**ESTUDOS ANATÔMICOS DA ORGANOGÊNESE *in vitro* DE SOJA E
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO VIA *Agrobacterium
tumefaciens***

ADRIANA CRISTINA ALVES
Bióloga

Orientadora: Profa. Dra. **MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de
São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio 1999

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Alves, Adriana Cristina

Estudos anatômicos da organogênese *in vitro* de soja e otimização do processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* / Adriana Cristina Alves. - Piracicaba, 1999.

107 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
Bibliografia.

1. Anatomia vegetal 2. Melhoramento genético vegetal 3. Organogênese 4. Soja
5. Transformação genética. I. Título

CDD 633.34

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O Autor"

**Aos meus pais,
Antonio e Iris
dedico**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira, pela oportunidade concedida, orientação e amizade.

Aos professores do Departamento de Genética pelos ensinamentos.

À Profa. Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ, pela orientação nas análises histológicas e ultra-estruturais.

À farmacêutica Marli Kasue Misaki Soares, técnica do Laboratório de Anatomia do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ, pelo valioso apoio na documentação fotográfica dos dados e auxílio nas técnicas de microscopia.

Ao Prof. Dr. Elliot W. Kitajima do Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária - NAP/MEPA, por ter possibilitado a utilização do microcópico eletrônico de varredura.

Ao Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira do Laboratório de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – USP, pelas linhagens de *Agrobacterium* cedidas.

Ao Prof. Dr. Isaías Olivio Geraldi do Depto. de Genética da ESALQ, pela cessão e multiplicação das sementes do genótipo de soja utilizado.

Às amigas companheiras Vera Quecini, Maria Imaculada Zucchi, Juliana Fernando, Mariza Monteiro e Maria Cristina Falco, pelas longas horas de conversas, apoio, amizade e compreensão. Obrigada.

Em especial à Maria Aldete Ferreira, pela amizade inigualável e socorro quando minha bolsa chegou ao fim.

À Maria Imaculada Zucchi, pelo apoio no laboratório e também em casa, por ter me ensinado nesses anos de convivência, que a simplicidade é a melhor forma de vida!

Ao biólogo Carlos Alberto de Oliveira, técnico de laboratório e Lissandra Muzzarinho, auxiliar de laboratório, ambos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas do Depto de Genética da ESALQ, pelo apoio e amizade.

Aos amigos do Laboratório: Ilene Ribeiro, Monalisa Carneiro, Paulo Barroso, Luciana Rossini e Heiko Rossmann.

Aos amigos Christina, Madeira, Henry, Yvonne e Vilma Palazetti, pela "força" sempre presente.

À minha família, pela infindável compreensão nos momentos de longa ausência.

Ao Jair, pela amorosa dedicação nem sempre correspondida a altura, meu pedido de desculpas.

A todos os funcionários e alunos do Departamento de Genética, pelo apoio e amizade.

À CAPES e CNPq, pela concessão da bolsa.

À FAPESP, pelo financiamento da pesquisa (Processo nº 96/12845-8).

Página	Linha	Onde se lê:	Leia-se
47		Figura 10A	Figura 10B
48		Figura 10B	Figura 10A
59		Figura 35A	Figura 18A
61	12°	450-625 μ	450-625 μ m
	14°	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Helianthus annuus</i>
64	14°	com 0 μ M	na ausência
67		legenda da Figura 28	10^7 , 10^8 e 10^9 , respectivamente
68	13°	Com dois dias de pré-cultivo...	Em explantes inoculados sem o pré-cultivo...
76	1°	I. Estudo anatômico da organogênese em soja	I. Estudo anatômico da organogênese <i>in vitro</i> de soja
	15°	II. c. os compostos fenólicos podem ser...	os compostos fenólicos que seriam produzidos em resposta aos ferimentos podem ser ...
80	19°	potencial	potencial
86	5°	formaldehide-glutaraldehyde	formaldehide-glutaraldehyde
95	1°	adventitious	adventitious
98	1°	<i>Agrobacterium</i> -medited	<i>Agrobacterium</i> -mediated
	2°	Journal of Americam	Journal of American
100		Tabela 2 – % pontos azuis	Total de pontos azuis

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	x
SUMMARY	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Organogênese em soja	4
3.2 <i>Agrobacterium</i>	9
3.3 Suscetibilidade de soja ao <i>Agrobacterium</i>	15
3.4 Transformação de soja via <i>Agrobacterium</i>	17
3.5 Fatores que afetam a transformação via <i>Agrobacterium</i>	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Material vegetal	25
4.2 Caracterização anatômica do explante	25
4.3 Análise anatômica da organogênese	26
4.4 Análises ultra-estruturais da organogênese	26
4.5 Análise da profundidade do ferimento	26
4.6 Cultura bacteriana	26
4.7 Inoculação dos explantes	27
4.8 Análise da expressão transiente do gene repórter <i>uidA</i>	28
4.9 Localização histológica da expressão transiente do gene repórter <i>uidA</i>	29
4.10 Microscopia eletrônica de varredura da adesão do <i>Agrobacterium</i> à superfície do explante	29
4.11 Ensaios de otimização do processo de transformação via <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	29
4.11.1 Linhagens bacterianas	30
4.11.2 pH	30
4.11.3 Adição de acetoseringona no meio de cultura	30

	Página
4.11.4 Adição de acetoseringona na cultura bacteriana	30
4.11.5 Concentração de acetoseringona	30
4.11.6 Temperatura de co-cultivo	31
4.11.7 Tempo de co-cultivo	31
4.11.8 Concentração de bactérias	31
4.11.9 Presença de BAP durante o co-cultivo	31
4.11.10 Pré-cultivo com BAP	31
4.11.11 Meio de inoculação	31
4.11.12 Ferimento	31
4.11.13 Controles positivo e negativo	32
4.11.14 Ensaio final	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Caracterização anatômica do explante	33
5.2 Análise anatômica da organogênese	36
5.3 Análises ultra-estruturais da organogênese	43
5.4 Análise da profundidade do ferimento	46
5.5 Microscopia eletrônica de varredura da adesão de <i>Agrobacterium</i> à superfície do explante	46
5.6 Localização histológica da expressão transiente do gene repórter <i>uidA</i>	54
5.7 Ensaios de otimização do processo de transformação via <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	62
5.7.1 Linhagens bacterianas	62
5.7.2 pH	63
5.7.3 Adição de acetoseringona no meio de cultura	64
5.7.4 Adição de acetoseringona na cultura bacteriana	64
5.7.5 Concentração de acetoseringona	65
5.7.6 Temperatura de co-cultivo	66
5.7.7 Tempo de co-cultivo	66
5.7.8 Concentração de bactérias	67

	Página
5.7.9 Presença de BAP durante o co-cultivo	68
5.7.10 Pré-cultivo com BAP	68
5.7.11 Meio de inoculação	69
5.7.12 Ferimento	70
5.7.13 EHA105 X pH X temperatura	70
5.7.14 AGL1 X pH X temperatura	71
5.7.15 GV2260 X pH X temperatura	72
6 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXO A	99
ANEXO B	102

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Micro Einstein por metro quadrado por segundo
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
35 S	Promotor do vírus do mosaico da couve-flor
B5	Meio de cultura definido por Gamborg et al (1968)
BAP	6-Benzilaminopurina
CaMV	Vírus do mosaico da couve-flor
céls.mL ⁻¹	Células por mililitro
GUS	Precipitado azul resultante da reação da enzima β -glucuronidase com o substrato X-gluc
AIB	Ácido Indol Butílico
kb	Quilo base
kV	Quilovolt
L	Meio de cultura definido por Phillips & Collins (1979)
mg.L ⁻¹	Miligramas por litro
MS	Meio de cultura definido por Murashige & Skoog (1962)
MYA	Meio para crescimento de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>
ANA	Ácido Naftaleno Acético
nm	Nanometro
<i>nptII</i>	Gene codante da neomicina fosfotransferase
p/v	Peso por volume
pb	Par de bases
pTi	Plasmídio indutor de tumor
pRi	Plasmídio indutor de raízes

T-DNA	Região do DNA plasmidial de <i>Agrobacterium</i> que é transferido às células vegetais
TDZ	Thidiazuron
<i>uidA</i>	Gene codante da enzima β -glucuronidase
v/v	Volume por volume
X-gluc	5-Bromo-4 chloro-3 indolyl β -D-glucuronide cyclohexylamine salt

ESTUDOS ANATÔMICOS DA ORGANOGÊNESE *in vitro* DE SOJA E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO VIA *Agrobacterium tumefaciens*

Autora: ADRIANA CRISTINA ALVES

Orientadora: Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

RESUMO

Com o objetivo de se determinar os tipos celulares capazes de originar gemas adventícias em soja [*Glycine max* (L.) Merrill], assim como a localização das áreas meristemáticas, estudou-se o processo de diferenciação *in vitro* através de análises anatômicas. Utilizando-se como explantes nós cotiledonares, excisados aos 14 dias após a germinação *in vitro*, foi observado que as áreas meristemáticas localizadas na superfície do explante são formadas pela rediferenciação de células da epiderme e das primeiras camadas do parênquima cortical, caracterizando sua origem exógena, sendo que as gemas adventícias formam-se diretamente sobre o tecido do explante. A utilização de BAP durante a germinação das sementes foi um pré-condicionamento para a formação das gemas.

Neste estudo, também foram realizados ensaios para a otimização do processo de transformação via *Agrobacterium*. O emprego de ferimentos durante a inoculação da bactéria, visando alcançar células no interior do explante, não é necessário, uma vez que as células meristemáticas estão localizadas superficialmente e em processo ativo de divisão desde o início da cultura, fator importante na transformação genética. Doze variáveis foram avaliadas: adição e concentração de acetoseringona em meio de cultura e na cultura bacteriana, pH, temperatura, tempo de co-cultivo, meio de inoculação, concentração de células bacterianas, co-cultivo e pré-cultivo do explante na presença de 6-benzilaminopurina, linhagens bacterianas e

ferimento no explante, totalizando 22 tratamentos. Os caracteres estudados foram número de explantes apresentando reação positiva para o teste GUS e número de pontos azuis. Os dados foram analisados segundo o teste estatístico de χ^2 . Nenhum dos tratamentos apresentou mais do que 10% de explantes GUS positivos. Na maior parte dos tratamentos, 100% dos pontos azuis foram encontrados em regiões não meristemáticas, como epicótilos, cotilédones e base dos cotilédones. Em experimentos posteriores observou-se que o *Agrobacterium* comporta-se de maneira diferenciada conforme a combinação de pH e temperatura. Todas as combinações (linhagens AGL1, EHA105 e GV2260; pH 5,0 e 5,8; temperaturas 25 e 28°C) foram acompanhadas de aumento na expressão do gene repórter em áreas meristemáticas. A localização histológica do produto da expressão do gene repórter *uidA* mostrou que esta ocorre em células da epiderme e do parênquima cortical, sendo estes os mesmos tipos celulares envolvidos na formação das gemas adventícias em nós cotiledonares de soja. Esta coincidência suporta a possibilidade de obtenção de plantas transgênicas de soja, utilizando-se como vetor o *Agrobacterium tumefaciens*.

**ANATOMICAL STUDIES OF *in vitro* SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merrill]
ORGANOGENESIS AND OPTIMIZATION OF THE TRANSFORMATION
PROCESS MEDIATED BY *Agrobacterium tumefaciens***

Author: ADRIANA CRISTINA ALVES

Adviser: MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

SUMMARY

In order to determine the cells types capable to give rise to soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] adventitious buds, as well as the localization of meristematic areas, the *in vitro* differentiation process was studied through anatomical analysis. Using explants derived from cotyledonary nodes excised 14 days after *in vitro* germination, we observed that the localization of meristematic areas is superficial and they are formed by the dedifferentiation of epiderm and the first layers of cortex parenchymatous cells, characterizing their exogen origin and direct formation without a callus phase. Utilization of BAP during seed germination was a precondition to bud formation. As a second objective the optimization of transformation process was carried out. The employment of injury during *Agrobacterium* inoculation, aiming to reach cells inside the explants is not necessary, because meristematic cells are superficially localized and in active division process since the beginning of *in vitro* culture, the most important factor for genetic transformation. In this study, optimization assays to *Agrobacterium* transformation were accomplished, where 12 variables were tested, such as addition and acetosyringone concentrations on culture and/or bacteria media, bacterium cells concentration, cocultivation and precultivation with hormone 6-benzilaminopurine, temperature, pH, length of cocultivation, inoculation medium, bacterium strains and explant injury, totalizing 22 treatments. The experiment analysis was based on the number of GUS positive explants and on the number of blue spots. Data were analysed according to the χ^2 statistical procedure. None of the treatments

presented more than 10% of GUS positive explants. For most of the treatments, 100% of blue spots were found in non-meristematic regions, such as epicotyl, cotyledons and cotyledon bases. Posterior experiments showed that *Agrobacterium* behaviour differs according to pH and temperature combinations. All combinations (strains AGL1, EHA105 and GV2260; pH 5.0 and 5.8; temperatures 25 and 28 °C) were responsible for an increase in the expression of the reporter gene in meristematic areas. The histologic localization of the product of the expression reporter gene *uidA* took place in epiderm and cortex parenchymatous cells, the same cell types involved in adventitious bud formation in soybean cotyledonary nodes. This juxtaposition exposes the possibility of acquisition of soybean transgenic plants employing *Agrobacterium tumefaciens* as vector.

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma espécie anual de hábito herbáceo, pertencente a família Leguminosae. É a leguminosa de maior importância comercial, com uma safra mundial prevista para o biênio 1998/1999 de 156 milhões de toneladas de grãos. O Brasil é o segundo maior produtor mundial, com uma produção prevista de 29.700.000 toneladas para 1999, em uma área plantada de 12.606.013 hectares. De 1997 para 1998 o Brasil teve um crescimento de 15,47% na exportação de soja, mantendo-se em segundo lugar como exportador (Agrianual, 1999).

Devido à sua importância na economia mundial, tem-se muito interesse no desenvolvimento de estudos que contribuam para o melhoramento genético da soja, tanto em qualidade quanto em produtividade.

A transformação mediada por *Agrobacterium* é um método auxiliar no melhoramento genético de espécies vegetais e visa a introdução de genes exógenos via engenharia genética. Esta técnica tem sido extensivamente empregada para obtenção de plantas de interesse comercial, com resistência a doenças (Di et al., 1995 e Korte et al., 1994), herbicidas (Bean et al., 1997; Mannerlöf et al., 1997; McHughen, 1989 e Yamazaki et al., 1996), insetos (Billings et al., 1997; Metz et al., 1995 e Sane et al., 1997), aumento na qualidade nutricional (Falco et al., 1995; Molvig et al., 1997 e Saalback et al., 1994), alteração na biossíntese de lignina (Zhan et al., 1997) entre outros.

Entretanto, para o emprego da metodologia de transformação de plantas, há a necessidade de se ter um protocolo de regeneração eficiente (Davey et al. 1988; Declerck & Korban, 1995; Nauerby et al., 1991 e Yancheva, 1994), de maneira a se

obter plantas viáveis e férteis em alta frequência e qualidade para uma análise significativa dos transformantes (Adkins et al., 1995).

Segundo Yang et al. (1990), os estudos da organogênese têm recebido pouca atenção em comparação aos de embriogênese somática em soja. No entanto, muitos pesquisadores têm reconhecido a importância do desenvolvimento de um sistema mais eficiente para a cultura *in vitro* da soja via organogênese (Thomé et al., 1995).

O estudo anatômico da organogênese de soja *in vitro* vem contribuir para a detecção de áreas meristemáticas (Busing et al., 1994; Dan & Reichert, 1998; Wright et al., 1986 e Yang et al., 1990) e caracterização dos tipos celulares que dão origem ao desenvolvimento de gemas adventícias (Appezato-da-Glória, 1998). A determinação destas áreas e da sua distância em relação à superfície do explante comparada à profundidade do ferimento provocado pelo sistema de inoculação, contribuem para a definição de fatores importantes para o aumento da eficiência do processo de transformação de soja via *Agrobacterium*.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- ✓ estudo anatômico da organogênese em soja, visando localizar as áreas meristemáticas que dão origem às gemas adventícias, utilizando como explante nós cotiledonares de soja;
- ✓ determinação da distância das áreas meristemáticas em relação à superfície do explante;
- ✓ determinação da profundidade do ferimento causado pelo sistema de inoculação da cultura bacteriana;
- ✓ otimização do processo de transformação via *Agrobacterium* visando aumentar a eficiência da expressão transiente do gene repórter *uidA* em explantes derivados de nós cotiledonares;
- ✓ localização histológica da expressão transiente do gene *uidA*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Organogênese em soja

Organogênese é o processo pelo qual tecidos vegetais produzem órgãos adventícios *in vitro*. A organogênese pode ocorrer diretamente a partir de células do explante original ou indiretamente, através da formação de calo (Burritt & Leung, 1996).

O cultivo de soja *in vitro*, tanto pela via organogênica quanto a partir de embriogênese somática, ainda possui limitações, principalmente referentes ao genótipo com o qual se deseja trabalhar. Pode-se dizer que a cultura de tecidos em soja é genótipo-dependente.

O primeiro pré-requisito para a manipulação genética é que a espécie de interesse possua um protocolo eficiente de regeneração. O sistema de regeneração via organogênese em soja tem sido estudado exaustivamente por muitos autores nos últimos 20 anos. Espécies selvagens de soja foram estudadas quanto à sua capacidade de regeneração. Entre elas estão *Glycine canescens* e *G. latrobeana* (Kameya & Widholm, 1987), *G. canescens* (Lazzeri et al., 1985 e Widholm & Rick, 1983), *G. soja* (Jiang et al., 1986), *G. clandestina* (Hammatt et al., 1986 e Hymowitz et al., 1986), *G. canescens*, *G. falcata*, *G. tomentella* e *G. latrobeana* (Davey et al., 1988), *G. cyrtoloba* e *G. latrobeana* (Jones et al., 1988) e *G. argyrea* (Kumar et al., 1991).

As respostas obtidas por estes autores variaram em função do tipo de explante utilizado como por exemplo: hipocótilo, nó cotiledonar, cotilédones, folhas e pecíolos, sendo que os explantes excisados de nós cotiledonares apresentaram melhores resultados.

Em 1980, Cheng et al. foram os primeiros pesquisadores a obter plantas regeneradas de soja comercial via organogênese, utilizando segmentos nodais. A indução da brotação foi realizada com o emprego de várias concentrações de BAP e AIB, porém, concentrações superiores a 10 μM de BAP durante a germinação de sementes e subsequente cultura dos nós cotiledonares, na mesma concentração, resultou na produção contínua de gemas adventícias.

Wright et al. (1986) estudaram a regeneração de plantas via organogênese de soja (*Glycine max*), promoveram a germinação das sementes na presença de BAP, como pré-condicionamento das plântulas, alteração das concentrações de sais inorgânicos do meio MS, redução do fitorregulador BAP nas subculturas e utilização de frutose e sacarose para estimular o desenvolvimento dos brotos. Estes autores concluíram que a germinação de sementes em meio contendo BAP foi imprescindível para a indução de brotação múltipla, que atingiu um máximo de 20 brotos por nó cotiledonar em quatro meses, na maioria dos tratamentos utilizados. A presença de 5 μM de BAP produziu 3,5 vezes mais brotos que os tratamentos contendo 1 μM , não só durante a germinação, mas também durante as subculturas. A concentração de sais inorgânicos pareceu interagir com a fonte de carbono (frutose ou sacarose), somente quando utilizou-se concentração de $\frac{1}{4}$ MS, mostrando que sacarose reduziu a produção de brotos em 20 a 30 % comparativamente à utilização de frutose.

Trabalhos posteriores de regeneração de plantas de soja via organogênese têm seguido basicamente os protocolos de Cheng et al. (1980) e de Wright et al. (1986) usando explantes derivados de nós cotiledonares e indução com BAP ou em combinação com outros fitorreguladores, como AIB e ANA.

Kim et al. (1990) regeneraram plantas de *Glycine max* de oito cultivares, utilizando como explantes nós de folhas primárias, retiradas de plântulas de sete dias após a germinação. Estes explantes tiveram as folhas primárias retiradas, mas permaneceram com um cotilédone, uma vez que a presença de pelo menos um dos cotilédones é essencial ao processo regenerativo. Utilizando meio MS contendo quatro vezes a concentração original de micronutrientes, suplementado com vitaminas de B5, ANA, prolina e concentração de

BAP semelhante a de Wright et al. (1986), esses autores obtiveram, em média 18 brotos/explante para a cultivar Peking, demonstrando que as cultivares tinham capacidade de regeneração, embora o número médio de brotos tenha variado de oito a 20/explante. Os autores concluem que esta variação observada entre os cultivares pode ser de natureza genética.

Estudos comparativos da organogênese e regeneração de plantas a partir de vários explantes de soja foram realizados por Yang et al. (1990) em seis cultivares japoneses. Os explantes foram excisados de plantas de casa de vegetação, como cotilédones imaturos, plúmula de embriões imaturos, sementes maduras germinadas durante três dias e sem o ápice radicular, contendo metade de um cotilédone, um cotilédone, duas metades dos cotilédones ou os dois cotilédones inteiros. O meio de cultura foi semelhante ao utilizado por Kim et al. (1990) suplementado com tiamina e uma concentração superior de BAP e ANA; AIB foi igualmente usado em associação com BAP. A regeneração a partir de explantes derivados de cotilédones imaturos se deu indiretamente, originando brotos anormais. A cultura de plúmula de embriões imaturos gerou gemas adventícias diretamente sobre o tecido do explante, com baixa frequência de regeneração. Explantes apresentando um cotilédone ou as duas metades dos cotilédones apresentaram melhores resultados. Os autores concluíram que explantes derivados de sementes maduras ou embriões são mais responsivos que outras fontes de explantes e podem ser empregados eficientemente na regeneração de plantas de soja.

Kim et al. (1994) avaliaram os efeitos sinérgicos da prolina e micronutrientes na regeneração de brotos da cultivar Peking. Em um experimento fatorial avaliou-se concentração de micronutrientes (1, 2, 4 e 8x a concentração original do meio MS) na presença de prolina (0, 1, 2 e 4 g.L⁻¹) em dois tipos de explantes: nó de folhas primárias e cotilédones. A interação mais favorável ocorreu na concentração 4x de micronutrientes, com 2 g.L⁻¹ de prolina, para ambos os explantes. Os autores avaliaram igualmente o efeito da presença ou ausência de cada micronutriente (B, Co, Cu, I, Mn, Mo, e Zn) frente a vários níveis de concentração dos demais. Observaram que Zn exerce forte efeito sobre a regeneração de brotos em nós foliares, assim como em cotilédones, e a

magnitude deste efeito independe da concentração dos demais. Co pareceu estar em excesso quando utilizado em concentração 4x, pois desfavoreceu a regeneração embora sua presença seja necessária. O efeito inibitório do Co ocorre somente quando os outros micronutrientes estão na mesma concentração, ou seja, 4x. Neste trabalho, Kim et al. recomendam para uma regeneração eficiente, a utilização de explantes obtidos de plântulas com 7 dias, cultivados em meio MS com concentração de micronutrientes 4x, com excessão do Co e adição de 2 g.L⁻¹ de prolina.

Busing et al. (1994) estudaram a regeneração de plantas, induzindo à morfogênese, eixos embrionários obtidos de sementes maduras. A indução ocorreu em altas concentrações de BAP (22 µM, durante 24 horas), seguindo-se cultivo em meio MS contendo metade de sua concentração original. Os autores trabalharam com 12 cultivares de *Glycine max*, quatro de *G. gracilis* e duas de *G. soja*. Com esta curta exposição ao BAP, o número de brotos por eixo embrionário não foi superior a cinco, indicando que para uma maior eficiência, este fitorregulador deve estar presente durante os subcultivos como proposto por vários autores (Cheng et al., 1980; Dan & Reichert, 1998; Kaneda et al., 1997; Kim et al., 1990; Kim et al., 1994; Thomé et al., 1995; Wright et al., 1986 e Yang et al., 1990).

Estudos da regeneração via organogênese utilizando genótipos brasileiros de *Glycine max* foram realizados por Thomé et al. (1995), visando a obtenção de um protocolo eficiente para a transformação genética. A partir de nós cotiledonares obtidos de plântulas com sete dias e nós cotiledonares obtidos de sementes maduras, a brotação múltipla foi induzida usando-se BAP associado ao NAA. Gemas adventícias surgiram diretamente em ambos os explantes. Thomé et al. (1995) observaram diferenças entre os genótipos avaliados sendo que o número de brotos foi em média cinco/explante. Não houve diferença em termos de número de brotos formados entre os explantes derivados de plântulas germinadas ou não na presença de BAP (Marin, 1996) com aqueles derivados de sementes maduras para o genótipo IAS-5.

Kaneda et al. (1997) compararam a eficiência dos fitorreguladores TDZ e BAP, concentração ótima de TDZ e concentrações de sais de quatro formulações de meio

de cultura na regeneração de brotos de soja. O estudo utilizou nós cotiledonares e hipocótilos de plântulas com 14 dias, germinadas na presença de TDZ ou BAP quando se tratou de comparar a eficiência destes fitorreguladores. Concluíram que TDZ é uma citocinina mais eficiente para a organogênese em soja, tanto a partir de nós cotiledonares quanto hipocótilos. Explantes obtidos de hipocótilos apresentaram uma taxa de formação de brotos de 1,5 a 2x maior que os nós cotiledonares quando cultivados na presença de TDZ. Entre as várias concentrações utilizadas, encontraram que 2 mg.L^{-1} é a melhor concentração para indução de multibrotação, a qual foi adotada para os testes seguintes. Utilizando diferentes formulações de meio de cultura em suas concentrações originais ou reduzidas à metade (L2 – Phillips & Collins, 1979; B5 – Gamborg et al., 1968; MS – Murashige & Skoog, 1962 e MSB – Lazzeri et al., 1987) observaram que o meio $\frac{1}{2}$ B5 teve uma alta frequência de indução de brotos, enquanto o meio $\frac{1}{2}$ L2, induziu mais eficientemente a multibrotação, indicativo de que a concentração de sais influencia a organogênese, semelhante aos resultados encontrados por Wright et al. (1986) e também por Kim et al. (1990; 1994) quando estudaram influência da concentração de micronutrientes na regeneração de soja.

Mais recentemente, Dan & Reichert (1998) trabalharam com hipocótilos de 13 genótipos, excisados de plântulas de sete dias, germinadas em meio MS modificado, contendo BAP. Os genótipos responderam a este protocolo, embora a concentração de BAP tenha sido inferior àquela utilizada por outros autores ($0,36 \mu\text{M}$). Testando a interação entre meio de cultura e luminosidade, encontraram alta porcentagem de resposta para todos os genótipos. Os autores desenvolveram este protocolo de regeneração objetivando a utilização em transformação via biobalística, já que explantes derivados de hipocótilos apresentam regeneração somente em uma das extremidades.

Pelo apresentado, vê-se que a regeneração de plantas de soja, via cultura de tecidos, é mais um desafio para a adaptação de protocolos a determinado genótipo. Protocolos têm sido adequados pela alteração dos componentes do meio de cultura: concentrações de sais, vitaminas, fitorreguladores e aminoácidos, além da utilização de outras formulações (B5, L2, MSB, etc). Fatores externos como luz e temperatura também

contribuem para a otimização da cultura, tendo sido avaliados conjuntamente com o meio de cultivo.

3.2 *Agrobacterium*

Agrobacterium é um fitopatógeno que está envolvido numa forma de parasitismo sofisticado que se dá pela transferência de parte de sua própria informação genética à célula vegetal (Tinland, 1996). Esta bactéria de solo, gram-negativa, é o agente causal de duas doenças amplamente difundidas e conhecidas como "galha-da-coroa" e "raízes em cabeleira", produzidas por *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, respectivamente (Hooykaas & Beijersbergen, 1994; Van Sluys et al., 1992 e Weising & Kahl, 1996). Estas doenças ocasionam perdas no hemisfério norte estimadas em centenas de milhares de dólares, afetando principalmente culturas de uva, pêsego, abricó, nectarina, ameixa, pera, maçã, cereja, amêndoas, nozes e espécies ornamentais de *Prunus*, rosa e crisântemo (Clare & McClure, 1995).

Durante a infecção, uma região específica do plasmídeo, o T-DNA, é transferido para as células vegetais e integrado no DNA nuclear da planta (Lee et al., 1995 e Vicedo et al., 1996). A transferência do T-DNA é consequência da expressão dos genes de virulência (*vir*) localizados na região de virulência do plasmídeo bacteriano (Lee et al., 1995; Tinland, 1996 e Vicedo et al., 1996).

A integração do T-DNA no genoma vegetal e a sua expressão resultam na superprodução de auxinas e citocininas e na síntese de opinas (Brasileiro, 1993; Nam et al., 1997 e Tinland, 1996). Esses fitorreguladores vegetais causam o fenótipo tumorogênico que é caracterizado pela capacidade da célula vegetal em se proliferar ilimitada e autonomamente, mesmo na ausência de fitorreguladores endógenos. Nas células tumorais ocorre a síntese de certos tipos de opinas, que são compostos específicos formados pela conjugação de um aminoácido e um açúcar (Hooykaas & Beijersbergen, 1994) ou cetoácido (Sheng & Citovsky, 1996).

As opinas produzidas são secretadas para os espaços intercelulares e catabolizadas pelas bactérias presentes nestes espaços. Dessa forma, *Agrobacterium* cria um nicho favorável para si próprio, após a modificação genética das células vegetais, caracterizando uma verdadeira “colonização genética” (Hooykaas & Beijersbergen, 1994).

Organização do Plasmídio

Os plasmídios Ti e Ri possuem cerca de 200 Kb e estão presentes na célula bacteriana em baixo número de cópias e podem ser transferidos por conjugação para outra bactéria (Hooykaas & Beijersbergen, 1994). Os plasmídios Ti e Ri são classificados de acordo com o tipo de opina sintetizada pela célula vegetal. As opinas estão agrupadas em quatro famílias: octopina, nopalina, manopina e agrocinopina, tendo sido identificados cerca de 20 tipos de opinas (Weising & Kahl, 1996).

Os plasmídios Ti e Ri possuem a mesma estrutura, diferindo principalmente na função do T-DNA. Metade do plasmídio é ocupada pela origem de replicação e incompatibilidade (*ori/inc*), funções de conjugação (*tra*, Clare & McClure, 1995), região de catabolismo de opina (OPC), sendo nenhuma delas necessária à virulência. A outra metade do plasmídio contém a região T (a qual abriga os oncogenes – *onc*) e a região de virulência - *vir* (Hooykaas & Beijersbergen, 1994 e Van Sluys et al., 1992).

Região de Virulência - *vir*

A região de virulência contendo os genes *vir* do plasmídio forma um conjunto de operons corregulados pelas mesmas proteínas. Estas unidades transcricionais denominadas de *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* e *virG* possuem um tamanho de aproximadamente 40 Kb, estando localizadas adjacentes à borda esquerda da região T (Brasileiro, 1993 e Hooykaas & Beijersbergen, 1994). Os operons *virA* e *virG* são monocistrônicos, enquanto os demais são policistrônicos (Brasileiro, 1993; Draper & Scott, 1994 e Zambryski, 1988). Somente quatro locos *vir* são absolutamente essenciais para a tumorigênese (*virA*, *virB*, *virG* e *virD*), enquanto os outros afetam somente a eficiência de transferência (Weising & Kahl, 1996).

A região *vir* consiste em mais de 20 genes organizados em pelo menos seis unidades transcricionais: *virA* (1 gene), *virB* (11 genes), *virC* (2 genes), *virD* (4 genes), *virE* (2 genes), *virG* (1 gene). Todos os locos *vir* são induzidos na presença de compostos fenólicos e alguns monossacarídeos (Hooykaas & Beijersbergen, 1994)

Dependendo do tipo de plasmídeo, outros locos *vir* podem estar presentes. Plasmídios tipo octopina possuem os operons *virF* e *virH*, os tipos nopalina perderam os *virF* e *H* e contêm um outro, denominado *tzs* (trans-zeatin synthase). Recentemente, um loco *vir* adicional foi descoberto, o *virJ*, o qual é essencial quando complementado por um loco de virulência cromossômico (*acvB*, Pan et al., 1995).

O loco *vir A* é expresso constitutivamente (Draper e Scott, 1994 e Zambryski, 1988) e produz a proteína VirA que se localiza na membrana interna da bactéria (Weising e Kahl, 1996; Hooykaas e Beijersbergen, 1994 e Lee et al., 1995). É uma proteína sensora que detecta moléculas-sinal da célula vegetal lesada, se autofosforila e transfere o fosfato para a proteína VirG, a qual ativa a transcrição dos demais genes *vir* (Doty et al., 1996; Weising e Kahl, 1996; Zupan & Zambryski, 1997).

Os genes *virB* codificam proteínas que estão localizadas na membrana interagindo entre si para formar um poro ou canal na membrana bacteriana, através do qual o T-DNA é transferido para a célula vegetal (Weising & Kahl, 1996).

A proteína VirC auxilia no processo de excisão da fita T, se ligando à região *overdrive*, localizada próxima a borda direita do T-DNA desnaturando parcialmente as sequências das bordas do T-DNA (Weising & Kahl, 1996).

Os genes *virD₁* e *D₂* agem como endonucleases específicas reconhecendo e clivando na sequência de 25 pb da borda do T-DNA (Brasileiro, 1993; Hooykaas & Beijersbergen, 1994 e Weising & Kahl, 1996). Tanto a proteína VirD₁ como a VirD₂ possuem atividade de topoisomerase e relaxam especificamente o T-DNA nas vizinhanças de suas bordas (Weising & Kahl, 1996). A proteína VirD₂ liga-se covalentemente à extremidade 5' da fita T protegendo-a da degradação por endonucleases (Zupan & Zambryski, 1997).

O operon *virE* apresenta 2 unidades transcricionais: *virE*₁ e *virE*₂. A proteína VirE₁ possui uma função ainda indeterminada na tumorigênese, e VirE₂ é uma proteína que se associa ao DNA de fita simples (*SSB - Protein - Single-Strand Binding*) e se liga de maneira não específica a fita T, tendo função de empacotamento e possivelmente no transporte e integração do T-DNA (Zambryski, 1988) além de proteção contra as nucleases vegetais no momento da transferência (Brasileiro, 1993 e Hooykaas & Beijersbergen, 1994).

A proteína VirG é ativada pela autofosforilação da proteína VirA, e está localizada no citoplasma sob forma inativa. Uma vez ativada, a proteína VirG age como um fator transcricional, ligando-se às regiões 5' *vir*-boxes, uma região de 12 pb presente em todos os operons *vir* (Tamamoto et al., 1990), ativando a transcrição dos genes *vir* (Hooykaas e Beijersbergen, 1994).

virF e *H* não são essenciais à tumorigênese, mas parecem influenciar o espectro de hospedeiros da respectiva linhagem de *Agrobacterium* (Kanemoto et al., 1989). Proteínas codificadas pelo gene *virH* podem estar envolvidas na detoxificação de agentes de proteção da planta, presentes nos exsudados (Kanemoto et al., 1989), enquanto proteínas VirF possivelmente tenham função dentro da célula vegetal, discriminando plantas hospedeiras e não hospedeiras (Jarchow et al., 1991).

Adesão do *Agrobacterium* à superfície vegetal.

A ligação das células bacterianas à superfície vegetal é um passo significativo em certas doenças de plantas e representa um fator importante na colonização epífita. Esta adesão provavelmente aumenta a capacidade de virulência de certas linhagens, pela habilidade destas bactérias em resistir à remoção, o que tornou-se uma vantagem seletiva (Romanstschuk, 1992)

A adesão de *Agrobacterium* à célula vegetal hospedeira é um dos primeiros passos na indução de tumor (Matthysse et al., 1981). Este processo ocorre em duas etapas. A primeira etapa seria uma ligação fraca reversível com receptores localizados na superfície celular da planta e um segundo passo, substâncias produzidas pela planta conduziriam à

uma ligação irreversível através da síntese de fibrilas de celulose (Sykes & Matthysse, 1986).

Quatro locos de virulência cromossômicos, *chvA*, *chvB*, *pscA* e *att* codificam produtos envolvidos na adesão durante o processo de infecção e foram identificados como tendo função no início da ligação de *Agrobacterium* à superfície celular vegetal. A produção de fibrilas de celulose pela bactéria não é absolutamente necessária para a virulência (Matthysse, 1986). Mutantes *chvA*, *chvB*, *pscA* e *att* perderam a capacidade de se ligar à parede celular (Vande Broeck & Vanderleyden, 1995) e em consequência tiveram sua virulência reduzida (Matthysse et al., 1995), não pela perda da virulência, mas sim pela incapacidade de se manter ligada à superfície vegetal.

Já em 1981, Matthysse et al. propuseram um modelo para a adesão do *Agrobacterium* à parede celular de cenoura, baseado em seis etapas: (1) a bactéria se liga a um sítio receptor na parede celular e (2) induz a produção de fibrilas de celulose; (3) estas fibrilas ancoram a bactéria à parede celular e (4) também a ligam a outras bactérias, as quais também produzem fibrilas, (6) que vão se ligando a outras, resultando na formação de colônias. A bactéria ligada à parede, produz uma enzima que digere a parede celular (5) e estabelece um contato com a membrana plasmática da célula vegetal para facilitar a transferência do T-DNA. A hipótese da existência dessa quinta etapa parece ter caído no esquecimento, após a caracterização dos genes de virulência dos plasmídios Ti e Ri.

Transferência do T-DNA

O processo de transferência do T-DNA pode ser dividido em duas etapas: etapa bacteriana e etapa vegetal. A etapa bacteriana inclui os eventos que levam à produção e exportação de um vetor funcional contendo a informação genética do T-DNA. A etapa vegetal inclui os eventos que ocorrem dentro da célula vegetal até o momento da integração do DNA bacteriano no genoma nuclear da planta (Tinland, 1996).

Após a ativação da expressão dos genes *vir*, uma molécula de DNA linear de fita única (fita T) é produzida em seguida à clivagem nas bordas repetidas que flanqueiam a região T. Estas sequências repetidas de 24 pb são repetições imperfeitas diretas, e ativas em

apenas uma orientação. A borda direita é essencial para a tumorigênese, mas a esquerda é dispensável (Hooykaas & Beijersbergen, 1994 e Zambryski, 1988).

A fita T é transferida para o núcleo da célula vegetal como um complexo proteína-DNA (complexo-T, Weising & Kahl, 1996 e Zupan & Zambryski, 1997). O complexo-T é composto por nucleoproteínas (fita única do DNA) associado às proteínas VirD₂ e VirE₂.

Integração do T-DNA no genoma vegetal

O passo final da transformação é a integração do T-DNA no genoma da planta. Estudos recentes indicam que ocorre a integração de uma ou mais cópias, tanto em tandem como em uma ou duas cópias separadas e a localização dos sítios de integração ocorre ao acaso (Tinland, 1996; Weising & Kahl, 1996 e Zambryski, 1988). Algumas evidências, entretanto, têm demonstrado que o sítio de inserção não é verdadeiramente ao acaso e a análise da estrutura da cromatina do T-DNA sugere uma integração preferencial em regiões de transcrição ativa (Tinland, 1996 e Weising & Kahl, 1996).

Um modelo do processo de integração foi apresentado por Gheysen et al. (1991) e Mayerhofer et al. (1991), no qual a integração do T-DNA é comparada à recombinação ilegítima e requer uma falha no DNA alvo. A fita T invade a falha, e o contato entre o T-DNA e a sequência de DNA genômico da planta é formado através de um pareamento parcial. O T-DNA a ser integrado pode ser de fita simples ou dupla. A síntese da segunda fita do T-DNA é então iniciada por uma quebra na fita superior, e a fita derivada é formada seguindo o reparo da falha. Se o T-DNA integrado é de fita dupla, somente as falhas no final do T-DNA serão reparadas.

Uma vez que o T-DNA não codifica enzimas que catalizam a integração, presume-se que VirD₂ catalize a integração da fita T no genoma vegetal, embora poucos dados tenham sido obtidos para caracterizar este processo (Zupan & Zambryski, 1997). Alternativamente, a inserção do T-DNA no genoma vegetal pode ser mediada por proteínas transportadas da bactéria infectante e/ou por fatores da célula vegetal hospedeira (Sheng & Citovsky, 1996).

3.3 Suscetibilidade de soja ao *Agrobacterium*

Muitos estudos têm demonstrado que a suscetibilidade de *Glycine* ao *Agrobacterium* varia entre diferentes espécies e mesmo entre cultivares de *G. max*. De Cleene & De Ley (1976); Matthysse & Gurlitz (1982) e Mauro et al., (1995a) relatam que soja não é uma planta hospedeira de *Agrobacterium*, embora muitos autores tenham demonstrado a suscetibilidade de várias espécies, cultivares e genótipos de soja, à esta bactéria.

Em 1983, Pedersen et al. induziram e cultivaram *in vitro* tumores de três cultivares de *G. max* (Mandarin, Evans e Bravalla), utilizando três linhagens selvagens de *Agrobacterium tumefaciens* (C58, T37 e Ach5). Embora as linhagens tenham induzido à formação de tumores nas cultivares, houve diferenças marcantes entre elas, sendo que a cultivar Mandarin foi a mais suscetível com 80% das inoculações com C58 resultando em tumor, contrastando com a cultivar Bravalla, na qual apenas 10% das inoculações com T37 formaram tumores.

Owens & Cress (1985) avaliaram 24 cultivares domesticadas de *Glycine max* (L.) e três de seus progenitores selvagens, *G. soja*, com uma linhagem de *A. tumefaciens* (A348), uma linhagem de *A. rhizogenes* (R 1000) e uma linhagem controle, sem plasmídeo Ri ou Ti (A136). Definiram quatro classes designadas, arbitrariamente, pelo peso médio dos tumores obtidos: altamente suscetível, moderadamente suscetível, pouco suscetível e não suscetível. Com esta classificação, três cultivares de *G. max* (Biloxi, Júpiter e Peking) e uma de *G. soja* (PI 3386933B) foram altamente suscetíveis, 10 moderadamente suscetíveis, 11 pouco suscetíveis e duas não susceptíveis. A interação entre genótipo e ambiente foi demonstrada quando algumas cultivares foram inoculadas *in vitro*. A cultivar Biloxi, altamente responsiva em casa de vegetação, mostrou-se pouco suscetível *in vitro*. Os autores concluíram que a indução e o crescimento dos tumores não estão relacionados às características de maturação do genótipo, mas refletem outros caracteres genéticos.

Byrne et al. (1987) trabalharam com outras cultivares de *G. max*, *G. soja* e *G. canescens*, a maioria diferente daquelas estudadas por Owens & Cress, e inocularam

com outras linhagens selvagens de *Agrobacterium* (12 de *A. tumefaciens* e uma de *A. rhizogenes*). Em um primeiro experimento utilizaram duas linhagens de *A. tumefaciens* e uma de *A. rhizogenes*. *A. tumefaciens* A208 mostrou-se mais virulenta que a linhagem A281 e a linhagem de *A. rhizogenes* (C58C1) não mostrou formação de tumores ou raízes em nenhuma das cultivares. A cultivar Peking apresentou 100% das plantas produzindo tumor, seguida pelas cultivares Arksoy e Ransom com 26 e 27% respectivamente. No segundo experimento, cultivares de soja suscetíveis a *Pseudomonas glycinea* e *Xanthomonas phaseoli* var *sojensis* foram inoculadas com as linhagens A208, A281 e GV3101. As cultivares avaliadas se mostraram altamente suscetíveis, principalmente à linhagem A208, enquanto nenhum resultado foi observado nas inoculações realizadas com a linhagem A281. Mas como cultivares resistentes à *Pseudomonas glycinea* e *Xanthomonas phaseoli* var *sojensis* não foram incluídas neste estudo, não se pode associar a existência de suscetibilidade a estes patógenos e *Agrobacterium*.

Byrne et al. (1987) utilizando a cultivar Peking e cinco linhagens de *Agrobacterium* tipo nopalina e seis octopina, observaram que linhagens nopalina apresentaram 100% de frequência de indução de tumor, com tamanhos variando de médio a grande, enquanto as linhagens octopina apresentaram frequências variando de 27% a 72% e pequenos tumores. Estes resultados sugerem que a virulência de *Agrobacterium* em soja é específica e característica de plasmídios Ti, do tipo nopalina.

Delzer et al. (1990) também encontraram que linhagens nopalina (A208 e C58) produziam mais tumores que a linhagem L,L-succinamopina (A281); e a maior frequência de tumores foi observada na cultivar Peking. Esses autores conseguiram induzir tumores pela adição de acetoseringone no inóculo bacteriano, contrariando parte dos resultados obtidos por Byrne et al. (1987).

O estudo da herança do caráter susceptibilidade foi conduzido por Bailey et al. (1994) e por Mauro et al. (1995b), cruzando a cultivar Peking, suscetível ao *Agrobacterium*, com cultivares resistentes. Em ambos os estudos, os autores mostram que a geração F₁ mostrou-se intermediária em relação aos parentais no número de tumores; nas gerações seguintes, a média observada não diferiu dos valores esperados, indicando que a

susceptibilidade é um caráter quantitativo. No entanto, também demonstraram que a suscetibilidade, medida pela formação de tumores, nem sempre é indicativa de transferência do T-DNA, podendo ocorrer transformação sem ocorrência de formação de tumores (Bailey et al., 1994; Byrne et al., 1987 e Mauro et al., 1995b)

Droste et al. (1994) estudaram quatro cultivares brasileiras de *G. max* (BRAGG, BR4, CEP16 e IAS5) inoculadas com quatro linhagens de *A. tumefaciens*: três virulentas (A208, C58 e A281) e uma avirulenta (A136). Encontraram que as linhagens tipo nopalina (A208 e C58) induziram maior formação de tumor que a agropina (A281), semelhante ao observado por Delzer et al. (1990) e Byrne et al. (1987). Entre as cultivares avaliadas, BRAGG mostrou maior frequência de tumor enquanto a cultivar IAS5, a menor frequência.

Mauro et al. (1995a) estudaram 25 genótipos brasileiros e a cultivar Peking, utilizada como controle, e três linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*: C58 (nopalina), Bo542 (agropina) e Ach5 (octopina). Os resultados obtidos mostraram que existe uma forte interação entre genótipo e linhagens de *Agrobacterium*. No entanto, não houve diferença no número de tumores formados pelas três linhagens. Observaram também que nenhum dos 26 genótipos analisados foram suscetíveis às três linhagens simultaneamente.

Estas diferenças na suscetibilidade de *Agrobacterium* não ocorrem somente em soja. Podem ser encontradas em outras leguminosas como ervilha (Hobbs et al., 1989 e Robbs et al., 1991), feijão (Brasileiro et al., 1996), e em outras dicotiledôneas como *Vitis* (Stover et al., 1997), *Arabidopsis* (Nam et al., 1997) e *Gmelina*, uma espécie florestal produtora da madeira (Maringoni & Furtado, 1997).

3.4 Transformação de soja via *Agrobacterium*

A transformação de plantas utilizando como vetor *Agrobacterium tumefaciens* tem sido amplamente utilizada pela sua eficiência e simplicidade, sendo altamente específica ao hospedeiro (Binns, 1990).

A transformação de soja iniciou-se pelo estudo da especificidade de várias linhagens bacterianas em induzir tumores em diferentes cultivares, avaliando-se as interações entre planta hospedeira e bactéria (Byrne, et al., 1987; Delzer et al., 1990; Mauro et al., 1995a; Owens & Cress, 1985 e Pedersen et al., 1983).

Em 1987, Byrne et al. utilizando uma linhagem engenheirada de *Agrobacterium* obtiveram tecidos transformados apresentando resistência à canamicina. Facciotti et al., (1985) também conseguiram obter suspensão celular de soja resistente à canamicina, porém em ambos os trabalhos não houve regeneração de plantas transformadas. Owens & Smigocki (1988) obtiveram tumores expressando resistência à canamicina inoculando conjuntamente as linhagens 281 e LBA 4404 pBin6. Os autores demonstraram que estes tumores, quando cultivados *in vitro*, desenvolveram calo sem a presença de fitorreguladores e na presença de canamicina, indicativo da ocorrência de co-transformação.

As primeiras plantas transformadas de *Glycine* foram obtidas por Rech et al. (1988) a partir de brotos regenerados de raízes provenientes de tumores induzidos por *Agrobacterium rhizogenes* em *G. canescens* e *G. clandestina*, mas somente *G. canescens* regenerou plantas transformadas, as quais produziam opinas. Em seguida, Rech et al. (1989), obtiveram plantas transformadas de *G. canescens* expressando resistência ao antibiótico canamicina.

O marco inicial da transformação da soja cultivada com um gene de interesse agrônômico foi dado por Hinchey et al. (1988) que obtiveram plantas transgênicas via *Agrobacterium tumefaciens*. As plantas regeneradas por via organogênica a partir de cotilédones expressavam o gene repórter *uidA* e resistência à canamicina e/ou tolerância ao herbicida glifosato. As cultivares submetidas à transformação (Peking, Delmar e Maple Pristo) foram previamente selecionados quanto às suas suscetibilidades *in vitro* a *A. tumefaciens*.

Plantas transformadas de soja foram obtidas pela inoculação de sementes em germinação com *Agrobacterium tumefaciens*. Esse método possui a vantagem de não utilizar a cultura *in vitro*, pois foram inoculados a plúmula e regiões adjacentes à ela e, em seguida,

as sementes foram colocadas para germinar em casa de vegetação. A frequência de transformação obtida foi da ordem de 0,7% (Chee et al., 1989).

Wenbin & Komatsuda (1994) utilizaram quatro cultivares, entre elas a Peking, duas linhagens engenheiradas de *A. tumefaciens*, EHA 101 e LBA 4404, ambas com o vetor binário contendo os genes *uidA* e *nptII*, e empregaram dois processos de regeneração, embriogênese somática e organogênese. Em ambos os processos, a linhagem LBA4404 não produziu nenhum transformante, indicando ser avirulenta ou pouco virulenta aos genótipos de soja. Ao contrário, a linhagem EHA101 produziu de 0 a 12% de transformantes dos diferentes genótipos, nos dois processos de regeneração. Neste trabalho, a seleção dos transformantes foi avaliada somente pela atividade do gene da β -glucuronidase, não havendo informação sobre o desenvolvimento completo das plantas transformadas.

Tumores expressando os genes da β -glucuronidase e de resistência à canamicina foram obtidos por Droste et al. (1994), utilizando a cultivar BR4 e a linhagem A281::pZA₃. Os segmentos avaliados foram positivos para o teste de GUS, demonstrando a transferência do T-DNA do plasmídeo Ti e/ou binário. Da mesma forma, Luo et al. (1994) produziram tumores transgênicos de soja expressando resistência à canamicina e o gene da β -glucuronidase.

Em 1996, Di et al. obtiveram plantas transgênicas expressando o gene do precursor da capa protéica do vírus da clorose em vagem de feijão (BPMV). Utilizando 800 nós-cotilédones da cultivar Fayette, obtiveram cinco transformantes independentes, os quais foram analisados molecularmente, confirmando sua transformação genética.

3.5 Fatores que afetam a transformação mediada por *Agrobacterium*

Vários são os fatores que podem influenciar a transformação genética de plantas via *Agrobacterium*. Estes fatores podem ocorrer tanto do lado da bactéria quanto da planta, e os mesmos podem sofrer variação de acordo com a espécie vegetal (tecido ou órgão), linhagem bacteriana e fatores externos empregados.

A indução dos genes *vir* por componentes fenólicos é um dos principais eventos na transferência do T-DNA para o genoma vegetal. Os compostos fenólicos têm sido utilizados rotineiramente na indução dos genes *vir*. Além disso, muitos estudos têm sido realizados para se obter informações de como ocorre esta indução em nível molecular. Lee et al. (1995) estudaram a habilidade de quatro linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*, de sofrerem indução por diferentes compostos fenólicos, pertencentes a três grupos, de acordo com suas estruturas químicas. Os autores observaram que as linhagens de *Agrobacterium* são induzidas por diferentes compostos fenólicos e que esta indução está relacionada com a proteína VirA, e ainda sugerem que esta proteína interage diretamente com os compostos fenólicos.

Godwin et al. (1991) estudaram o efeito de acetoseringona (200 μ M) e três níveis de pH (5,2; 5,5 e 5,8) em cinco espécies vegetais (*Allium cepa*, *Antirrhinum majus*, *Brassica campestris*, *Glycine max* e *Nicotiana tabacum*) utilizando três linhagens selvagens de *A. tumefaciens* (Ach5, N2/73 e A281) e observaram diferenças marcantes na tumorigênese apresentada por estas espécies. *A. cepa* não apresentou formação de tumor. O melhor resultado obtido para *A. majus* foi com a linhagem N2/73 em pH 5,5 e na presença de acetoseringona; *B. campestris* com A281 e pH 5,8 e com A281 a pH 5,2 e 5,5; *N. tabacum* apresentou um número elevado de tumores em todos os testes com as três linhagens de *A. tumefaciens*. Ach5 não formou tumores em *G. max* e em *B. campestris*. Em todos os casos de formação de tumores, estes foram induzidos por acetoseringona, com exceção de *N. tabacum*. Hooykaas & Beijersbergen (1994) e Lee et al. (1995) sugerem que a indução por compostos fenólicos ocorre somente em meio com pH ácido.

Um outro fator importante no processamento do T-DNA é a temperatura. Há várias décadas, Ricker (1926, citado por Fullner & Nester, 1996) descobriu que o desenvolvimento de tumores após a infecção por *Agrobacterium* era sensível a temperaturas superiores a 29°C. Em 1993, Jin et al. observaram pela medição da atividade da β -glucuronidase em *A. tumefaciens*, contendo a fusão *virB::LacZ*, sob o controle do promotor *Lac* (que não é afetado por variações de temperatura), que a

expressão do gene *vir* é reduzida com o aumento de temperatura, caindo para 11 e 2% a 32 e 37 °C, respectivamente. No mesmo trabalho os autores estudaram, *in vitro*, a influência da temperatura na fosforilação das proteínas VirA e VirG, encontrando que a fosforilação de VirA e VirG, diminuem com o aumento da temperatura. Estes dados sugerem que VirA é uma proteína termo-sensível.

Fullner & Nester (1996) estudaram a transferência do plasmídeo RSF 1010 (plasmídeo não conjugativo) entre linhagens de *A. tumefaciens*, através do sistema de transferência do T-DNA sob várias temperaturas (15 a 31°C). Encontraram um número maior de transconjugantes à temperatura de 19°C, sendo que a frequência de transferência diminuiu 50% a cada aumento de 3°C na temperatura. O número de bactérias doadoras sobreviventes diminuiu drasticamente sob temperaturas acima de 22°C. Este decréscimo pode contribuir para a diminuição da frequência de transferência, embora a extensão dessa contribuição não seja conhecida. Com a utilização de mutantes dos genes *vir*, Fullner & Nester demonstraram que a maquinaria de transferência do T-DNA é sensível a altas temperaturas e que a mobilização do plasmídeo IncQ é inibida em temperaturas acima de 25°C.

Dillen et al. (1997b) analisando a expressão do gene repórter *uidA*, demonstraram que a transferência de genes via *Agrobacterium* é afetada pela temperatura. Usando folhas jovens de *N. tabacum* e calos de feijão (*Phaseolus acutifolius*) e três plasmídios (GV2260, MP90 e EHA101) demonstraram que a temperatura ótima de co-cultivo foi de 22°C para calos de feijão para os três plasmídios, embora a expressão do gene *uidA* tenha sido maior para o plasmídeo GV2260. Em *N. tabacum*, os níveis de expressão foram semelhantes aos de feijão, mostrando que a expressão do gene repórter diminui entre 25 e 29°C, sendo as melhores a 19 e 22°C.

Atualmente, vem sendo discutida a importância do ciclo celular durante o processo de transformação. Sangwan et al. (1992) em um estudo detalhado de transformação de *Arabidopsis thaliana* observaram que pré-tratamentos com reguladores de crescimento, antes da infecção com *Agrobacterium*, induzem à dediferenciação e multiplicação celular, colaborando para a eficiência de transformação, pois células em

divisão possuem uma parede mais delgada. Um máximo de transformação foi obtido quando células do mesófilo estavam na fase G₂ da mitose. Semelhante a este estudo, Guivarc'h et al. (1993) obtiveram os mesmos resultados para discos de raiz de cenoura, e observaram que a inoculação feita 24 horas após o ferimento, ou seja, após o reinício do ciclo celular, aumentou em 4x o número de células GUS positivas, quando comparado à inoculação feita imediatamente após o ferimento. Em 1997, Villemont et al. estudaram a função do ciclo celular na transformação de *Petunia*, postulando que a transferência do T-DNA e sua integração são fenômenos dependentes da fase do ciclo celular e que somente células na fase S são capazes de integrar o T-DNA, isto devido à duplicação do DNA e ao sistema de reparo e recombinação que em células eucariotas ocorrem durante a fase S.

Já foi proposto que ferimentos podem induzir à formação de meristemas (Malik & Saxena, 1992) ou à divisão celular (Escudero & Hohn, 1997). Vários trabalhos têm demonstrado haver regeneração (brotos ou calos) em áreas onde houve secção do explante (Billings et al., 1997; Detrez et al., 1994; Penã et al., 1997; Sangwan et al., 1992; Schaart et al., 1995; Stiller et al., 1997; Trieu & Harrison, 1996; Tzfira et al., 1997 e Villemont et al., 1997). Nestas mesmas áreas, tem sido observado brotos, calos e gemas expressando o gene repórter *uidA* ou resistência ao agente seletivo (Penã et al., 1997; Sangwan et al., 1992; Stiller et al., 1997; Tzfira et al., 1997 e Villemont et al., 1997).

Muitos explantes utilizados para a regeneração e transformação não apresentam esta habilidade de regeneração nos locais onde são seccionados (por exemplo, nós cotiledonares) então, outros ferimentos são realizados utilizando-se instrumentos como lâminas de bisturi (Zhang et al., 1997), pinça (Shen et al., 1993), biobalística (May et al., 1995 e Tingay et al., 1997) e ultra-som (Trick & Finer, 1998). Tendo-se a intenção de causar danos à célula vegetal sem, no entanto, trazer injúrias que comprometam a transformação ou regeneração. Neste caso, os métodos de biobalística e o ultra-som parecem ser menos danosos.

Por outro lado, Escudero & Hohn (1997) observaram a expressão transiente do gene *uidA* em plântulas intactas de fumo. Os autores atribuíram estes

resultados ao fato da bactéria ter sido "pré-induzida" e a inoculação ter sido conduzida de tal forma a permitir a transferência do T-DNA da bactéria ao tecido intacto. Entretanto, tecidos que sofreram ferimentos apresentaram expressão superior do gene repórter em relação ao tecido intacto.

A pré-indução da bactéria tem sido utilizada por diversos autores, a qual é realizada cultivando-se *Agrobacterium* por alguns minutos até horas na presença de acetoseringona (Aldemita & Hodges, 1996; Dillen et al., 1997a; May et al., 1995 e Shen et al., 1993). Este composto fenólico tem sido igualmente utilizado no meio de cultura durante o co-cultivo (Hiei et al., 1994; Ishida et al., 1996; May et al., 1995; Shen et al., 1993 e Trick & Finer, 1998). A concentração de acetoseringona tem variado entre 40 a 500 μ M. No entanto, alguns autores têm conseguido obter plantas transgênicas na ausência de acetoseringona ou qualquer outro composto fenólico (Confalonieri et al., 1995; Tingay et al., 1997 e Zhang et al., 1997), o que pode sugerir que as espécies vegetais estudadas produzem compostos fenólicos através dos ferimentos, suficientes para induzir os genes *vir*.

Os autores têm trabalhado com pH variando entre 5,2 (Aldemita & Hodges, 1996; Hiei et al., 1994; Schaart et al., 1995 e Stiller et al., 1997), 5,5 (Dillen et al., 1997a; Tzfira et al., 1997), 5,7 (Confalonieri et al., 1995; Peña et al., 1997; Sangwan et al., 1992 e Villemont et al., 1997) e 5,8 (Billings et al., 1997; Ishida et al., 1996; Trieu & Harrison, 1996 e Zhang et al., 1997).

A maioria desses autores adotou temperaturas de co-cultivo entre 24 e 25°C e o tempo de co-cultivo de dois a três dias. A concentração de células bacterianas durante o co-cultivo tem variado, sendo que alguns autores controlam o número de células (Escudero & Hohn, 1997; Fári et al., 1995; Ishida et al., 1996; Nam et al., 1997; Narasimhulu et al., 1996; Sangwan et al., 1992 e Shen et al., 1993), outros cultivam a bactéria até uma determinada densidade óptica, medida em diferentes comprimento de onda [1,6 a 1,9 (600 nm), Aldemita & Hodges, 1996; 0,8 (595 nm), Dillen et al., 1997a e 1997b; 1,0 (600 nm), Freitas et al., 1997; Karthikeyan et al., 1996; Laparra et al., 1995; Mukhopadhyay et al., 1992; 0,1 a 0,5 (600 nm) Trick & Finer, 1998 e 0,8 a 1,0 (640 nm)

Zhang et al., 1997] e há aqueles que não usam nenhum controle (Di et al., 1996 e Uematsu et al., 1991).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Sementes do genótipo de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] BR8014853 foram cedidas pelo Prof. Dr. Isaías Olívio Geraldi, do referido departamento. Para o desenvolvimento dos experimentos, sementes de soja foram desinfetadas em etanol 70% (v/v) durante 40 segundos e em seguida em hipoclorito de sódio 2% (v/v) contendo 0,02 % (v/v) de Tween 80 por 20 minutos, sendo então lavadas três vezes em água destilada deionizada esterilizada, e colocadas para germinar em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo metade da sua concentração original, acrescido de 2,5 μM de BAP e solidificado com 0,7% (v/v) de agar (Merck). A germinação se deu em sala de cultura com 30 $\mu\text{E.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação luminosa e fotoperíodo de 16 horas. Após 14 dias foram retirados os nós cotiledonares, ficando o explante com as seguintes dimensões: 3 mm de epicótilo, 5 mm de cada cotilédono e 3 mm de hipocótilo (Marin, 1996).

4.2 Caracterização anatômica do explante

Inicialmente, foi realizada uma caracterização do explante de modo a diferenciar a formação da gema axilar das gemas adventícias. Sementes de soja foram colocadas para germinar como descrito no item 4.1, em meio MS/2 sem BAP. No 14º dia, os nós cotiledonares foram excisados. Em alguns explantes foram mantidas as gemas axilares. Em seguida, os explantes foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), as amostras foram desidratadas em série alcoólica etílica e infiltradas com resina

glicol metacrilato (Reichert-Jung). As seções foram obtidas com 5 μm de espessura, coradas com azul de toluidina (Sakai, 1973) e montadas em Entelan (Merck).

4.3 Análise anatômica da organogênese

Os nós cotiledonares, excisados 14 dias após a germinação, foram cultivados em meio MS/2 suplementado com 2,5 μM de BAP (Marin, 1996), e coletados a cada 5 dias, a partir do dia 0 até o 30º dia, quando apresentaram regeneração intensa. Os explantes foram fixados e preparados conforme descrito em 4.2.

4.4 Análises ultra-estruturais da organogênese

Nós cotiledonares com 0 e 10 dias de cultivo foram fixados em solução de Karnovsky, desidratados em série alcoólica etílica, secos ao ponto crítico com dióxido de carbono, montados sobre suportes de alumínio e recobertos com uma camada de ouro de 30 a 40 nm. As observações foram realizadas sob microscópio eletrônico de varredura modelo DSM 940A (Zeiss) operando a 5 kV.

4.5 Análise da profundidade do ferimento

A fim de verificar a eficiência do processo de inoculação de *Agrobacterium* no explante de soja, conforme sugerido por Marin (1996), foram realizadas medições da profundidade alcançada pela agulha usada para o ferimento do explante. Cortes a mão livre de explantes feridos sem que houvesse a inoculação de bactéria e cortes preparados conforme descrito no item 4.2, foram analisados sob microscopia óptica, com ocular graduada após aferição em lâmina micrométrica.

4.6 Cultura bacteriana

As linhagens de *A. tumefaciens* utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e estão relacionados na Tabela 01. As linhagens GV2260, AGL1 e GV3101 contêm o vetor binário p35S GUS INTRON

(Vancanneyt et al, 1990) e a linhagem EHA 105 foi transformada segundo Walkerpeach e Velten (1994) com o vetor binário pCAMBIA 2301 (Roberts, et al, 1997). Ambos os vetores possuem entre as bordas do T-DNA o gene *nptII* que confere à planta resistência ao antibiótico canamicina e o gene repórter *uidA*, que codifica para a enzima β -glucuronidase, ambos sob o controle do promotor 35S do CaMV. O gene *uidA* contém dentro da sua sequência codante um intron, que impede sua transcrição dentro do sistema procarioto de *Agrobacterium*.

A cultura bacteriana inicial foi feita a partir de estoque em glicerol, mantido à -80°C. Uma alíquota retirada com alça de platina foi semeada em placas contendo meio MYA sólido (Tepfer & Casse - Delbart, 1987) com os antibióticos específicos à cada linhagem (Tabela 1) e mantidas em incubadora do tipo BOD, a 26°C, durante dois a três dias. As placas foram conservadas sob refrigeração, a 4°C. Culturas líquidas foram utilizadas na infecção dos explantes, após ter sua densidade ótica (OD) determinada através da leitura da absorbância a 600 nm. O número de células bacterianas foi ajustado para 1×10^9 células.mL⁻¹, utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Número de Células.mL}^{-1} = \text{O.D.} \times 3 \times 10^9 \text{ (Mathis \& Hinchee, 1994)}$$

O ajuste final da concentração de bactérias foi feito após centrifugação da cultura a 4.000 rpm por 9 minutos e o precipitado ressuspendido em volume adequado de solução NaCl 0,85 % (p/v) e 40 μ M de acetoserigona.

4.7 Inoculação dos explantes

Os nós cotiledonares foram infectados com a cultura bacteriana utilizando-se uma seringa esterilizada de 1cc com agulha 29G ½". A inoculação constituiu na liberação de pequenos volumes (~ 0,5 μ L) da cultura bacteriana, fazendo-se pequenos ferimentos nas regiões entre os cotilédones e o epicótilo do explante, sobre papel de filtro esterilizado para a absorção do excesso da cultura bacteriana diminuindo-se, desta forma, a contaminação. Após a inoculação, os explantes foram colocados em placas de Petri,

contendo 25 mL de meio MS/2 sem BAP e cultivados por 48 horas nas condições descritas no item 4.1.

Tabela 1: Linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*

Linhagem	Cromossomo	Plasmídio Ti Original	Tipo de Vetor	Antibióticos e Concentração (mg.L ⁻¹)	Referência
GV2260	C58C1	B6S3	cointegrado	rifampicina 50 carbenicilina 100 canamicina 25	Deblaere et al, 1985
GV3101	C58C1	C58	binário	rifampicina 50 gentamicina 50 canamicina 25	Koncz e Schell, 1986
EHA105	A136	Bo542	binário	rifampicina 100 canamicina 25	Hood et al, 1986
AGL1	A136	Bo542	binário	rifampicina 50 carbenicilina 100 canamicina 25	Lazo et al, 1991

4.8 Análise da expressão transiente do gene repórter *uidA*

Os nós cotiledonares, após passarem por co-cultivo de 48 horas, foram colocados em frascos de 10 mL e cobertos com o substrato X-gluc (Chemica Alta LTD), preparado de acordo com McCabe et al. (1988). Os explantes foram mantidos a 37°C, em incubadora do tipo BOD por 24 horas, em seguida foram fixados em solução de Karnovsky por 24 horas e então desidratados em série alcoólica etílica até 70%. Neste ponto, a clorofila foi removida aquecendo-se as amostras até aproximadamente 60°C, com trocas de álcool 70% até a sua completa remoção, quando os explantes foram analisados para a presença de pontos azuis.

4.9 Localização anatômica da expressão transiente do gene *uidA*

A análise histológica da expressão transiente foi realizada de maneira a identificar áreas de coincidência entre a formação de gemas e a expressão do gene *uidA*.

Nós cotiledonares demonstrando reação positiva, ou seja, tecidos com pontos azuis, foram fixados e processados como descrito no item 4.2, porém omitindo-se a etapa de coloração. Também foram realizados cortes manuais destes materiais.

4.10 Microscopia eletrônica de varredura da adesão do *Agrobacterium* à superfície do explante

Após a inoculação de cada linhagem e co-cultivo de 48 horas, nós cotiledonares de soja foram fixados e processados conforme descrito em 4.2.3, de forma a verificar se estava ocorrendo a adesão da bactéria à célula vegetal. Para ocorrer a adesão há produção de fibrilas de celulose, formando uma rede sobre o tecido vegetal. Estas fibrilas somente são visíveis quando analisadas sob microscopia eletrônica.

Neste estudo, foram usadas quatro linhagens de *Agrobacterium*, foi analisado o efeito da temperatura e o tempo de co-cultivo na produção de fibrilas de celulose. Após o co-cultivo, explantes cultivados a 22; 25 e 28 °C e com dois, três e seis dias de co-cultivo foram fixados em solução de Karnovsky e preparados conforme descrito em 4.2.3.

4.11 Ensaios de otimização do processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*

Os ensaios de otimização do processo de transformação foram baseados em trabalhos encontrados na literatura corrente envolvendo várias espécies vegetais. Os experimentos foram realizados com o objetivo de se obter um procedimento que produzisse uma alta porcentagem de expressão transiente em nós cotiledonares de soja. Os ensaios foram realizados em três repetições, contendo 10 explantes/placa.

4.11.1 Linhagens bacterianas

Foram utilizadas quatro linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*: AGL1, EHA101, GV3101 e GV2260.

4.11.2 pH

Este ensaio compreendeu três tratamentos com pH 5,0; 5,4 e 5,8.

4.11.3 Adição de acetoseringona no meio de cultura

Acetoseringona na concentração de 100 μ M foi adicionada ao meio MS/2 sem BAP e utilizado no co-cultivo dos explantes inoculados com *Agrobacterium*. Conjuntamente foram inoculados explantes em meio de cultura sem acetoseringona.

4.11.4 Adição de acetoseringona na cultura bacteriana

À cultura bacteriana adicionou-se acetoseringona na concentração de 100 μ M durante o crescimento "overnight". Após centrifugar e ressuspender a cultura bacteriana em solução salina, foram adicionados 40 μ M de acetoseringona (item 4.6). Comparativamente, utilizou-se a cultura bacteriana sem adição de acetoseringona durante crescimento "overnight".

4.11.5 Concentração de acetoseringona.

Foram utilizadas três concentrações de acetoseringona, 40, 100 e 200 μ M, a qual foi adicionada após ressuspender a cultura bacteriana em solução salina.

4.11.6 Temperatura de co-cultivo

Os explantes foram co-cultivados durante 48 horas a 22, 25 e 28 °C, em incubadora do tipo BOD com temperatura e fotoperíodo controlados.

4.11.7 Tempo de co-cultivo

Explantos inoculados com *Agrobacterium* foram co-cultivados em períodos de dois, três e seis dias.

4.11.8 Concentração de bactérias

Foram utilizadas três concentrações bacterianas: 10^7 , 10^8 e 10^9 céls.mL⁻¹.

4.11.9 Presença de BAP durante o co-cultivo

Foram utilizadas duas concentrações de BAP: 2,5 e 5,0 µM comparando-se com o tratamento sem BAP.

4.11.10 Pré-cultivo com BAP

O pré-cultivo foi feito utilizando-se BAP 2,5 µM e realizado por períodos de três e seis dias antes da inoculação com *Agrobacterium*. Um tratamento sem pré-cultivo foi incluído neste ensaio.

4.11.11 Meio de inoculação

Neste experimento foi utilizado o meio MS/2 líquido sem BAP como meio inoculante, isto é, a cultura bacteriana, após centrifugação, foi ressuspensa em MS/2 líquido. Neste meio, os explantes foram feridos previamente e imersos durante 5 minutos. Decorrido o tempo, foram retirados e colocados sobre papel filtro esterilizado para remoção do excesso de meio, e então colocados em placas com MS/2 sólido. Este tratamento foi comparado com outro, no qual a cultura bacteriana foi ressuspensa em solução NaCl 0,85%.

4.11.12 Ferimento

Os ferimentos nos nós cotiledonares foram feitos conforme descrito em 4.7. Um tratamento no qual os explantes não foram feridos foi realizado em conjunto.

4.11.13 Controles positivo e negativo

Como controle positivo foram inoculados discos foliares de *N. tabacum* variedade Petit Havana, a qual é suscetível ao *Agrobacterium*. Como controles negativos, foram utilizados nós cotiledonares de soja e discos foliares de *N. tabacum* não inoculados com a bactéria.

4.11.14 Ensaio Final

Posteriormente à instalação destes experimentos, foi realizado um experimento final empregando-se três linhagens bacterianas (AGL1, EHA105 e GV2260), dois níveis de pH (5.0 e 5.8) e duas temperaturas de co-cultivo (25 e 28 °C).

Em todos os ensaios os caracteres analisados foram: número de explantes apresentando reação positiva de GUS e número de pontos azuis. Os dados obtidos da contagem de pontos azuis nos explantes (item 4.8), foram analisados pelo teste de χ^2 (Anexo A).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização anatômica do explante

O método de preparo do nó cotiledonar, utilizado como explante, envolve a retirada das gemas axilares, uma vez que estas podem inibir o desenvolvimento de gemas adventícias (Busing et al., 1994 e Malik & Saxena, 1992). O método de excisão das gemas axilares nem sempre foi bem sucedido (Figura 1A, seta) e por esse motivo foram realizadas análises anatômicas do explante visando detectar as possíveis causas do insucesso na retirada das gemas e buscar soluções para o problema.

A região do nó cotiledonar possui duas folhas cotiledonares inseridas de maneira oposta. Cada folha possui uma gema axilar posicionada no ponto central entre o cotilédone e o eixo nodal (Figura 2) ladeada por duas estípulas foliáceas. Nos nós cotiledonares ocorre uma variação no ângulo de abertura dos cotilédones durante o processo de germinação, além disto, as gemas axilares diferem quanto ao desenvolvimento sendo uma mais desenvolvida que a outra no mesmo nó (Figura 1B e 1C). A análise anatômica do explante cuja gema axilar foi excisada (Figura 1D) revela que o seccionamento não ocorre no ponto de inserção da gema axilar com o eixo nodal, permanecendo a porção basal da mesma. Portanto, aqueles nós cujos cotilédones apresentam ângulo menor com o epicótilo aumentam a dificuldade da excisão e as gemas menos desenvolvidas são seccionadas com maior dificuldade e o tecido remanescente pode continuar o seu desenvolvimento (Figura 1A).

Figura 1: A - D. Segmento nodal de soja *Glycine max* (L.) Merrill, genótipo BR8014853 após 9 dias de inoculação em meio MS/2. A. Visão geral do explante evidenciando o desenvolvimento de uma das gemas axilares (seta); B e C. Seções longitudinais do explante mostrando gemas axilares em dois estágios distintos de desenvolvimento; D. Seção longitudinal da gema axilar excisada durante o preparo do explante. C = cotilédone; Ep = epicótilo; G = gema axilar; Ge, gema axilar excisada. (A. barra = 2,2 mm; B, C e D barra = 198,9 μ m).

Figura 2: Seção transversal do segmento nodal de soja mostrando a gema axilar (G) inserida na posição central entre o cotilédone (C) e o eixo nodal (EN); barra = 198,9 μm .

5.2 Análise anatômica da organogênese

Seguindo o protocolo de Marin (1996), foi possível obter segmentos nodais de soja do genótipo BR-8014853, após 20 dias de cultivo *in vitro*, formando gemas adventícias nas regiões inter (seta) e intracotiledonares (Figura 3).

O segmento nodal excisado de plântulas germinadas na ausência de BAP, em seção transversal (Figura 4A), apresenta epiderme unisseriada provida de estômatos e tricomas. Segue-se o parênquima cortical com cerca de seis camadas de células vacuolizadas arranjadas, deixando poucos espaços intercelulares. A endoderme não é diferenciada morfológicamente. O sistema vascular, próximo à região do epicótilo, compreende um cilindro contínuo do tipo colateral aberto. Internamente, ocorre a medula provida de células parenquimáticas.

Os segmentos nodais, quando excisados de plântulas germinadas em meio MS/2 suplementado com BAP, apresentam estrutura anatômica (Figura 4B) diferente daquelas germinadas na ausência deste regulador vegetal (Figura 4A).

Na presença de BAP (Figura 4B), as células do parênquima cortical, principalmente aquelas localizadas próximas ao cilindro vascular, passam a exibir núcleo e núcleolo evidentes e dividem-se periclinal e anticlinalmente (seta). O arranjo destas células parenquimáticas passa a ser frouxo. Também no parênquima floemático são observadas divisões.

A adição do regulador vegetal BAP, durante a germinação de sementes, acelerou o processo de divisão celular nos segmentos nodais utilizados como explantes confirmando as observações feitas por Busing et al. (1994) e Thomé et al. (1995). O fato das células do explante já entrarem em cultura em processo ativo de divisão parece ser um fator crítico para a diferenciação organogênica e da multibrotação (Mohamed et al., 1992; Thomé et al., 1995; Marin, 1996).

Durante o período de cultivo *in vitro*, as divisões celulares no explante são intensificadas e, por volta do 5º dia de cultura, já são iniciados os meristemóides que se desenvolverão em gemas.

Figura 3: Segmento nodal de soja genótipo BR8014853 no 20º dia de cultivo em meio MS/2 contendo 2,5 μ M de BAP apresentando gemas adventícias na região intercotiledonar (seta), barra = 3,3 mm.

Figura 4. *Glycine max* (L.) Merr. Seções transversais de segmentos nodais excisados de plântulas germinadas na ausência de BAP (A) e presença de BAP (B). Na presença de BAP (B), as células do parênquima cortical, principalmente aquelas localizadas próximas ao cilindro vascular, apresentam tamanho maior e dividem-se (seta). Estas divisões não são observadas na ausência de BAP (A). (barras = 73,7 μ m). e = epiderme; f = floema; m = medula; pc = parênquima cortical; pr = procâmbio; x = xilema

Estes meristemóides resultam da rediferenciação de células epidérmicas e subepidérmicas que passam a se dividir ativamente (Figura 5A-D). Na figura 5A, as setas indicam a origem de dois meristemóides intracotiledonares. No início, os meristemóides são constituídos de células vacuolizadas que dividem-se ativamente (Figura 5B-D). Com o desenvolvimento, as células dos meristemóides acabam adquirindo citoplasma denso (Figura 6A-B, setas). O alongamento vertical destes meristemóides levaram à formação de primórdios de gemas caulinares bem definidos (Figura 6A). As mesmas observações foram feitas em *Cicer arietinum* por Murthy *et al.* (1996).

As gemas adventícias são formadas ao longo de todo o setor intercotiledonar e no setor intracotiledonar (Figuras 7), e as primeiras gemas caulinares são visualizadas na superfície do explante por volta do 10º dia de cultivo *in vitro* (Figura 8). Independente da região de origem, as gemas apresentam ampla ligação com o tecido do explante e estabelecem conexão vascular com o mesmo através de nódulos vasculares que são formados no tecido do nó cotiledonar nas proximidades da base das gemas (Figuras 7A e 7B, setas).

Em espécies de leguminosas, o único relato referente à origem interna das gemas caulinares, foi realizado por Dornelas *et al.* (1992) em *Stylosanthes scabra*. Segundo os autores, a formação de gemas caulinares ocorre a partir de estruturas nodulares vasculares situadas no interior do tecido caloso. Porém, as análises realizadas em *S. guianensis* (Apezzato-da-Glória, 1998) mostram claramente que os meristemóides que dão origem às estruturas foliares e posteriormente às gemas caulinares estão situados nas camadas periféricas do calo. Além disto, em *G. max* foi possível observar que, durante o desenvolvimento das gemas neoformadas, ocorre a formação de um nódulo vascular próximo à sua base através do qual se estabelece a conexão vascular com o tecido de origem. As mesmas observações foram feitas por Malik & Saxena (1992) em espécies de *Phaseolus*.

Em *Phaseolus vulgaris*, gemas múltiplas originavam-se na região de junção dos cotilédones e epicótilo e, ocasionalmente, na terminação superior do epicótilo (McClean & Grafton, 1989). Esta última origem não foi verificada no presente estudo.

Figura 5: *Glycine max* (L.) Merrill. **A.** Início da formação de dois meristemóides intracotiledonares através de divisões das células epidérmicas e subepidérmicas rediferenciadas (barra = 198,8 μm). **B.** Detalhe do meristemóide indicado pela seta curta em **A**. Uma célula em divisão neste setor está indicada pela seta (barra = 36,8 μm). **C.** Detalhe do meristemóide indicado pela seta longa em **A**. Uma das células em divisão neste setor está indicada pela seta (barra = 19 μm). **D.** Detalhe das células subepidérmicas em divisão durante o desenvolvimento de um meristemóide (barra = 7,37 μm). Nc = nó cotiledonar; C = cotilédone.

Figura 6: **A.** Seção longitudinal do explante com 30 dias de cultivo evidenciando a origem superficial do meristemóide (m) e da gema adventícia (g), (barra = 74 μ m); **B.** Detalhe do meristemóide (m), (barra = 37 μ m).

Figura 7. *Glycine max* (L.) Merrill. Seção longitudinal do segmento nodal mostrando o setor intracotiledonar no 15° (A) e 20° dia (B) de cultivo, respectivamente. A. Gema adventícia recém-formada. B. As gemas caulinares adventícias apresentam ampla ligação com o tecido do explante e estabelecem conexão vascular (Cv) com o mesmo através de nódulos vasculares (Nv) que são formados no tecido do nó cotiledonar nas proximidades da base das gemas (setas). (barra = 198,9 μ m). e = epiderme, pc = parênquima cortical.

De acordo com McClean & Grafton (1989), as análises histológicas revelaram que as gemas se desenvolviam a partir de células do parênquima subepidérmico do nó confirmando as observações obtidas no presente estudo e as de Wright et al. (1986). Também Malik & Saxena (1992), trabalhando com três espécies do gênero *Phaseolus*, verificaram através de análises histológicas, que as gemas caulinares originavam-se diretamente a partir de tecidos subepidérmicos dos nós cotiledonares.

As gemas neoformadas observadas neste estudo mostraram o mesmo padrão de formação daquelas desenvolvidas a partir de meristemas apicais de eixos embrionários de soja (Busing et al., 1994). As análises histológicas conduzidas no presente estudo, demonstraram que as células dos meristemóides possuem as características de células competentes para a transformação genética via *Agrobacterium* conforme descrição elaborada por Sangwan et al. (1992): são células pequenas, isodiamétricas com paredes delgadas, citoplasma denso e núcleo proeminente. Segundo as observações de Nauerby et al. (1991), o sistema de regeneração rápido e direto a partir de camadas superficiais, como verificado neste trabalho, é claramente vantajoso tanto em experimentos de regeneração como de transformação. Visto que a regeneração observada em soja ocorre diretamente a partir de meristemóides de origem epidérmica e subepidérmica, situados nas porções inter e intracotiledonares, o explante utilizado neste estudo é recomendado para o processo de infecção por *Agrobacterium*.

5.3 Análises ultra-estruturais da organogênese em soja

Através da análise em microscopia eletrônica de varredura do segmento nodal, ao 10º dia de cultivo *in vitro* (Figuras 8 e 9), foi possível observar a presença de meristemóides (m) ao lado de gemas adventícias (g) nas regiões inter (9 A-D) e intracotiledonar do explante (8 A-D; 9 D). Gemas em diferentes fases do desenvolvimento foram observadas lado a lado numa mesma região (Figura 8).

Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura do explante de soja genótipo BR8014853 no 10º dia de cultivo em MS/2 contendo 2,5 μ M de BAP,. A. Gema neoformada (asterisco), barra = 455 μ m; B. Detalhe mostrando outra gema em formação (seta), barra = 167 μ m; C. Setor localizado entre o epicótilo (Ep) e o cotilédone (C) mostrando gemas advéncias (g) em desenvolvimento, barra = 588 μ m; D. Detalhe evidenciando as gemas em diferentes estágios de desenvolvimento, barra = 294 μ m.

Figura 9: *Glycine max* (L.) Merrill. Segmentos nodais após 10 dias de cultivo *in vitro* analisados ao Microscópio Eletrônico de Varredura. **A.** Observa-se a presença de meristemóides (m) e de uma gema adventícia (g) em início do desenvolvimento (barra = 625 μ m); **B.** Explante mostrando ferimento provocado por agulha no epicótilo (Ep), durante inoculação da bactéria, (barra = 417 μ m), detalhe = 104 μ m; **C.** Gemas neoformadas (g) em região intracotiledonar, detalhe da base das gemas e do epicótilo, (barra = 200 μ m, detalhe = 100 μ m); **D.** Detalhe da Figura A, mostrando região intercotiledonar com gema, (barra = 500 μ m, detalhe da gema, barra = 250 μ m). C = cotilédone.

O estudo anatômico e ultra-estrutural mostraram a formação múltipla de gemas adventícias em diferentes estágios de desenvolvimento, demonstrando que o processo organogênico direto em soja é assincrônico, como em *Begonia* (Burritt & Leung, 1996), embora Detrez et al. (1994) tenha observado sincronia no desenvolvimento de gemas em outra leguminosa, *Sesbania grandiflora*.

5.4 Análise da profundidade do ferimento

Os ferimentos resultantes do processo de inoculação de *Agrobacterium* no explante foram profundos chegando a atingir a região medular do eixo nodal (1031 μm) e epicótilo (Figura 9B). Portanto, os tecidos alcançados pela agulha no processo de inoculação não foram coincidentes com as áreas de regeneração das plantas de soja *in vitro*. Conforme discutido no item 5.2, as áreas competentes para a organogênese eram sempre superficiais (83 μm) e não relacionadas com as áreas meristemáticas resultantes do processo de cicatrização.

Os resultados deste estudo sugerem que não há necessidade da realização destes ferimentos no processo de inoculação por *Agrobacterium*, conforme indicado por Marin (1996).

Também Mukhopadhyay et al. (1992) e Laparra et al. (1995) verificaram que havia uma baixa eficiência no processo de transformação via *Agrobacterium* pelo fato de não ocorrer uma coincidência entre a área de regeneração das plantas com as áreas acessíveis às bactérias.

5.5 Microscopia eletrônica de varredura da adesão de *Agrobacterium* à superfície do explante

A figura 10 (A-C) mostra as características ultra-estruturais da superfície do explante de soja obtido a partir de nós excisados de plântulas germinadas *in vitro*. A figura 10A corresponde a um setor da superfície afastada da região de excisão da gema axilar no preparo do explante. Observam-se as células íntegras e a cutícula intacta. Em

Figura 10: Microscopia eletrônica de varredura de nó cotiledonar de soja germinado *in vitro*, sem a inoculação de *Agrobacterium* utilizado como controle negativo da produção de fibrilas. **A.** Superfície celular do explante, barra = 2,3 μm ; **B** e **C.** Setores próximos à área de excisão da gema axilar, barra = 4,5 μm .

setores próximos à área da excisão, as células aparecem rompidas havendo a liberação do seu conteúdo para a superfície do explante (Figura 10B e 10C). Tais observações permitiram uma melhor caracterização das fibrilas produzidas pelas bactérias em ensaios posteriores.

As quatro linhagens de *Agrobacterium* (AGL1, EHA105, GV2260, e GV3101) produziram fibrilas na superfície do explante, após 48 horas de co-cultivo a 28°C empregando-se uma concentração de bactérias de 10^9 células. mL⁻¹ (Figura 11A-D). As bactérias foram encontradas isoladas ou ligadas entre si através das fibrilas formando aglomerados. Na maioria das vezes as bactérias estavam posicionadas perpendicularmente ao tecido do explante e aderidas a este através das fibrilas (Figura 11A).

Guivarc'h et al. (1993) observaram que a inoculação de *Agrobacterium* em células de cenoura não tratadas com acetoseringona formavam aglomerados estando ligadas entre si pelas fibrilas. Em contraste, nas células pré-tratadas, as bactérias estavam ligadas à parede celular, na sua maioria em posição perpendicular. Porém, de acordo com Matthyse et al. (1981) não existe um padrão quanto ao posicionamento da bactéria em relação à superfície celular.

De acordo com Matthyse et al. (1981), a adesão à superfície celular por *Agrobacterium* se dá pela produção de fibrilas, as quais são compostas por celulose sendo a adesão, um dos primeiros passos na transferência do T-DNA.

Visando verificar se o tempo de co-cultivo poderia interferir na produção de fibrilas, alterando o padrão que foi obtido pela linhagem GV2260 nas condições descritas por Marin (1996) e mostradas na Figura 12, foram avaliados os seguintes períodos: dois, três e seis dias.

A análise do tempo de co-cultivo na produção de fibrilas pela linhagem GV2260 (Figura 12) mostrou que esta produção é visível com dois e três dias de co-cultivo (Figuras 12A e 12B) porém, com seis dias (Figura 12C) as bactérias passam a exibir o dobro do seu tamanho inicial, sendo impossível visualizar as fibrilas. O explante

Figura 11: Adesão de quatro linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* em nós cotiledonares de soja, visualizada através da produção de fibrilas de celulose (setas). A. GV3101, barra = 1,0 μm ; B. EHA105, barra = 3,1 μm ; C. AGL1, barra = 1,8 μm e D. GV2260, barra = 3,1 μm

após este período de co-cultivo apresentava-se envolto por uma substância esbranquiçada.

Narasimhulu et al. (1996) e Sangwan et al. (1992) verificaram que períodos muito longos de co-cultivo favorecem a multiplicação bacteriana levando à morte do tecido vegetal, interferindo negativamente no processo de transformação.

A produção de fibrilas de celulose também foi analisada em função da concentração de células bacterianas (Figura 13) e da temperatura de co-cultivo (Figura 14). Na concentração de 10^7 células.mL⁻¹ (Figura 13A) as bactérias são vistas formando aglomerados na superfície do explante. Concentrações de 10^8 células.mL⁻¹ (Figura 13B) e 10^9 células.mL⁻¹ (Figura 13C) parecem conduzir uma melhor distribuição das bactérias pela superfície do explante, embora algumas bactérias sejam encontradas formando pequenos aglomerados.

No co-cultivo a 22 °C (Figura 14A) as bactérias formam pequenos aglomerados e estão ligadas entre si pelas fibrilas. Fibrilas de celulose formando uma rede sobre o tecido do explante foram observadas quando o co-cultivo se deu a 25 °C, onde várias fibrilas distendidas são visualizadas (Figura 14B, setas). As fibrilas frequentemente se entrelaçam formando fibrilas maiores. A 28 °C (Figura 14C), as bactérias aparecem em sua maioria isoladas na superfície do explante.

Durante o crescimento da bactéria em meio líquido também ocorre a produção de pequenas quantidades de fibrilas (Matthysse et al., 1981), o que manteria algumas bactérias agregadas. Segundo Matthysse et al. (1981) a formação de aglomerados de bactérias junto à parede vegetal pode facilitar a transferência da região T. A bactéria se liga à célula vegetal mesmo esta estando morta, significando que *Agrobacterium* não possui um sistema de reconhecimento de células lesadas ou mortas (Matthysse et al., 1981).

Neste trabalho, tempo de co-cultivo e concentração de células bacterianas não interferiram na síntese de fibrilas de celulose. Seis dias de co-cultivo mostraram ser um período demasiado longo, levando à uma mudança morfológica da bactéria, assim como o aparecimento de uma substância esbranquiçada recobrindo todo o explante. Fibrilas de celulose foram observadas nas concentrações bacterianas analisadas. Entre as

Figura 12: Adesão da linhagem GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* em nós cotiledonares de soja, através da produção de fibrilas (setas). A. 2 dias, barra = 1,3 µm; B. 3 dias, barra = 5 µm e C. 6 dias, barra = 5 µm.

Figura 13 Adesão da linhagem GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* em nós cotilédones de soja, através da produção de fibrilas de celulose (setas). A. 10^7 células. mL^{-1} , barra = 5 μm ; B. 10^8 células. mL^{-1} , barra = 5 μm ; C. 10^9 células. mL^{-1} barra = 2 μm .

Figura 14: Adesão da linhagem GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* em nós cotiledonares de soja, através da produção de fibrilas de celulose (setas). A. 22° C, barra = 5 µm; B. 25° C, barra = 5 µm; C. 28° C, barra = 5 µm.

temperaturas de co-cultivo testadas, 25 °C foi a que mostrou fibrilas em grande quantidade e distentidas entre as bactérias.

Mesmo sendo um fator importante, a síntese destas fibrilas somente aumenta a capacidade de virulência pela manutenção da bactéria ligada à superfície celular (Matthysse, 1983), embora não seja essencial para a ocorrência da transferência do T-DNA (Matthysse, 1986).

5.6 Localização histológica da expressão do gene repórter *uidA*

Na Figura 15 pode-se ver a expressão transiente do gene repórter *uidA* em discos foliares de *N. tabacum*, por quatro linhagens de *A. tumefaciens*. GV2260 e AGL1 apresentaram um maior nível de expressão que EHA105 e a linhagem GV3101 formou apenas um pequeno ponto azul, visível somente em aumento superior. A Figura 16 mostra a localização histológica do produto do gene repórter *uidA* em discos foliares inoculados com a linhagem GV2260. Em corte transversal é possível ver a reação positiva de GUS, nas células da epiderme abaxial e do mesofilo que apresentam o seu conteúdo azul (Figura 16A). O detalhe de uma destas células é mostrado na Figura 16B.

Tendo em vista que a expressão em soja foi menos intensa (Figuras 17 e 18), as análises histológicas foram realizadas a partir de seções manuais, mais espessas (20 -25 µm). A reação positiva de GUS foi observada nas células da epiderme e do parênquima cortical. Na epiderme, em algumas células dos tricomas glandulares e tectores (Figura 19A), a expressão do gene repórter é mais intensa e assemelha-se à reação verificada em *N. tabacum*.

Porém, a reação positiva de GUS observada nas demais células da epiderme e do parênquima cortical aparecem concentrados preferencialmente na região central da célula (Figura 19B) ou na forma de muitos cristais aciculares dispersos (Figura 20A). Em algumas células, a reação positiva de GUS ocorre ao redor do núcleo e também apresenta a forma de cristais aciculares (Figura 20B). Este mesmo tipo de expressão do gene repórter *uidA* foi observado em células de embriões eletroporados de *Vigna unguiculata* Walp, nas quais o produto da reação da enzima β-glucuronidase com

Figura 15: Expressão transiente do gene repórter *uidA* em discos foliares de *Nicotiana tabacum* variedade Petit Havana, inoculados com quatro linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*. A. GV2260, barra = 870 μm ; B. AGL1, barra = 870 μm ; C.EHA105, barra = 870 μm e D. GV3101, barra = 133 μm .

Figura 16: **A.** Localização histológica da expressão do gene repórter *uidA* em discos foliares de *Nicotiana tabacum*, barra = 19 μm ; **B.** Detalhe de A. mostrando célula transformada, barra = 7,4 μm .

Figura 17: Expressão transiente do gene repórter *uidA* em nós cotiledonares de soja. **A.** Gemas adventícias intercotiledonares (setas), barra = 175 μm ; **B.** Base de gema axilar excisada (seta), barra = 384 μm .

Figura 18: Expressão transiente do gene repórter *uidA* em regiões não meristemáticas do nó cotiledonar de soja. **A.** Superfície do epicótilo, barra = 133 μm ; **B.** Região de corte do cotilédone, barra = 281 μm .

Figura 19: Localização histológica da expressão transiente do gene repórter *uidA* em nó cotiledonar de soja. **A.** Tricomas (setas) da superfície demonstrando reação GUS positiva cuja visualização superficial foi mostrada na Figura 35A. Notar a diferença na expressão destas células com as células da epiderme e das células subepidérmicas, barras = 36,8 μm ; **B.** Reação GUS positiva concentrada ao redor do núcleo, barra = 19 μm .

Figura 20: **A** e **B**. Células parenquimáticas com reação GUS positiva na forma de cristais aciculares (setas), **A**, barra = 19 μm ; **B**, barra = 7,4 μm .

o substrato x-gluc apresenta-se como cristais azuis localizados em todos os tipos celulares (Akella & Lurquin, 1993).

Em seções transversais de discos foliares de *N. tabacum* também se observam diferenças na reação de GUS nas diversas células transformadas, sendo que a face abaxial apresenta uma reação mais intensa (Figura 16A).

A localização do produto do gene repórter, em nós cotiledonares de soja, ocorre em células epidérmicas e subepidérmicas, ou seja, nos mesmos tipos celulares que originam os meristemóides que desenvolvem gemas adventícias.

Mukhopadhyay et al. (1992), atribuíram a baixa eficiência do processo de transformação ao fato da regeneração de plantas ocorrer a partir de células meristemáticas competentes, mas, que por estarem localizadas muito além da superfície do explante (entre 450-625 μ), não são acessíveis à bactéria, ou então, não são fisiologicamente competentes para a transformação. Laparra et al., (1995), descreveram a obtenção de expressão transitória em girassol (*Helianthus annuus* L.), nas células próximas à epiderme, porém numa região onde o tipo celular não era competente para a regeneração de plantas. Fári et al. (1995), Uematsu et al. (1991) e Villemont et al. (1997) demonstraram em seus trabalhos cortes histológicos de plantas transformadas, nos quais a reação GUS positiva apresenta-se na maioria das células ou em todo o tecido.

Hinchee et al. (1988) mostraram cortes histológicos feitos a mão livre, de explantes cotiledonares três semanas após a inoculação com *Agrobacterium*, visualizando gemas adventícias com reação positiva de GUS em toda sua extensão. Freitas et al. (1997) observaram a expressão do gene repórter *uidA* em células subepidérmicas e no parênquima cortical e vascular de explantes cotiledonares de amendoim, 48 horas após a inoculação. A formação de meristemas foi observado a partir da rediferenciação do parênquima cortical e vascular. A expressão do gene repórter, inicialmente restrita às células subepidérmicas, abrangeu outros tipos celulares quando a inoculação foi feita realizando-se ferimentos com agulha (Freitas et al., 1997).

Em soja, a expressão do gene repórter sempre foi menos intensa em relação aos discos foliares de *N. tabacum*, utilizados como controle nesta pesquisa. Esta variação pode ser devida a diferenças na integração do T-DNA no genoma vegetal e/ou

sua expressão, o que pode refletir uma dificuldade na estabilização do T-DNA em algumas espécies de plantas (Nam et al., 1997).

5.7 Ensaios de otimização do processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*

Os dados da otimização do processo de transformação por *Agrobacterium* estão representados graficamente segundo cada tratamento (Figuras 21 a 35). As áreas meristemáticas incluem aquelas com capacidade de regeneração de gemas adventícias (Figura 17A), onde são encontradas células da epiderme e do parênquima em ativo processo de divisão e base de gemas axilares (Figura 17B), capazes de produzir brotos transgênicos. Áreas não meristemáticas incluem áreas do epicótilo (Figura 18A), dos cotilédones (Figura 18B) e base dos cotilédones, além dos tricomas glândulares e tectores apresentando reação GUS positiva (Figuras 18A e 19A).

5.7.1 Linhagens bacterianas

O maior número de pontos azuis foi encontrado em explantes inoculados com a linhagem GV3101 seguida pelas linhagens GV2260, AGL1 e EHA105 (Figura 21). O teste de χ^2 mostrou que existe diferença altamente significativa ($p= 0,01$) entre essas linhagens. Embora a linhagem EHA105 tenha apresentado o menor número de pontos azuis, foi a única que os apresentou em regiões meristemáticas.

Figura 21: Número de explantes GUS positivos e de pontos azuis em nós cotiledonares de soja empregando quatro linhagens bacterianas.

5.7.2 pH

Os explantes submetidos ao pH 5,8 apresentaram o maior número de pontos azuis. A análise do χ^2 mostrou haver uma diferença altamente significativa entre os tratamentos ($p=0,01$). Nenhuma expressão do gene repórter foi observada em pH 5,4 (Figura 22). Embora apresentasse menor expressão transiente, somente em pH 5,0 houve pontos azuis em regiões meristemáticas

Figura 22: Número de explantes GUS positivos e de pontos azuis em nós cotiledonares de soja utilizando-se três pHs.

5.7.3 Adição de acetoseringona no meio de cultura

A Figura 23 mostra que a utilização de acetoseringona no meio de cultura elevou o número de explantes GUS positivos, mas não o de pontos azuis. A diferença entre os tratamentos foi altamente significativa ($p=0,01$). A utilização de acetoseringona na concentração de 100 μM aumentou a expressão transiente do gene *uidA* em áreas meristemáticas, enquanto que na sua ausência foi observada a expressão transiente em áreas não meristemáticas.

Figura 23: Número de explantes GUS positivos e de pontos azuis em nós cotiledonares de soja empregando-se acetoseringona no meio de cultura.

5.7.4 Adição de acetoseringona na cultura bacteriana

Pelos dados apresentados na Figura 24, a adição de acetoseringona durante o crescimento bacteriano não influenciou o número de explantes GUS positivos. A presença de acetoseringona propiciou a expressão do gene repórter em áreas meristemáticas, o que não ocorreu com os explantes inoculados com 0 μM de acetoseringona, os quais apresentaram pontos azuis em áreas não meristemáticas. O χ^2 foi altamente significativo ($p=0,01$).

Figura 24: Número de explantes GUS positivos e de pontos azuis em nós cotiledonares de soja empregando-se acetoseringona na cultura bacteriana.

5.7.5 Concentração de acetoseringona

O aumento da concentração de acetoseringona na solução salina antes da inoculação dos explantes resultou no aumento proporcional de explantes GUS positivos (Figura 25), embora o mesmo aumento proporcional não tenha sido observado em termos de pontos azuis em áreas meristemáticas. As análises estatísticas foram altamente significativas ($p=0,01$). Na concentração de 200 µM observou-se um maior número de pontos azuis em regiões meristemáticas que nas concentrações de 40 e 100 µM. Na concentração de 40 µM não houve expressão do gene repórter em áreas meristemáticas.

Figura 25: Número de explantes GUS positivos e de pontos azuis em nós cotiledonares de soja em três concentrações de acetoseringona acrescentadas ao meio de inoculação.

5.7.6 Temperatura de co-cultivo

Não foi observado nenhum explante GUS positivo quando a temperatura de co-cultivo foi de 22 °C. No co-cultivo a 25 °C foi observado o maior número de explantes GUS positivos enquanto a 28 °C observou-se o maior número de pontos azuis (Figura 26). Estatisticamente, o teste do χ^2 indicou existir diferença altamente significativa ($p= 0,01$) entre as temperaturas empregadas. Apenas o co-cultivo com temperatura de 25 °C apresentou pontos azuis em áreas meristemáticas.

Figura 26: Número de explantes GUS positivos e de pontos azuis em nós cotiledonares de soja em três temperaturas de co-cultivo.

5.7.7 Tempo de co-cultivo

A Figura 27 mostra que o co-cultivo de dois dias apresentou o maior número de explantes GUS positivos e também de pontos azuis, apesar da expressão do gene *uidA* não ter sido observada em áreas meristemáticas. Embora tenham sido observados explantes GUS positivos e expressão transiente em áreas meristemáticas, co-cultivo de seis dias não é recomendado por ser um período longo, podendo ocasionar a morte do tecido infectado, pelo crescimento excessivo da bactéria sobre o explante. Entre os tratamentos que apresentaram respostas, detectou-se diferença altamente significativa ($p= 0,01$).

Figura 27: Número de explantes GUS positivos e de pontos azuis em nós cotiledonares de soja em três períodos de co-cultivo.

5.7.8 Concentração de bactérias

Concentrações abaixo de 10^9 céls. mL^{-1} apresentaram melhores resultados em relação ao número de explantes GUS positivo e também de pontos azuis. O χ^2 foi altamente significativo ($p=0,01$). Somente foi observado pontos azuis em áreas não meristemáticas quando utilizou-se a concentração de 10^9 (Figura 28); concentração de 10^7 céls. mL^{-1} foi a que apresentou um maior número de pontos azuis em áreas meristemáticas.

Figura 28: Número de explantes GUS positivos e de pontos azuis em nós cotiledonares de soja em três concentrações de células bacterianas.

5.7.9 Uso de BAP durante o co-cultivo

A utilização de BAP na concentração de 2,5 μM durante o co-cultivo produziu um maior número de explantes GUS positivos e também de pontos azuis. O número de pontos azuis visualizados em cada tratamento foi analisado e mostrou-se haver diferenças altamente significativas ($p=0,01$) entre eles. Somente na concentração de 2,5 μM foram observados pontos azuis em áreas meristemáticas (Figura 29).

Figura 29: Número de explantes GUS positivos e de pontos azuis em nós cotiledonares de soja em três concentrações de BAP durante o co-cultivo.

5.7.10 Pré-cultivo com BAP

Em termos de número de explantes GUS positivos, todos os períodos avaliados mostraram-se semelhantes (Figura 30). Submetendo-se os explantes a três dias de pré-cultivo observou-se o maior número de pontos azuis, enquanto a seis dias o menor (χ^2 altamente significativo, $p=0,01$). Com dois dias de pré-cultivo não houve expressão transiente do gene repórter em áreas meristemáticas, tendo sido observada a expressão em maior extensão com três dias de pré-cultivo e em menor, com seis dias.

Figura 30: Número de explantes GUS positivos e de pontos azuis em nós cotiledonares de soja em três períodos de pré-cultivo com hormônio BAP antes da inoculação do explante.

5.7.11 Meio de inoculação

A inoculação da bactéria em solução salina mostrou ter ação semelhante à da inoculação em meio MS/2 líquido, uma vez que observou-se igual número de explantes GUS positivos (Figura 31). A inoculação com NaCl, resultou em maior número de pontos azuis que aquela realizada com meio MS/2 (χ^2 significativo, $p=0,01$). Inoculações feitas com NaCl não resultaram na expressão do gene repórter em áreas meristemáticas, somente aquelas feitas com meio MS/2.

Figura 31: Número de explantes GUS positivos e de pontos azuis em nós cotiledonares de soja em dois meios de inoculação.

5.7.12 Ferimento

A realização de ferimentos durante a inoculação dos explantes produziu o mesmo número de explantes GUS positivos observado nos explantes intactos. Embora explantes feridos tenham apresentado o maior número de pontos azuis quando comparados com os intactos (Figura 32), somente nos intactos foram observados pontos azuis em áreas meristemáticas. A análise estatística do total de pontos azuis detectou diferença entre os tratamentos ($p = 0,01$).

Figura 32: Número de explantes GUS positivos e de pontos azuis em nós cotiledonares de soja realizando-se ou não ferimentos durante a inoculação.

5.7.13 EHA105 X pH X Temperatura

Quando foram analisados em conjunto os efeitos de pH e temperatura, observou-se que em pH 5,0, a linhagem EHA105 apresentou o maior número de explantes GUS positivos a 28 °C. Este resultado se inverteu em pH 5,8 sob o qual os melhores resultados foram observados a 25 °C. Em termos de número de pontos azuis, estes foram observados em maior proporção a 25 °C, tanto em pH 5,0 como 5,8, o que resultou em diferenças altamente significativas ($p = 0,01$) detectadas pelo teste de χ^2 (Figura 33). A expressão do gene repórter em áreas meristemáticas foi observada nos explantes co-cultivados em ambos os pH, sendo que os melhores resultados foram obtidos à temperatura de 25 °C.

Figura 33: Número de explantes GUS positivos e de pontos azuis em nós cotiledonares de soja inoculados com a linhagem EHA105, em função do pH (**A**, pH 5,0; **B**, pH 5,8) e temperatura.

5.7.14 AGL1 X pH X temperatura

O mesmo comportamento alternado foi observado quando utilizou-se a linhagem AGL1 (Figura 34). Em pH 5,0 foram observados explantes GUS positivos e pontos azuis somente a 28 °C. Sob pH 5,8, explantes GUS positivos e pontos azuis foram observados em ambas as temperaturas. Para o número total de pontos azuis, a análise do χ^2 , detectou diferenças altamente significativas entre os tratamentos ($p=0,01$). Em ambos os pHs e somente a 25 °C foi observada a expressão transiente do gene repórter em áreas meristemáticas.

Figura 34: Número de explantes GUS positivos e de pontos azuis em nós cotiledonares de soja inoculados com a linhagem AGL1, em função do pH (A, pH 5,0; B, pH 5,8) e temperatura.

5.7.15 GV2260 X pH X temperatura

Um maior número de explantes GUS positivos foi observado quando utilizou-se a linhagem GV2260, pH 5,0 e temperatura de 28 °C. Em pH 5,8 um número semelhante de explantes GUS positivos foi observado, independente da temperatura. Em termos de pontos azuis, os tratamentos diferiram significativamente ($p = 0,01$). Os números mais elevados de pontos azuis foram observados a 28 °C (Figura 35). Em todos os tratamentos foram observados pontos azuis em áreas meristemáticas.

Figura 35: Número de explantes GUS positivos e de pontos azuis em nós cotiledonares de soja inoculados com a linhagem GV2260, em função do pH (A, pH 5,0; B, pH 5,8) e temperatura.

Baseando-se no número de pontos azuis visualizados nas áreas meristemáticas dos explantes nos experimentos iniciais, alguns fatores durante o co-cultivo podem ser ajustados, como temperatura de 25° C, concentração de acetoseringona a 200 µM, dois dias de co-cultivo, emprego do fitorregulador BAP durante o co-cultivo e utilização do meio MS/2 líquido como meio de inoculação sem, no entanto, submergir os explantes no meio e tampouco realizar fermentos. Estas alterações independem da linhagem bacteriana.

Alterações nas condições de cultivo da bactéria parecem não ser relevantes (Laparra et al., 1995) e o número de células bacterianas é bem variado, como demonstrado por vários autores. No caso de nós cotiledonares de soja, o pré-condicionamento com BAP, durante a germinação das sementes, torna o pré-cultivo desnecessário, pois após a excisão dos explantes, estes se apresentam em um processo ativo de divisão, favorecendo a inoculação com *Agrobacterium*. A inoculação dos explantes sem a realização de fermentos pode aumentar as possibilidades de obtenção de plantas transgênicas pelo fato de se manter a integridade dos tecidos meristemáticos, os quais situam-se superficialmente. Os compostos fenólicos que seriam liberados pelas células lesadas podem ser substituídos pela adição de acetoseringona ao meio de inoculação.

Pôde-se ainda verificar que vários fatores interferem no processo de transformação via *Agrobacterium* e estes devem ser avaliados para se determinar quais as condições ótimas para uma transformação genética eficiente. Pelos resultados mostrados nas Figuras 33, 34 e 35 ocorre uma mudança no comportamento da bactéria em função do pH e temperatura utilizados, e esta mudança ocorre para todas as linhagens de *Agrobacterium*, inclusive com aumento no número de explantes GUS positivos e maior expressão do gene repórter em áreas meristemáticas.

Na literatura, pouco se encontra sobre otimização de protocolos de transformação via *Agrobacterium*. Confalonieri et al. (1995) trabalhando com álamo negro, avaliaram: concentração de bactérias, presença de acetoseringona, linhagens de *Agrobacterium*, fermentos e clones de álamo. Observaram que clones, linhagens

bacterianas e adição de acetoseringona afetaram sensivelmente a eficiência de transformação do álamo negro.

Muitos autores empregam pH ácido (5,2 – 5,8). Godwin et al. (1991) avaliaram a influência do pH no desenvolvimento de tumores em cinco espécies vegetais, observando que ocorre variação com a espécie e também com a presença de acetoseringona. A adição de compostos fenólicos, principalmente acetoseringona, aumenta as possibilidades de obtenção de plantas transformadas (Aldemita & Hodges, 1996; Dillen et al., 1997b; Hiei et al., 1994, Shen et al., 1993), embora na sua ausência o evento de transformação também ocorra.

O co-cultivo em temperaturas ao redor de 25 °C são as mais utilizadas e pelo observado neste trabalho, esta temperatura de co-cultivo associada a outros fatores, como por exemplo pH, pode influenciar na expressão do gene repórter. Quando a variável temperatura foi combinada com pH, 25 °C foi igualmente a melhor temperatura de co-cultivo para segmentos nodais de soja. Para discos foliares de *N. tabacum* e calos de feijão, Dillen et al. (1997a) observaram que temperaturas entre 19 e 22 °C favoreceram a transferência do T-DNA. Hiei et al. (1994) recomendam, na transformação de arroz, temperaturas de co-cultivo entre 22 e 28 °C, pois a temperatura influencia o sistema de transferência do T-DNA de *Agrobacterium* (Fullner & Nester, 1996 e Jin et al., 1993).

A presença de fitorreguladores durante o co-cultivo ou pré-cultivo do explante ganhou importância no processo de transformação. Células em divisão ativa estão aptas à transformação por possuírem parede celular delgada e principalmente em função do ciclo celular (Freitas et al., 1997; Guivarc'h et al., 1993; Nam et al., 1997 e Villemont et al., 1997). A integração do T-DNA é favorecida em fases onde ocorre duplicação, recombinação e reparo do DNA (Mayerhofer et al., 1991). A presença de fitorreguladores durante o co-cultivo ativa o processo de divisão celular assim como no pré-cultivo. Neste estudo, nós cotiledonares de soja pré-cultivados por períodos acima de três dias mostraram um maior número de pontos azuis em regiões meristemáticas. Zhang et al. (1997) observaram uma maior porcentagem de explantes cotiledonares de feijão GUS positivo (4%) quando co-cultivados durante seis dias a 25 °C no escuro; estes

apresentaram 14,3% das gemas ou brotos GUS positivos. Fári et al. (1995) trabalhando com beringela selecionaram entre os diferentes métodos empregados o procedimento mais eficiente, o qual incluía dois dias de pré-cultura seguido de dois dias de co-cultivo, com o qual conseguiram regenerar plantas transformadas via embriogênese somática e organogênese.

A utilização de ferimentos durante a inoculação do *Agrobacterium*, além de ser um pré-requisito para a transferência do T-DNA, aumenta o número de pontos azuis (Shen et al., 1993). Neste trabalho, a realização de ferimento em explantes cotiledonares de soja não aumentou o número de explantes GUS positivos em relação aos explantes sem ferimentos. Regiões meristemáticas, expressando o gene repórter *uidA*, somente foram observados em explantes mantidos intactos durante a inoculação.

A concentração de células bacterianas durante o co-cultivo não tem se mostrado ser um fator crítico para a transformação de plantas, pois esta tem sido obtida nas mais variadas concentrações de bactérias (Hiei et al., 1994; Ishida et al., 1996; Nam et al., 1997 e Laparra et al., 1995). Pelo que foi demonstrado neste estudo, concentração de 10^7 céls.mL⁻¹ foi a que apresentou o maior número de pontos azuis em regiões meristemáticas. Talvez o número de células bacterianas influencie na sua eliminação após o co-cultivo, pela ação de antibióticos.

Vários fatores afetam a eficiência de transformação e a otimização das condições de co-cultivo são críticas (Hiei et al., 1994). Explantes de plantas tropicais, normalmente cultivadas em temperaturas elevadas, podem ser tratados em temperaturas reduzidas durante o co-cultivo, uma vez que são benéficas para a transferência do T-DNA (Dillen et al., 1997b).

6 CONCLUSÕES

I. Estudo anatômico da organogênese em soja :

- a. A formação das gemas adventícias ocorre por via direta, sem a passagem pela fase de calo;
- b. As regiões meristemáticas são formadas pela rediferenciação de células epidérmicas e subepidérmicas dos setores intra e intercotiledonares do explante, tendo portanto, origem exógena;
- c. As células dos meristemóides apresentam características de células competentes à transformação via *Agrobacterium*.

II. Análise da profundidade dos ferimentos provocados pelo sistema de inoculação do *Agrobacterium*:

- a. Os ferimentos atingem regiões profundas, muito além das células que originam os meristemóides;
- b. As áreas de regeneração não coincidem com as áreas dos ferimentos;
- c. Uma vez que não há necessidade de se fazer ferimentos, os compostos fenólicos podem ser substituídos pela adição de acetoseringona ao meio de inoculação.

III. A localização histológica do gene repórter *uidA* foi coincidente com os tipos celulares que originam as áreas meristemáticas, ou seja, células epidérmicas e subepidérmicas. A coincidência destas áreas viabiliza a obtenção de plantas transgênicas de soja mediada por *Agrobacterium* como vetor de transformação.

IV. Otimização do processo de transformação: As principais condições que favorecem a transformação de soja são:

- temperatura de co-cultivo de 25 °C;
- co-cultivo de dois dias;
- 200 µM de acetoseringona;
- concentração de 2,5 µM de BAP durante o co-cultivo;
- pH 5.0;
- MS/2 líquido como meio de inoculação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADKINS, A.L.; GODWIN, I.D.; ADKINS, S.W. An efficient *in vitro* regeneration system for australian-grown chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. **Australian Journal of Botany**, v.43, p.491-497, 1995.
- AKELLA, V.; LURQUIN, P.F. Expression in cowpea seedlings of chimeric transgenes after electroporation into seed-derived embryos. **Plant Cell Reports**, v.12, p.110-117, 1993.
- ALDEMITA, R.R.; HODGES, T.K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *japonica* and *indica* rice varieties. **Planta**, v.199, p.612-617, 1996.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. p.448-483, 1999.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Aspectos histológicos e ultra-estruturais da organogênese somática *in vitro* de três espécies de leguminosas. Piracicaba, 1998. 74p. Tese (Livre Docente). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- BEAN, S.J.; GOODING, P.S.; MULLINEAUX, P.M.; DAVIES, D.R. A simple system for pea transformation. **Plant Cell Reports**, v.16, p.513-519, 1997.

- BAILEY, M.A.; BOERMA, H.R.; PARROTT, W.A. Inheritance of *Agrobacterium tumefaciens*-induced tumorigenesis of soybean. **Crop Science**, v.34, p.514-519, 1994.
- BILLINGS, S.; JELENKOVIC, G.; CHIN, C.K.; EBERHARDT, J. The effect of growth regulators and antibiotics on eggplant transformation. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.122, p.156-162, 1997.
- BINNS, A.N. *Agrobacterium*-mediated gene delivery and the biology of host range limitations. **Physiologia Plantarum**, v.79, p.135-139, 1990.
- BRASILEIRO, A.C.M. Biologia de *Agrobacterium* sp. **ABCTP Notícias**, v.20, p.2-6, 1993.
- BRASILEIRO, A.C.M.; ARAGÃO, F.J.L.; ROSSI, S.; DUSI, D.M.A.; BARROS, L.M.G.; RECH, E.L. Susceptibility of common and tepary beans to *Agrobacterium* spp. strains and improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation using microprojectile bombardment. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.121, p.810-815, 1996.
- BUISING, C.M.; SCHOEMAKER, R.C.; BENBOW, R.M. Early events of multiple bud formation and shoot development in soybean embryonic axes treated with the cytokinin, 6-benzylaminopurine. **American Journal of Botany**, v.81, p.1435-1448, 1994.
- BURRITT, D.J.; LEUNG, D.W.M. Organogenesis in cultured petiole explants of *Begonia X erythrophylla*: the timing and specificity of the inductive stimuli. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.557-567, 1996.

- BYRNE, M.C.; McDONNELL, R. E.; WRIGHT, M.S.; CARNES, M.G. Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium*-soybean interaction. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.8, p.3-15, 1987.
- CHEE, P.P.; FOBER, K.A.; SLIGHTOM, J.L. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, v.91, p.1212-1218, 1989.
- CHENG, T.Y.; SAKA, H.; VOQUI-DINH, T.H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. **Plant Science Letters**, v.19, p.91-99, 1980.
- CLARE, B.G.; McCLURE, N.C. *Agrobacterium*. In: SINGH, U.S.; SINGH, R.P.; KOHMOTO, K. (Ed.). **Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. V.1 – Prokariotes. Great Britain: Pergamon, 1995. p. 221-236.
- CONFALONIERI, M.; BALESTRAZZI, A.; BISOFFI, S.; CELLA, R. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in several black poplar clones. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.43, p.215-222, 1995.
- DAN, Y.; REICHERT, N.A. Organogenic regeneration of soybean from hypocotyl explants. **In Vitro Cellular Development Biology**, v.34, p.14-21, 1998.
- DAVEY, M.R.; HAMMATT, N.; JONES, B. Somatic cell techniques in soybean improvement: problems, progress and potencial. **Soybean Genetics Newsletter**, v.15, p.41-48, 1988.
- DE CLEENE, M.; DE LEY, J. The host range of crown gall. **Botanical Review**, v.42, p.389-466, 1976.

DEBLAERE, R.; BYTEBIER, B.; DE GREVE, H.; DEBLOECK, F.; SHELL, J.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. **Nucleic Acids Research**, v.13, p.4777-4789, 1985.

DECLERCK, V.; KORBAN, S.S. Shoot regeneration from leaf tissues of *Phlox paniculata* L. **Journal of Plant Physiology**, v.147, p.441-446, 1995.

DELZER, B.W.; SOMERS, D.A.; ORF, J.H. *Agrobacterium tumefaciens* susceptibility and plant regeneration of 10 soybean genotypes in maturity groups 00 to II. **Crop Science**, v.30, p.320-322, 1990.

DETREZ, C.; NDIAYE, S.; DREYFUS, B. *In vitro* regeneration of the tropical multipurpose leguminous tree *Sesbania grandiflora* from cotyledon explants. **Plant Cell Reports**, v.14, p.87-93, 1994.

DI, R.; PURCELL, V.; COLLINS, G.B.; GHABRIAL, S.A. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. **Plant Cell Reports**, v.15, p.746-750, 1996.

DILLEN, W.; DE CLERCQ, J.; GOOSSENS, A.; VAN MONTAGU, M.; ANGENON, G. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A. Gray. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.151-158, 1997a.

DILLEN, W.; DE CLERCQ, J.; KAPILA, J.; ZAMBRE, M.; VAN MONTAGU, M.; ANGENON, G. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. **The Plant Journal**, v.12, p.1459-1463, 1997b.

- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis induced in immature tissues of *Stylosanthes scabra*. **Annals of Botany**, v.70, p.477-482, 1992.
- DOTY, S.L.; YU, M.C.; LUNDIN, J.I.; HEATH, J.D.; NESTER, E.W. Mutacional analysis of input domain of the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.961-970, 1996.
- DRAPER, J.; SCOTT, R. Gene transfer to plants. In: GRIERSON, D. (Ed.) **Plant genetic engineering**, Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1994. v .1, cap.2, p.961-970.
- DROSTE, A.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; MUNDSTOCK, E.; HU, C.Y. Susceptibility of brazilian soybean cultivars to *Agrobacterium tumefaciens*. **Brazilian Journal of Genetics**, v.17, p.83-88, 1994.
- ESCUADERO, J.; HOHN, B. Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant. **The Plant Cell**, v.9, p.2135-2142, 1997.
- FACCIOTI, D.; O'NEAL, J.K.; LEE, S.; SHEWMAKER, C.K. Light-inducible expression of a chimeric gene in soybean tissue transformed with *Agrobacterium*. **Bio/Technology**, v.88, p.241-246, 1985.
- FALCO, S.C.; GUIDA, T.; LOCKE, M.; MAUVAIS, J.; SANDERS, C.; WARD, R.T.; WEBBER, P. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. **Bio/Technology**, v.13, p.577-582, 1995.
- FÁRI, M.; NAGY, I.; CSÁNYI, M.; MITYKÓ, J.; ANDRÁSFÁVY, A. *Agrobacterium* mediated genetic transformation and plant regeneration via organogenesis and

somatic embryogenesis from cotyledon leaves in eggplant (*Solanum melongena* L. cv. 'Kecskeméti lila'). **Plant Cell Reports**, v.15, p.82-86, 1995.

FREITAS, V.G.; LACORTE, L.; SACHETTO-MARTINS, G.; KRUL, W.R.; OLIVEIRA, D.E.; NEVES, L.J.; MANSUR, E. Identification of competent cells for *Agrobacterium* transformation and *in vitro* regeneration in peanut leaf and cotyledon explants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, p.157-167, 1997.

FULLNER, K.J.; NESTER, E.W. Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.1498-1504, 1996.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.

GHEYSEN, G.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M. Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. **Genes and Development**, v.5, p.287-297, 1991.

GODWIN, I.; TODD, G.; FORF-LLOYD, B.; NEWBURWY, J. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. **Plant Cell Reports**, v.9, p.671-675, 1991.

GUIVARCH, A.; CAISSARD, J.-C.; BROWN, S.; MARIE, D.; DEWITTE, W.; VAN ONCKELEN, H.; CHRIQUI, D. Localization of target cells and improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency by direct acetosyringone pretreatment of carrot root discs. **Protoplasma**, v.174, p.10-18, 1993.

- HAMMATT, N.; DAVEY, M.R.; NELSON, R.S. Plant regeneration from seedling cotyledons, leaves and petioles of *Glycine clandestina*. **Physiologia Plantarum**, v.68, p.125-128, 1986.
- HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal**, v.6, p.271-282, 1994.
- HINCHEE, M.A.W.; CONNOR-WARD, D.V.; NEWELL, C.A.; McDONNELL, R.E.; SATO, S.J.; GASSER, C.S.; FISCHHOFF, D.A.; RE, D.B.; FRALEY, R.T.; HORSCH, R.B. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Bio/Technology**, v.6, p.915-922, 1988.
- HOBBS, S.L.A.; JACKSON, J.A.; MAHON, J.D. Specificity of strain and genotype in the susceptibility of pea to *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v.8, p.274-277, 1989.
- HOOD, E.E.; HELMER, G.L.; FRALEY, R.T.; CHILTON, M.D. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A 208 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. **Journal of Bacteriology**, v.168, p.1291-1301, 1986.
- HOOYKAAS, P.J.J.; BEIJERSBERGEN, A.G.M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Annual Review in Phytopathology**, v.32, p.157-179, 1994.
- HYMOWITZ, T.; CHALMERS, N.L.; COSTANZA, S.H.; SAAM, M.M. Plant regeneration from leaf explants of *Glycine clandestina* Wendl. **Plant Cell Reports**, v.3, p.192-194, 1986.

- ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, v.14, p.745-750, 1996.
- JARCHOW, E.; GRIMSLEY, N.H.; HOHN, B. *virF*, the host-range-determining virulence gene of *Agrobacterium tumefaciens*, affects T-DNA transfer to *Zea mays*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.10.426-10.430, 1991.
- JIANG, X.C.; SHAO, Q.Q.; CARLSON, P.S. Callus induction and plant regeneration of wild soybean (*Glycine soja*) tissue culture. **In: CONFERENCE ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY OF THE SOYBEAN**; Iowa, 1986. **Abstract**. Ames: Iowa State University, 1986. p.29-31.
- JIN, S.; SANG, Y.N.; DENG, W.Y.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. The regulatory VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.6830-6835, 1993.
- JONES, B.; HAMMATT, N.; DAVEY, M.R. Screening of perennial *Glycine* species for shoot regeneration. **Soybean Genetics Newsletter**, v.15, p.51-53, 1988.
- KAMEYA, T.; WIDHOLM, J.M. Regeneration from hypocotyl sections of *Glycine* species. **Plant Science Letters**, v.21, p.289-294, 1987.
- KANEDA, Y.; TABEL, Y.; NISHIMURA, S.; HARADA, K.; AKIHAMA, T.; KITAMURA, K. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Plant Cell Reports**, v.17, p.8-12, 1997.

- KANEMOTO, R.H.; POWELL, A.T.; AKIYOSHI, D.E.; REGIER, D.A.; KERSTETTER, R.A.; NESTER, E.W.; HAWES, M.C.; GORDON, M.P. Nucleotide sequence and analysis of the plant-inducible locus *pinF* from *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v.171, p.2506-2512, 1989.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.27, p.137-138, 1965.
- KARTHIKEYAN, A.S.; SARMA, K.S.; VELUTHAMBI, K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Vigna mungo* (L.) Hepper. **Plant Cell Reports**, v.15, p.328-331, 1996.
- KIM, J.; HACK, E.; LAMOTTE, C.E. Synergistic effects of proline and inorganic micronutrients and effects of individual micronutrients on soybean (*Glycine max*) shoot regeneration *in vitro*. **Journal of Plant Physiology**, v.144, p.726-734, 1994.
- KIM, J.; LAMOTTE, C.E.; HACK, E. Plant regeneration *in vitro* from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v.136, p.664-669, 1990.
- KONCZ, C.; SCHELL, J. The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. **Molecular and General Genetics**, v.204, p.383-396, 1986.
- KORTE, A.M.; MAIB, E.; CASPER, R. *Agrobacterium*-mediated gene transfer as a tool for the induction of resistance against plum pox virus (PPV) in plum (*Prunus domestica* L.) - evaluation of three gene transfer methods. **Euphytica**, v.85, p.63-74, 1995.

KUMAR, V.; JONES, B.; DAVEY, M.R. Transformation by *Agrobacterium rhizogenes* and regeneration of transgenic shoots of the wild soybean *Glycine argyrea*. **Plant Cell Reports**, v.10, p.135-138, 1991

LAPARRA, H.; BURRUS, M.; HUNOLD, R.; DAMM, B.; BRAVO-ANGEL, A.M.; BRONNER, R.; HAHNE, G. Expression of foreign genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) - evaluation of three transfer methods. **Euphytica**, v.85, p.63-74, 1995.

LAZO, G.R.; STEIN, P.A.; LUDWIG, R.A. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. **Bio/Technology**, v.9, p.963-967, 1991.

LAZZERI, P.A.; HILDEBRANDT, D.F.; COLLINS, G.B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. **Plant Molecular Biology**, v.3, p.160-167, 1985.

LAZZERI, P.A.; HILDEBRANDT, D.F.; COLLINS, G.B. Soybean somatic embryogenesis: effects of hormones and culture manipulations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.10, p.197-208, 1987.

LEE, Y.W.; JIN, S.; SIM, W.S.; NESTER, E.W. Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the Vir A protein of *Agrobacterium tumefaciens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.12245-12249, 1995.

LUO, G.; HEPBURN, A.; WIDHOLM, J. A simple procedure for the expression of genes in transgenic soybean callus tissue. **Plant Cell Reports**, v.13, p.632-636, 1994.

- MALIK, K.A.; SAXENA, P.K. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from intact seedlings of *Phaseolus acutifolius* A., *P. aureus* (L.) Wilczek, *P. coccineus* L., and *P. wrightii* L. **Plant Cell Reports**, v.11, p.163-168, 1992.
- MANNERLÖF, M.; TUVESON, S.; STEEN, P.; TENNING, P. Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate. **Euphytica**, v.94, p.83-91, 1997.
- MARIN, V.A. Avaliação dos processos de regeneração e infecção por *Agrobacterium* em genótipos de soja selecionados para alto teor de proteína. Piracicaba, 1996. 113p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MARINGONI, A.C.; FURTADO, E.L. Patogenicidade de *Agrobacterium tumefaciens* em gmelina. **Summa Phytopathologica**, v.23, p.248-251, 1997.
- MATHIS, N.L.; HINCHEE, M.A.W. *Agrobacterium* inoculation techniques for plant tissues. In: GELVIN, S.B.; SCHILPEROORT, R.A. (Ed.) **Plant Molecular Biology Manual**. 2. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. B6 1-9.
- MATTHYSSE, A.G. Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. **Critical Review in Microbiology**, v.13, p.281-307, 1986.
- MATTHYSSE, A.G. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. **Journal of Bacteriology**, v.154, p.906-915, 1983.
- MATTHYSSE, A.G.; GURLITZ, R.H.G. Plant cell range for attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to tissue culture cells. **Physiology and Plant Pathology**, v.21, p.381-387, 1982.

- MATTHYSSE, A.G.; HOLMES, K.V.; GURLITZ, R.H.G. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. **Journal of Bacteriology**, v.145, p.583-595, 1981.
- MATTHYSSE, A.G.; WHITE, S.; LIGHTFOOT, R. Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.1069-1075, 1995.
- MAURO, A.O.; NÓBREGA, J.C.; BARALDI, G.L.; COLLINS, G.B. Susceptibility of some brazilian soybean genotypes to three strains of *Agrobacterium tumefaciens*. **Brazilian Journal of Genetics**, v.18, p 417-420, 1995a.
- MAURO, A.O.; PFEIFFER, T.W.; COLLINS, G.B. Inheritance of soybean susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to transformation. **Crop Science**, v.35, p.1152-1156, 1995b.
- MAY, G.D.; AFZA, R.; MASON, H.S.; WIECKO, A.; NOVAK, F.J.; ARNTZEN, C.J. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Bio/Technology**, v.13, p.486-492, 1995.
- MAYERHOFER, R.; KONCZ-KALMAN, Z.; NAWRATH, C.; BAKKEREN, G.; CRAMIRI, A.; ANGELIS, K.; REDEI, G.P.; SCHELL, J.; HOHN, B.; KONCZ, C. T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. **The Embo Journal**, v.10, p.697-704, 1991.
- MCCABE, D.E.; SWAIN, W.F.; MARTINELL, B.J.; CHRISTOU, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. **Bio/Technology**, v.6, p.923-926, 1988.

- McCLEAN, P.; GRAFTON, K.F. Regeneration of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. **Plant Science**, v.60, p.117-122, 1989.
- McHUGHEN, A. *Agrobacterium*-mediated transfer of chlorsulfuron resistance to commercial flax cultivars. **Plant Cell Reports**, v.8, p.445-449, 1989.
- METZ, T.D.; DIXIT, R.; EARLE, E.D. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*). **Plant Cell Reports**, v.15, p.287-292, 1995.
- MOHAMED, M.F.; READ, P.E.; COYNE, D.P. Dark preconditioning, CPPU, and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.177, p.668-672, 1992.
- MOLVIG, L.; TABE, L.M.; EGGUM, B.O.; MOORE, A.E.; CRAIG, S.; SPENCER, D.; HIGGINS, T.J.V. Enhanced methionine levels and increased nutritive value of expressing a sunflower seed albumin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.8393-8398, 1997.
- MUKHOPADHYAY, A.; ARUMUGAM, N.; NANDAKUMAR, P.B.A.; PRADHAN, A.K.; GUPTA, V.; PENTAL, D. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. **Plant Cell Reports**, v.11, p.506-513, 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

- MURTHY, B.N.S.; VICTOR, J.; SINGH, R.P.; FLETCHER, R.A.; SAXENA, P.K. *In vitro* regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.): stimulation of direct organogenesis and somatic embryogenesis by thidiazuron. **Plant Growth Regulation**, v.19, p.233-240, 1996.
- NAM, J.; MATTHYSSE, A.G.; GELVIN, S.B. Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. **The Plant Cell**, v.9, p.317-333, 1997.
- NARASIMHULU, S.B.; DENG, X.B.; SARRIA, R.; GELVIN, S.B. Early transcription of *Agrobacterium* T-DNA genes in tobacco and maize. **The Plant Cell**, v.8, p.873-886, 1996.
- NAUERBY, B.; MADSEN, M.; CHRISTIANSEN, J.; WYNDAELE, R. A rapid and efficient regeneration system for pea (*Pisum sativum*), suitable for transformation. **Plant Cell Reports**, v.9, p.676-679, 1991.
- OWENS, L.D.; SMIGOCKI, A.C. Transformation of soybean cells using mixed strains of *Agrobacterium tumefaciens* and phenolic compounds. **Plant Physiology**, v.88, p.570-573, 1988.
- OWENS, L.D.; CRESS, D.E. Phenotypic variability of soybean response to *Agrobacterium* strains harbouring the Ti or Ri plasmids. **Plant Physiology**, v.77, p.87-94, 1985.
- PAN, S.Q.; JIN, S.; BOULTON, M.I.; HAWES, M.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. An *Agrobacterium* virulence factor encoded by a Ti plasmid gene or a chromosomal gene is required for T-DNA transfer into plants. **Molecular Microbiology**, v.17, p.259-269, 1995.

- PEDERSEN, H.C.; CHRISTIANSEN, J.; WYNDAELE, R. Induction and *in vitro* culture of soybean crown gall tumors. **Plant Cell Reports**, v.2, p.201-204, 1983.
- PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PENA, J.A.; NAVARRO, L. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing): factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, v.16, p.731-737, 1997.
- PHILLIPS, G.C.; COLLINS, G.B. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. **Crop Science**, v.19, p.59-64, 1979.
- RECH, E.L.; GOLDS, T.J.; HAMMATT, N.; MULLIGAN, B.J.; DAVEY, M.R. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of the wild soybeans *Glycine canescens* and *G. clandestina*: production of transgenic plants of *G. canescens*. **Journal of Experimental Botany**, v.39, p.1275-1285, 1988.
- RECH, E.L.; GOLDS, T.J.; HUSNAIN, T.; VAINSTEIN, M.H.; JONES, B.; HAMMATT, N.; MULLIGAN, B.J.; DAVEY, M.R. Expression of a chimaeric kanamycin resistance gene introduced into the wild soybean *Glycine canescens* using a cointegrate Ri plasmid vector. **Plant Cell Reports**, v.8, p.33-36, 1989.
- ROBBS, S.L.; HAWES, M.C.; LIN, H.-J.; PUEPPKE, S.G.; SMITH, L. Inheritance of resistance to crown gall in *Pisum sativum*. **Plant Physiology**, v.95, p.53-57, 1991.
- ROBERTS, C.S.; RAJAGOPAL, S.; SMITH, L.A.; NGUYEN, T.A.; YANG, W.; NUGROHO, S.; RAVI, K.S.; CAO, M.-L.; VIJAYACHANDRA, K.; PATELL, V.; HARCOURT, R.L.; DRANSFIELD, L.; DESAMERO, N.; SLAMET, I.; KEESE, P.; KILIAN, A.; JEFFERSON, R.A. A comprehensive set of modular vectors for advanced manipulations and efficient transformation of plants by both

Agrobacterium and DNA uptake methods. pCAMBIA vector release manual version 3.05. oct. 1997. 6p.

ROMANTSCHUK, M. Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. **Annual Review in Phytopathology**, v.30, p.225-243, 1992.

SAALBACH, I.; PICKARDT, T.; MACHEMEHL, F.; SAALBACH, G.; SCHIEDER, O.; MÜNTZ, K. A chimeric gene encoding the methionine-rich 2S albumin of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) is stably expressed and inherited in transgenic grain legumes. **Molecular General Genetics**, v.242, p.226-236, 1994.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of parafilm embedded plant material using toluidine blue O¹. **Stain Techonology**, v.48, p.247-249, 1973.

SANE, V.A.; NATH, P.; SANE, P.V. Development of insect-resistant transgenic plants using plant genes: expression of cowpea trypsin inhibitor in transgenic tobacco plants. **Current Science**, v.72, p.741-747, 1997.

SANGWAN, R.S.; BOURGEOIS, Y.; BROWN, S.; VASSEUR, G. SANGWAN-NORREEL, B. Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v.188, p.439-456, 1992.

SCHAART, J.G.; PUIITE, K.J.; KOLOVA, L.; POGREBNYAK, N. Some methodological aspects of apple transformation by *Agrobacterium*. **Euphytica**, v.85, p.131-134, 1995.

SHEN, W.H.; ESCUDERO, J.; SCHLÄPPI, M.; RAMOS, C.; HOHN, B.; KOUKOLÍKOVÁ-NICOLA, Z.; T-DNA transfer to maize cells: histochemical

investigation of β -glucuronidase activity in maize tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p.1488-1492, 1993.

SHENG, J.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **The Plant Cell**, v.8, p.1699-1710, 1996.

STILLER, J.; MARTIRANI, L.; TUPPALE, S.; CHIAN, R.-J.; CHIURAZZI, M.; GRESSHOFF, P.M. High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. **Journal of Experimental Botany**, v.48, p.1357-1365, 1997.

STOVER, E.W.; SWARTZ, H.J.; BURR, T.J. Endophytic *Agrobacterium* in crown gall-resistant and susceptible. *Vitis* genotypes. **Vitis**, v.36, p.21-26, 1997.

SYKES, L.C.; MATTHYSSE, A.G. Time required for tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, p.597-598, 1986.

TAMAMOTO, S.; AOYAMA, T.; TAKANAMI, M.; OKA, A. Binding of the regulatory protein VirG to the phased signal sequences upstream from virulence genes on the hairy-root-inducing plasmid. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.537-547, 1990.

TEPFER, M.; CASSE-DELBART, F. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. **Microbiology of Science**, v.4, p.24-28, 1987.

- THOMÉ, G.C.H.; SANTARÉM, E.R.; FERREIRA, A.G. Adventitious bud induction and plant regeneration from soybean cotyledonary nodes. **Phyton**, v.57, p.127-135, 1995.
- TINGAY, S.; McELROY, D.; KALLA, R.; FIEG, S.; WANG.M.; THORNTON, S.; BRETTELL, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. **The Plant Journal**, v.11, p.1369-1376, 1997.
- TINLAND, B. The integration of T-DNA into plant genomes. **Trends in Plant Science**, v.1, p.178-184, 1996.
- TRICK, H.N.; FINER, J.J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. **Plant Cell Reports**, v.17, p.482-488, 1998.
- TRIEU, A.T.; HARRISON, M.J. Rapid transformation of *Medicago truncatula*: regeneration via shoot organogenesis. **Plant Cell Reports**, v.16, p.6-11, 1996.
- TZFIRA, T.; JENSEN, C.S.; VAINSTEIN, A.; ALTMAN, A. Transformation and regeneration of transgenic aspen plants via shoot formation from stem explants. **Physiologia Plantarum**, v.99, p.554-561, 1997.
- UEMATSU, C.; MURASE, M.; ICHIKAWA, H.; IMAMURA, J. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of kiwifruit. **Plant Cell Reports**, v.10, p.286-290, 1991.
- VAN SLUYS, M.A.; HASHIMOTO, R.Y.; SCORTECCI, K.C. Gene transfer from *Agrobacterium* to plants. **Ciência e Cultura**, v.44, p.296-300, 1992.

- VANCANNEYT, G.; SCHMIDT, R.; O'CONNOR-SANCHEZ, A.; WILLMITZER, L.; ROCHA-SOSA, M. Construction of an intron containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium* mediated plant transformation. **Molecular and General Genetics**, v.220, p.245-250, 1990.
- VANDE BROECK, A.; VANDERLEYDEN, J. The role of bacterial motility, chemotaxis, and attachment in bacteria-plant interactions. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.8, p.800-810, 1995.
- VICEDO, B.; LÓPEZ, M.J.; ASÍNS, M.J.; LÓPEZ, M.M. Spontaneous transfer of the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the nopaline catabolism plasmid of *A. radiobacter* strain K84 in crown gall tissue. **Phytopathology**, v.36, p.528-534, 1996.
- VILLEMONT, E.; DUBOIS, F.; SANGWAN, R.S.; VASSEUR, G.; BOURGEOIS, Y.; SANGWAN-NORREEL, B.S. Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. **Planta**, v.201, p.160-172, 1997.
- WALKERPEACH, C.R.; VELTEN, J. *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector system. In: GELVIN, S.B.; SCHILPEROORT, R.A. (Ed.) **Plant Molecular Biology Manual**. 2. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. B1, p. 1-19.
- WEISING, K.; KAHL, G. Natural genetic engineering of plant cells: the molecular biology of crown gall and hairy root disease. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.12, p.327-351, 1996.

- WENBIN, L.; KOMATSUDA, T. Binary vector mediated transformation of soybean. **Soybean Genetics Newsletter**, v.21, p.87-911, 1994.
- WIDHOLM, J.M.; RICK, S. Shoot regeneration from *Glycine canescens* tissue cultures. **Plant Cell Reports**, v.2, p.169-173, 1983.
- WRIGHT, M.S.; KOEHLER, S.M.; HINCHEE, M.A.; CARNES, M.G. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. **Plant Cell Reports**, v.5, p.150-154, 1986.
- YAMAZAKI, M.; SON, L.; HAYASHI, T.; MORITA, N.; SASMIZU, T.; MOURAKOSHI, I.; SAITO, K. Transgenic fertile *Scoparia dulcis* L., a folk medicinal plant, conferred with a herbicide-resistance trait using an Ri binary vector. **Plant Cell Reports**, v.15, p.317-321, 1996.
- YANCHEVA, S.D. Preliminary studies on regeneration and transformation of plum (*Prunus domestica* L.). **Acta Horticulturae**, v.359, p.159-163, 1994.
- YANG, Y.S.; WADA, K.; FUTZUHARA, Y. Comparative studies of organogenesis and plant regeneration in various soybean explants. **Plant Science**, v.72, p.101-108, 1990.
- ZAMBRYSKI, P. Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. **Annual Review in Genetics**, v.22, p.1-30, 1988.
- ZHAN, X.; KAWAI, S.; KATAYAMA, Y.; MOROHOSHI, N. A new approach based on the leaf disc method for *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of aspen. **Plant Science**, v.123, p.105-112, 1997.

ZHANG, Z.; COYNE, D.P.; MITRA, A. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of common bean. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.122, p.300-305, 1997.

ZUPAN, J.; ZAMBRYSKI, P. The *Agrobacterium* DNA transfer complex. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.16, p.279-295, 1997.

ANEXO A

Tabela 2: Resultados obtidos nos ensaios de otimização da transformação via *Agrobacterium tumefaciens*.

Ensaios	N	Número de explantes GUS positivos	Total de pontos azuis	Total de pontos azuis em áreas meristemáticas
Linhagens bacterianas				
GV2260	30	2	91	0
GV3101	30	4	130	0
AGL1	30	3	21	0
EHA105	30	4	11	3
			$\chi^2= 154,00 *$	
pH				
5,0	30	6	36	2
5,4	30	0	0	0
5,8	30	2	91	0
			$\chi^2= 99,23 *$	
AS no meio de cultura				
0 μM	30	2	91	0
100 μM	30	5	28	13
			$\chi^2= 33,35 *$	
AS na cultura bacteriana				
0 μM	30	2	91	0
100 μM	30	2	6	1
			$\chi^2= 74,48 *$	
Concentração de AS				
40 μM	30	2	91	0
100 μM	30	5	8	2
200 μM	30	8	209	18
			$\chi^2= 198,75 *$	
Temperatura de co-cultivo				
22 °C	30	0	0	0
25 °C	30	4	11	11
28 °C	30	2	91	0
			$\chi^2= 145,12 *$	
Tempo de co-cultivo				
2 dias	30	2	91	0
3 dias	30	0	0	0
6 dias	30	1	52	13
			$\chi^2= 87,45 *$	
Concentração céls bacterianas				
1×10^7	30	4	90	75
1×10^8	30	4	337	22
1×10^9	30	2	91	0
			$\chi^2= 234,61 *$	
Co-cultivo com BAP				
0 μM	30	2	91	0
2,5 μM	30	3	174	21
5,0 μM	30	1	30	0
			$\chi^2= 106,26 *$	

Ensaio	N	Número de explantes GUS positivos	Total de pontos azuis	% pontos azuis em áreas meristemáticas
Pré-cultivo com BAP				
0 dia	30	2	91	0
3 dias	30	2	159	36
6 dias	30	2	37	10
			$\chi^2 = 78,13 *$	
Meio de inoculação				
NaCl	30	2	91	0
MS/2	30	2	56	3
			$\chi^2 = 8,33$	
Ferimento				
Sim	30	2	91	0
Não	30	2	43	16
			$\chi^2 = 17,19$	
EHA105 pH 5,0				
25 °C	30	7	361	203
28 °C	30	12	104	1
			$\chi^2 = 142,04 *$	
EHA105 pH 5,8				
25 °C	30	5	187	14
28 °C	30	2	7	0
			$\chi^2 = 167,01 *$	
AGL1 pH 5,0				
25 °C	30	0	0	0
28 °C	30	7	147	53
			$\chi^2 = 147,00 *$	
AGL1 pH 5,8				
25 °C	30	4	81	2
28 °C	30	2	5	0
			$\chi^2 = 67,16 *$	
GV2260 pH 5,0				
25 °C	30	1	3	2
28 °C	30	2	20	6
			$\chi^2 = 12,56$	
GV2260 pH 5,8				
25 °C	30	5	23	2
28 °C	30	5	55	10
			$\chi^2 = 13,12$	

AS = Acetoseringona

* = altamente significativo ao nível de 1%

ANEXO B

PLANT TRANSFORMATION: ADVANCES AND PERSPECTIVES

Adriana Cristina Alves; Vera Maria Quecini; Maria Lucia Carneiro Vieira*

Depto. de Genética-ESALQ/USP, C.P. 83, CEP: 13400-970 - Piracicaba, Brasil

*e-mail: mlcvieir@carpa.ciagri.usp.br

ABSTRACT: Genetic transformation is a powerful tool for plant breeding and genetical, physiological or biochemical research, consequently it is an extremely dynamic field. Transgenic plants are commonly used to complete or substitute mutants in basic research, helping the studies of complex biological situations such as pathogenesis process, genome organization, light reception and signal transduction. In this review, recent approaches for foreign gene introduction (e.g. *Agrobacterium* transformation, whole tissue electroporation, *in planta Agrobacterium* transformation), screening (reporter gene possibilities and performance) and transformant selection (*ipt* selective marker) are discussed. Transgene expression and mechanisms underlying (trans)gene inactivation are presented. Practical applications of genetically modified plants, field tests and commercial transgenic crops worldwide and in Brazil are listed, as well as the main traits and species modified. Potential uses of transgenic plants for animal compound production, biological remediation and synthetic polymer assembly are also shown.

Key words: plant transformation, *Agrobacterium*, electroporation, reporter genes, transgenic crops

TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS: AVANÇOS E PERSPECTIVAS

RESUMO: A transformação genética é um valioso recurso para o melhoramento e para a pesquisa em Genética, Fisiologia e Bioquímica. Plantas transgênicas são usadas para complementar ou substituir mutantes na pesquisa fundamental e para auxiliar em estudos de fenômenos biológicos complexos como patogenicidade, organização do genoma, captação de luz e transdução de sinais. Nesta revisão, são discutidas abordagens recentes visando a introdução, *screening* e seleção de transformantes, estudos sobre expressão do transgene e uso de plantas geneticamente modificadas. Ensaios de campo e culturas transgênicas comerciais são listadas assim como as principais espécies e características modificadas. O potencial das plantas transgênicas para a produção de compostos animais, remediação biológica e síntese de polímeros é igualmente apresentado.

Palavras-chave: transformação de plantas, *Agrobacterium*, eletroporação, genes repórteres, culturas transgênicas

A commonly accepted definition of plant transformation is: "the introduction of exogenous genes into plant cells, tissues or organs employing direct or indirect means developed by molecular and cellular biology" (Jenes et al., 1993). However, only integrative events, confirmed by molecular and genetical analyses, are correctly designated as genetic transformation (Potrykus, 1990; Potrykus, 1991; Birch, 1997).

Numerous methods for exogenous gene introduction into plant genomes have been described (Potrykus, 1990; Potrykus, 1991), and they can be classified into two groups: **indirect gene transfer** - where exogenous DNA is introduced by a biological vector and **direct gene transfer** - where physical and chemical processes are responsible for DNA

introduction. Some of the proposed methods show low efficiency and repeatability, being scarcely utilized. Thus, basically three methods are responsible for almost all existing transgenic plants, namely indirect transformation mediated by *Agrobacterium* (i) or direct systems using electroporation (ii) and biolistics (iii). Detailed explanations, applications and characteristics of these methods can be found in: Horsch et al. (1984), De Block et al. (1984), Teffer (1990), Zupan & Zambryski (1995) and Sheng & Citovsky (1996) concerning the *Agrobacterium* system; Fromm et al. (1987), Shillito & Potrykus (1987), Gad et al. (1990), Negruțiu et al. (1990) and Neuhaus & Spangenberg (1990) for electroporation procedures and, Klein et al. (1987), Sanford (1988), Morikawa

et al. (1989), Birch & Franks (1991), Christou (1992), Sanford et al. (1993) and Christou (1995) for microparticle bombardment.

Regardless of the transformation method, a previous plant regeneration protocol for the species under investigation and a cloned gene of interest must exist. Foreign genes can be obtained from other plant species or even from different kingdoms, like fungi, bacteria and animals.

Every stable transformation process demands the simultaneous occurrence of two independent biological events, which are: stable insertion of the transgene into the plant genome and regeneration of those cells where it occurred, producing a non-chimeric transgenic plant. The need of both events occurring in the same cell makes it a constraint for higher transformation efficiency. Selection markers and reporter genes are frequently used to detect transformation sites.

Although perfectly established, principal transformation methods often undergo changes or improvements to achieve recalcitrant species transformation or higher frequencies.

Agrobacterium-mediated plant transformation without the need of an *in vitro* culture stage was achieved by employing *in planta* inoculation (Bechtold et al., 1993; Chang et al., 1994). In this methodology, young flower buds are inoculated with the bacteria under *ex-vitro* conditions. When seeds are produced, they are submitted to selection for marker-induced resistance. Despite the ease of this method, only *Arabidopsis thaliana* stable transformants have been obtained and, differences in the efficiency among ecotypes were observed (Bechtold et al., 1993).

Since the system greatly depends on pathogenesis, basic aspects of *Agrobacterium*-plant interaction have been studied, such as T-DNA transfer and insertion (Bundock & Hooykaas, 1996), susceptibility of plant genotypes (Nam et al., 1997) and influence of host cell cycle stage on T-DNA transference (Villemont et al., 1997). In addition, technical improvements in order to increase transformation rates, such as employment of particle bombardment to provoke microwounding at the inoculation site - *Agrobacterium* (Bidney et al., 1992; Brasileiro et al., 1996; Hansen & Chilton, 1996) and intracellular microinjection of bacteria into regions with regenerative abilities (Escudero et al., 1996) have been developed.

Electroporation is a technique that uses electrical discharges to create reversible pores in the plasma membrane, thus allowing the introduction of foreign DNA. Since the main drawback for electroporation employment is the ability to obtain

fully developed plants from protoplasts, whole tissues have been used as explants, like zygotic intact embryos in cowpea (Akella & Lurquin, 1993), common bean (Dillen et al., 1995) and rice (Xu & Li, 1994; Rao, 1995).

Immediate identification is a highly desirable feature of transformed cells, but since most introduced genes are unable to induce phenotypes distinct from the wild type, the utilization of a promptly identified reporter gene *in cis* or *in trans* provides a screening tool.

The most utilized reporter gene so far is *uidA*, which codes for a monomeric stable enzyme- β -glucuronidase (GUS), which catalyzes the conversion of methylumbeliferone glucuronide into methylumbeliferone, forming an easily identifiable blue precipitate. There are many advantages of GUS: it is undemanding to visualize, the enzyme is not easily denatured and the precipitate is stable (Jefferson, 1987). However a disadvantage of the GUS system is that it is a destructive assay, that is, the explant cannot be recovered.

Some plants show variable levels of endogenous β -glucuronidase expression (Kosugi, 1990), which impairs interpretation of GUS assay results. Use of an engineered virus as a gene amplification vector of GUS was proposed by Shen & Hohn (1994). These authors reported up to a four fold increase in blue points, indicating that viral DNA was responsible for reporter gene amplification.

Alternatively, Chalfie et al. (1994), Niedz et al. (1995) and Sheen et al. (1995) suggested "green fluorescent protein (GFP)" as useful reporter gene for plant and animal systems. GFP is a protein produced by a jellyfish, *Aequorea victoria*, that is able to emit green fluorescence under blue light or UV illumination without any additional substrate. The principal advantages of this reporter gene compared to the formerly used, namely GUS, is the easiness of its visualization. It needs no extra substrate for detection and, most important, is a non-destructive assay (Vain et al., 1998). Very recently, soluble, highly fluorescent variants of GFP were produced (Davis & Vierstra, 1998).

Since transformation is a rare event, selective markers impair the development of a great number of non-transformed cells in favor of transgenic ones. However, the use of a selective agent, which is frequently an antibiotic or a herbicide, retards cell differentiation and shoot development in the explant submitted to a transformation process (Colby & Meredith, 1990). In addition, if another transformation of the same material is needed, the selective marker is no longer effective. Due to these limitations, Ebinuma et al. (1997) proposed a

selective marker that unlike the former ones imposes no negative effect on non-transformed cells, instead inducing a different phenotype in transgenic shoots. These authors have proposed a construction based on a chimeric *ipt* gene, which codes isopentenyl AMP, a cytokinin precursor (phenotype ESP - "extreme shooty phenotype") cloned inside the maize transposable element *Ac*. Transposon *Ac* was used to remove the gene *ipt* from the transformed cells in explants with an ESP phenotype after transformation, since during the transposition process the excised element very rarely reintegrates. If it does, it occurs in a sister chromatid and is lost due to somatic segregation.

Concerning the size of cloning vectors, most of the plasmids employed in plant transformation range from 15 to 25 kb, but the construction of an artificial binary bacterial chromosome (BIBAC) made the stable insertion of 150 kb possible, which is approximately ten times the previous sequence size (Hamilton et al., 1996). It opens the possibility of the introduction of quantitative traits into other plant genomes. Gelvin (1998) for example, modernly described multigene plant transformation.

Frequently, high levels of expression are desirable, thus constitutive promoters, like 35S from cauliflower mosaic virus (CaMV), have been widely used as single or double copies. Surprisingly, events of partial or complete transgene and/or its endogenous homologue expression inhibition have been observed (Napoli et al., 1990; Van Der Krol et al., 1990). These inactivation events are due to complex mechanisms involving methylation and epigenetic alterations (Renckens et al., 1992; Meyer et al., 1992; Neuhuber et al., 1994; Meyer & Heidmann, 1994; Park et al., 1996; Thierry & Vaucheret, 1996). Although the exact mechanism that targets certain sequences to methyltransferases or other enzymes responsible for epigenetic alterations remains unknown, there are some hypotheses suggesting the involvement of DNA-DNA, DNA-RNA and RNA-RNA homology-dependent interactions (Grierson et al., 1991; Mol et al., 1991; Flavell, 1994; Matzke & Matzke, 1995a; Matzke & Matzke, 1995b; Meyer, 1996; Stam et al., 1997).

Utilization of DNA sequences known as "matrix attachment regions" (MAR) or "scaffold attachment regions" (SAR) has been recommended as a means of keeping chromatin structure accessible to RNA polymerase and the transcription machinery, promoting higher levels and more constant transgene expression (Spiker & William, 1996). Elimination of repeated sequences in

transformation vector construction, selection of plants with lower copy numbers and moderated transcription rates in order to favor RNA turnover and the avoidance of multiple copies of the 35S promoter are strategies recommended by Matzke & Matzke (1995b) to avoid (trans)gene silencing. Other promoters able to drive high transcription rates, like chimeric promoters derived from *Agrobacterium tumefaciens* octopine and manopine synthase genes (Ni et al., 1995), are possible alternatives to maintain high expression levels and reduce homology in order to avoid inactivation phenomena.

Many aspects of plant biology have been elucidated using transgenic plants. There are several reports employing transgenic plants, and a few recent ones are here emphasized: Creté et al. (1997) and Scheible et al. (1997) have elucidated transcription regulation and signal transduction aspects of nitrogen metabolism in higher plants using genetically modified *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana plumbaginifolia* and *N. tabacum*. Molecular identification of plant blue light photoreceptor has also employed transgenic plants (Ahmad & Cashmore, 1993; Lin et al., 1995a; 1995b). Complex biological situations like pathogenesis (Bonas & Van Der Ackerveken, 1997), developmental regulation (Silverstone et al., 1997), genome organization (Murata et al., 1997), reproductive self-incompatibility (Lee et al., 1994) and cross-membrane transportation (Grabov et al., 1997) among many others, have been studied using transgenic plants.

Gene expression and its regulation are frequently studied employing chimeric constructs carrying the promoter fused to a reporter gene, so that induction of the promoter under study is easily assessed by reporter gene expression. However, studies using fusion promoter/reporter genes are being severely criticized (Taylor, 1997), because they do not take into consideration upstream and intragenic sequences that also regulate gene transcription.

Nowadays, many countries have field tests of transgenic plants. As of December 1995, 3,647 genetically engineered plants were field tested worldwide: United States (1952), Canada (486), France (253), United Kingdom (133), Holland (113), Argentina (78), Italy (69), Germany (49), Australia (46), Chile (39), Mexico (38), Spain (30), Japan (25), South Africa (22), Sweden (18), Cuba (18) and Russia (11) among many others. The main transgenic tested field crops are maize, oilseed rape, potato, tomato, soybean, cotton and tobacco, and the most frequent genetically introduced traits are herbicide tolerance (35%), product quality (20%), insect resistance (18%), virus resistance (11%), fungi resistance (3%)

and others (13%). The last corresponds to nematode and bacteria resistance and marker or reporter gene transference (Fontes & Carvalho, 1997).

In Brazil, from February to June, 1997, several companies started field tests with transgenic plants. Company names, plant material and the introduced character are listed in TABLE 1 (Comissão Técnica de Biossegurança - CTNBio, 1997). Birch (1997) shows an extensive list of commercial transgenic plants worldwide. Besides the above mentioned conventional applications, genetically modified plants have also been used in phytoremediation (environmental heavy metal detoxification) (Rugh et al., 1996), metabolic engineering (Nawrath et al., 1994; John & Keller, 1996) and animal protein production (Ma & Hein, 1995; Rosso & Abad, 1996). Moreover, plant-based vaccines are attractive alternatives to more traditional

antigen preparations because of their ease of production and delivery. Arakawa et al. (1998) have developed a transgenic potato that produces human insulin, an insulin-dependent diabetes mellitus autoantigen (IDDM). When the transformed potato was fed to a mouse model of IDDM, the protein was directed to the gut-associated lymphoid tissue, where it induced oral tolerance, as shown by decreased insulinitis and suppression of diabetic symptoms.

The main objective of plant transformation is to solve agricultural problems without environmental damage, so that the development of "intelligent plants" able to exclusively kill fungus-infected cells (Strittmatter et al., 1995), or grow taller when there is a shortage of light but grow normally when there are no surrounding plants (Robson et al., 1996), are the goals of modern breeding programs all over the world.

TABLE 1 - Field assays of transgenic plants in Brazil from February to June 1997.

Company	Plant Material	Character
Sociedade Agrícola Germinal Ltda	<i>Zea mays</i> line	Stalk worm tolerance
Sociedade Agrícola Germinal Ltda	<i>Zea mays</i> hybrids	Pest control
Sociedade Agrícola Germinal Ltda	<i>Zea mays</i> hybrids	Pest and herbicide control
Monsanto do Brasil Ltda	Ten <i>Glycine max</i> cultivars	Roundup resistance
Monsanto do Brasil Ltda	Ten BR and ten US <i>Glycine max</i> cultivars	Roundup resistance
Copersucar Ltda	<i>Saccharum</i> sp. hybrids	Ammonium glyphosinate resistance
Profigen do Brasil Ltda	<i>Nicotiana tabacum</i> variety	Resistance to TSWV
Hoechst Shering AgrEvo do Brasil Ltda	<i>Glycine max</i> cultivars	Ammonium glyphosinate resistance

REFERENCES

- AHMAD, M.; CASHMORE, A.R. *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, v.366, n.5, p.162-166, 1993.
- AKELLA, V.; LURQUIN, P.F. Expression in cowpea seedlings of chimeric transgenes after electroporation into seed-derived embryos. *Plant Cell Reports*, v.12, n.2, p.110-117, 1993.
- ARAKAWA, T.; YU, J.; CHONG, D. K. X.; HOUGH, J.; ENGEN, P. C.; LANGRIDGE, W. H. R. A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nature Biotechnology*, v.16, n.10, p.934-938, 1998.
- BECHTOLD, N.; ELLIS, J.; PELLETIER, G. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Académie de Sciences/Paris*, v.316, n.3, p.1194-1199, 1993.
- BIDNEY, D.; SCELONGE, C.; MARTICH, J.; BURRUS, M.; SIMS, L.; HUFFMAN, G. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, v.18, n.2, p.301-313, 1992.
- BIRCH, R.G.; FRANKS, T. Development and optimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.18, n.5, p.453-469, 1991.
- BIRCH, R.G. Plant Transformation: Problems and strategies for practical applications. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, v.48, p.297-326, 1997.
- BONAS, U.; VAN DER ACKERKEKEN, G. Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial diseases? *The Plant Journal*, v.12, n.1, p.1-8, 1997.

- BRASILEIRO, A.C.M.; ARAGÃO, F.J.L.; ROSSI, S.; DUSI, D.M.A.; BARROS, L.M.G.; RECH, E.L. Susceptibility of common and tepary beans to *Agrobacterium* spp. strains and improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation using microprojectile bombardment. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, v.121, n.5, p.810-815, 1996.
- BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P.J.J. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences/USA*, v.93, n.26, p.15272-15275, 1996.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUKIRCHEN, G.; WARD, W.W.; PRASHER, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, v.263, n.5148, p.802-805, 1994.
- CHANG, S.S.; PARK, S.K.; KIM, B.C.; KANG, B.J.; KIM, D.U.; NAM, H.G. Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation in planta. *The Plant Journal*, v.5, n.4, p.551-558, 1994.
- CHRISTOU, P. Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *The Plant Journal*, v.2, n.3, p.275-281, 1992.
- CHRISTOU, P. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. *Euphytica*, v.85, n.1/3, p.13-27, 1995.
- COLBY, S.M.; MEREDITH, C.P. Kanamycin sensitivity of cultured tissues of *Vitis*. *Plant Cell Reports*, v.9, n.5, p.237-240, 1990.
- CRETÉ, P.; CABOCHE, M.; MEYER, C. Nitrite reductase expression is regulated at the post-transcriptional level by the nitrogen source in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, v.11, n.4, p.625-634, 1997.
- DAVIS, S.J.; VIERSTRA, R.D. Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Molecular Biology*, v.36, n.4, p.521-528, 1998.
- DE BLOCK, M.; HERRERA-ESTRELLA, L.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J.; ZAMBRYSKI, P. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *EMBO Journal*, v.3, n.8, p.1681-1689, 1984.
- DILLEN, W.; ENGLER, G.; VAN MONTAGU, M.; ANGONON, G. Electroporation-mediated DNA delivery to seedling tissues of *Phaseolus vulgaris* L. (common beans). *Plant Cell Reports*, v.15, n.1/2, p.119-124, 1995.
- EBINUMA, H.; SUGITA, K.; MATSUNAGA, E.; YAMAKADO, M. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences/USA*, v.94, n.6, p.2117-2121, 1997.
- ESCUADERO, J.; NEUHAUS, G.; SCHLÄPPI, M.; HOHN, B. T-DNA transfer in meristematic cells of maize provided with intracellular *Agrobacterium*. *The Plant Journal*, v.10, n.2, p.355-360, 1996.
- FLAVELL, R.B. Inactivation of gene expression in plants as consequence of specific sequence duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences/USA*, v.91, n.9, p.3490-3496, 1994.
- FROMM, M.; CALLIS, J.; TAYLOR, L. P.; WALBOT, V. Electroporation of DNA and RNA into plant protoplasts. *Methods in Enzymology*, v.153, p.351-366, 1987.
- FONTES, E.M.G.; CARVALHO, V.F. Biosafety on genetically modified plants: an overview in Brazil and in the world. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL TOMATO DISEASES, 1., Recife, 1996. *Proceedings*. Alexandria: American Society for Horticultural Science, 1997. p.100-103.
- GAD, A.E.; ROSENBERG, N.; ALTMAN, A. Liposome-mediated gene delivery into plant cells. *Physiologia Plantarum*, v.79, n.1, p.177-183, 1990.
- GELVIN, S.B. Multigene plant transformation: More is better! *Nature Biotechnology*, v.16, n.10, p.1009-1010, 1998.
- GRABOV, A.; LEUNG, J.; GIRAUDAT, J.; BLATT, M.R. Alterations of anion channel kinetics in wild-type and abi1-1 transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. *The Plant Journal*, v.12, n.1, p.203-214, 1997.
- GRIERSON, D.; FRAY, R.G.; HAMILTON, A.J.; SMITH, C.J.S.; WATSON, C.F. Does co-suppression of sense genes in transgenic plants involve antisense RNA? *Trends in Biotechnology*, v.9, n.4, p.122-123, 1991.
- HAMILTON, C.M.; FRARY, A.; LEWIS, C.; TANKSLEY, S.D. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences/USA*, v.93, n.18, p.9975-9979, 1996.
- HANSEN, G.; CHILTON, M.D. "Agrolistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated in planta. *Proceedings of the National Academy of Sciences/USA*, v.93, n.25, p.14978-14983, 1996.
- HORSCH, R.B.; FRALEY, R.T.; ROGERS, S.G.; SANDERS, P.R.; LLOYD, A. Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*, v.223, n.4635, p.496-498, 1984.
- INSTRUÇÕES normativas e comunicados da CTNBio. Brasília: CTNBio, 1997. 84p.
- JEFFERSON, R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reports*, v.5, n.7, p.387-405, 1987.

- JENES, B.; MOORE, H.; CAO, J.; ZHANG, W.; WU, R. Techniques for gene transfer. In: KUNG, S.; WU, R. (Ed.) **Transgenic plants**. New York: Academic Press, 1993. cap.4, p.125-146.
- JOHN, M.E.; KELLER, G. Metabolic pathway engineering in cotton: Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences/USA**, v.93, n.23, p.12768-12773, 1996.
- KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R.; SANFORD, J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, v.327, n.6117, p.70-73, 1987.
- KOSUGI, S.; OHASHI, Y.; NAKAJIMA, K.; ARAI, Y. An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. **Plant Science**, v.70, n.1, p.133-140, 1990.
- LEE, H.S.; HUANG, S.; KAO, T.H. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. **Nature**, v.367, n.6463, p.560-563, 1994.
- LIN, C.; AHMAD, M.; GORDON, D.; CASHMORE, A.R. Expression of a *Arabidopsis* cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A and green light. **Proceedings of the National Academy of Sciences/USA**, v.92, n.18, p.8423-8427, 1995a.
- LIN, C.; ROBERTSON, D.E.; AHMAD, M.; RAIBEKAS, A.A.; JORNS, M.S.; DUTTON, P.L.; CASHMORE, A.R. Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY 1. **Science**, v.269, n.5226, p.968-970, 1995b.
- MA, J.K.-C.; HEIN, M.B. Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants. **Trends in Biotechnology**, v.13, n.12, p.522-527, 1995.
- MATZKE, M.A.; MATZKE, A.J. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: what does it really tell us? **Trends in Genetics**, v.11, n.1, p.1-3, 1995a.
- MATZKE, M. A.; MATZKE, A.J. How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? **Plant Physiology**, v.107, n.3, p.679-685, 1995b.
- MEYER, P.; HEIDMANN, I. Epigenetic variants of a transgenic petunia line show hypermethylation in transgene DNA: an indication for specific recognition of foreign DNA in transgenic plants. **Molecular and General Genetics**, v.243, n.4, p.390-399, 1994.
- MEYER, P. Homology-dependent gene silencing in plants. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.4, p.23-48, 1996.
- MEYER, P.; LINN, F.; HEIDMANN, I.; MEYER, H.Z.A.; NIEDENHOF, I.; SAEDLER, H. Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. **Molecular and General Genetics**, v.231, n.3, p.345-352, 1992.
- MOL, J.; VAN BLOKLAND, R.; KOOTER, J. More about co-suppression. **Trends in Biotechnology**, v.9, n.6, p.182-183, 1991.
- MORIKAWA, H.; IIDA, A.; YAMADA, Y. Transient expression in plant cells and tissues obtained by a simple biolistic device (particle-gun). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.31, n.3, p.320-322, 1989.
- MURATA, M.; HESLOP-HARRISON, J.S.; MOTOYOSHI, F. Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones. **The Plant Journal**, v.12, n.1, p.31-38, 1997.
- NAM, J.; MATTHYSSE, A.G.; GELVIN, S.B. Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. **The Plant Cell**, v.9, n.3, p.317-333, 1997.
- NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, v.2, n.4, p.279-289, 1990.
- NAWRATH, C.; POIRIER, Y.; SOMERVILLE, C. Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthesis pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences/USA**, v.91, n.26, p.12760-12764, 1994.
- NEGRUTIU, I.; DEWULF, J.; PIETRZAK, M.; BOTTERMAN, J.; RIETVELD, E. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. II. Transient expression versus stable transformation: analysis of parameters influencing gene expression levels and transformation efficiency. **Physiologia Plantarum**, v.79, n.1, p.197-205, 1990.
- NEUHAUS, G.; SPANGENBERG, G. Plant transformation by microinjection techniques. **Physiologia Plantarum**, v.79, n.1, p.213-217, 1990.
- NEUHUBER, F.; PARK, Y. D.; MATZKE, A. J. M.; MATZKE, M. A. Susceptibility of transgene loci to homology-dependent gene silencing. **Molecular and General Genetics**, v.244, n.3, p.230-241, 1994.
- NI, M.; CUI, D.; EINSTEIN, J.; NARASIMHULU, S.; VERGARA, C.E.; GELVIN, S.E. Strength and tissue specificity of chimeric promoters derived from the octopine and mannopine synthase genes. **The Plant Journal**, v.7, n.4, p.661-676, 1995.
- NIEDZ, R.P.; SUSSMAN, M R.; SATTERLEE, J.S. Green fluorescent protein: an *in vivo* reporter of plant gene expression. **Plant Cell Reports**, v.14, n.7, p.403-406, 1995.
- PARK, Y.D.; PAPP, I.; MOSCONE, E.A.; IGLESIAS, V.A.; VAUCHERET, H.; MATZKE, A.J.M.; MATZKE, M.A. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. **The Plant Journal**, v.9, n.2, p.183-194, 1996.

- POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.42, p.205-225, 1991.
- POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessments and perspectives. **Physiologia Plantarum**, v.79, n.1, p.125-134, 1990.
- RAO, K.V. Transient gene expression in electroporated immature embryos of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology**, v.147, n.1, p.71-74, 1995.
- RENCKENS, S.; DE GREVE, H.; VAN MONTAGU, M.; HERNALSTEENS, J.P. Petunia plants escape from negative selection against a transgene by silencing the foreign DNA via methylation. **Molecular and General Genetics**, v.233, n.1/2, p.53-64, 1992.
- ROBSON, P.R.H.; MCCORMAC, A.C.; IRVINE, A.S.; SMITH, H. Genetic engineering of harvest index in tobacco through overexpression of a phytochrome gene. **Nature Biotechnology**, v.14, n.8, p.995-998, 1996.
- ROSSO, M.N.; ABAD, P. Des anticorps pour soigner les plantes. **La Recherche**, v.288, n.6, p.34-36, 1996.
- RUGH, C.L.; WILDE, H.D.; STACK, N.M.; THOMPSON, D.M.; SUMMERS, A.O.; MEAGHER, R.B. Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *mer A* gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences/USA**, v.93, n.8, p.3182-3187, 1996.
- SANFORD, J. The biolistic process. **Trends in Biotechnology**, v.6, n.12, p.299-302, 1988.
- SANFORD, J.C.; SMITH, F.D.; RUSSEL, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzymology**, v.217, p.483-509, 1993.
- SCHEIBLE, W.R.; LAUERER, M.; SCHULZE, E.D.; CABOCHE, M.; STITT, M. Accumulation of nitrate in shoots acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. **The Plant Journal**, v.11, n.4, p.671-692, 1997.
- SHEEN, J.; HWANG, S.; NIWA, Y.; KOBAYASHI, H.; GALBRAITH, D.W. Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. **The Plant Journal**, v.8, n.5, p.777-784, 1995.
- SHEN, W.H.; HOHN, B. Amplification and expression of the β -glucuronidase gene in maize plants by vectors based on maize streak virus. **The Plant Journal**, v.5, n.2, p.227-236, 1994.
- SHENG, J.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **The Plant Cell**, v.8, n.10, p.1699-1710, 1996.
- SHILLITO, R.D.; POTRYKUS, I. Direct gene transfer to protoplasts of dicotyledonous and monocotyledonous plants by a number of methods, including electroporation. **Methods in Enzymology**, v.153, p.313-336, 1987.
- SILVERSTONE, A.L.; CHANG, C.W.; KROL, E.; SUN, T.P. Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene *GA1* in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.12, n.1, p.9-20, 1997.
- SPIKER, S.; WILLIAM, F. Nuclear matrix attachment regions and transgene expression in plants. **Plant Physiology**, v.110, n.1, p.15-21, 1996.
- STAM, M.; MOL, J.N.M.; KOOTER, J.M. The silence of genes in transgenic plants. **Annals of Botany**, v.79, n.1, p.3-12, 1997.
- STRITTMATTER, G.; JANSSENS, J.; OPSOMER, C.; BOTTERMAN, J. Inhibition of fungal disease development by engineering controlled cell death. **Bio/Technology**, v.13, n.10, p.1085-1089, 1995.
- TAYLOR, C.B. Promoter fusion analysis: an insufficient measure of gene expression. **The Plant Cell**, v.9, n.3, p.273-275, 1997.
- TEFTER, D. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. **Physiologia Plantarum**, v.79, n.1, p.140-146, 1990.
- THIERRY, D.; VAUCHERET, H. Sequence homology requirements for transcriptional silencing of 35S transgenes and post-transcriptional silencing of nitrite reductase (trans)genes by the tobacco 271 locus. **Plant Molecular Biology**, v.32, n.6, p.1075-1083, 1996.
- VAIN, P.; WORLAND, B.; KOHLI, A.; SNAPE, J.W.; CHRISTOU, P. The green fluorescent protein (GFP) as a vital marker in rice transformation. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, n.2, p.164-169, 1998.
- VAN DER KROL, A.R.; MUR, L.A.; BELD, M.; MOL, J.N.M.; STUITJE, A.R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **The Plant Cell**, v.2, n.4, p.291-299, 1990.
- VILLEMONT, E.; DUBOIS, F.; SANGWAN, R.S.; VASSEUR, G.; BOURGEOIS, Y.; SANGWAN-NORREEL, B.S. Role of host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. **Planta**, v.201, n.2, p.160-172, 1997.
- XU, X.; LI, B. Fertile transgenic Indica rice plants obtained by electroporation of the seed embryo cells. **Plant Cell Reports**, v.13, n.3/4, p.237-242, 1994.
- ZUPAN, J.R.; ZAMBRYSKI, P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. **Plant Physiology**, v.107, n.4, p.1041-1047, 1995.

Recebido para publicação em 25.01.99

Aceito para publicação em 25.02.99