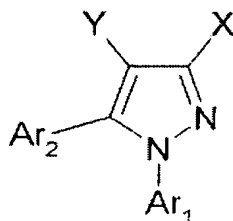
pendendo das aplicações preferidas (tais como tipos de células e afins) para a separação de células individuais. Outros inibidores IMI com funções semelhantes podem ser usados nas separações celulares em questão mediante suspensão da síntese da pectina. À luz da presente revelação, inibidores IMI
5 adicionais e análogos dos mesmos podem ser testados e selecionados pela sua eficácia na produção e manutenção de células individuais.

A estrutura química do DAS-PMTI-1, também conhecido como etil éster de ácido 4-cloro-1,5-difenil-1H-pirazol-3-ilóxi)-acético é como segue:



10 Um gênero preferido de compostos para uso de acordo com a presente invenção são compostos tipo DAS-PMTI-1. Tais compostos podem estar em conformidade com a estrutura geral proporcionada acima e incluem derivados funcionais (para uso de acordo com a presente invenção) e análogos dos mesmos.

15 Segue abaixo uma fórmula química geral de alguns inibidores conhecidos da microtubulina para uso de acordo com a presente invenção. Enquanto o DAS-PMTI-1 é uma modalidade preferida, praticamente qualquer agente inibidor da microtubulina pode ser usado de acordo com a presente invenção. Em algumas modalidades preferidas, um ou mais membros
20 do gênero diarilpirazol a seguir são usados em combinação com a colchicina:



em que

$X = \text{CO}_2\text{R}, \text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}, (\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{R}, \text{OCH}_2\text{CO}_2\text{R}, \text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{R},$
 $\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{R}, \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{R}, \text{CH}_2\text{CH}(\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{R}, \text{ ou }$
 $\text{OCH}(\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{R}$

$Y = \text{CN}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{F}, \text{ ou } \text{NO}_2$

Ar_1 = fenila não-substituída, piridina não-substituída, 1,3 fenila substituída, 1,3 piridina substituída, substituída por halogênio ou CN

5 Ar_2 = fenila não-susbtituída, piridina não-substituída, 1,3 fenila substituída, 1,3 piridina substituída, substituída por halogênio ou CN

$\text{R} = \text{H}$ ou 1-5 carbonos de éster linear ou ramificado

Assim, cultivos de células vegetais individuais em suspensão foram produzidas usando-se inibidores dos microtúbulos que podem ser mantidos por pelo menos dois ciclos de subcultivo. Essas suspensões de células individuais são únicas na medida em que apresentam paredes celulares intactas, ainda que existam separadamente umas das outras.

Uma planta "transgênica", célula vegetal e similares (a não ser que de outra maneira especificado), uma planta completa, um cultivo de células vegetais, uma linhagem de células vegetais, um cultivo de tecido vegetal, planta inferior, cultivo de células vegetais de monocotiledônea, cultivo de células vegetais de dinocotiledônea ou progênie dos mesmos derivam de uma célula vegetal transformada (ou protoplasto ou afim) que contém DNA exógeno, introduzido por técnicas de laboratório, não originalmente presente em uma célula vegetal nativa não-transgênica da mesma espécie. Os termos "planta transgênica" e "planta transformada" foram algumas vezes usados na técnica como sinônimos para definir uma planta cujo DNA contém uma molécula de DNA exógeno. Uma planta transgênica pode ser estavelmente transformada para conter DNA exógeno que funcione dentro e seja incorporado no DNA genômico da planta ou ser uma planta transgênica que foi transformada por vetores de base viral e expressa temporariamente o DNA exógeno.

"Isolado" e "purificado" implicam a "mão do homem" e podem se aplicar a polinucleotídeos e a proteínas. Um polinucleotídeo clonado é um

polinucleotídeo isolado, por exemplo.

Métodos de transformação. Testou-se a transformação nuclear e com plastídeos dessas células individuais usando-se *Agrobacterium* polietilenoglicol (PEG) para a transformação nuclear e para o bombardeio biolístico como objetivo de transformação com plastídeos. Em tentativas de transformação nuclear, foram demonstradas a inserção do DNA do plasmídeo e a expressão temporária da proteína fluorescente amarela. Na transformação com plastídeos, células foram recuperadas e a estabilidade da transformação foi demonstrada por análise por PCR. Isolados de células transplastômicas foram expandidos e estão sendo analisados em busca do marcador seletivo, expressão do marcador nptII por ELISA.

A metodologia de transformação aqui descrita pode ser aplicada a processos relacionados com a saúde animal. Contudo, a transformação com base em células individuais por meio de novos meios de inserção, incluindo inserção mediante nanopartículas podem também proporcionar abordagens únicas para a transformação de plantas de cultivo além da multiplicidade dos tipos celulares usados na produção de proteínas recombinantes.

O desenvolvimento da transformação da célula individual em questão por meio de métodos de PEG e/ou eletroporação torna as células individuais com paredes celulares intactas tão conformáveis quanto sistemas de células bacterianas/de mamíferos e também é útil em sistemas de transformação de alta produtividade para aqueles tipos celulares.

A capacidade de transformar células individuais tem diversas aplicações possíveis. Por exemplo, os métodos delineados aqui têm utilidade no aperfeiçoamento de processos relacionados à produtividade de cultivos de células vegetais para aplicações relacionadas com a saúde animal. Mais uma vez, os processos em questão são úteis para o aumento da eficiência dos processos referentes à saúde e biofarmacêutica animal no caso de produtos baseados em células vegetais. Os processos em questão podem também auxiliar na seleção de clones de elite em linhagens celulares vegetais. Tais aplicações podem ser usados na inicialização de cultivos celulares em mini-suspensão com a finalidade de diminuir a variação de expres-

são de lote a lote e para desenvolver um POP para minimizar ou eliminar as células não-transgênicas ou a presença de eventos múltiplos em agregados.

Como discutido na seção Antecedentes da Invenção, métodos envolvendo o *Agrobacterium* são muito ineficazes e a transformação mediada pelo WHISKERS® não serve como processo de alta produtividade. O método mediado pelo PEG é usado com protoplastos. Ainda que os protoplastos do tabaco sejam fáceis de transformar, eles não são facilmente conformáveis a processos de transformação HTP devido aos problemas da regeneração da parede celular.

Em contraste, a presente invenção proporciona uma parede celular intacta. O processo mediado pelo PEG é o primeiro relato de uma célula individual com parede celular intacta. Os presentes métodos são altamente eficientes. Além disso, esse processo elimina a integração basal usando na transfecção plasmídeos purificados de fragmentos. Um protocolo de transformação rápida envolvendo células vegetais individuais tal como a Separação Celular Ativada por Fluorescência (FACS) seria ideal para miniaturização e automação de processos para selecionar eventos apropriados com custo, recursos e prazos reduzidos. Isso poderia melhorar drasticamente os processos atuais de seleção de agregados de calose ou em suspensão mediante a seleção das células transformadas através de separadores de células e da determinação de eventos de elite de expressão homogênea para desenvolvimento posterior mediante pesquisa industrial ou linhas de produção.

Assim, o presente processo proporciona elementos fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa e desenvolvimento de bioprocessos, para a seleção HTP no caso de necessidades referentes à saúde animal e aperfeiçoamento de linhagens de células hospedeiras, por exemplo.

A presente invenção permite desenvolvimentos posterior de análises baseadas em células individuais e de processos para a seleção de células com o objetivo de identificar células de expressão estável com base na expressão do RNA conjugada com sondas fluorescentes de resfriamento celular.

Tais células individuais são também úteis na análise temporária e/ou estável do Gene de Interesse (GEI) para plataformas de proteção de traços e cultivos.

5 A não ser quando especificamente indicado ou implicado, os termos "um", "uma", "o" e "a" significam "pelo menos um(a)" conforme aqui utilizados.

Todas as patentes, pedidos de patente, pedidos provisórios e publicações aqui referidas ou citadas estão incorporadas por referência na íntegra na medida em que não sejam inconsistentes com os ensinamentos
10 explícitos deste relatório.

EXEMPLO 1 – materiais e métodos

Células BY2 cultivadas em suspensão foram obtidas do tabaco do Japão e mantidas em meio LSBY2 em um ciclo de 7 dias. Suspensão de Orelha-de-Macaco e tabaco Petite Havana foram iniciados a partir de calose
15 iniciada em suspensões de DAS e Xanthi obtidas sob a forma de amostra do Professor Jack Wildholm, da UIUC, Illinois. Células JT-NT1 em suspensão, obtidas da Universidade de Washington, mantidas em meio NT1B em um ciclo de 7 dias, foram usadas apenas no estudo da enzima de degradação da pectina para separar as células em células individuais. As células foram
20 cultivadas em frascos agitados a 25-28°C no escuro em agitadores orbitais a 150 rpm. A colchicina foi obtida da Fluka, o DAS-PMTI-1 (Martin *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2001) foi obtido da DAS CRS e as enzimas para degradação da pectina (pectoliase Y e pectinase) da Sigma. Os concentrados dos dois despolimerizadores da tubulina usados nesta investigação foram dissolvidos em
25 DMSO para preparar 0,5 M de solução-estoque. A concentração testada tanto no caso da enzima pectinase quanto da enzima pectoliase estava na faixa de 0,0005% a 0,005%. As linhagens celulares de tabaco em suspensão NT-1 e BY-2, por exemplo, são apropriadas para a prática da presente invenção. As células BY-2 estão comercialmente disponíveis de acordo com Nagata *et al.*, por exemplo (Nagata, T., Nemoto, Y. e Hasezawa S. [1992], Tobacco
30 BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the biology of higher plants. Intl. Rev. Cytol. 132: 1-30). As células NT-1 foram originalmente desenvolvidas a partir

da *Nicotiana tabacum* L.cv. Bright Yellow 2 (BY-2). A linhagem celular NT-1 é amplamente utilizada e prontamente disponível. Qualquer linhagem celular de tabaco em suspensão é, contudo, consistente com a prática da invenção. Vale notar que as origens da linhagem celular NT-1 são obscuras. Ademais, a linhagem celular parece variar e ser dada a alterações em resposta às condições de cultivo. As células NT-1 apropriadas para uso nos exemplos abaixo estão disponíveis na American Type Culture Collection sob o número de acesso ATCC 74840. Ver também a Patente US 6.140.075.

EXEMPLO 2 – observações microscópicas

A expansão e a separação celulares foram observadas por microscopia óptica (microscopia Nomarski e de campo escuro). As células esféricas e as células individuais foram contadas com um hemacitômetro para determinação do grau de expansão e separação celular, respectivamente. O número de células nos agregados foi determinado mediante tratamento com 5% (peso/volume) de trióxido de cromo por 16 h e contagem das células (Henshaw *et al.*, 1966). A viabilidade celular foi determinada pela coloração das células (Yokoyama *et al.*, 1997) com diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP) em um microscópio fluorescente (fotomicroscópio Zeiss). Para determinar a presença das paredes celulares nestes cultivos de células individuais usou-se alvejante óptico. O calcofluor, obtido da Sigma, que é um corante fluorescente específico para a celulose, foi usado neste estudo e a formação de complexos de celulose-calcofluor foi observada mediante microscopia de fluorescência (fotomicroscópio Zeiss). O calcofluor (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) foi preparado como uma solução a 0,1% (peso/volume) em tampão PBS e armazenado no escuro em temperatura ambiente (Kwok *et al.*, 2003). Antes do uso, o corante de calcofluor foi centrifugado a 15.000 g por 2 minutos para a remoção de precipitados. Uma gota ou duas de solução de calcofluor foram adicionadas às células separadas. Após 2 ou 3 minutos à temperatura ambiente, a suspensão celular foi lavada com água e submetida à contracoloração com 0,1% de azul de Evan (Sigma, E-2129) em TBS (pH 7,2) por 1 min à temperatura ambiente e observada em microscópio ultravioleta a uma amplitude de onda de 395 a 415

nm (luz de observação de 455 nm). A parede celular apareceu como halos ovais branco-azulados ou turquesa.

EXEMPLO 3 – resultados de tratamentos contínuos com adição ao meio de pectinase e pectoliase

5 Suspensões de células de tabaco Petite Havana, BY2 e NT1 foram usadas para investigar o efeito de enzimas causadoras da degradação da pectina, a pectinase e a pectoliase, em diferentes concentrações. As suspensões de JT-NT1 de fato responderam melhor a tratamentos com pectinase e a suspensão de BY2 respondeu melhor à pectoliase do que à outra en-
10 zima. Contudo, houve mortalidade celular, visualizada sob a forma de colorações vitais e inibição do crescimento dos tipos celulares. O volume de inóculo de células no estágio de subcultivo foi aumentado até 12 vezes para uma produção apropriada das células individuais. As células PH (Petite Havana) e BY2 puderam ser cultivadas por pelo menos 7 dias em cultivo com
15 pectoliase. O cultivo contínuo dessas células em baixa concentração da enzima pectoliase (3 unidades ativas) pareceu ser prejudicial. Essas células, no sexto dia de cultivo, produziram numerosas células individuais quando o volume de inóculo era de 6 ml (volume inicial de inóculo na fase estacionária) e cultivadas em 50 ml de meio fresco junto com a enzima. Essas células,
20 quando testadas com FDA e IP após 6 dias de cultivo, demonstraram um número mais alto de células individuais viáveis (**Figuras 1 e 2**). O crescimento da suspensão foi drasticamente afetado nos tratamentos enzimáticos e subcultivar as células no mesmo meio contendo enzima pareceu ser prejudicial. Recomenda-se que as células poderiam ser tratadas em meio fresco
25 por um período máximo de 7 dias de cultivo e que elas deveriam ser então transferidas para o meio sem a enzima para recuperar o crescimento. Na melhor das hipóteses, esse método poderia ser usado para a seleção de clones transgênicos de elite nos agregados heterogêneos ou para iniciar cultivos em suspensão de alta capacidade de produção com volume celular
30 uniforme.

Figura 1: isolamento de células individuais com paredes celulares intactas a partir de células JTNT1 em suspensão em tratamentos conti-

nuos com pectoliase com subcultivo no meio por 7 dias.

A – suspensão normal de células BY2; **B** – o mesmo que **A**, mas com as células coloridas com I2KI para mostrar a agregação das células; **C** e **D** – células separadas após 6 dias de tratamento enzimático contínuo; **E** e **F** – células individuais separadas com e sem coloração com I2KI. Nota-se a divisão celular normal (**F**).

Figura 2: viabilidade das células BY2 após 6 dias de tratamento contínuo com pectoliase (células tratadas com FDA e IP) e a produção de células individuais.

A: agregados de células BY2; **B:** células BY2 em 1 ml de inóculo em pectoliase no meio por 5 dias; **C:** 6 ml de inóculo com enzima no meio no dia 5; **D, E e F:** fotos por microscópio de **C**; **G:** aglomerados de controle com variante da célula BY2 desenvolvida em BAP e sacarose a 12%; **H e I:** células individuais de **G** após tratamento enzimático contínuo por 5 dias. Células coloridas em FDA e IP. Note as células mortas em PI coloridas em vermelho.

EXEMPLO 4 – efeitos das colchicinas sobre o crescimento de células BY2, NT1, Petite Havana (PH), Xanthi (Xan) e de Orelha-de-Macaco (JM) em suspensão.

Após 7 dias de cultivo o número de células de BY2, Xan e JM respondeu a concentrações de 0,5 mM e 1mM de colchicinas (**Figuras 3, 4 e 5**). Contudo, um alto número de células individuais em suspensão foi visto em 1 mM de células BY2 e de células JM em suspensão. Foi significativo notar que o desenvolvimento das células JM foi afetado drasticamente mesmo em 0,5 mM de colchicina e que o crescimento não pôde ser recuperado mesmo após uma semana adicional de cultivo no mesmo meio. Isso indica que a divisão celular é inibida pela colchicina em células de JM e que concentrações mais baixas precisam ser testadas para maior otimização da separação celular sem redução da densidade ou do crescimento da cultura. O interessante é que tal inibição do crescimento não foi observada em células BY2 em suspensão que puderam ser cultivadas continuamente por pelo menos 14 dias na presença de 1 mM de colchicina. Inchamento celular foi observado primeiramente no terceiro dia e as células desenvolveram formas

esféricas à medida que o cultivo continuou com células BY2 em suspensão. Uma vez que as células esféricas foram gradualmente liberadas dos agregados, presumiu-se que a separação celular era acompanhada por expansão. Havia quantidades aproximadamente iguais de células BY2 no meio contendo 1 mM de colchicina após 7 dias, como nos cultivos de controle. Quando as células cultivadas por 7 dias em 1 mM de colchicina foram subcultivadas em um meio sem colchicina, a capacidade de crescimento como agregados não foi completamente recuperada. Em vez disso, ~90% das células em suspensão foram vistas como células individuais intactas. A expansão e a separação celulares também ocorreram parcialmente em agregados celulares em suspensão de todas as outras suspensões celulares testadas em meio contendo 0,5 mM de colchicina. Há resposta de inibição do crescimento celular nas suspensões de células JT-NT1 e JM. As células NT1 em suspensão registraram quase 50% de redução do crescimento em 1 mM de colchicina.

Entre estas células, células grandes segregadas foram observadas semelhantes àsquelas de células da raiz epidérmica separadas relatadas nos mutantes qual-1 da pectina (Bouton, 2002). Segregação parcial de células semelhante com formato esférico foi observada em todos os tipos de suspensão celular testados com o DAS-PMTI-1. Contudo, o crescimento celular foi afetado muito significativamente na suspensão tratada com DAS-PMTI-1 em uma concentração de 0,5 mM. Experimentos posteriores podem ser realizados para aperfeiçoar as condições da separação celular com este composto e minimizar a inibição do crescimento celular. Conforme demonstrado por testes de coloração com FDA e PI, há alto grau de viabilidade celular nas suspensões de células BY2 e JM testadas. As células eram muito arredondadas e muitas apresentavam uma projeção semelhante a um bico, indicando a extensão da parede celular das células ativas, possivelmente antes da divisão celular. As células separadas eram grandes, expandidas, e tinham um formato esférico típico do protoplasto. Coloração por calcofluor foi usada para determinar a presença ou ausência de paredes celulares intactas. A **Figura 4** mostra a clara presença de parede celular ao redor dessas

células arredondadas. A observação dessas células sob o condensador de campo escuro do microscópio mostrou uma espessa parede celular ao redor da célula (**Figura 3**, painel C). Essas células individuais eram resilientes nos cultivos agitados, uma vez que não havia células mortas devido à ausência da pectina e à presença de células grandes, como observado no teste de coloração vital (**Figura 5**). Um percentual muito alto de células saudáveis foi observado neste painel. Portanto, é possível usar essas células nos cultivos agitados ou em placas de microtitulação como inóculos com número preciso de células.

Figura 3: indução de suspensão de células individuais de tratamentos de 7 dias com adição de colchicina ao meio a partir de suspensões de agregados de células BY2 e de tabaco Xanthi.

A: agregado normal de células BY2 em suspensão (colorido com calcofluor); **B:** suspensão de células BY2 individuais em 1 mM de colchicina por 7 dias; **C:** o mesmo que **B**, mas aumentado para mostrar células individuais com paredes celulares intactas; **D:** agregados celulares de Xanthi; **E:** agregados de Xanthi em suspensão tratados por 7 dias em 0,5 mM de colchicina. Nota-se a liberação parcial de células individuais em 0,5 mM; **F:** células individuais de Xanthi separadas em 1 mM de colchicina.

Figura 4: liberação de células individuais com paredes celulares intactas em tratamentos com colchicina a partir de agregados de células de tabaco BY2 e Xanthi em suspensão.

A: agregados normais de BY2 em suspensão; **B:** suspensão de células BY2 individuais em 1 mM de colchicina por 7 dias; **C** e **D:** recuperação de células de volta em agregados após remoção da colchicina (4 dias após subcultivo com 1 ciclo de cultivo de tratamento com colchicina); **E:** agregados de Xanthi em suspensão; **F:** agregados de Xanthi em suspensão tratados por 7 dias em 1 mM de colchicina. Note as células individuais liberadas nos cultivos de BY2 e Xanthi e a presença da parede celular intacta na presença do alvejante óptico calcofluor. (Todas amostras tratadas com calcofluor a 0,1% e examinadas ao microscópio fluorescente Leica).

Figura 5: liberação de células individuais viáveis com paredes

celulares intactas em tratamentos com colchicina da variante BY2 do tabaco (aclimatadas em meio com sacarose a 12%) e agregados de Orelha-de-Macado em suspensão.

A: agregados de BY2-V normais em suspensão; **B:** visão aproximada dos agregados não-tratados; **C, D e E:** indução de células BY2 individuais em suspensão em 1 mM de colchicina por 7 dias (células sob magnificação de 10x, 20x e 40x); **F:** indução de células individuais em suspensão de Orelha-de-Macaco em 1 mM de colchicina, tratamento de 7 dias. Todas as amostras tratadas com FDA e PI e examinadas sob microscópio fluorescente Leica. Nota-se a alta viabilidade das células vistas aqui na coloração com FDA e com pouquíssimas células coloridas em vermelho pelo IP.

EXEMPLO 5: produção de células individuais e a influência do DAS-PMTI-1 em meio contendo glicerol como única fonte de carbono

O presente exemplo proporciona outra discussão no que refere-se um novo meio de cultivo com glicerol e o efeito do DAS-PMTI-1 em baixa concentração e as características do cultivo. Os presentes resultados são muito significativos, uma vez que houve relatos anteriores na literatura de que o glicerol mitiga os efeitos da colchicina sobre a ruptura dos microtúbulos da soja; assim, a técnica ensinava a evitar o uso de glicerol nos meios destinados às presentes aplicações. Ver, por ex., Hayashi e Yoshida, 85 PNAS 2618-22 (1988). Além disso, os presentes dados referentes ao glicerol são novos no que refere-se a células vegetais e tais resultados não foram previamente relatados. Três diferentes genótipos de cultivos rápidos de tabaco foram cultivados de maneira bem-sucedida por vários meses usando-se glicerol a 3% como a única fonte de carbono.

Esse exemplo também proporciona uma curva de crescimento que representa o comportamento do cultivo em duas diferentes concentrações de DAS-PMTI-1 em comparação com o tratamento nulo.

Diversas classes de compostos que provocam ruptura dos microtúbulos produzem células individuais. Os compostos incluem agentes que rompem ou inibem os microtúbulos (compostos que se ligam à α - e à β -tubulina) classificados como (i) dinitroanilinas (colchicinas, orizalina, triflurali-

na, cloralina) e (ii) N-fenilcarbamatos tais como benzamida, pronamida, amida fosfórica, amiprofosmetil (Morejohn e Foskett, 1986; Akashi *et al.*, 1988), assim como os antifúngicos benzamida e zaralamida (Young, 1991), (iii) os fármacos anticâncer paclitaxel (Morejohn e Foskett, 1986), vincristina e vimbastina e (iv) outros compostos que rompem os microtúbulos e/ou afetam as propriedades da parede celular, tais como os inibidores da síntese de celulose e os inibidores do citoesqueleto, tais como o alumínio e a cumarina também têm testados sua capacidade de produzir células individuais com a formação de poucos ou nenhum micronúcleo. Os microtúbulos corticais e mitóticos têm diferente sensibilidades e combinações em comparação com os compostos de diferentes classes listados acima ou de uma das classes, mas rompem seletivamente os túbulos na medida em que a divisão celular não é afetada. A propriedade adesiva da célula será, contudo, suficientemente rompida para se levar as células ao estado individual e mantê-las nele sem nenhuma ou com pouca instabilidade genômica.

Foram examinados os efeitos dos inibidores de microtúbulos (IMI) sobre o crescimento do tabaco em cultivo em suspensão. Células da fase estacionária do dia 7 (1 ml) foram transferidas para o meio (50 ml) em frascos agitados de 250 ml (Bokros *et al.*, 1993) contendo diferentes concentrações de 25 a 1000 nM) de IMI e foram cultivadas por 7 dias, no escuro, a 25°C. Tanto os frascos de controle quanto aqueles contendo IMI continham uma concentração final de 0,5 – 0,1% (v/v) de DMSO. O crescimento desses químicos foi avaliado em meio EP12 no caso das células BY2 e em meio NT1B no caso das células BTI-NT1, no qual a fonte de carbono é substituído por glicerol a 3%. A resposta dessas células foi comparada usando-se meio com a mesma composição, mas com sacarose a 3% como fonte de carbono. O meio com glicerol foi usado uma vez que se sabe que o glicerol é um estabilizador dos microtúbulos e que as células de tabaco aclimatadas ao glicerol a 3% não apresentam fenóis quando sob estresse.

A intervalos de 1 dia, amostras de células em tréplica (0,5 ml) foram sedimentadas mediante curta centrifugação em tubos de microcentrifugação tarados e os pesos úmidos foram determinados. Os resultados a-

presentados na **Figura 6** mostram que após um intervalo de 2 dias, as células de controle cresceram rapidamente por 4 dias e então entraram em fase estacionária por volta do dia 6. As células de tabaco cultivadas com 25 nM de DAS-PMTI-1 apresentaram cinética de crescimento similar àquelas do cultivo de controle. Entretanto, os pesos úmidos dessas culturas eram ligeiramente maiores do que os controles durante a fase estacionária, sugerindo um favorecimento do crescimento com 50 nM de DAS-PMTI-1. As células cultivadas com 0,5-1,0 mM de DAS-PMTI-1 apresentaram inibição completa e morte celular no prazo de 3 dias do início do cultivo mediante exame das células tratadas com FDA e iodeto de propídio sob microscópio fluorescente. Os dados demonstram que o crescimento das células de tabaco é inibido próximo ao limiar de 50 nM, mas concentrações acima de 100 nM causam inibição da mitose e morte celular.

Em contraste com a colchicina, uma dinitroanilina de baixa potência para a produção de células individuais, que a uma concentração de 0,25-0,5 mM é eficaz, o DAS-PMTI-1 é muito eficaz em concentrações tão baixas quanto 5-25 nM mesmo na presença do glicerol como fonte de carbono total tanto no caso das células NT1 quanto no caso das BY2. A faixa de concentração de 25 nM não é eficaz apenas na liberação de células individuais, mas também muito eficiente ao não diminuir a taxa de crescimento das células por um período de 10 dias (**Figura 6**). De fato, há um ligeiro aumento da biomassa na fase estacionária do crescimento devido ao fato de essas células individuais sofrerem expansão. As observações microscópicas, contudo, não revelaram a presença de micronúcleos nessas células individuais.

Figura 6: efeitos do DAS-PMTI-1 sobre o crescimento das células de tabaco NT1. As células foram cultivadas na ausência ou na presença de 25 ou 50 nM de DAS-PMTI-1 em meio NT1B com glicerol a 3% como fonte exclusiva de carbono. Todos os valores de peso úmidos representam médias $\pm 0,18$ das células replicadas.

O status de célula individual das células produzidas mediante DAS-PMTI-1 foi analisado sob microscópio confocal e foi claramente confir-

mado que se tratava de células individuais, uma vez que se descobriu que elas não estavam unidas.

EXEMPLO 6 – desconvolução de linhagens transgênicas em suspensão e produção de linhagem clonal

5 As suspensões de tabaco normalmente contêm células em agregados ou pequenos aglomerados e são altamente heterogêneas. As células em cultivo podem ser geneticamente idênticas (população homogênea) ou podem apresentar alguma variação genética (população heterogênea). Uma população homogênea de células derivadas de uma única célula de
10 origem é chamada clone. Portanto, todas as células de uma população clonal são geneticamente idênticas e altamente homogêneas em termos do caráter celular. As suspensões de células de tabaco BY2 e NT1 são rotineiramente utilizadas como sistemas-modelo em muitos laboratórios.

 Essas células são prontamente transformadas após a remoção
15 da parede celular (Mathur e Koncz, 1998) seja diretamente mediante bombardeio com partículas, seja mediante cocultivo com *Agrobacterium tumefaciens* (An, 1985; Klein *et al.*, 1988; Rempel e Nelson, 1995). Ainda que a transformação das BY2 mediada pelo *A. tumefaciens* seja realizada rotineiramente em muitos laboratórios, descobrimos que a eficácia na obtenção de
20 calos transgênicos varia entre experimentos e depende principalmente da qualidade do cultivo de células BY2. A sincronização de células BY-2 nas fases M e no início da fase G1 origina suscetibilidade 10x maior na transformação estável mediada pelo *A. tumefaciens* do que células no estágio G2. Além disso, a cepa de *Agrobacterium* LBA4404 que expressa constitutiva-
25 mente o gene *virG* (van der Fits *et al.*, 2000) é 2 a 5 vezes mais eficaz na geração de calos transgênicos. Normalmente, cerca de 500 calos transgênicos podem ser obtidos de 4 ml de células BY-2 cocultivadas com esta cepa de *Agrobacterium*, permitindo que programas de seleção de fenótipo sejam
30 realizados. Contudo, os aglomerados ou agregados das linhagens celulares transformadas parecem ter múltiplos eventos transgênicos heterogêneos. Como resultado, há níveis de expressão inconsistentes de um lote de cultivo para o outro. O método com células individuais é empregado na desconvolu-

ção da mistura quimérica de células do aglomerado e separá-la em células individuais para identificar eventos clonais. Células individuais produzidas das linhagens de tabaco NT1 em suspensão transgênicas e quiméricas (GAD1762-034) transformadas com o gene marcador seletivo PAT (**figuras 7 e 8**).

Figura 7: produção de células individuais e de colônias a partir de linhagens celulares DAS GAD1762-034. **Figuras 8A, 8B e 8C:** cultivo de 2-6 semanas de colônias de células DAS GAD1762-034 individuais.

Cerca de 20 colônias separadas foram selecionadas aleatoriamente e expandidas em meio de seleção fresco. Linhagens em suspensão foram produzidas a partir dessas colônias e linhagens de cultivo rápido obtidas mediante 6 ciclos de cocultivo de 7 dias cada. A produção de biomassa dessas colônias era consideravelmente uniforme entre as linhagens e produziram 19 linhagens para posteriores análises de proteína.

As amostras foram coletadas nos dias 7 e 13 para mais de 4 ciclos de cocultivo e análises de expressão foram realizadas. Os dados de expressão obtidos foram postos em um gráfico (**figura 9**).

Fica claro a partir da análise dos dados que havia possibilidade de obter diversas linhagens clonais com expressão bem delimitada em diversos ciclos de cultivo em comparação com a linhagem agregada de controle em suspensão nº 34. Além disso, a sublinhagem 17 teve desempenho melhor do que a linhagem de controle em níveis de expressão, indicando que esse processo seleciona a linhagem clonal de elite dentro da população e que o aperfeiçoamento posterior da desconvolução poderia ajudar na obtenção de linhagens de elite de expressão uniforme.

EXEMPLO 7 – transformações de cultivos de células individuais em suspensão

Materiais e métodos

Preparação das células vegetais: três a quatro dias antes da transformação, um cultivo em suspensão de 1 semana de idade é subcultivado em meio fresco mediante transferência de 2 ml de cultivo de NT1 ou de BY2 em 40 ml de meio NT1B ou LSBY2 em um frasco de 250 ml. A concen-

tração dos inibidores de microtúbulos (IMI) foi usada como descrito acima para produzir células individuais. As células individuais foram coletadas ou 4 ou 7 dias após o tratamento inicial com IMI.

Figura 10: células individuais das células BY2 isoladas com DAS-PMTI-1, um derivado do metilindol patenteado da DAS e potente herbicida inibidor dos microtúbulos. Uma concentração de 20-50 ml foi usada para produzir células individuais após 5 dias de subcultivo. Nota-se que as células são células individuais (o par tem extremidades sobrepostas) e a imagem foi obtida sob microscópio de contraste por interferência diferencial acoplado a um sistema de imagem confocal.

Quando as células BY2 individuais foram processadas através do citômetro Beckman Flow, havia 658.250 células viáveis/ml de meio, células viáveis com um diâmetro médio de 10,43 μm e um volume de 593,8 μm^3 .

Preparação do *Agrobacterium*. O construto com a cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 contendo o gene YFP (pDAB4613) é armazenado em glicerol a 50% a -80°C . Uma alíquota de 20-500 μl do cultivo concentrado, contendo o vetor de expressão, é usada para iniciar uma cultura líquida diretamente mediante adição de 20-500 μl a 30 ml de meio líquido YEP contendo 10 g/l de extrato de levedura, 10 g/l de peptona, 5 g/l de NaCl, 10 g/l de sacarose e 50 mg/l de espectinomicina. Realizou-se em seguida incubação por 18-20 horas no escuro a 28°C e centrifugação a 150-200 rpm até a cultura atingir uma densidade de cerca de 1,5 a OD^{600} .

Cocultivo de células individuais para transformação nuclear: no momento da transformação, 1,0 ml de suspensão de *Agrobacterium* é adicionado a um frasco contendo 40 ml da suspensão de células de tabaco individuais de 4 a 7 dias de idade (pré-lavadas no meio para remover qualquer IMI) e misturada por pipetagem para cima e para baixo 5 vezes com uma pipeta de 10 ml. A suspensão uniforme é então transferida em alíquotas de 250 μl para placas de 24 poços embaladas em parafilme e cultivadas no escuro a 25°C sem agitação por 3 dias. Uma alíquota de cerca de 50 μl de suspensão foi testada mediante colocação na lâmina do microscópio e busca da expressão temporária da proteína fluorescente amarela (YFP).

Tratamento com PEG/DNA de células individuais para transformação nuclear: suspensões de agregados de células JT-NT1 foram tratadas com 1 mM de concentração final de colchicina (Fluka) em meio NT1B no início do subcultivo e cultivadas por 7 dias a 125 rpm em um agitador orbital. As suspensões foram cultivadas a 25°C. Ao final do sétimo dia, 1 ml (0,6 OD⁶⁰⁰) das células individuais foram coletadas do frasco e colocadas em um tubo estéril de 14 ml. 10 ml de meio MaMg (para a composição, ver a **Tabela 1**, abaixo) foram adicionados e realizou-se centrifugação por 5 min a ~1.000 rpm.

Tabela 1: composição do meio MaMg (transformação mediada pelo PEG)			
Meio MaMg			
Volume total do meio	Concentração estoque	100	ml
MES		0,1	g
Manitol		7,3	g
MgCl ₂	15 mM	1,5	ml
pH 5,5			

O líquido foi decantado e as células ressuspendidas em 300 µl de MaMg. ~50 µl de DNA de plasmídeo foram adicionados. A essa mistura de células individuais e DNA, foram adicionados 300 µl de PEG 3350 (PEG 3350 a 40% peso/volume, 0,4 M de manitol, 0,1 M de Ca (NO₃)² pH 5-6 final), misturados lenta e suavemente. Procedeu-se à incubação das células individuais e a mistura de DNA e PEG a temperatura ambiente por 20 minutos e então foram adicionados 10 ml de W5 (meio para lavagem) e fez-se agitação por 5 min a ~1000 rpm. O líquido foi decantado e foram adicionados 2 ml de meio líquido de base (NT1B) e a suspensão celular foi transferida para uma placa de múltiplos poços. Diversas réplicas puderam assim ser transferidas para os poços de placas de 24 poços. Procedeu-se ao teste por 20-24 horas da expressão transitória de YFP mediante a coleta de um volume de 50 µl da suspensão celular em uma lâmina de microscópio e posterior exame sob microscópio fluorescente com um filtro apropriado (excitação 500/20 nm, diacromo, emissão 535/30 nm).

Bombardeio biolístico das células individuais para a trans-

formação com plastídeos: as células BY2 foram tratadas em 20-50 nM de DAS-PMTI-1 em meio EP a 12% para aumentar o número de plastídeos e com 2,4-D ou com a adição de BAP para aumentar o tamanho do plastídeos por 7 dias. Ao final do sétimo dia as células individuais foram coletadas e 2 ml da suspensão foram transferidos para o filtro de papel. As células foram mantidas no meio LS BY2 em forma gel por 2 horas para dessecação. Foram bombardeadas cinco placas de linhagens celulares individuais deficientes de 2,4-D e cinco placas de linhagens tratadas com BAP. Essas células foram tratadas com 50 nM de DAS-PMTI-1 por 2 semanas e na 3ª semana elas foram tratadas com 20 nM de DAS-PMTI-1. As células estavam em bom estado e relativamente saudáveis.

As células foram bombardeadas com pDAB3969 em partículas de ouro de 0,6 µm de acordo com o protocolo padrão usando-se o canhão biolístico (BioRad). Elas foram transferidas para o LS-BY2 com sacarose a 12% + 100 mg/l de canamicina e a seleção foi realizada após dois dias de recuperação em meio sem o agente de seleção.

Resultados e Discussão

Tentativas de transformação nuclear. As tentativas de transformação com PEG (**figura 11**) e *Agrobacterium* (**figura 3**) claramente mostraram frequências de expressão similares. Em uma alíquota de 50 ml de células analisada, havia 2-3 células que expressavam a YFP. Assim, há uma célula transformada em cada lote de 10.970 células individuais, o que indica de maneira geral que o processo pode não ser muito eficiente. É provável que não tenha havido remoção da colchicina residual. Em um experimento paralelo, as células foram revividas em colônias mais rápido e com mais saúde e com maior frequência de colônias. Isso indica que uma etapa de lavagem aumenta a frequência de transformação em experimentos de otimização. Caso apenas um evento seja selecionado de uma célula individual, haverá pelo menos 50-60 células transformadas por ml de células individuais em uma placa de microtitulação em ambos esses métodos de transformação. Contudo, as condições de transformação podem ser mais aperfeiçoadas e colônias adicionais, transformadas de maneira estável, podem ser isoladas.

Figura 11: expressão da YFP (plasmídeo Ubi10-YFP) após 72 horas de tratamento com PEG. Uma das células filhas (em divisão) no plano de foco apresenta expressão de GFP, indicando que a expressão podia ser estável.

5 Transformação com plastídeo: após 6 semanas de cultivo, 5 colônias em crescimento ativo foram identificadas no meio de seleção. Entretanto, as células de controle não tratadas foram mortas na seleção com 100 mg/l de canamicina (**figura 12**). As colônias em crescimento ativo foram amostradas e analisadas por PCR para determinar a integração dos plasmídeos. Duas de cada 5 colônias apresentam produtos de PCR claros, indicando que o transgene está integrado nos plastídeos.

Figura 12, esquerda: tecido de controle não tratado com 100 mg/l de canamicina; **direita:** célula individual derivada de provável isolado transplastômico em crescimento no meio de seleção.

15 Experimentos adicionais estão sendo realizados para refinar os protocolos de transformação nuclear e com plastídeos de alta capacidade de produção.

Experimentos de transformação adicionais estão sendo realizados para aperfeiçoar o protocolo para o posterior desenvolvimento de um protocolo de transformação HTP e estrutura livre (usando plasmídeos purificados de fragmentos) para novas pesquisas de bioprocessamento e desenvolvimento.

EXEMPLO 8 – aclimação de culturas em suspensão em meio com glicerol

Materiais e métodos

25 **Condicionamento dos cultivos para sincronização.** De maneira a melhorar a sincronização, todas os cultivos foram continuados por 2 semanas sem subcultivo, seguido de diluição de 1 ml do cultivo antigo em meio fresco. As células não-diferenciadas e em divisão foram contadas após este subcultivo (foi observado um índice amitótico de até 40%), enquanto as

30 células diferenciadas que não se encontravam em processo de divisão foram observadas após 10 dias de cultivo. Amostras de 0,5 ml de suspensão foram usadas para procedimentos de protuberância total.

Cultivos celulares

Células brilhantes amarelas 2 (BY-2) cultivadas a longo prazo em meio LSGS-BY2 (Apêndice I) e células NT1 assim como células de tabaco em suspensão de curto prazo Petite Havana (PH) foram cultivadas em meio LSG-BY-2 (Apêndice II) ou em meio G-NT1 (Apêndice III). Todos os meios tinham glicerol como fonte de carbono substituta no lugar da sacarose, exceto no caso dos cultivos regulares de BY2, nos quais o meio continha, além do glicerol, sacarose a 1%. Os cultivos em suspensão foram diluídos em intervalos semanais (1 ml da cultura antiga em 50 ml de meio fresco) em frascos de Erlenmeyer de 250 ml. A suspensão celular foi agitada em um agitador giratório a 100 rpm e mantida a 25°C no escuro. Vos *et al.*, "Microtubules become more dynamic but not shorter during preprophase band formation: a possible 'Search-and-Capture' mechanism for microtubule translocation," *Cell Motil Cytoskeleton* 57: 246-258, 2004).

Características dos cultivos celulares cultivados em meio com glicerol

Em geral, o crescimento dos cultivos foi reduzido em comparação com os cultivos de controle contendo açúcar. Quando o nível inicial de inóculos do cultivo aumenta, contudo, obtêm-se taxas de crescimento normais. As células eram saudáveis e era possível continuar a cultivá-las sem que surgisse a coloração marrom típica observada nas células em cultivos de controle com açúcar. As células cultivadas nos cultivos com glicerol apresentavam uma agregação maior de células nas unidades de suspensão em comparação com suas contrapartes cultivadas com açúcar. Estas células foram usadas nos experimentos para testar os compostos IMI na eliminação das propriedades adesivas das células das subunidades agregadas, uma vez que o glicerol diminui a estabilidade das membranas.

Apêndice I

O meio LSGS-BY2 consiste em macro- e microssais de Murashige e Skoog (Murashige e Skoog, 1962) suplementados com 30 ml de glicerol (v/v) e 10 g de sacarose (p/v), 100 mg/l de mioinositol, 200 mg/l de KH_2PO_4 , 1 mg/l de tiamina e 0,2 µl de 2,4-ácido diclorofenoxiacético. O meio

é ajustado para um pH de 5,8 antes da autoclavagem.

Apêndice II

O meio LSG-BY2 consiste em macro- e microssais de Murashige e Skoog (Murashige e Skoog, 1962) suplementados com 30 ml de glicerol (v/v), 100 mg/l de mioinositol, 200 mg/l de KH_2PO_4 , 1 mg/l de tiamina e 0,2 $\mu\text{g/l}$ de 2,4-ácido diclorofenoxiacético. O meio é ajustado para um pH de 5,8 antes da autoclavagem.

Apêndice III

O meio G-NT1 consiste em macro- e microssais de Murashige e Skoog (Murashige e Skoog, 1962) suplementados com 30 ml de glicerol (v/v), 100 mg/l de mioinositol, 180 mg/l de KH_2PO_4 , 1 mg/l de tiamina e 2 mg/l de 2,4-ácido diclorofenoxiacético. O meio é ajustado para um pH de 5,8 antes da autoclavagem.

EXEMPLO 9 – produção de células individuais a partir de cultivos em suspensão da dicotiledônea (tabaco (*BY2*, *NT1*, *Petite Havana*, *Xanthi*)), cenoura (*Daucus carota L. ssp. sativus cv Sativa*).

Cultivos de cenoura em suspensão

Cultivos de calose de cenoura foram iniciados a partir de plantas *Daucus carota L. ssp. sativus cv Sativa* mantidas *in vitro*. Explantes isolados da folha do pecíolo foram cultivados em meio semissólido (Mashayekhi-Nezamabadi, 2000). Os cultivos em suspensão foram iniciados a partir da calose mediante transferência de 50 mg de calos friáveis para 1,5 ml de meio LSGBY2 (Apêndice I) em uma placa de 24 poços. As suspensões com crescimento mais rápido foram então transferidas para frascos com 1 ml de suspensão em 35 ml de meio líquido LSGBY2. Os cultivos foram mantidos em luz difusa em um ciclo de subcultivo de 7 dias. Esses cultivos eram regeneráveis e as unidades de suspensão eram volumosas com células arranjadas de forma compacta. Quando tratadas com 0,5 mM a 1mM de colchicina ou com 25 nM a 0,5 mM de DAS-PMTI-1 ((éster etil de 4-cloro-1,5 difenil-1H-pirazol-3 ilóxi)-ácido acético) no estágio de iniciação da suspensão do subcultivo, as células das unidades se separam e são liberadas no meio no terceiro dia a partir do início do cultivo. Os cultivos celulares apresentavam

produção homogênea de células individuais em tratamentos com colchicina, mas com DAS-PMTI-1 apresentaram produção de células individuais apenas com formatos celulares variados, em vez de arredondados. As células apresentavam paredes celulares intactas, conforme analisado mediante coloração com calcofluor sob microscópio fluorescente.

Produção de linhagem clonal de suspensões celulares individuais da cenoura

A suspensão de células individuais na fase estacionária de crescimento, 7 dias após o início do cultivo em tratamentos com 0,5 M de colchicina foram diluídas usando-se meio LSBY2 fresco a 0,6 OD⁶⁶⁰. Um cultivo de células individuais diluído de 1,5 ml foi plaqueado em meio M (Apêndice II) em placas de Petri de 15 x 100 e espalhado usando-se o anel. Agregados de cenoura em suspensão não-tratados também foram diluídos na mesma densidade e plaqueados de igual maneira para comparação das respostas de crescimento entre esses cultivos. Após 4 semanas de cultivo no escuro, as placas com as células individuais produziram diversas colônias separadas, indicando que linhagens clonais podiam ser obtidas a partir dessas células. A suspensão não-tratada, contudo, apresentou crescimento de calose na superfície da placa (**figura 13**). Assim, é possível demonstrar que as células isoladas da cenoura podiam produzir colônias derivadas de células individuais para produzir linhagens clonais.

Figura 13: produção de linhagens clonais a partir de suspensões de células individuais de cenoura. O crescimento no meio M plaqueado com agregados em suspensão não tratados (painel A). O crescimento de colônias separadas no meio plaqueado com as células individuais (painel B).

EXEMPLO 10 – produção de células individuais a partir de cultivos de monocotiledônea em suspensão (milho, arroz (T309), Capim do Pomar, trigo (Anza))

Cultivos de células de milho clorofílico totipotente (totipotent chlorophyllous)

Os cultivos fotoautótrofos de milho foram iniciados e mantidos em ciclos de cultivos de 7 dias (Jayakumar *et al.*, 2005). Os cultivos foram

tratados durante o período de subcultivo ou com 25 nM a 0,5 mM de DAS-PMTI-1 ((éster etil 4-cloro-1,5 difenil-1H-pirazol-3 ilóxi)-ácido acético) ou 10 nM a 0,5 mM de trifluralina para separar células individuais dos agregados. A colchicina é ativa apenas em concentrações acima de 0,5 mM até uma faixa de 1 mM e libera células individuais (**figura 14**). As unidades de suspensão de milho estão compactadas em agregados celulares rígidos em comparação com as células de dicotiledônea analisadas. As células de milho verde, contudo, apresentavam as unidades em suspensão mais duras e os tratamentos apresentaram até 50% de células viáveis liberadas em 7 dias que podiam ser separadas seja mediante curtas centrifugações a 100 rpm, seja mediante filtração através de telas com poros variando de 75 a 100 μ M de diâmetro.

Figura 14: tratamento com 0,5-1M de colchicina em meio líquido e cultivos analisados 14 após o início do subcultivo (final do segundo ciclo de subcultivo). **A:** as células individuais são liberadas dos aglomerados; **B:** agregado celular compacto colorido com coloração vital FDA; **C e D:** células individuais coloridas com FDA liberadas em tratamentos com 1 mM e 0,5 mM, respectivamente, após filtração da suspensão (com filtros com poros de 100 μ m de diâmetro); **E e F:** visão mais aproximada das células individuais de **D**.

Cultivos em suspensão de capim do pomar e arroz (T309)

Calose de Campim do pomar e de T309 foram iniciadas a partir de sementes maduras (coleção de sementes DAS) em meio semissólido. Os cultivos em suspensão foram iniciados a partir desta calose derivada de sementes usando-se o protocolo descrito por Fauquet *et al.*, 1996. Os cultivos celulares em suspensão foram mantidos em um ciclo de subcultivo de 7 dias em frascos agitados a 150 rpm no escuro. Compostos IMI similares àquelas descritas no caso do milho (acima) foram utilizados em uma faixa de concentração semelhante. Células individuais de capim do pomar e de arroz foram liberadas 3-5 dias após o início do cultivo.

Cultivo em suspensão de trigo (cv. Anza)

Calose de trigo Anza foi iniciada em meio MS2-D Trigo (Apêndi-

ce III) a partir do tecido do escutelo. Os tecidos de escutelo foram isolados de tecidos esterilizados e embebidos e a calose induzida a partir de diferentes tecidos foi transferida para meio MS-2D Trigo (Apêndice III). Uma linhagem celular de crescimento rápido foi isolada e submetida a subcultivo posterior por 7 anos em um ciclo de subcultivo de 7 dias em meio líquido MS2D e mantida por longo prazo (7 anos). Para a produção de células individuais os cultivos foram primeiro aclimatados em meio líquido NB dicamba (Apêndice IV). Cultivos de trigo Anza puderam ser condicionados a produzir suspensões de qualidade neste meio com unidades de agregação com tamanho uniforme. Fez-se adição de colchicina, trifluralina ou DAS-PMT1-1 aos inoculados no estágio de iniciação do subcultivo no meio em uma faixa de concentração de 25 nM a 1mM. A suspensão liberou células individuais no meio a partir de 3 dias após o início do cultivo. As células individuais eram pequenas e uniformes.

15 **Apêndice I**

O meio LSBY2 consiste em macro- e microssais de Murashige e Skoog (Murashige e Skoog, 1962) suplementados com 30 g de sacarose (p/v), 100 mg/l de mioinositol, 200 mg/l de KH_2PO_4 , 1 mg/l de tiamina e 0,2 $\mu\text{l/l}$ de 2,4-ácido diclorofenoxiacético. O meio é ajustado para um pH de 5,8 antes da autoclavagem. O volume da suspensão no 7º dia de cultivo na fase estacionária foi usado para iniciar os cultivos. Um volume de 1ml de inóculos de suspensão de cenoura foi transferido para 50 ml de meio LSBY2 e então os cultivos foram colocados em agitadores a 150 rpm no escuro a 28°C. Os compostos IMI foram adicionados junto com o meio fresco no ciclo de iniciação do cultivo.

25 **Apêndice II**

O meio M consiste em sais basais LS e vitaminas B, 30 g de glicose, 1 μM de 2,4-D e de cinetina e o meio foi ajustado para pH 5.8 antes de 8 gm/l de ágar nobre serem adicionados ao meio. O meio é então autoclavado e despejado em placas de Petri de 15 x 100.

30 **Apêndice III**

O meio MS2D consiste de sais MS (Murashige e Skoog, 1962) e

vitaminas de Eriksson suplementados com 2 mg de 2,4-D, 0,5 mg de tiamina, 30 g de sacarose, 400 mg de mioinositol, 400 mg de hidrolisado de caseína. Os cultivos foram autoclavados após ajuste do pH do meio em 5,8. Os cultivos em suspensão foram rotineiramente subcultivados em intervalos de 7 dias (6 ml dos inóculos iniciais de suspensão usada em 54 ml de meio fresco) e cultivados com agitação a 150 rpm no escuro a 28°C. Sob estas condições, as populações celulares se encontravam sempre em crescimento exponencial entre 2 e 6 dias após a inoculação. Para que o meio em gel induzisse a calose a partir do escutelo da semente madura, o meio MS2D continha um componente adicional de gelrite a 2,5 g/l adicionado após ajuste do pH.

Apêndice IV

O meio NB Dicamba consiste em sais basais NB, 30 g/l de sacarose, 100 mg/l de mioinositol, 300 mg/l de hidrolisado de caseína, 1,7 ml/l de L-prolina (2,5 M), 500 mg/l de L-glutamina e 6,6 mg/l de Dicamba. O meio é ajustado para pH 5,8 antes de ser esterilizado por filtração.

EXEMPLO 11 – produção de células individuais de cenoura e transformação genética mediada por Si-C Whiskers de cultivos de células individuais de cenoura

20 Iniciação de suspensões de células individuais de cenoura

Uma linhagem criopreservada de cenoura regenerável (D2-40-018) foi descongelada e cultivada em meio Linsmeier-Skoog (LS) (Nagata, T., Nemoto, Y. e Hasezawa, S. (1992). Os sais do meio foram obtidos da *Phyto Technology Laboratories*, número de catálogo N° L689. Uma linhagem em suspensão em crescimento ativo foi estabelecida em uma semana e a linhagem de manutenção foi subcultivada mediante transferência de 2ml de PCV para 58 ml de meio de suspensão LSHY2 a 28°C em um agitador orbital (Innova-3300) a 125 rpm sob luz difusa em um ciclo de cultivo de 7 dias. Para a produção de células individuais, 1 ml de VCM de suspensão de cenoura na fase estacionária foi adicionado a 30 ml de meio de suspensão LS com 1 mM de colchicina (Sigma, número de catálogo #C3915) e fez-se cultivo por 7 dias. As células individuais foram produzidas de 3-7 dias de cultivo,

estando prontas para os experimentos de transformação. As células individuais de cenoura podiam ser mantidas na fase estacionária por até 28 dias mediante diluição dos cultivos no 14º dia pela adição de 60 ml de meio líquido LS BY2 fresco.

5 **Transformação genética mediada por Whiskers® de células individuais de cenoura**

Células individuais produzidas em meio LSBY2 com 1 mM de colchicina foram observadas no 4º dia e no 11º dia após o início do cultivo. As células individuais apresentam muita atividade e viabilidade, conforme determinado por coloração com diacetato de fluoresceína. Eventos de calose expressando a proteína amarela fluorescente foram observados na colônia derivada de células individuais 10 dias e 25 dias após seleção em placas com glufosinato de amônio.

Transformação genética de células individuais de cenoura

Um protocolo de transformação WHISKERS® modificado [Petolino, Welter e Cai (2003). Molecular Methods of Plant Analysis, Vol. 23, 147-158, Capítulo 9, Genetic Transformation of Plants, ISBN 3540002928] foi usado no experimento de transformação. Os experimentos foram iniciados com a transferência de 25 ml de suspensão de células individuais de cenoura, no dia 4 e no dia 11 após o tratamento das células individuais e do início da cultura, para garrafas de centrifugação IEC de 250 ml (Fischer Scientific, número de catálogo #05-433B). As transformações foram realizadas mediante a adição de 8,1 ml de suspensão Whiskers recém-preparada (Silar SC-9, Advanced Composite Materials Corp, Greer, SC) e 170 ug de pDAB3831 contendo iniciador AtUbi10 do gene PAT e iniciador CSVMS do gene YFP. Cada transformação consistiu em uma garrafa que foi colocada no misturador de tintas modificado (Red Devil Equipment Co, Minneapolis, MN) e agitada a alta velocidade por 10 segundos, após o que as células foram recolocadas em um frasco de recuperação de 500 ml e 100 ml de meio líquido LSBY2 foram adicionados. As células foram deixadas para se recuperar por uma hora em um agitador giratório a 125 rpm a 28°C.

Após a recuperação, alíquotas de 3 ml de suspensão celular fo-

ram uniformemente despejadas em discos de filtros de papel estéreis de 55 mm número 4 (Whatman International Ltd.) em um funil de Büchner e o meio líquido foi aspirado. Os filtros de papel com células foram então colocados em placas de Petri de 60 x 20 mm contendo meio LSBY-B15 semissólido com 15 mg/l de glufosinato de amônio e Ágar TC a 0,8% como agente gelificador. As placas foram encubadas a 28°C no escuro. Após 10 dias, eventos expressando GFP foram removidos do filtro de papel e colocados em placas individuais de LSBY2-B15 semi-sólido. Os filtros e células remanescentes foram transferidos para meio LSBY2-B15 semi-sólido e incubados no escuro a 28°C.

Análises de eventos de colônias de células individuais

Possíveis eventos transgênicos uniformemente fluorescentes sob um microscópio fluorescente invertido Leica 25 dias após o início dos experimentos de transformação foram analisados para a proteína funcional marcadora selecionável PAT por meio de um teste ELISA sensível usando o "EnviroLogix LibertyLink® PAT/pat Plate Kit". O EnviroLogix LibertyLink® PAT/pat Plate Kit é um teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) tipo "intercalado". O tecido caloso foi colocado em um tubo de microcentrifugação e 250 µl de tampão de extração foram adicionados. O tampão de extração foi o PBS (Fisher, número de catálogo BP665-1) e Tween -20 a 0,05% (Sigma-Aldrich, número de catálogo P-1379). O tecido foi moído à mão com um pilão pequeno no tubo de microcentrifugação. A extração de amostra foi centrifugada a 11.000 rcf por um minuto e o sobrenadante foi usado no ELISA nas seguintes diluições: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64. Os métodos ELISA foram seguidos como indicado no Envirologix Kit, número de catálogo AP014. No teste, as extrações de amostra foram adicionadas aos poços de teste recobertos com anticorpos contra a PAT do gene *pat*. Quaisquer resíduos presentes no extrato de amostra se ligam aos anticorpos e são então detectados pela adição do anticorpo PAT/pat marcado com enzima (peroxidase de rábano). Após uma simples etapa de lavagem, os resultados da análise são visualizados mediante uma etapa de desenvolvimento de cor; esta é proporcional à concentração de PAT/pat no extrato de amos-

tra.

O resultado mostrou que o tecido do controle negativo, a uma taxa de amostragem de 143 mg/250 ul de tampão de extração, não produziu um valor no ELISA PAT. O evento 001B a uma taxa de amostragem de 63 mg/250 ul produziu um valor de ELISA de 83 ng/ml, o que equivale a 330 pg de PAT por mg de calose e, assim, indicou um evento de fluorescência brilhante de fato transformado tanto por PhiYFP fluorescente na faixa esperada assim como com o gene marcador selecionável por PAT.

EXEMPLO 12 – classe química dos inibidores de microtúbulos e produção de células vegetais individuais

O paralelismo entre os microtúbulos e as microfibrilas representa uma resposta relacionada a um princípio polarizador desconhecido mais do que uma relação causal (Emons et al., 1992). Isso é sustentado por vários exemplos nos quais a maioria das células na zona de maturação da raiz do milho (*Zea mays*) sob estresse por água (*Zea mays*) apresenta arranjos de microtúbulos em hélices orientadas à direita, mas microfibrilas nas hélices orientadas à esquerda (Baskin et al., 1999). De maneira similar, o mutante *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), organização de microtúbulos 1, apresenta arranjos de microtúbulos aberrantes, mas, aparentemente, microfibrilas alinhadas de maneira inalterada (Himmelspach et al., 2003; Sugimoto et al., 2003). As suspensões de células individuais dos experimentos apresentam resposta de crescimento similar àquela do controle, no qual o peso seco aumenta no ciclo de subcultivo das células, indicando que as células se dividem na concentração mais baixa de inibidores da microtubulina (IMIs), a despeito do fato de que possuem células que apresentam o crescimento isotrópico com expansão radial. Além disso, mediante a alteração da composição do meio, é possível ver a placa equatorial de tais células individuais com crescimento isotrópico fotografado, o que dá sustentação adicional ao fato de que essas células de fato estão se dividindo em baixas concentrações de IMIs. Assim, as células vegetais tratadas com baixas concentrações de um inibidor de microtúbulos e mantidas em níveis ótimos no meio poderiam apresentar uma população substancial de microtúbulos corticais inalterada.

Isso permitiria que as células individuais continuassem o processo normal de criação de paredes celulares, incluindo a formação de fragmoplastos, o que é um importante pré-requisito da divisão celular.

Para inibir parcialmente o funcionamento dos microtúbulos e selecionar compostos que sejam seletivos no rompimento deles em baixas concentrações, diferentes classes de compostos foram analisados. A interação dos IMIs com a tubulina vegetal foi bem caracterizada (Hugdahl e Morejohn, 1993). Ainda assim, todos os inibidores apresentam efeitos inespecíficos (Vaughn e Lehn, 1991). Portanto, neste exemplo uma comparação de classes de inibidores de microtúbulos com químicas diferentes foi avaliada para identificar compostos que poderiam sustentar o crescimento de células individuais sem efeitos inespecíficos. Há compostos, tais como o clorprofam, que inibem, como é conhecido, o alongamento a concentrações mais baixas do que as necessárias para estimular a expansão radial, à medida que eles afetaram microtúbulos mitóticos mais ativamente do que os corticais (Hoffman e Vaughn, 1994). Assim, um objetivo deste trabalho foi selecionar compostos que em concentração baixa ótima reteriam microtúbulos corticais suficientes para realizar a função celular normal e manter, ao mesmo tempo, o crescimento isotrópico produzindo nenhum ou poucos efeitos inibitórios inespecíficos.

A colchicina é um derivado da tropolona cuja estrutura estereoquímica e modo de ação estão bem estabelecidos (Keats e Mason, 1981; Margolis e Wilson, 1977; Raugh e Wilson, 1980; Murgulis, 1974), e ela previne a formação de microtúbulos a partir de dímeros da tubulina. A propizamida e outras benzamidas agem no fuso nuclear de células vegetais (Akashi *et al.*, 1988; Bartels P. G. e Hilton J. L., 1973; Carlson *et al.*, 1975) e foram desenvolvidas como herbicidas de pré-emergência eficazes em gramíneas anuais e ervas daninhas de folha larga (Aya *et al.*, 1975). O uso de amidas fosfóricas é similar ao de herbicidas de dinitroanilina, incluindo a orizalina (Surflan) e a trifluralina (Treflan) (Ashton e Crafts, 1981). A trifluralina é um dos representantes mais conhecidos da família de herbicidas contendo dinitroanilina; ela destrói os microtúbulos vegetais, mas é ineficaz em células

animais (Hess e Bayer, 1974); Hess e Bayer, 1977). As piridinas têm um anel de benzeno com um dos carbonos substituído por um nitrogênio. Há diversas piridinas substituídas que são usadas como herbicidas. Pertencem a este grupo o dithiopyr (Dimension®) e o thiazopyr (Visor®). O dithiopyr é um material de pré- e pós-emergência usado apenas sobre a turfa para controlar uma ampla variedade de ervas daninhas. Ele é frequentemente formulado com outros herbicidas e em fertilizantes. O thiazopyr é um composto de pré-emergência seletivo que funciona bem com praticamente todas as ervas daninhas e em uma ampla variedade de cultivos, incluindo cítricos, algodão, milho, amendoim, soja e batata. Assim, as piridinas parecem ser inibidores da formação dos microtúbulos em seu funcionamento.

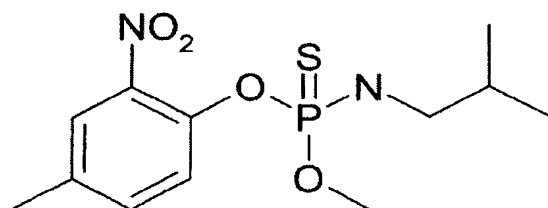
Materiais e métodos

Cultivos em suspensão de tabaco JTNT1. Os cultivos em suspensão de células de tabaco JTNT1 foram mantidos mediante o subcultivo de 1 ml de volume corpuscular médio (VCM) em 20 ml de meio de tabaco (sais MS, mioinositol, tiamina HCl (1 mg/ml), fosfato de potássio dibásico (anidro), MES, 2,4-D (10 mg/ml) e glicerol a 3% (meio NT1B). A linhagem celular foi subcultivada a cada 7 dias e expandida conforme necessário para o teste. 1 M de sacarose inibiu tanto a taxa quanto a dimensão da polimerização da tubulina vegetal induzida pelo taxol (Bokros *et al.*, 1993). A investigação da polimerização da tubulina vegetal na presença de 1 M de sacarose (tanto APM, amiprofosmetil, quanto orizalina) produziu uma diminuição concentração-dependente do comprimento dos microtúbulos vegetais (Morejohn e Fosket, 1984; Morejohn *et al.*, 1987). Além disso, a sacarose estabiliza os microtúbulos pré-formados, tornando o exame dos efeitos dos IMIs sobre os microtúbulos pré-formados inviável. Além disso, a sacarose aumenta substancialmente a viscosidade da solução e a polimerização da tubulina é alterada pelo menos em parte pelas taxas menores de difusão dos dímeros e polímeros. Assim, era importante ter pouca ou nenhuma sacarose no meio de produção das células individuais. Dessa maneira, uma nova linhagem JTNT1 aclimatada ao glicerol foi desenvolvida para este estudo.

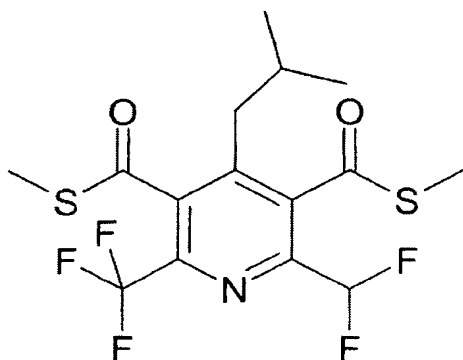
Para os tratamentos, as linhagens em suspensão foram prepa-

radas com 1 ml de volume celular médio (VCM) em 20 ml de meio mexendo-se com frequência para permitir uma boa distribuição das células (uma vez que os agregados em suspensão tendem a se sedimentar) e então transferidas para os poços de placas de microtitulação de 24 poços. Cada um dos 24 poços continha 1 ml de suspensão JTNT1. As placas de 24 poços foram mantidas em Innova 4900 Multienvironmental Shaker com presilhas e arreios especiais para permitir o empilhamento de até 6 placas. As placas foram giradas a uma velocidade de 130 rpm e a 25°C no escuro.

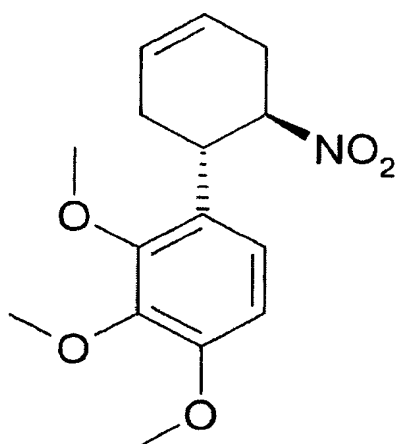
Produção de células individuais. Cada composto foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) para proporcionar soluções estoque de 0,5 M. Um ml de suspensão JTNT1 (1 ml de meio de tabaco PCV/20) foi adicionado a cada poço das placas de 24 poços. A cada poço um químico individual foi adicionado para se alcançar a concentração desejada (a 1 µM, 3 µM e 10 µM). Permitiu-se que os cultivos crescessem por 7 dias no Innova Shaker. A cada dia medidas de turbidez foram feitas em cada poço usando-se um SpectraMax M2^e Molecular Device (configurado em 600 de absorção com 5 leituras tomadas por poço). No dia 7, as células foram observadas com o microscópio invertido confocal Leica 5000 em busca da formação de células individuais e da viabilidade celular.



Amiprofosmetil (APM)



dithiopyr



(±)-4S, 5R-4-NITRO-5-(2,3,4-trimetoxifenil)ciclohexeno (trimetoxifenilciclohexeno)

Produção de eventos clonais de calose mediante células BY2 individuais em meio LSBY2 com glicerol. Células de tabaco BY2 (Nagata *et al.*, 1992) foram transformadas com pDAB1590 mediante um protocolo modificado descrito por Shaul *et al.*, 1996, e selecionado no LSBY15 após 4 dias de cocultivo. O evento de calose expressando a proteína verde fluorescente foi recuperado e a calose foi mantida em meio LSBY2 B15. No prazo de um mês um evento de calose cresceu vários centímetros em diâmetro e um pedaço pequeno, mas de fluorescência brilhante (aglomerado de ~2 a 5 mm²), foi transferido para meio sólido fresco para manter as células supridas com nutrientes em agente de seleção fresco e para selecionar calose expressando GFP de maneira homogênea. Um pedaço de 500 mg de calose foi transferido para 50 ml de LSBY-Gly-B15, um meio líquido LSBY2 modificado com glicerol a 3% e sacarose a 1% como fonte de carbono em um frasco agitado de 250 ml (130 rpm a 25°C no escuro). A cada semana, um volume celular médio de 0,5 ml (VCM) de células era usado para iniciar um cultivo em suspensão. Assim, calose e agregados em suspensão expressando a proteína verde fluorescente (GFP) foram mantidos respectivamente em um ciclo de um mês e de 7 dias.

Produção de células individuais expressando a GFP. Células individuais foram produzidas pela adição de uma concentração de 1 uM do composto DDP (difenilpirazol) durante a iniciação do ciclo de cultura de 7 dias no meio LSBY2-Gly-B15 junto com a adição de 0,5 ml de volume celular

médio (VCM) de agregados em suspensão expressando a GFP na fase estacionária. Alternativamente, 25 ml de agregados em suspensão foram transferidos para 25 ml de meio de suspensão LSBY-Gly-B15 fresco mediante a adição de 50 µl de 1 M de solução estoque de difenilpirazol dissolvidos em DMSO para proporcionar uma concentração final de 1 µM na suspensão. Assim, células individuais puderam ser produzidas em um ciclo muito mais curto, de apenas 3,5 dias. O meio LSBY215 sempre contém 15 mg/l de glufosinato de amônio para fins de seleção.

A GFP foi expressada como uma proteína quimérica em células individuais por toda a duração dos ciclos de cultivo de 3,5 ou 7 dias e se encontravam em localizações subcelulares, enquanto a expressão da GFP dos construtos quiméricos foi observada em células vivas mediante epifluorescência convencional com um microscópio Leica assim como microscópios de escaneamento confocal a laser Zeiss Axiovision. A expressão foi vista em muitos dos compartimentos subcelulares, incluindo o núcleo e os filamentos citoplasmáticos.

Resultados e discussão

As células estavam muito saudáveis nos meios de cultivo de tabaco contendo glicerol e os aglomerados de células eram muito evidentes. As células mostravam bom aumento da biomassa em um período de 7 dias, ainda que tenha havido uma redução de ~50% da biomassa em comparação com o controle com açúcar. Os cultivos de controle também tinham DMSO a 0,1% para garantir que não houvesse efeito induzido pelo DMSO. A adição de 1 µM de éster etil 14-cloro-1,5-difenil-1H-pirazol-3-ilóxi-ácido acético (difenilpirazol) seja ao meio contendo sacarose, seja ao meio contendo glicerol, não reduziu significativamente a biomassa das células em comparação com os respectivos controles, indicando que ocorre crescimento ativo de células individuais similar ao do controle na presença do difenilpirazol. A curva de crescimento é semelhante quando os cultivos passaram por 2 subciclos ou 3,5 dias. A produção de células individuais no meio com glicerol também demonstra elevados números de células viáveis em comparação com o controle.

Diversos outros compostos incluindo a trifluralina, a orizalina e os compostos da classe dos estabilizadores dos microtúbulos tais como o Taxol tiveram estudada sua eficácia na produção de células individuais a partir de cultivos em suspensão de células de tabaco JTNT1 cultivados em meio NT1B com glicerol a 3% como única fonte de carbono. Estes foram a colchicina, o N-1(1,1-dimetilpropinil)3-clorobenzamida, a propizamida e a trifluralina. Nestes estudos, os compostos diferiram na sua eficácia para produzir células individuais e na inclinação da curva dose-resposta. A Orizalina, assim como os outros compostos testados, aumentou o diâmetro das células individuais em pelo menos 4 vezes e apresentou uma concentração de saturação cerca de 10 vezes acima do limiar. A colchicina aumentou o diâmetro em 5 vezes e teve curva de dose-resposta mais íngreme, o que indica que esses dois compostos podem ser preferíveis para o trabalho com altas dosagens.

As concentrações necessárias para produzir células individuais estavam na faixa de 50 μ M e 2 mM para a colchicina e entre 10 nM e 100 μ M para a propizamida e a N-1(1,1-dimetilpropinil)3-clorobenzamida. Entretanto, as concentrações de orizalina e trifluralina para a produção ótima de células individuais variou entre 100 nM e 1 mM. Contudo, em altas concentrações esses compostos aumentaram a síntese de proteínas, a divisão de plastídeos e de mitocôndrias ocorreu nas células tratadas, levando à formação de células gigantes de até 300 μ M de diâmetro com poliploidia nuclear, como visto em células de cenoura cultivadas por 21 dias. Esses resultados sugerem que a inibição da mitose é o efeito fundamental desses compostos nas altas concentrações estudadas. Assim, pareceu importante manter não apenas a concentração ótima de IMIs, mas também a química do composto (que apresentará função muito seletiva sobre os túbulos e não a função não-seletiva similar à função de divisão celular). Em conformidade com este objetivo, outros compostos estão descritos abaixo além do difenilpirazol descrito acima.

Agregados de BY2 em suspensão foram observados: em meio LSBY2 com açúcar; células BY2 individuais em divisão produzidas em 1 μ M

de difenilpirazol mostrando a placa equatorial em meio LSBY2; células transgênicas BY2 GFP após deconvolução e evento de colônia de células individuais clonais no meio LSBY2-15 em forma de gel.

Sumário da produção de células de tabaco BY2 individuais em meio

- 5 **LSBY2 contendo glicerol.** As células individuais produzidas em 1 uM de difenilpirazol a partir de agregados em suspensão apresentavam núcleos únicos com um ou dois nucléolos em 90% das células em cultivo de 3,5 dias. Essas células podiam ser plaqueadas em uma placa com LSBY2 em forma de gel com ágar TC a 0,8% e 15 mg/l de glufosinato de amônio como agente
- 10 de seleção uma vez que o plasmídeo pDAB1590 usado para transformar os agregados em suspensão tinha o PAT como marcador seletivo. As células foram diluídas no meio líquido em diluição de 1:4 e plaqueadas no meio em gel e evento clonal selecionado a 21 dias após o plaqueamento.

- No que refere-se ao amiprofosmetil (APM), quando ele foi adi-
- 15 cionado às suspensões de JTNT1, células individuais foram formadas na concentração de 1-10 μ M; a concentrações mais altas há notável redução do crescimento e inibição da divisão celular. Células redondas separadas podem ser vistas nas imagens de 1 μ l e 3 μ l de APM comparadas com o controle apenas com DMSO. As células de tabaco JTNT1 eram de saudável cor
- 20 amarela e cresciam bem na presença de 1 μ M e 3 μ M de APM. A viabilidade celular, conforme medição por coloração com diacetato de fluoresceína e iodeto de propídio, demonstrou viabilidade de até 70%.

- Mais uma vez, foi observado que o APM induziu a produção de células de tabaco JTNT1 individuais em meio contendo glicerol. Os agrega-
- 25 dos de JTNT1 em suspensão de controle foram observados em meio com glicerol e DMSO a 0,1%; células individuais de JTNT1 foram observadas em meio NT1B contendo glicerol com 1,3 e 10 uM de APM.

- O dithiopyr pertence à classe dos herbicidas com piridina substituída que rompem os microtúbulos. Quando adicionadas às suspensões de
- 30 JTNT1 a concentrações de 1 μ M, 3 μ M e 10 μ M, as células individuais foram formadas usando concentrações de 1 μ M e 3 μ M (imagens E e F), mas a concentração de 10 μ M apresentou células individuais (e a concentração de

células foi pequena). As células de tabaco eram saudáveis, estavam em crescimento e eram de cor amarela usando-se o dithiopyr em todas as concentrações testadas. A viabilidade celular após o tratamento com 1 μ M e 3 μ M de dithiopyr foi de 70-80%, indicando uma maior viabilidade.

5 Um mimético da colchicina (Evans *et al.*, 2003), ($\pm$)-4S,5R-4-nitro-5-(2,3,4-trimetoxifenil)-ciclohexeno (trimetoxifenilciclohexeno), teve sua eficiência na produção de células individuais testada nas culturas de tabaco JTNT1. Enquanto houve um leve alveijamento das células (elas eram de um amarelo ligeiramente mais claro), as células cresceram muito bem na placa.

10 Esse químico promoveu a formação de células individuais a 1 μ M, 3 μ M e 10 μ M. As células eram redondas e a viabilidade celular em todos os níveis variou entre 80-90%. A inibição do crescimento celular é mais ou menos similar entre as concentrações testadas e as células eram saudáveis com alta viabilidade e menos citotoxicidade.

15 Assim, a produção induzida de células individuais de tabaco JTNT1 foi observada em meio contendo glicerol em concentração de 10 μ M de de trimetoxifenilciclohexeno.

Supercélulas individuais. Agregados de células de cenoura em suspensão podiam ser cultivados em 1 mM de colchicina em 60 ml de meio líquido LSBY2 e mantidos no mesmo meio por até 28 dias. O crescimento

20 após o segundo subcultivo declina após 14 dias, mas as células continuam a crescer para formar supercélulas individuais vivas e saudáveis (mas que apresentam grandes núcleos lobados, indicando a ocorrência de poliploidia nuclear). Supercélulas individuais de cenoura com vários núcleos foram observadas em células de 21 dias de idade com 1 mM de colchicina contínua

25 em meio LSBY2.

Conclusão. O crescimento celular nestes níveis de teste foi observado visualmente, mediante o peso seco (medido apenas no dia 7) e leituras de turbidez. A figura 15 mostra as leituras de turbidez tomadas em um

30 período de 7 dias. As leituras de turbidez se referiram a placas contendo apenas o meio (com glicerol a 3%) e o inibidor de microtúbulos a concentrações de 1 μ M, 3 μ M e 10 μ M. Enquanto os controles apresentaram os me-

lhores padrões de crescimento, como esperado, nenhum dos químicos testados fez com que as linhagens celulares morressem a taxas de 1µM e 3µM. As células em todos os tratamentos experimentaram um aumento da taxa de crescimento por volta do mesmo ponto temporal (dia 3) e o volume celular
5 ainda estava aumentando no dia 7. Isso mostra que as células tratadas quimicamente permaneceram viáveis por pelo menos 7 dias.

Referências do exemplo 12:

1. Akashi *et al.*, (1988). *Plant Cell Physiol* 29(6): 1053-1062.
2. Aya, *et al.*, (1975). Fifth Asian-Pacific Weed Science Society Conference,
10 pp. 138-141.
3. Bartels P. G. e Hilton J. L. (1973). *Pestic Biochem Physiol* 3: 462-472.
4. Carlson *et al.*, (1975). *Weed Sci* 23: 155-161.
5. Emmons *et al.*, (1992) *Physiol Plant* 84: 486-493.
6. Evans *et al.*, *Tetrahedron*, 59, 2223-2229.
- 15 7. Hess F. D. e Bayer D. E. (1974). *Acala* 4-42. *J Cell Sci* 15: 429-441.
8. Hess F. D. e Bayer D. E. (1977). *J Cell Sci* 24: 351-360.
9. Himmelsbach *et al.*, (2003). *Plant J* 36: 565-575.
10. Hoffman J. C., Vaughn K. C. (1994). *Photoplasma* 179: 16-25.
11. Hugdahl J. D., Morejohn L. C. (1993) *Plant Physiol* 102: 725-740.
- 20 12. Keates R. A. B. e Mason G. B. (1981). *Can J Biochem* 59: 361-370.
13. Margolis R. L. e Wilson L. (1977). *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3466-3470.
14. Murthy J. *et al.*, (1994). *Plant Physiology* 105: 309-320.
15. Margulis T. N. (1974). *J Am Chem Soc* 96: 899-901.
- 25 16. Nagata T., Nemoto Y. % Hasezawa S. (1992). *Int. Rev. Cytol.* 132: 1-30.
17. Rauch C. T. e Wilson L. (1980). *Biochemistry* 19: 5550-5557.
18. Shaul O., Mironov V., Burssens S., Van Montagu M., Inzé D. (1996). *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4868-4872.
19. Sugimoto K. *et al.*, (2003) *Plant Cell* 15: 1414-1429.
- 30 20. Vaughn K. (2006). *Pestic Biochemistry and Physiology*, vol. 84(2): 63-71.
21. Vaughn, K. C., Lehnen L. P. Jr (1991). *Weed Sci* 39: 450-457.

EXEMPLO 13 – uma investigação comparativa da estrutura subcelular, citogênese e da instabilidade genômica molecular de células individuais produzidas com IMIs

A estabilidade genômica aproximada de plantas derivadas de tecidos em cultivos foi estudada no nível citogênico em várias espécies vegetais (Shoyana *et al.*, 1995; Zorinants *et al.*, 2003). No que refere-se à estabilidade de plantas derivadas de embriões, estudos citogênicos revelaram observações contrastantes. Otake *et al.* (1993) relataram duplicação cromossômica (de diplóide para tetraplóide) em 66,7% e 100% das plantas derivadas de embriões de *Asparagus officinalis* L. obtidas de meio solidificado e meio líquido de goma gelana, respectivamente. Em contraste, Mamiya *et al.* (2001) não relataram alterações de ploidia durante a embriogênese somática na *A. officinalis*. Auxinas sintéticas tais como o 2,4-D (2,4-diclorofenóxi-ácido acético) e ANA (ácido naftaleno acético) usadas em meios de cultura foram relatadas como associadas a variações somaclonais (Karp, 1989; Philips *et al.*, 1994). De fato, uma redução da ploidia foi relatada tanto no sistema de embriogênese somática com cenoura (Ronchi *et al.*, 1992) quanto com álamo (Rugh *et al.*, 1993) nos quais o 2,4-D tinha sido usado. Inibidores da microtubulina (IMIs) também aumentaram a ploidia em células vegetais. A concentração e a classe do composto IMI, contudo, determinam a natureza da ploidia ou sua ausência. Por exemplo, a orizalina induz a poliploidia nuclear em células TBY2, mas a propizamida em concentrações similares não o faz (Ehsan *et al.*, 1999). De igual maneira, a exposição de longo prazo de células de cenoura em suspensão induz a poliploidia nuclear em concentrações mais altas de colchicina. As células de cenoura em suspensão apresentaram poliploidia nuclear em células individuais cultivadas com 1 mM de colchicinas após 14-21 dias de tratamento contínuo. A frequência de tais níveis de ploidia, entretanto, é muito menor em cultivos de até 14 dias ou menos e menos 1%, o que é similar aos resultados relatados para suspensões de controle cultivadas com auxina (Karp, 1989; Phillips *et al.*, 1994). Entre os compostos testados neste estudo, não obstante, o etil éster ácido 4-clor-1,5-difenil-1H-pirazol-3-ilóxi)-acético e o 4S,5R-4-nitro-5-

(2,3,4-trimetoxifenil)ciclohexeno apresentaram produção eficiente de células individuais com percentual baixo ou nulo de ploidia nuclear em 14 dias de tratamento contínuo.

De qualquer maneira, o processo de indução de células individuais a partir de agregados celulares usando-se tais IMIs de baixa citotoxicidade ainda poderia alterar os padrões de expressão genética de células individuais com um padrão diferente de expressão genética. Sabe-se que a metilação do DNA dispara consequências indesejáveis, o que leva à variação somaclonal *in vitro*. Além disso, os IMIs induzem alterações que poderiam resultar em variações ou instabilidades moleculares. Um percentual polimórfico de 1,09% foi relatado em duplicidades cromossômicas induzidas pela colchicina em tetraplóides de *Eragrostis curvula* (Mecchia *et al.*, 2007). O nível de concentração de colchicina usado para tratar as sementes de *E. curvula* foi de 0,05%. Um objetivo do presente estudo foi avaliar a estabilidade genômica das células individuais de JTNT1 produzidas em 1 uM de éster etil ácido 4-cloro-1,5-difenil-1H-pirazol-3-ilóxi)-acético.

Diversas abordagens moleculares tais como AFLP, RAPD (rapid amplified polymorphic DNA) RFLP (restriction fragment length polymorphism) foram tentadas para identificar e medir o nível de variação somaclonal em plantas derivadas de tecidos em cultivo (Devarumath *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2004; Sanchez-Teyer *et al.*, 2003; Hale e Miller, 2005). Apesar da metodologia utilizada, contudo, apenas uma pequena porcentagem (muito menor do que 1%) do genoma pode ser testado não importa o quanto prolífica seja a técnica (em termos do número de *loci* amostrados). Das diversas técnicas disponíveis, a AFLP é a mais altamente multiplexada, normalmente com 50-100 *loci* testados por par de iniciadores. Acredita-se que esses *loci* estejam espalhados de maneira mais ou menos aleatória por todo o genoma e, assim, a AFLP oferece as melhores chances de detecção de alterações induzidas pelo cultivo de tecidos. Ademais, a AFLP é também uma das técnicas moleculares mais robustas para a identificação de cultivares e análise de variabilidade (Hale e Miller, 2005). Assim, esse método de avaliação foi escolhido para uso neste estudo.

Materiais e Métodos

Iniciação de células individuais de tabaco JTNT1 e coleta de amostras. Células individuais de tabaco JTNT1 foram iniciadas em dois meios diferentes, NT1B com sacarose a 3% (NT1B-Sac) e NT1B com glicérol a 3% (NT1B-Gly) em um ciclo de cultivo de 3,5 dias. Os cultivos foram iniciados mediante a adição de 12,5 ml de agregados em suspensão em cultivos em fase estacionária mantidos nos respectivos meios de cultivo e transferidos para 12,5 ml de meio de cultura fresco em frascos agitados de 125 ml contendo 1 μ M de éster etil ácido 4-cloro-1,5-difenil-1H-pirazol-3-ilóxi)-acético (difenilpirazol). Os frascos foram fechados com um tampão de espuma e cultivados em um agitador orbital a 130 rpm no escuro a 25-28°C. Os cultivos foram subcultivados a cada 3,5 dias até um período de 14 dias. Quatro amostras (células cultivadas em Sac/Gly e os cultivos de controle em meio Sac/Gly com DMSO a 0,2%) dos cultivos foram coletadas a cada 3,5 dias mediante centrifugação da suspensão a 3.000 rpm por 5 minutos. As amostras foram imediatamente liofilizadas para impedir a oxidação celular de maneira a minimizar qualquer efeito deletério sobre as amostras introduzidos após a coleta. As células individuais foram coloridas com coloração nuclear Hoechst por uma hora e observadas ao microscópio em busca de qualquer anomalia nuclear por até dois ciclos de cultivo.

Caracterização citológica das células individuais

Viabilidade celular e parede celular. Células JTN1 individuais estabelecidas foram coloridas com FUN1 (F-7030, Molecular Probes, Invitrogen Inc), uma coloração para células que é usada em testes de viabilidade na levedura e que contém duas sondas fluorescentes coloridas. A terceira calcofluor White M2R, que colore a parede celular, foi usada para colorir as células. No caso das células individuais de JTNT1, 20 μ m de coloração FUN1 foram adicionados e a cultura foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos. 1 ml de meio de cultivo fresco foi adicionado para lavar o excesso de corante e fez-se centrifugação a 3.000 rpm. O sobrenadante foi descartado. As células foram examinadas e imagens foram registradas em um microscópio Zeiss ApoTome.

Membrana plasmática. As células JTNT1 foram incubadas com 5 µm de FM4-64 (coloração estiril) por 5 minutos e lavadas com meio fresco. O cultivo foi centrifugado a 3.000 rpm e meio fresco foi adicionado. As células foram visualizadas em um microscópio Zeiss ApoTome.

5 **Núcleo.** As células individuais foram coloridas com coloração nuclear Hoechst por uma hora e observadas em um Zeiss ApoTome para verificação de qualquer anomalia até dois ciclos de cultivo. Coloração cristal de violeta também foi utilizada como uma coloração nuclear vital para a observação da estrutura nuclear para fins de caracterização da ploidia.

10 **Citoesqueleto.** As falotoxinas se ligam a filamentos de actina. Alex Fluor 488 Phalloidin (A12379, Invitrogen Inc) foi utilizada para colorir as células individuais. 6,6 µm de Alex fluor foram adicionados às células individuais e procedeu-se a incubação por 30 minutos seguida de visualização ao microscópio.

15 **Avaliação molecular da estabilidade genômica**

Extração de DNA. O DNA genômico de amostras representativas foi coletado a 3,6; 7; 10,5 e 14 dias. Cultivos Sac e Gly juntos com os controles (10 amostras) foram extraídos usando-se o protocolo CTAB (ver Apêndice-Exemplo 12). O DNA foi quantificado com coloração PicoGreen® da Molecular Probes, Inc (Eugene, Oregon). Cada poço de uma placa de microtitulação continha 90 µl de 200x picogreen combinados com 10 µl de amostra de DNA em diluição de 40x ou de acordo com os padrões de DNA Lambda (0; 2,5; 5 e 10 ng/µl). As placas foram agitadas por curto período usando-se um agitador de placas padrão e a fluorescência foi lida (excitação ~480 nm, emissão ~520 nm) usando-se um fluorômetro Spectra Max GeminiXS da Molecular Devices (Sunnyvale, Califórnia). Cada amostra foi quantificada em triplicata e uma média dos três resultados foi usada nas diluições subsequentes. As concentrações de DNA de amostra foram diluídas até uma diluição de trabalho de 91 ng/µl com água estéril.

30 **Análise AFLP.** Análises por Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) foram realizadas usando-se uma modificação do protocolo de Vos *et al.* (1995), como descrito em Bryan *et al.* (2000). A enzima de res-

trição de 6 pb EcoR1 foi usada em combinação com a enzima de restrição de 4 pb MseI. Iniciadores AFLP para EcoR1 marcados por fluorescência e a iniciadores AFLP para Mse1 não marcados foram obtidos da Applied Biosystems (Foster City, Califórnia). A análise AFLP foi realizada usando-se o AFLP Plant Mapping Protocol da Applied Biosystems mediante a reação de amplificação seletiva com uma modificação. A modificação foi que as reações de digestão/ligação foram incubadas a 37°C durante a noite. Os produtos seletivamente amplificados foram diluídos duas vezes em água deionizada esterilizada. 0,5 ul do produto diluído foi combinado com 5 ul de tampão de carregamento (5 ul de GeneScan 500 bp LIZ tamanho padrão misturados com 500 ul de formamida ABI HiDi). As amostras foram analisadas em um analisador de DNA AB3730XL com matriz espectral G5-RCT usando-se as condições padrão. Os dados foram então importados para o GeneMapper® versão 4.0 (Applied Biosystems, 2005). Os alelos receberam um valor numérico de acordo com o tamanho do fragmento de PCR.

Resultados e discussão

Citologia e outras avaliações subcelulares das células individuais

Parede e divisão celular. Durante o cultivo das células, ocorrem crescimento e diferenciação e a forma e a estrutura das células dependem da parede celular. As células individuais apresentaram crescimento isotrópico com um aumento de 3 a 10 vezes do tamanho apresentando como resultado uma célula tipicamente redonda. Para entender a estrutura da parede celular, foi usado calcofluor (um agente alvejante que tem afinidade de ligação com as celulosas). Nas células individuais, uma nítida parede circular foi observada. A parede celular é uma estrutura dinâmica que tem um importante papel na determinação da forma da célula e na interação com fatores ambientais. Ainda que a maioria das células individuais observadas tenha apresentado uma célula esférica, foi possível ver células em divisão com uma placa equatorial. O ganho de peso seco é outra indicação de que a divisão celular está ocorrendo dentro dessas células individuais. Após 14 dias de cultivo em IMI, caso as células individuais fossem transferidas para meio sem IMI as células reconstituíam o agregado em suspensão, mostrando a

reversibilidade do crescimento anisotrópico.

Membrana plasmática. A membrana plasmática é um dos importantes componentes da célula. Ela envolve todo o conteúdo da célula. Ela delinea a parede celular e proporciona o último filtro entre o interior da célula e o ambiente. Colorantes FM de estiril anfifílico são úteis no estudo da organização das organelas e do transporte vesicular em células eucarióticas vivas (Bolte *et al.*, 2004). Inicialmente, os corantes FM localizam a membrana plasmática (MP) e então sofrem endocitose. O FM4-64 (uma coloração fluorescente seletiva para a membrana) colore a membrana plasmática e então se internaliza em outras organelas celulares (Ueda *et al.*, 2001). Após 5 minutos de coloração, a fluorescência das células individuais foi observada na membrana plasmática e verificou-se a inexistência de defeitos estruturais. Em amostras individuais nas quais 100 nM de Isoxaben são usados para remover a rede celulósica, o FM4-64 apresentou extensa vesiculação na superfície. A membrana apresentou endocitose ativa em 5 minutos.

Núcleo. Relata-se que a organização nuclear da célula vegetal tratada com IMI é complexa e demonstrou-se que a poliploidia nuclear é comum em altas concentrações. As amostras foram examinadas até 7 dias em concentrações de 1 uM de difenilpirazol e trimetoxifenilciclohexeno. A estrutura das organelas nucleares foi analisada mediante o uso de vários corantes (Hoechst 3325). No caso da JTNT1, as células individuais contêm um núcleo único com um ou dois nucléolos em concentrações de 1 uM de difenilpirazol e trimetoxifenilciclohexeno em cultivos de 3,5 dias. Contudo, altas concentrações desses compostos levam à formação de células gigantes de até 150-300 uM de diâmetro com poliploidia nuclear, como visto no caso das células de cenoura cultivadas por 21 dias. Esses resultados sugerem que a inibição da mitose é o efeito fundamental desses compostos nas altas concentrações estudadas. Assim, é importante manter não apenas a concentração ótima de IMIs, mas também a química do composto, o que terá função muito seletiva sobre os túbulos e não a função não-seletiva similar à função de divisão celular.

Citoesqueleto. O citoesqueleto consiste em diversas proteínas

estruturais tais como as F-actinas e tubulinas, que estão envolvidas na integridade estrutural da célula. A dinâmica *in vivo* do citoesqueleto foi estudada usando-se Alexa Fluor 488 verde fluorescente conjugado com actina (A12373), que é mais brilhante e menos dependente do pH. Os microtúbulos e os filamentos de actina são estruturas essenciais para a manutenção da estrutura do citoesqueleto em células vegetais no que refere-se ao seu crescimento, diferenciação e sobrevivência (Kost *et al.*, 2002). As células individuais coloridas com faloidina apresentaram o citoesqueleto de filamentos de actina e não houve posicionamento incorreto dos filamentos, uma vez que a estrutura celular era normal.

Análise molecular. A análise AFLP envolveu 10 combinações de iniciadores com base no uso da *EcoRI* (uma enzima de restrição insensível à metilação). Dois dos pares de iniciadores (p6 e p10) não conseguiram amplificar e dois dos pares de iniciadores (3p e 8p) não apresentaram diferenças em nenhum dos fragmentos. O número de fragmentos claramente separados para os pares de iniciadores 1p, 2p, 3p, 4p, 5p, 7p, 8p, 9p foi 47, 39, 31, 42, 47, 32 e 46, respectivamente. Nenhum polimorfismo AFLP foi detectado entre as amostras tratadas com as combinações de pares de iniciadores insensíveis à metilação (isto é, *EcoRI-MseI*) exceto as amostras de JTNT1 (4º ciclo de subcultivo) cultivadas por 14 dias com glicerol. Em contraste, nenhum fragmento polimórfico foi identificado em todas as outras amostras de cultivos tratados com glicose. As amostras tratadas com sacarose não apresentaram polimorfismo em qualquer dos fragmentos para qualquer das combinações de pares de iniciadores testadas. Como esperado, não houve diferenças nas amostras de células individuais por pelo menos 3 ciclos de subcultivo. Contudo, no 4º ciclo de subcultivo o polimorfismo em culturas tratadas com glicerol pode se dever à presença contínua do composto além do estresse imposto pela falta de sacarose (que parece ter disparado a instabilidade). A diferença do cultivo de células de JTNT1 individuais que não apresentava polimorfismo sugere que a fonte de carbono simples glicerol, ainda que sua capacidade de estabilizar os microtúbulos seja conhecida, pode não ser capaz de sustentar muitas funções celulares, especialmente na

presença prolongada de um inibidor da microtubulina (IMI). De qualquer maneira, tratamentos de células individuais poderiam ser preparados de maneira bem-sucedida na faixa de concentração testada com difenilpirazol por pelo menos 4 ciclos de subcultivo sem problemas de instabilidade genômica.

- 5 Fotos de 2 exemplos de polimorfismo para o iniciador 5p foram tiradas. O subcultivo 4 teve uma inserção de fragmento de 130 pb e uma deleção de fragmento de 131 pb.

Os perfis AFLP envolvendo o uso de enzimas *EcoRI* e *msel* insensíveis à metilação com combinação de par de iniciadores foram determinados. Todas as amostras para 4 ciclos de subcultivo foram monomórficas, enquanto o perfil de glicerol no 4º ciclo de subcultivo foi polimórfico em vários *loci*.

Tabela 2: esta tabela proporciona detalhes de combinações de pares de iniciadores AFLP usados e os números de bandas correspondentes observadas. Sac-X: células individuais em meio NT1B-Sacarose; Gly-X: células individuais em meio NT1B-Glicerol; Cont-Sac: agregados em suspensão de células JTNT1 de controle em sacarose; Cont-Gly: agregados em suspensão de células JTNT1 de controle em glicerol.

Comb. de iniciadores	Sequência de iniciadores (5' a 3')	Número de bandas polimórficas									
		Cont Sac	Cont Gly	3,5 d Sac	3,5 d Gly	7 d Sac	7 d Gly	10,5 d Sac	10,5 d Gly	14 d Sac	14 d Gly

Combinação EcoRI/MseI

1p	AC/CAG	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	5
2p	AGC/CAG	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	10
3p	AGC/CTG	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	0
4p	ACT/CTT	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	5
5p	ACT/CAG	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	3
6p	ACT/CTG	n/a	n/a								
7p	ACC/CAG	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	4
8p	ACC/CTG	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	0
9p	ACA/CAG	n/a	n/a	0	0	0	0	0	0	0	7

10p	ACA/CTG	n/a	n/a								
Total											34

Avaliação genética molecular da uniformidade. O polimorfismo AFLP (entre o 4º ciclo subcultivado de suspensão de células individuais cultivadas com glicerol para 9 combinações de iniciadores dentre as 10 utilizadas) foram vistas neste estudo. Toda a variabilidade observada refere-se a fragmentos gerados usando-se EcoRI/MseI. Um aumento do status da metilação durante o cultivo do tecido foi relatado anteriormente no caso da calose do tomate, em comparação com as folhas (Smulders *et al.*, 1995) e com regenerantes de tecido em cultivo da ervilha (Cecchini *et al.*, 1992). Assim, para melhor avaliar a variação baseada na metilação, avaliações posteriores com a combinação PStI/MseI sensível à metilação pode ser conduzida.

Apêndice – Exemplo 13

Protocolo CTAB de extração DNA de suspensão de células de tabaco/tecidos calosos

1. Separe ~25 mg de tecido liofilizado em um tubo Eppendorf de 2 ml.
 2. Coloque uma esfera de aço inoxidável no tubo com o tecido e agite em um Geno Grinder ou misturador de tintas por aproximadamente 1 minuto (Geno-grinder ajustado para 500 batidas/min). Remova a esfera e bata o tubo gentilmente para reduzir a aglomeração do tecido.
 3. Acrescente 1 ml de tampão de extração e bata o tubo gentilmente para reduzir a aglomeração do tecido e coloque o tecido no tampão; incube, enquanto mistura gentilmente sobre as laterais por 2 horas a 65°C. Resfrie até a temperatura ambiente (~10 minutos).
- Tampão de extração (250 ml)
- Tris-HCl 25 ml
 - NaCl 29,2 g
 - Na EDTA 12,5 ml
 - CTAB 6,25 g
 - PVP 3,75 g
 - Água (adicionar até obter o volume final de 250 ml)

4. Adicione 0,75 ml de 25:24:1 fenol/clorofórmio/álcool isoamil, pH 8, ao tampão de extração e agite manualmente com suavidade por 5 min. Centrifugue por 5 minutos a 10.000 rpm para separar as fases. Transfira cuidadosamente a fase aquosa para um novo tubo.

5 Repita a etapa 4 usando 24:1 clorofórmio/octanol em vez da mistura alcoólica fenol/clorofórmio/álcool isoamil.

6. Adicione isopropanol ao sobrenadante em igual volume e deixe em repouso por 1 hora à temperatura ambiente.

7. Centrifugue os tubos por 10 minutos a 10.000 rpm e despeje o sobrenadante tomando cuidado para manter o peletizado no fundo do tubo.

8. Acrescente 0,5 ml de etanol a 70% e mistura de RNase para lavar o peletizado de DNA e centrifugue por 1 min a 10.000 rpm (RNase/etanol 1:1000).

9. Despeje cuidadosamente o sobrenadante e repita a etapa apenas com uma lavagem com etanol a 70%. Seque completamente o peletizado deixando-o descansar a temperatura ambiente por 3 horas ou submeta as amostras ao Rotovap por ~5 minutos.

10. Quanto não houver mais gotículas de álcool, dissolva o peletizado em 0,2 ml de tampão Tris EDTA 1x preaquecido a 65°C. Deixe as amostras descansarem por uma noite à temperatura ambiente para ressuspender-las totalmente.

11. Na manhã seguinte, agite os tubos suavemente para misturar o conteúdo. Submeta as amostras a gel de agarose para verificar a degradação e a presença de RNA e faça quantificação.

25 Referências do Exemplo 13:

1. Mecchia, M. A., A. Ochogavia, J. P. Selva, N. Laspina, S. Fellitti, L. G. Martelotto, G. Spangenberg, V. Echenique, S. C. Pessino, (2007). Genome polymorphisms and gene differential expression in a 'back-and-forth' ploidy-altered series of weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*). J. Plant Physiol., 164: 1051:1061.

2. Bryan G.J., McLean K., Bradshaw J. E., Phillips M., Castelli L., De Jong W. S., Waugh R. (2002). Mapping QTL for resistance to the cyst

nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato species *Solanum vernei*. *Theor Appl Genet* 105: 68-77.

3. Devarumath R. M., Nandy S., Rani V., Marimuthu S., Muraleedharan N., Raina S. N. (2002) RAPD, ISSR, and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three
5 diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam-India type). *Plant Cell Rep* 21: 166-173.

4. Ehsan H., Luc Roefa, Erwin Wittersa, Jean-Phillipe Reichheldb, Dirk van Bockstaelec, Dirk Inzé e Harry Van Onckelena (1999). Indomethacin-induced G1/S phase arrest of the plant cell cycle. *FEBS Letters*,
10 Volume 458, Edição 3, páginas 349-353.

5. Hale A. L., Miller J. C. (2005). Suitability of AFLP and microsatellite marker analysis for discriminating intracloonal variants of the potato cultivar Russet Norkotah. *J Am Soc Hortic Sci* 130: 624-630.
15

6. Karp A. (1989). Can genetic instability be controlled in plant tissue cultures? *Int Assoc Plant Tiss Cult Newsl* 58: 2-11.

7. Mamiya K., Sakamoto Y., Ohnishi N., Hirosawa T. (2001). Synthetic seeds of *Asparagus officinalis* L. In: Bhojwani S. S., Soh W.-Y. (eds). *Current trends in the embryology of angiosperms*. Kluwer, Dordrecht,
20 pp. 337-352.

8. Martins M., Sarmiento D., Oliveira M. M. (2004). Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Rep* 23: 492-496.

9. Odake Y., Udagawa A. Saga H., Mii M. (1993). Somatic embryogenesis of tetraploid plants from internodal segments of a diploid cultivar of *Asparagus officinalis* L. grown in liquid culture. *Plant Sci* 94: 173-177.
25

10. Payne R. W., Lane P. W., Digby P. G. N., Harding S. A., Leech P. K., Morgan G. W., Todd A. D., Thompson R., Tunnicliffe Wilson G.,
30 Welham S. J., White R. P. (1993). *Genstat 5 Release 3: reference manual*. Oxford University Press, Oxford.

11. Phillips R. L., Kaeppler S. M., Olhoft P. (1994). Genetic ins-

stability of plant tissue cultures – breakdown of normal controls. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5222-5226.

12. Ronchi V. N., Giorgetti L., Tonelli M., Martini G. (1992). Ploidy reduction and genome segregation in cultured carrot cell lines. 1. Prophase chromosome reduction. *Plant Cell Tiss Org* 30: 107-114.

13. Rugh C. L., Parrott W. A., Merkle S. A. (1993). Ploidy variation in embryogenic yellow poplar. In: *Proceedings of 22nd Southern Forest Tree Improvement Conference*, pp. 493.

14. Sanchez-Teyer L. F., Quiroz-Figueroa F., Loyola-Vargas V., Infante D. (2003). Culture induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. *Mol Biotechnol* 23: 107-115.

15. Shoyama Y., Matsushita H., Zhu X. X., Kishira H. (1995). Somatic embryogenesis in ginseng (*Panax species*). In: Bajaj Y. P. S. (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer, Berlin, pp. 344-356.

16. Smulders, M. J. M., Rus-Kortekaas W., Vosman B. (1995). Tissue cultured induced DNA methylation polymorphisms in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plants. *Theor Appl Genet* 91: 1257-1264.

17. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Vandeleee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995) AFLP – a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.

18. Zorinants S. E., Nosov A. V., Monforte-Gonzalez M., Mendes-Zeel M., Loyola-Vargas V. M. (2003) Variation of nuclear DNA content during somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. using cytophotometry. *Plant Sci* 164: 141-146.

EXEMPLO 14 – transformação com plastídeos de células BY2 individuais de tabaco

Iniciação de células individuais em preparação da transformação com plastídeos

30 Quatro mililitros de suspensão de células BY2 de tabaco (na fase de crescimento estacionária mantidas em um ciclo de 7 dias) foram adicionados e 26 ml de meio fresco composto seja por Meio A [sais LS (*Phyto-*

Technology Laboratories, L689), 120 g/l de sacarose, 1 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de piridoxina HCl, 10 mg/l de tiamina HCl e 20 nM de difenilpirazol (DPP)] ou Meio B [sais LS, 120 g/l de sacarose, 1 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de piridoxina HCl, 10 mg/l de tiamina HCl, 2,5 mg/l de benzilaminopurina (BAP) e 20 nM de DPP] contidos em um frasco agitado de 125 ml com um tampão de espuma. Os frascos foram colocados em um agitador giratório a uma velocidade de 125 rpm, no escuro, a uma temperatura de 28°C por 7 dias.

Experimento de transformação

Os experimentos de transformação foram iniciados mediante a diluição de cultivo em suspensão de células BY2 (cultivado como descrito acima) com meio fresco a uma OD⁶⁵⁰ de 1,0. Para cada alvo de transformação, 1,5 ml de suspensão diluída foram pipetados em um filtro de papel estéril colocado no topo de um dispositivo para filtração a vácuo. As células em suspensão foram depositadas de maneira uniforme sobre a superfície do filtro de papel. O filtro de papel e as células foram transferidos para um meio de bombardeio [sais basais MS, vitaminas B5, 18,2 g/l de manitol, 18,2 g/l de sorbitol, 30 g/l de sacarose, 1 mg/l de BAP, 0,1 mg/l de 1-ácido naftalenoacético (ANA), 8 g/l de Ágar TC (*PhytoTechnology Laboratories*, A175).

20 Construto de plasmídeo para a transformação de células individuais

O construto de DNA usado neste exemplo foi designado pDAB3969. Os elementos do construto eram flanqueados por sequências 16S trnI e trnA do genoma do cloroplasto do tabaco. Dois genes, aphA-6 e nptII foram usados como marcadores seletivos guiados pelo gene Prrn mais o gene 10 do fago T7 e promotores PpsbA, respectivamente. O gene 10 do fago T7 também guia o gene de interesse, o TurboGFP.

Bombardeio biolístico das células BY2 individuais

As células permaneceram em meio de bombardeio por 4 horas antes do bombardeio. Os alvos preparados foram bombardeados com um Bio-Rad PDS-1000/He Delivery System. Partículas de ouro (0,4 µm, Inbio Gold, Melbourne, Austrália) foram preparadas e o DNA foi precipitado sobre a sua superfície de acordo com os método padrão.

As placas-alvo foram bombardeadas a 7,584 MPa (1100 psi), junto com vácuo de mercúrio de 71,12 cm (28 polegadas) e a 9cm de distância da tela de retenção. As placas foram então postas de lado por um dia, para recuperação. Os filtros de papel e tecidos foram então transferidos para o Meio C [sais LS, 120 g/l de sacarose, 170 mg/l de fosfato de potássio, monobásico, anidro, 0,6 mg/l de tiamina-HCl, 0,2 mg/l de 2,4-D, 8 g/l de ágar TC e 100 mg/l de canamicina] e deixados na placa de seleção original até o surgimento de colônias resistentes. Quando colônias resistentes se desenvolveram até o diâmetro de 4-5 mm, elas foram isoladas em placas individuais com o Meio C em gel e expandidas até estarem grandes o bastante para serem amostradas para análise por PCR.

Resultados e discussão

As linhagens de células BY2 foram cultivadas em Meio A e Meio B por 7 dias. Cinco placas-alvo foram preparadas a partir das células cultivadas em Meio A e cinco placas adicionais foram preparadas a partir das células cultivadas no Meio B. Esses dois meios foram projetados para produzir amiloplastos aumentados mediante incremento do teor de sacarose, remoção da auxina ácido 2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D) e, no meio B, pela adição da citoquinina BAP (1, 2). Os amiloplastos aumentados serviram como alvos por laser da transformação biolística. Ambos os meios que continham 20 nM de DPP produziram células individuais. As placas bombardeadas produziram 3 colônias resistentes à canamicina a partir das células tratadas do Meio A e 2 colônias resistentes a partir das células tratadas com o Meio B.

Amostras de cada colônia foram colhidas para análise molecular. O DNA foi extraído com o protocolo DNasey e as alíquotas foram analisadas por PCR usando-se os seguintes conjuntos de iniciadores:

Nome do iniciador	Sequência do iniciador	
MAS394	TATGCTGCGTTCGGGAAGGATGAA	conjunto 2
MAS395	GATTAAAAAGAATAAACATCCGATG	
MAS396	TTGCCTAAGAGAGAGGATGCATCGGA	conjunto 3
MAS397	TTGTCTGTTGTGCCCGAGTCATAGC	

Nome do iniciador	Sequência do iniciador	
MAS398	TGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGG	conjunto 4
MAS399	TTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGATG	
MAS400	TGGAGTACCAGCACGCCTTCAAGC	conjunto 5
MAS401	GGCTATGCCATCCTAAGGTGCTGC	

Segmentos amplificados com iniciadores do construto de transformação. O iniciador MAS401 insere no plastídeo de tabaco nativo 83 pares de bases além da extremidade do flanco trnA e demonstra a integração no genoma do plastídeo.

- 5 As reações de PCR para os conjuntos de iniciadores 2, 3,4 e 5 produziram reações positivas para todas as cinco amostras. O DNA de células BY2 de tipo selvagem (não-transformadas) em suspensão e o controle vegetal de tabaco não produziram quaisquer bandas. Assim, os resultados de PCR indicam a presença de todos os três transgenes e a integração no
- 10 genoma do plastídeo.

Listagem de sequências

	<110>	Dow AgroScience LLC	
		Jayakumar, Pon Samuel	
		Beringer, Jeffrey R.	
5		Schmitzer, Paul	
		Burroughs, Frank	
		Garisson, Robbi	
		Ainley, William Michael	
		Samboju, Narasimha Chary	
10	<120>	"MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA A INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS CELULARES VEGETAIS EM SUSPENSÃO COMO CÉLULAS INDIVIDUAIS COM PAREDES CELULARES INTACTAS E PARA A TRANSFORMAÇÃO DAS MESMAS".	
	<130>	DAS-140XC1 PCT	
		PCT/US2007/088970	
15	<140>	60/878,028	
	<141>	2006-12-29	
	<160>	8	
	<170>	Patente versão 3.3	
	<210>	1	
20	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	iniciador para MAS394	
	<400>	1	
		tatgctgcgt tcgggaagga tgaa	24
25	<210>	2	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	Iniciador para MAS395	
	<400>	2	
30		gattaaaaga ataaacatcc gatg	24
	<210>	3	
	<211>	24	

<212> DNA
 <213> Iniciador para MAS396
 <400> 3
 ttgcctaaga gaggatgcat cgga 24
 5 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Iniciador para MAS397
 <400> 4
 10 ttgtctgttg tgcccagtca tagc 24
 <210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Primer MAS398
 15 <400> 5
 tgatattgct gaagagcttg gcgg 24
 <210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 20 <213> Primer MAS399
 <400> 6
 ttggtgtagc cgccgttggt gatg 24
 <210> 7
 <211> 24
 25 <212> DNA
 <213> Primer MAS400
 <400> 7
 tggagtacca gcacgccttc aagc 24
 <210> 8
 30 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Primer MAS401

<400> 8

ggctatgcca tcctaagggtg ctgc

24

REINVINDICAÇÕES

1. Célula vegetal individual, isolada, compreendendo uma parede celular intacta.

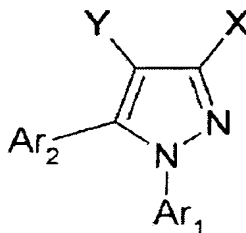
2. Método para produzir uma célula como definida na reivindicação 1, compreendendo tal método o cultivo de células vegetais compreendendo paredes celulares intactas em meio contendo glicerol e um agente separador do grupo consistindo de uma enzima causadora da degradação da pectina e um composto despolimerizador da tubulina.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, sendo o meio mencionado um meio líquido e estando as células mencionadas em uma suspensão.

4. Método de acordo com a reivindicação 2, sendo o agente separador mencionado um composto despolimerizador da tubulina.

6. Método de acordo com a reivindicação 4, sendo o composto despolimerizador da tubulina mencionado selecionado do grupo consistindo de colchicina e dinitroanilina.

6. Método de acordo com a reivindicação 4, estando o composto despolimerizador da tubulina mencionado em conformidade com a seguinte fórmula:



na qual

X = CO₂R, CH₂CO₂R, CH₂CH₂CO₂R, (CH₂)₃CO₂R, OCH₂CO₂R, OCH(CH₃)CO₂R, OC(CH₃)₂CO₂R, CH₂OCH₂CO₂R, CH₂CH(CO₂CH₂CH₃)CO₂R, ou OCH(CO₂CH₂CH₃)CO₂R

Y = CN, Cl, Br, F, ou NO₂

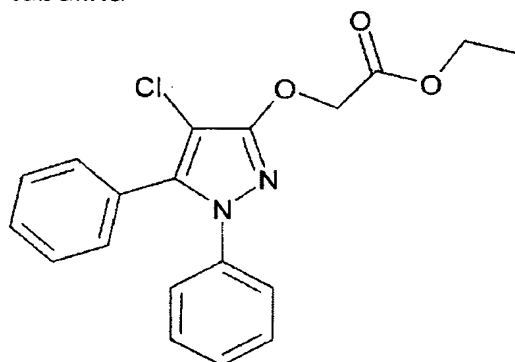
Ar₁ = fenila substituída, piridina não substituída, 1-3 fenila substituída ou 1-3 piridina substituída ou substituída por halogênio ou CN

Ar₂ = fenila não-substituída, piridina não-substituída, 1-3 fenila substituída, 1-3 piridina substituída ou substituída por halogênio ou CN e

R = H ou éster de 1-5 carbono linear ou ramificado

7. Método de acordo com a reivindicação 4, sendo o composto despolimerizador da tubulina mencionado é o etil éster de ácido 4-cloro-1,5-difenil-1H-pirazol-3-ilóxi)- acético.

5 8. Método de acordo com a reivindicação 4, sendo o composto despolimerizador da tubulina



9. Método de acordo com a reivindicação 2, sendo o agente separador uma enzima selecionada do grupo consistindo de pectinase e pectolase.

10 10. Célula de acordo com a reivindicação 1, sendo a célula individual e isolada mencionada selecionada do grupo consistindo de uma célula algácea, uma célula de dicotiledônea, uma célula de monocotiledônea, uma célula vascular lowever e uma célula não vascular.

11. Método para transformar uma célula como definida na reivindicação 1, compreendendo tal método a preparação de uma célula isolada com o método da reivindicação 2, a transformação de tal célula com um polinucleotídeo heterólogo e a seleção de uma célula transformada.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, sendo que a etapa de seleção mencionada utiliza seleção sem marcadores.

20 13. Cultura de células cultivadas de uma célula como definida na reivindicação 1, expressando-se tais células uniformemente.

14. Célula de acordo com a reivindicação 1, sendo tal célula transgênica.

25 15. Célula de acordo com a reivindicação 1, sendo tal célula transplastômica.

16. Método de acordo com a reivindicação 2, sendo tal método um processo de alta capacidade de produção.

17. Método de acordo com a reivindicação 10, sendo a etapa de transformação mencionada conduzida usando-se um método selecionado do grupo consistindo de polietilenoglicol, eletroporação, biolística e nanopartículas.

18. Célula de acordo com a reivindicação 1, sendo tal célula individual e isolada mencionada selecionada do grupo consistindo de uma célula de tabaco, uma célula de cenoura, uma célula de milho e uma célula de orelha-de-macaco.

19. Método de acordo com a reivindicação 2, sendo o meio mencionado selecionado do grupo consistindo em um gel e um meio semisólido.

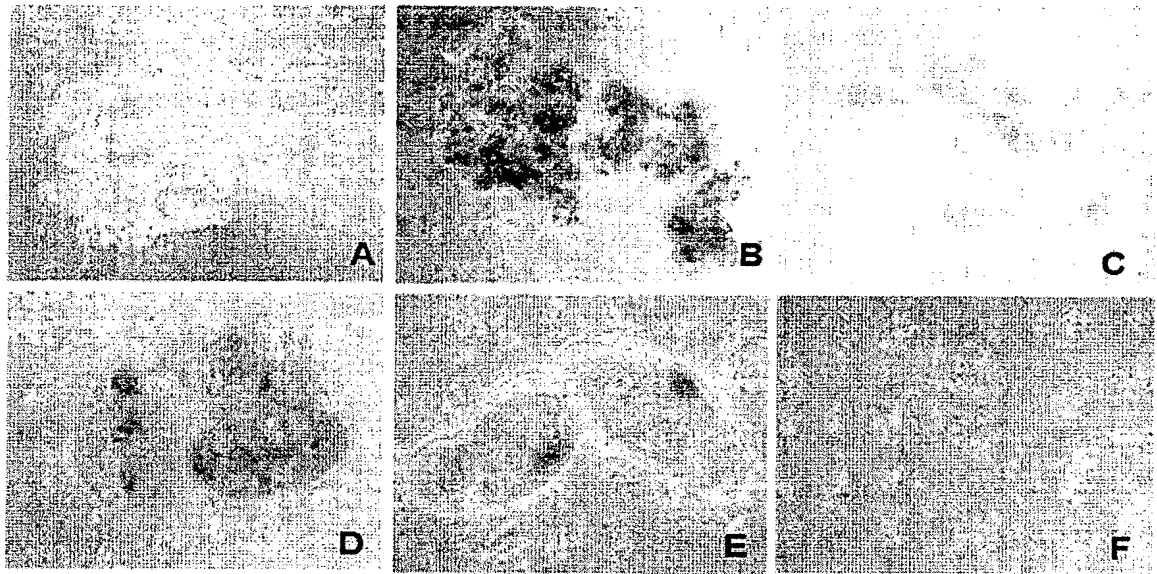


FIG. 1

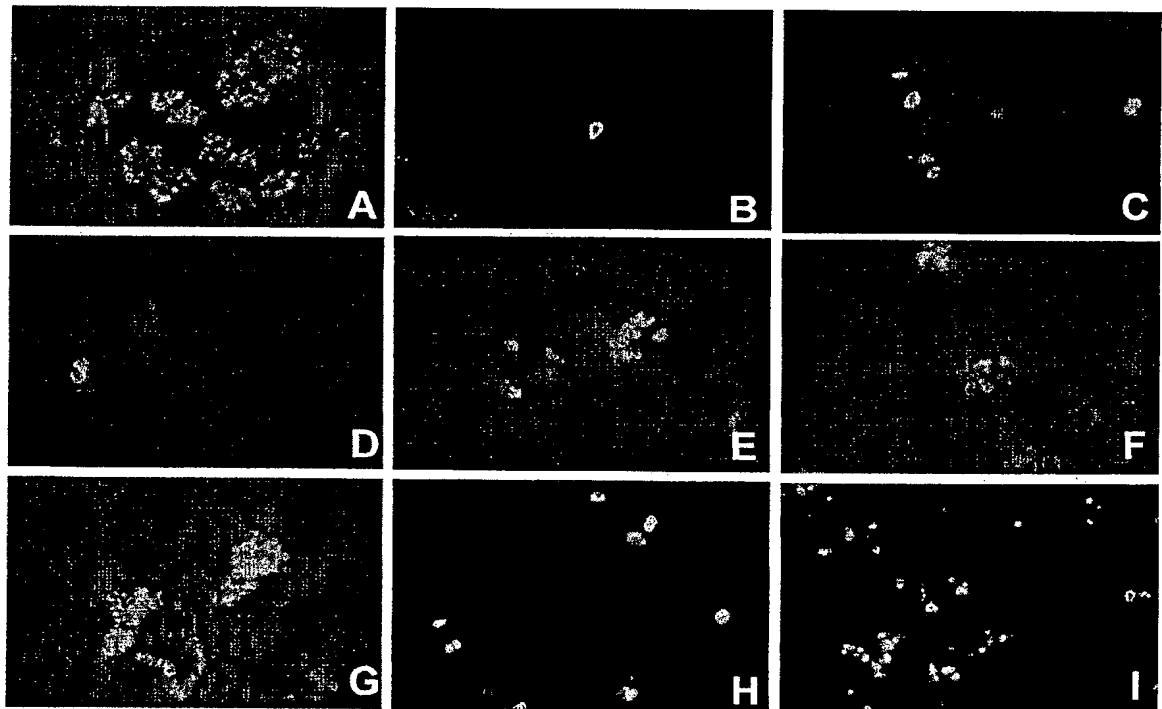


FIG. 2

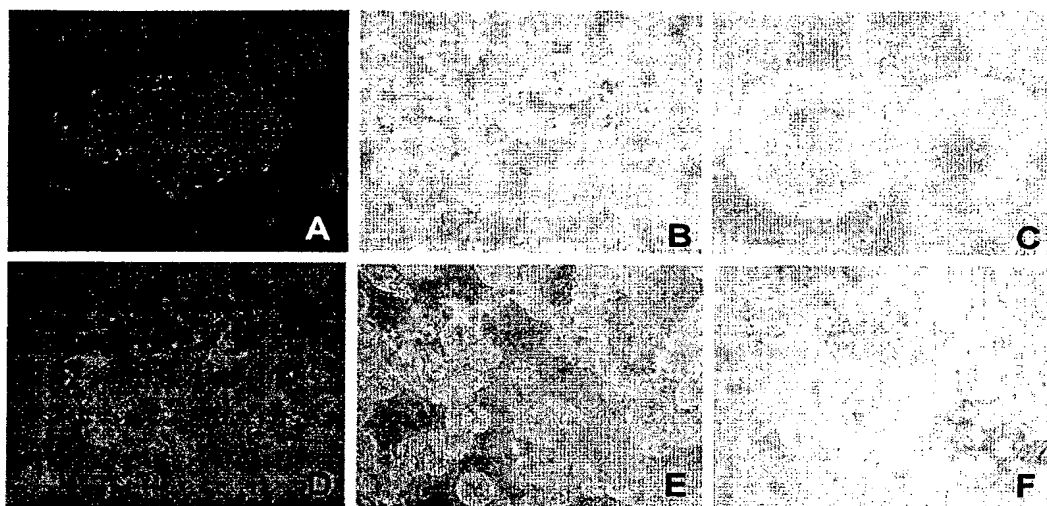


FIG. 3

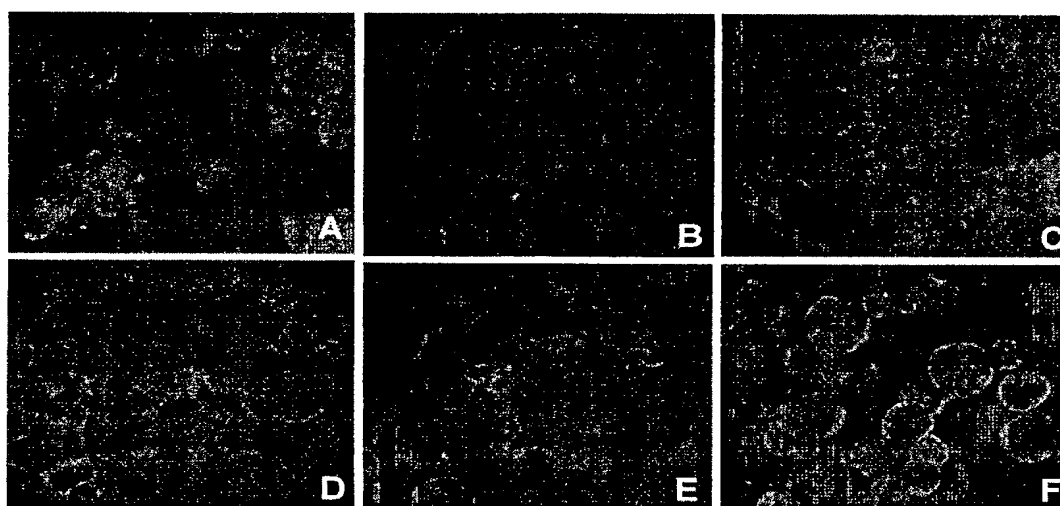


FIG. 4

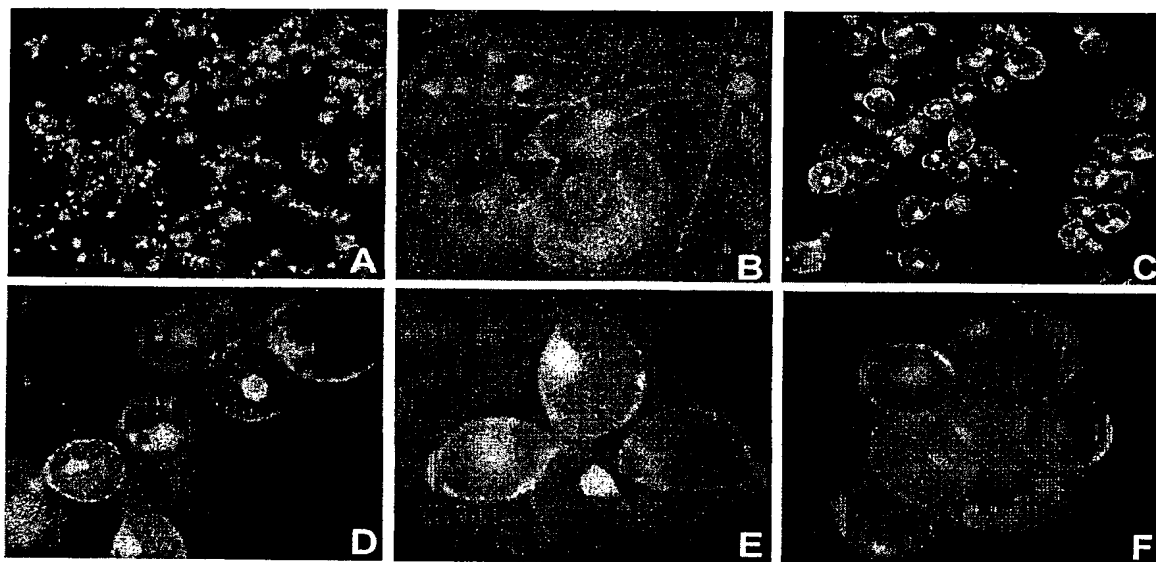


FIG. 5

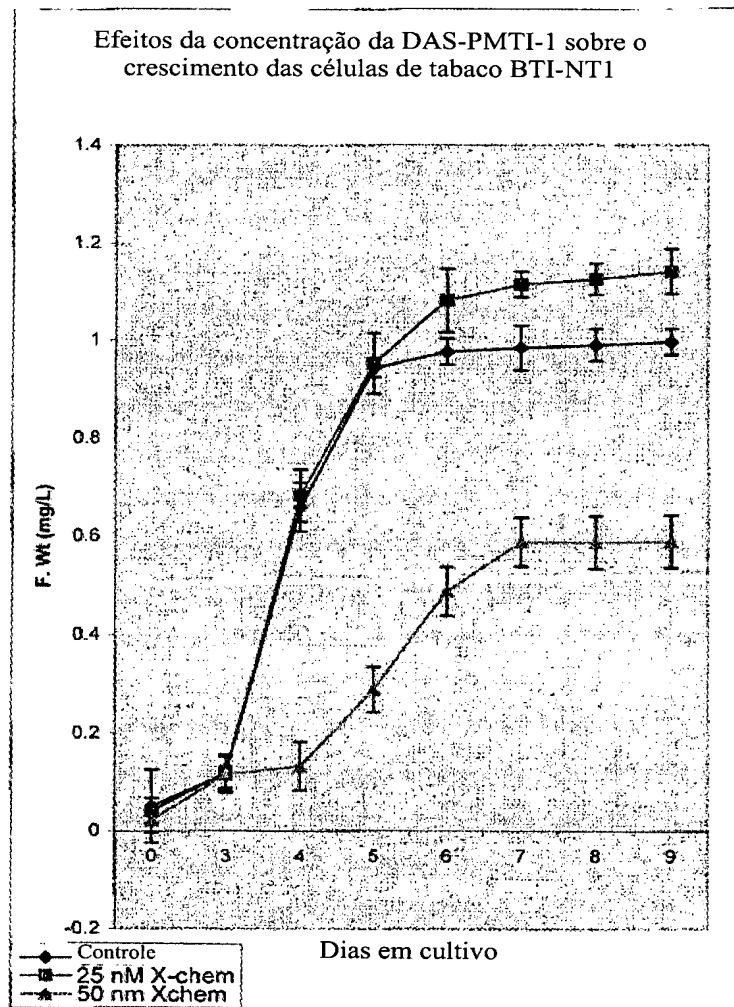


FIG. 6

Adição de agentes de rompimento dos microtúbulos (25 nM a 1mM) ao meio logo após início da suspensão



Liberação de células individuais 3-7 dias após o início da suspensão



Obtenção de alto percentual de células individuais após 7 dias de tratamento



As células individuais são passadas por filtros de 100, 75 e 40 μ M para remover quaisquer agregados de células mortas



Plaqueamento de 1,5 ml de células individuais à densidade de 0,6 OD660 em uma placa com meio LS BY2 com 10 mg/l de Bialophos por 2-4 semanas para selecionar colônias

FIG. 7

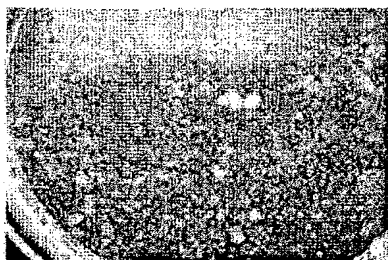


FIG. 8A



FIG. 8B



FIG. 8C

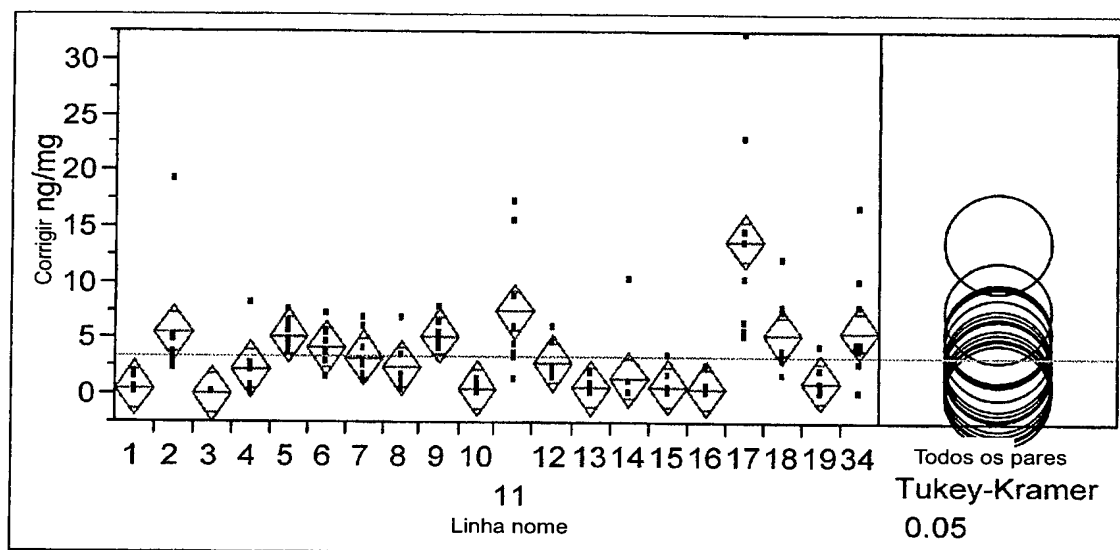


FIG. 9

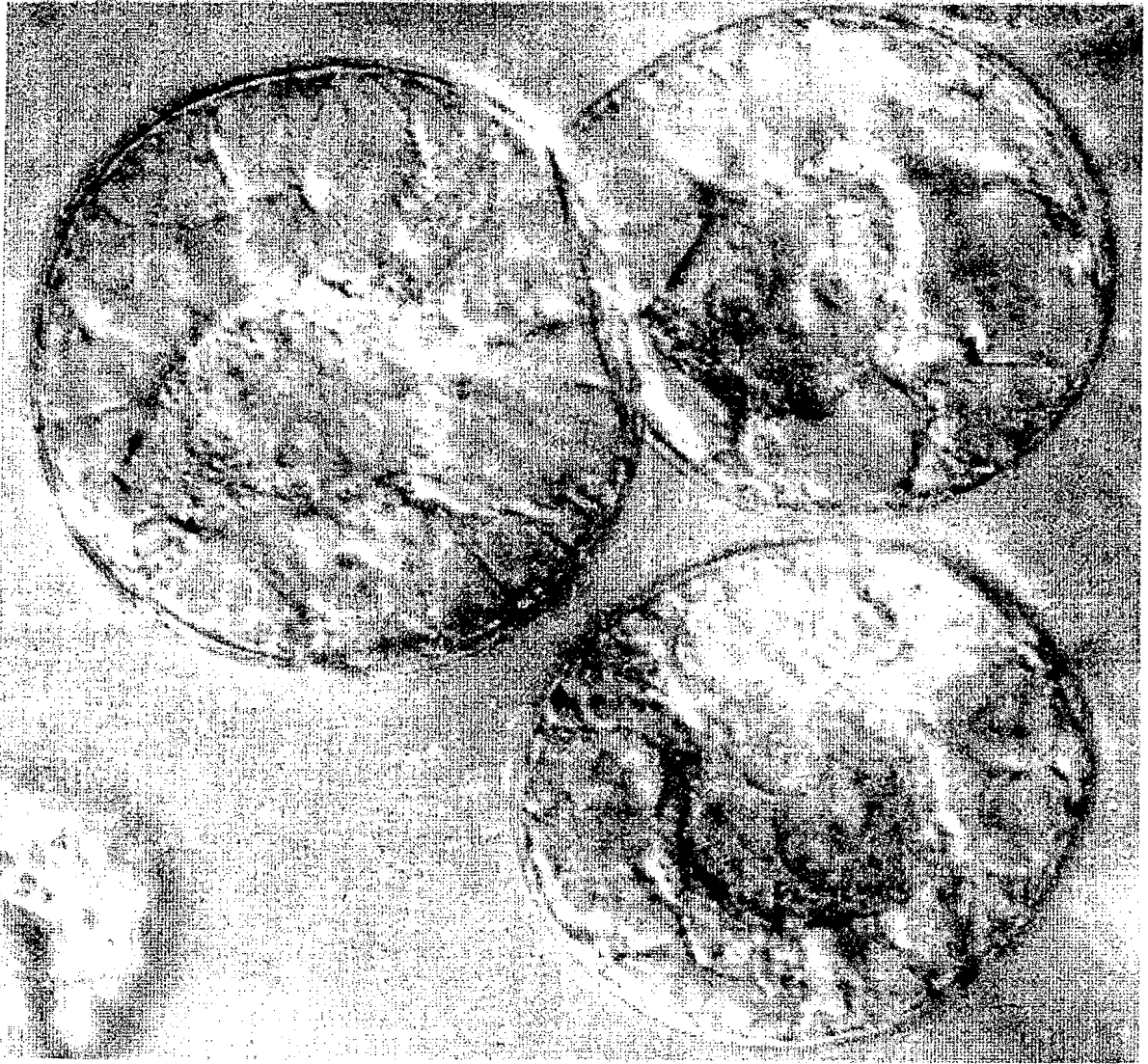


FIG. 10

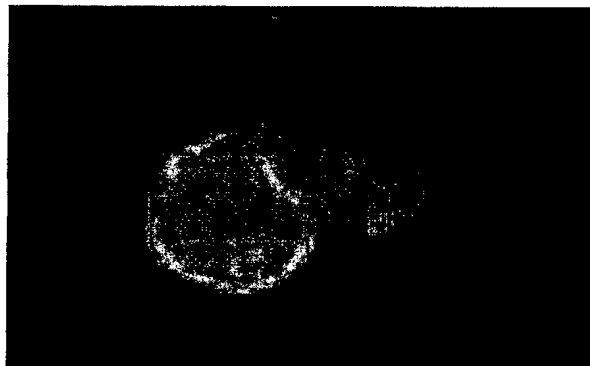


FIG. 11

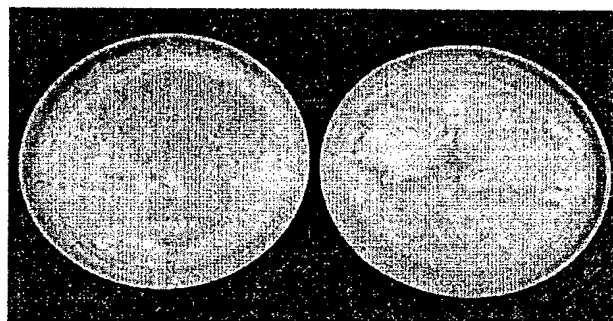


FIG. 12

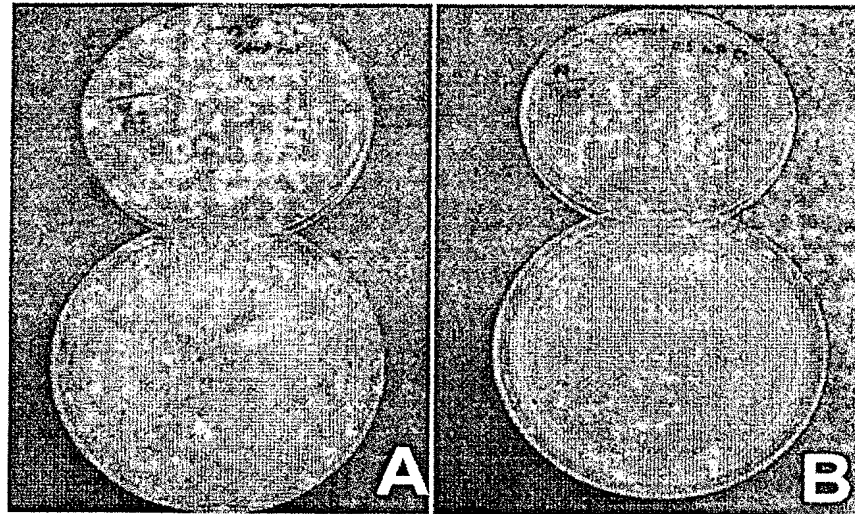


FIG. 13A

FIG. 13B

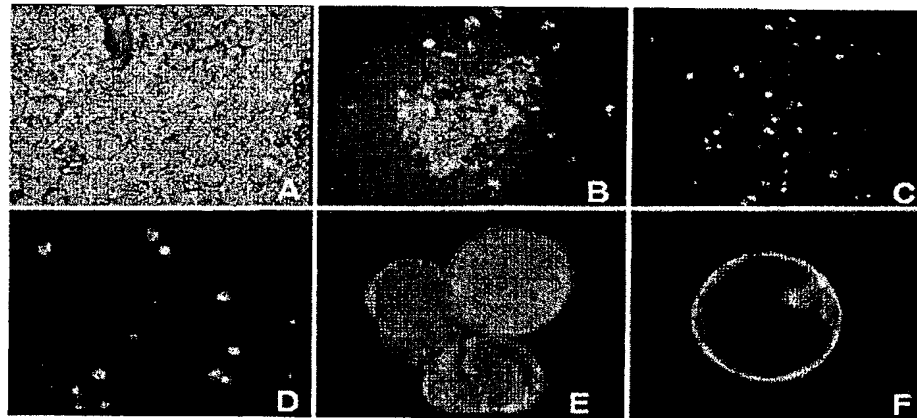


FIG. 14

Curva de crescimento das células JTNT1 em resposta aos IMIs

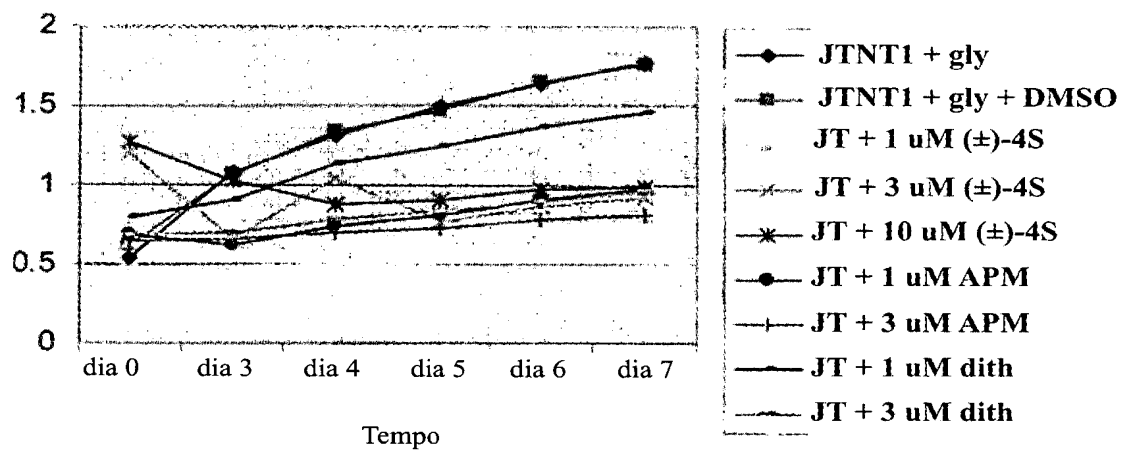


Fig.15

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS *IN VITRO* PARA A INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS CELULARES VEGETAIS EM SUSPENSÃO COMO CÉLULAS INDIVIDUAIS COM PAREDES CELULARES INTACTAS E PARA A TRANSFORMAÇÃO DAS MESMAS"**.

A presente invenção refere-se a métodos simples e consistentes para decompor agregados celulares de suspensões em células individuais com paredes celulares primárias intactas. A presente invenção se refere em parte à separação de células de agregados celulares de suspensões cultivadas em meio contendo enzimas causadoras de degradação da pectina ou compostos despolimerizadores da tubulina, incluindo a colchicina. A presente invenção também se refere a novos usos de compostos para tais fins. Outro aspecto da presente invenção se refere à transformação das células isoladas em questão. Tais processos simplificam e integram transformações baseadas em células individuais e processos de seleção em processos de trabalho de geração de eventos transgênicos e transplastômicos. A presente invenção também remove restrições técnicas e produz linhagens transgênicas sem marcadores e de expressão uniforme que apresentam alta capacidade de produção para atender a várias necessidades das plataformas de saúde animal, biofarmacêutica e proteção de traços e plantações.