**OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA SAAT (“SONICATION-ASSISTED
Agrobacterium-MEDIATED TRANSFORMATION”) PARA
TRANSFORMAÇÃO DE *Phaseolus vulgaris*.**

SOLANGE ROCHA MONTEIRO DE ANDRADE

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Tese apresentada à Escola
Superior de Agricultura “Luiz de
Queiroz, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro - 2001

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

Andrade, Solange Rocha Monteiro de
Otimização da técnica SAAT ("Sonication-Assisted *Agrobacterium*-Mediated Transformation") para transformação de *Phaseolus vulgaris* / Solange Rocha Monteiro de Andrade. - Piracicaba, 2001.
102 p. : il. -

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Bactéria fitopatogênica 2. Explante vegetal 3. Feijão 4. Transformação genética I.
Título

CDD 635.652

ERRATA

Página: Linha, Tabela ou Figura	Onde se lê:	Leia-se:
Agradecimentos		Ao Núcleo de Microscopia Eletrônica (NAP-MEPA), por permitir o desenvolvimento das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura, em especial ao Prof. Dr. Breno Leite pelas valiosas sugestões.
Agradecimentos, linha 18	... Departamento de Botânica...	... Departamento de Ciências Biológicas...
Página 3, linha 23	...foram obtidas plantas transgênicas de e soja...	... foram obtidas plantas transgênicas de soja...
Página 6, linha 10	... principalmente na América latina e no África...	... principalmente na América Latina e na África...
Página 18, linha 11	... quando relataram o transferência genética...	... quando relataram a transferência genética...
Página 23, linha 9	... meristemas apicais de sementes maduras...	... meristemas apicais de embriões provenientes de sementes maduras...
Página 28, linha 7	... Sementes de feijão...	... Sementes maduras de feijão...
Página 30, Figura 01	... 50.35...	...50.35 kb....
Página 30, Figura 01, legenda	... (25S-IG-NOS)	... (35S-IG-NOS)
Página 31, linha 16	... geneticina (5, 10, 20, mg/L)	... geneticina (10, 25, 50, 100 mg/L)...
Página 37, linha 9	... (geneticina 10 ml/L e...	... (geneticina 10 mg/L e...
Página 41	...o gene quimérico <i>Lhcb1*2</i> foi introduzido na ...	...o gene quimérico <i>Lhcb1*2</i> , gentilmente cedido pelo Dr. Kenton Ko (Queen's University, Canadá)...
Página 42, linha 10	... 1,5 μ M de $MgCl_2$...	... 1,5 mM de $MgCl_2$...
Página 43, Tabela 5	... $\pm$ 500 pb...	... 480 pb... .
Página 44, linha 7	... nos experimentos de crescimento do feijoeiro...	... nos experimentos de transformação do feijoeiro...
Página 50, linha 11	... de feijão (Tabela 2)...	... de feijão (Tabela 7)...
Página 70, linha 17	... Na figura 14, é possível...	... Na figura 15, é possível...
Página 70, Linha 25	... do tecido vegetal (Figura 14).	... do tecido vegetal (Figura 15).
Página 73, legenda		... (barra = 74 μ m)
Página 74, legenda		... (barra = 7,5 μ m)
Página 76, linha 11	... Os brotos recém formados se originam...	... As gemas axilares se originam...
Página 81, linha 16	... exposição do interior das células à <i>Agrobacterium</i> ...	... exposição das células internas à <i>Agrobacterium</i> ...
Página 88, linha 10	... p.179-180. 1993.	p. 179-180. 1983.

**Dedico este trabalho aos meus pais, por todo amor,
carinho e apoio que me dispensaram durante todos os
passos desta minha jornada.**

Agradecimentos

- À Deus, por me dar o Dom da vida para que eu possa ter a alegria de crescer e aprender durante a minha caminhada.
- Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, pela orientação e apoio na execução deste trabalho.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida e pelo financiamento deste projeto.
- A EMBRAPA-Cerrados por ter permitido o término desta tese
- Ao Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- ESALQ, pela oportunidade concedida para a realização do curso.
- Aos Professores do Departamento de Genética da ESALQ, pelos ensinamentos no decorrer do curso.
- À Dra. Mônica T.V. Labate, pela amizade, auxílio na execução deste trabalho e, principalmente, pela paciência manifestada.
- Ao técnico, José Carmezim, pela ajuda, amizade e constante bom humor.
- A Sra. Palmira Cogo pela amizade, carinho e por manter nossa bancada sempre organizada.
- À Profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória, pela acolhida no Laboratório de Microscopia do Departamento de Botânica, e pela amizade e sugestões concedidas para a realização do trabalho.
- À técnica Marly K.M. Soares do Departamento de Botânica pela ajuda no desenvolvimento das técnicas de microscopia.
- Aos colegas de laboratório, Luciana R. C. Pinto, Esteban R. Gonzalez, Alejandro Toro, Gisele Lacerda, Valéria Franco, Guillermo Salvatierra, Alexander Andrade, Daniele G. Gomes, Marcelo Romano, Raqueline,

Raphael e Ana Letícia pela convivência agradável e pela constante troca de informações.

- A aluna de graduação Danielle G. Gomes, pela amizade, alegria e ajuda na execução deste trabalho.
- Ao Prof. Heyder Diniz da Silva, pela amizade, carinho e principalmente, pelas análises estatísticas.
- Aos amigos do Departamento de Genética e de outros Departamentos da ESALQ em especial, Elaine Souza, Salete Gaziole, Gilberto Yokomizo, Luciana Ribeiro, Cláudio Tsutsumi, Chirlei Glienke, Leonardo Rosse, Antônio Ismael Cardoso, Luciana R. Costa Pinto, Rogério C. Pinto, Dario R. Mesquita, Ângela C.A. Lopes, Alexandre Coelho, Derly H. Silva, Alexandre Florindo, Alexandre Xavier e Alexandre Sene pela amizade e carinho durante este período.
- Às bibliotecárias Silvana Marchizelli, Aparecida Elizabeth S. Silva e Silvana C. N. Oliveira, pela amizade e préstimos gentilmente concedidos no decorrer do curso.
- A todos funcionários de Departamento de Genética pela amizade e atenção gentilmente cedida.
- A todos que de uma forma ou outra tenha contribuído para esta tese, e que por injustiça eu tenha esquecido de agradecer.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Importância da cultura do feijoeiro	5
2.2. Melhoramento do feijoeiro	8
2.3. Transformação genética de plantas	13
2.3.1. Eletroporação	14
2.3.2. Biobalística	15
2.3.3. Transformação via <i>Agrobacterium</i>	18
2.4. Transformação do feijoeiro	22
2.5 “Sonication-assited <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation” (SAAT)	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Material vegetal	28
3.2. Explantes vegetais	28
3.3. Linhagem de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
3.4. Aparelho de sonicação	30
3.5. Transformação por SAAT	31
3.5.1. Experimentos pi lotosde transformação por SAAT	31
3.5.1.1. Sobrevivência dos explantes em meio contendo antibióticos	31
3.5.1.2. Efeito do pré-tratamento na eficiência de transformação	32
3.5.1.3. Teste da eficiência de transformação por SAAT	32
3.5.1.4. Teste de expressão estável	34
3.5.2. Desenvolvimento do protocolo de transformação por SAAT	34
3.5.2.1. Efeito do tempo de co-cultivo	34
3.5.2.2. Efeito da acetoceringona	35
3.5.2.3. Efeito do tempo de sonicação – Expressão transitória	36
3.5.2.4. Efeito do tempo de sonicação – Expressão estável	37
3.5.2.5. Efeito da pré-incubação	37
3.5.2.6. Análise estatística	38
3.6. Análises de microscopia	38
3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura	38
3.6.2. Microscopia óptica	39
3.7. Transformação de <i>Phaseolus vulgaris</i> via SAAT	39
3.7.1. Transformação com o gene <i>uidA</i>	39
3.7.2. Transformação com <i>Lhcb1*2</i>	40

3.7.2.2. Vetor de transformação pENDK4: <i>Lhcb1*2</i>	41
3.7.2.2. Identificação dos transformantes por PCR	42
4. Resultados e Discussão	44
4.1. Experimentos pilotos de transformação por SAAT	44
4.1.1. Teste de resposta aos antibióticos	44
4.1.2. Teste para eficiência do pré-tratamento em meio de multibrotação	46
4.1.3. Teste da eficiência de transformação por SAAT	49
4.1.4. Teste de expressão estável	51
4.2. Desenvolvimento do protocolo de transformação por SAAT	55
4.2.1. Efeito do tempo de co-cultivo	55
4.2.2. Efeito da acetoceringona	58
4.2.3. Efeito da pré-incubação	62
4.2.4. Efeito do tempo de sonicação na expressão transitória da β - glucoronidase.....	64
4.2.5. Efeito do tempo de sonicação na expressão estável da β - glucoronidase	67
4.3. Análises de microscopia	70
4.3.1 Microscopia varredura e óptica	70
4.6. Transformação de <i>Phaseolus vulgaris</i> via SAAT	76
4.6.1. Transformação com o gene <i>uidA</i>	76
4.6.2. Transformação com <i>Lhcb1*2</i>	78
5. Conclusões	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXOS	98

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Mapa do vetor binário pTOK233 (Ishida et al., 1996) contendo o inserto dos gene quiméricos <i>uidA</i> (35S-IG-NOS) e <i>nptII</i> (NOS-NPT-NOS)	30
2. Mapa do vetor binário pENDKA (Kloe et al., 1985) contendo o inserto do genes quimérico <i>Lhcb1*2</i> (35ScaMV-TPRBCS- <i>Lhcb1*2</i>)	42
3. Posição de hibridização dos primers com o gene quimérico <i>Lhcb1*2</i> , para amplificação por PCR	43
4. Explantes de feijão cv. Olathe Pinto submetidos ao teste de sobrevivência à geneticina (Gen) ou à canamicina (Kan), após 30 dias de exposição ao agente seletivo.	46
5. Atividade da β -glucoronidase em folhas de <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Olathe Pinto, após 30 dias de inoculação e 12 de pré-tratamento.	53
6. Broto transgênico de <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Olathe Pinto, após 30 dias de inoculação e 14 dias de pré-tratamento.	54
7. Broto transgênico de <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Olathe Pinto após 15 dias de inoculação e 10 dias de pré-tratamento.	54
8. Efeito do tempo de co-cultivo na expressão transitória de explantes de feijão cv. Olathe Pinto. Tratamento 1= 15 minutos em meio líquido e 24 horas em meio sólido; 2= 15 minutos em meio líquido e 48 horas em meio sólido; 3= 15 minutos em meio líquido e 72 horas em meio sólido; 4= 2 horas em meio líquido e 24 horas em meio sólido; 5= 2 horas em meio líquido e 48 horas em meio sólido; 6= 2 horas em meio líquido e 24 horas em meio sólido; 7= 24 horas em meio líquido e 24 horas em meio sólido; 8= 24 horas em meio líquido e 48 horas em meio sólido; 9= 24 horas em meio e 72 horas em meio sólido. Média de 3 repetições.	57
9. Efeito da acetoceringona na expressão transitória de explantes de feijão cv. Olathe Pinto. Tratamento 1= 2 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; 2= 2 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona; 3= 2 horas de co-cultivo líquido, com	

acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; 4= 2 horas de co-cultivo líquido, com acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona; 5= 24 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; 6= 24 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona; 7= 24 horas de co-cultivo líquido, com acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; 8= 24 horas de co-cultivo líquido, com acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona.	60
10. Atividade da β -glucoronidase em explantes de feijão cv. Olathe Pinto com 12 dias de pré-tratamento em meio de multibrotação. Tratamento 1= 2 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; 2= 2 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona; 3= 2 horas de co-cultivo líquido, com acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; 4= 2 horas de co-cultivo líquido, com acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona; 5= 24 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; 6= 24 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona; 7= 24 horas de co-cultivo líquido, com acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; 8= 24 horas de co-cultivo líquido, com acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona.	61
11. Efeito da pré-incubação na expressão transitória de explantes de feijão cv. Olathe Pinto. Tratamento 1= 0 segundos de pré-sonicação e 30 Segundos de SAAT; 2= 0 segundos de pré-sonicação e 60 segundos de SAAT; 3= 30 segundos de pré-sonicação e 30 segundos de SAAT; 4= 30 segundos de pré-sonicação e 60 segundos de SAAT; 5= 60 segundos de pré-sonicação e 30 segundos de SAAT; 6= 60 segundos de pré-sonicação e 60 segundos de SAAT.	63

12. Efeito do tempo de sonicação na expressão transitória de explantes de feijão cv. Olathe Pinto. Tratamento 1= sem sonicação; 2= 2 segundos; 3= 4 segundos; 4= 10 segundos; 5= 30 segundos; 6= 60 segundos. Média de 3 repetições.	65
13. Atividade da β -glucoronidase nos tecidos de feijão cv. Olathe Pinto sonificados em diferentes períodos de tempo. Tratamento A= 0 segundos; B= 2 segundos; C= 4 segundos; D= 10 segundos; E= 30 segundos; F= 60 segundos.	66
14. Efeito do tempo de sonicação na expressão estável do gene <i>uidA</i> . (♦) Dados observados; () Dados estimados.	68
15. Análise da superfície dos primórdios foliares de explante de feijoeiro ao microscópio de varredura, 14 dias após pré-tratamento em meio de multibrotação. A= não sonificado, inoculado (barra = 5 μ m); B= sonificado 60 segundos, inoculado (barra = 5 μ m), seta indica a microfissura e invasão da <i>Agrobacterium</i>	72
16. Cortes longitudinais do ápice caulinar de feijoeiro (<i>P.vulgaris</i> L.) pré-tratado por 14 dias em meio de multibrotação. A= controle, não sonificado, inoculado; B= sonificado 60 segundos, inoculado.	73
17. Detalhe do meristema apical caulinar do explante sonificado por 60 segundos em conjunto com <i>Agrobacterium</i> . A seta indica a presença da <i>Agrobacterium</i> na região do domo meristemático.	74
18. Cortes transversais de primórdios foliares do explante. A= controle, não sonificado, inoculado (barra = 19 μ m); B= sonificado por 60 segundos e inoculado, no qual observam-se células epidérmicas e subepidérmicas rompidas e apresentando <i>Agrobacterium</i> no seu interior (barra= 7,5 μ m).	75
19. Explantes de feijão cv. Olathe Pinto submetido à SAAT por 30 segundos, mantidos por 30 dias em meio seletivo contendo 20 mg/L de geneticina.	77

20. Explantes de feijão cv. Olathe Pinto submetidos à SAAT por 60 segundos, mantidos 30 dias em meio seletivo contendo 20 mg/L de geneticina.	77
21. Explantes de feijão cv. Olathe Pinto submetidos à SAAT por 60 segundos, mantidos 30 dias em meio seletivo contendo 20 mg/L de geneticina.	78
22. Transformação de feijoeiro cv. Olathe Pinto. Análise de PCR para o gene <i>Lhcb1*2</i> . Amostra 1= controle dos componentes da reação, sem DNA; 2= controle negativo (Feijoeiro selvagem); 3 a 34= transformantes putativos; 35= controle positivo (tabaco cab). Setas apontam região de amplificação do gene por PCR, na altura de 500 pb.	80

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Descrição dos tratamentos para estudo do efeito da SAAT em explantes de feijoeiro cv. Olathe Pinto.	33
2. Descrição dos tratamentos utilizados no estudo do tempo de co-cultivo em meio líquido e sólido (min= minuto; h= horas).	35
3. Descrição dos tratamentos utilizados nos experimentos da acetoceringona (20mg/L).	36
4. Descrição dos tratamentos para estudos do efeito da pré-incubação. s= segundos.	38
5. Conjunto de primers utilizados para amplificação por PCR.	43
6. Efeito do pré-tratamento dos embriões na eficiência de transformação de células de feijoeiro cv. Olathe Pinto por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Tempo de sonicação= 2 segundos.	49
7. Efeito da sonicação na eficiência de transformação de plântulas de feijoeiro cv. Olathe Pinto via <i>Agrobacterium</i>	51
8. Atividade da β -glucoronidase em explantes de feijoeiro cv. Olathe Pinto pré-tratados em meio de multibrotação. Resultados expressos em porcentagem (total de explantes apresentando atividade β -glucoronidase/total de explantes inoculados).	52
9. Resumo da análise estatística baseada no modelo generalizado (Nelder & Wededlburn, 1972) para co-cultivo.	56
10. Desdobramento da interação líquido/sólido.	57
11. Resumo da análise estatística baseada no modelo generalizado (Nelder & Wededlburn, 1972) para efeito da acetoceringona.	59
12. Média dos resultados em função da presença ou ausência de acetoceringona no meio líquido ou sólido.	59

13. Resumo da análise estatística baseada no modelo generalizado (Nelder & Wededlburn, 1972) para pré-incubação.	63
14. Desdobramento da interação pré-incubação vs SAAT.	63
15. Resumo da análise estatística baseada no modelo generalizado (Nelder & Wededlburn, 1972).	65
16. Contraste entre os tempos de sonicação.	66
17. Análise dos parâmetros estimados (Nelder & Wededlburn, 1972).	68
18. Resumo da análise estatística baseada no modelo generalizado (Nelder & Wededlburn, 1972) para na expressão estável.	68

OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO SAAT ("SONICATION-ASSISTED AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION) PARA TRANSFORMAÇÃO DE *PHASEOLUS VULGARIS* L.

Autora: SOLANGE ROCHA MONTEIRO DE ANDRADE

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO LABATE

RESUMO

Phaseolus vulgaris L. era considerado recalcitrante à transformação por *Agrobacterium*. Entretanto, alterações no meio de co-cultivo, utilização de linhagens hipervirulentas de *Agrobacterium* e de vetores binários contendo genes *vir* demonstraram que o feijoeiro é susceptível à *Agrobacterium*. No entanto, ainda não foram obtidas plantas transgênicas de feijoeiro por meio deste método. Em 1997, Trick & Finer descreveram a metodologia SAAT ("Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation"). Esta técnica consiste em produzir microferimentos no explante através da sonicação por curtos períodos de tempo na presença do *Agrobacterium*. Por meio deste método foram obtidas plantas transgênicas de soja e trigo. O objetivo do presente trabalho foi ajustar a metodologia SAAT para a transformação de *P. vulgaris*. A variedade de feijoeiro utilizada foi a Olathe Pinto, a linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* foi LBA4404:pTOK. Foram estudados o efeito do pré-tratamento, tempo de co-cultivo, duração do SAAT e presença de acetoceringona. Os resultados demonstram que a expressão transitória e estável da β -glucoronidase foi maior quando os eixos embrionários foram pré-tratados por 10 a 14 dias em meio de multibrotação. O antibiótico geneticina (G418) apresentou maior capacidade de seleção de brotos do que canamicina, nas concentrações estudadas. SAAT de 60 segundos dos explantes apresenta melhor expressão transitória e estável da β -glucoronidase. O tempo de co-cultivo líquido de 2 horas seguido de 48 horas em meio sólido, na ausência de

acetoceringona, apresentou a maior expressão transitória. A presença de acetoceringona (20 mg/l) aumentou a expressão transitória. Pré-incubação por 24 horas não aumentou a eficiência do tratamento SAAT. As análises de microscopia óptica e de varredura demonstraram a presença de rupturas na epiderme, quebras da parede celular e invasão do *Agrobacterium* nos tecidos subepidérmicos. Os resultados demonstraram que o método SAAT é uma técnica viável para a transformação de *P. vulgaris* via *Agrobacterium*.

OPTIMIZATION OF SAAT (SONICATION-ASSITED *AGROBACTERIUM*- MEDIATED TRANSFORMATION) TECHNIQUE TO TRANSFORM *PHASEOLUS VULGARIS* L.

Author: SOLANGE ROCHA MONTEIRO DE ANDRADE

Adviser: DR. CARLOS ALBERTO LABATE

SUMMARY

Common bean was considered recalcitrant to *Agrobacterium*-mediated transformation. After some studies with co-cultivation medium, pre-treatment of explants, hypervirulent *Agrobacterium* strains and binary vectors with *vir* genes, it has been reported the susceptibility of *Phaseolus vulgaris* to some *Agrobacterium* strains. However, still no transgenic bean has been reported using this method. The *Agrobacterium*-mediated transformation of *P. vulgaris* presents several problems, such as the interaction *Agrobacterium*-host, explant maturity, pre-culture conditions, co-cultivation medium, and selection strategies. The technique SAAT consists to produce microwounds of the explant through sonication during short period of time in presence of *Agrobacterium*. Using this method Trick & Finer (1997; 1998) obtained transgenic wheat and soybean. The objective of the present work is to adjust the SAAT method to transform common bean. The bean variety used was Olathe Pinto, and *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404:pTOK. Transient and stable transformation increased when mature embryos were pre-treated during 10 to 14 days in cytokinin-induced shoot organogenesis medium. Geneticin (G418) was observed to be better than kanamycin to select shoots. SAAT duration effect on transient and stable transformation shown, in both experiments, that 60 seconds presents the best results. Co-cultivation conditions, without acetosyringone, of 2 hours in liquid medium followed by 48 hours in solid medium presented the higher transient expression. Acetosyringone (20 mg/L) increases transient

expression and pre-incubation for 24 hours didn't increase SAAT efficiency. Scanning and optical microscopy demonstrated that sonication produces microwounds in the explant epidermal surface, cell wall break and *Agrobacterium* invasion of subepidermal tissue. Results shown that SAAT is a promising method to transform *P. vulgaris*.

1 Introdução

O feijoeiro é uma das culturas mais diversificadas em termos de seus métodos de cultivo, seu uso, ambientes para os quais foi adaptado, e sua variabilidade morfológica. Encontrado em várias altitudes desde o nível do mar até 3000 m, pode ser cultivado em monocultura, em associação, ou em rotações. É considerado pelos nutricionistas, um alimento praticamente perfeito, pois possui alto conteúdo protéico e calórico, além de ser fonte de fibras e sais minerais. O grão maduro, a semente imatura, ou as vagens podem ser utilizados na alimentação. Em geral a colheita ocorre cerca de dois meses após o plantio permitindo a alternância com outras culturas. O hábito de crescimento, arbustivo ou trepador, oferece competição mínima em consórcio com outras espécies, como por exemplo, milho, cana de açúcar, ou mesmo em projetos de reflorestamento, ou entre frutíferas ou plantações de café, dos quais não se obtém renda nos primeiros anos.

Em 1998, o consumo médio per capita era de 11 quilos por pessoa por ano, dependendo do país e do nível econômico do consumidor (CIAT, 2000). Dentro da categoria de grãos básicos, o feijoeiro é a segunda cultura em área plantada, após o milho (Viana, 1998). A produção mundial total excede 12 milhões de toneladas, das quais cerca de 7 milhões são produzidas na América Latina e África. Apesar de todos os fatores descritos, o feijoeiro ainda é cultivado principalmente por pequenos agricultores com o propósito de subsistência e, freqüentemente, em sistemas consorciados, principalmente com o milho.

Com exceção da Argentina, onde a cultura é produzida em grandes propriedades e com sistemas de produção modernos, na América Latina normalmente é cultivado por pequenos proprietários de terras. Entretanto, em alguns locais, o feijoeiro está mudando de “*status*” e lugar, isto é, está deixando de ser uma lavoura de subsistência para transformar-se numa cultura tecnificada, com plantações irrigadas e colheitas semi-mecanizadas. Apesar disto alguns fatores ainda desestimulam a exploração do feijoeiro por grandes produtores, principalmente o risco econômico devido à baixa resistência a doenças, insetos, deficiências nutricionais, pouca tolerância à seca, baixa produtividade e estabilidade (Schoonhoven & Voyset, 1993; Aragão et al., 1996). Assim, o direcionamento de programas de melhoramento do feijoeiro, no sentido de aumentar o seu potencial produtivo, tanto para culturas tecnificadas como consorciadas e de subsistência, é altamente desejável. Entre as ferramentas com alto potencial para acelerar o processo de melhoramento convencional, está a transformação genética. Por meio desta é possível a introdução de genes próprios da espécie ou de outras espécies, com o intuito de aumentar a resistência a doenças e pragas, e a qualidade nutricional, e outras características de interesse.

Phaseolus vulgaris, bem como várias outras espécies de leguminosas, apresentava inúmeras dificuldades para a transformação genética. Estas variavam desde a introdução do gene até a regeneração e cultura de tecidos, passando por problemas de reprodutibilidade, aplicabilidade a todas as variedades, além da baixa eficiência de transformação (Nagl et al., 1997). A utilização do meristema apical de embriões maduros como tecido alvo para o processo de transformação e o desenvolvimento de técnicas de regeneração permitiu a obtenção de plantas transgênicas de feijoeiro através da biobalística (Aragão et al., 1996). Entretanto, esta técnica possui a desvantagem de ter eficiência de transformação (1%), longe do ideal para projetos aplicados, além de, em geral, permitir a introdução de mais de uma cópia do gene de interesse.

A transformação por *Agrobacterium* possui a vantagem de introduzir um menor número de cópias do gene, em geral, uma a duas cópias (Hansen & Chilton, 1996; Block, 1993), e de integrá-lo mais facilmente ao genoma da planta, porém algumas espécies são consideradas resistentes à transformação por essa via, principalmente as leguminosas e monocotiledôneas (Godwin et al., 1992). Trabalhos recentes mostram que com a alteração do meio de cultivo e das condições de co-cultivo, associado ao uso de indutores dos genes *vir*, e a modificações dos vetores de transformação pode-se transformar espécies consideradas recalcitrantes. O avanço dessas técnicas tem permitido a transformação transitória do feijoeiro mediada por *Agrobacterium*, entretanto até o presente momento, nenhum método de transformação estável foi descrito.

Em 1997, Trick & Finer descreveram um método de transformação genética utilizando *Agrobacterium* associado com sonicação - SAAT ("Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation). Neste sistema o explante é sonicado por curto período de tempo na presença de *Agrobacterium*. A sonicação produz uma série de microferimentos que variam de 1 µm até 1 mm, e que permitem a colonização dos tecidos internos e, conseqüentemente, aumentando a eficiência do processo de transformação (Santarém et al., 1998). Este sistema tem o potencial de transformar o tecido meristemático encontrado sob várias camadas de células. Através de SAAT foi possível aumentar a eficiência de transformação transitória de diferentes tecidos vegetais, como folhas, cotilédones imaturos, embriões somáticos e zigóticos, ápices caulinares, entre outros. Também já foram obtidas plantas transgênicas de e soja (Trick & Finer, 1998; Santarém et al., 1998). Esta técnica pode ser utilizada para obter transformação genética de outras espécies consideradas recalcitrantes a transformação por *Agrobacterium*.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo de transformação de *Phaseolus vulgaris* via SAAT, com o intuito no futuro de obtermos plantas transgênicas de feijoeiro superexpressando o gene *Lhcb1*2*. Este gene codifica para a proteína CAB ("Chlorophyll a/b binding") do tipo I, que

é componente do sistema antena LHCII, associado ao fotossistema II nos tilacóides dos cloroplastos. Plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam esta proteína, apresentam, em baixas condições de luminosidade, um aumento da biomassa, da capacidade fotossintética, e outros efeitos pleiotrópicos (Ko et al., 1992; Real, 1997). A superexpressão desta proteína em plantas de feijão poderá representar uma importante contribuição para aumentar a eficiência de cultivares consorciados.

2 Revisão de Literatura

2.1 Importância do feijão

O feijão é uma cultura de grande valor sócio-econômico em países da América Latina, África e Ásia. Cerca de 83% das proteínas totais da dieta alimentar destes países são de origem vegetal. Atualmente cultivares de leguminosas em grãos são responsáveis por cerca de $\frac{1}{4}$ da dieta protéica no mundo (Nagl et al., 1997). Nutricionistas caracterizam o feijão como um alimento próximo da perfeição, porque além de seu alto conteúdo protéico, possui grande quantidade de fibras, carboidratos complexos, ácido fólico (fonte de vitamina B), ferro, zinco, magnésio e potássio (CIAT, 2000).

Apesar da sua importância nutricional, o feijoeiro é cultivado principalmente por pequenos produtores com o propósito de subsistência. As propriedades, em geral, possuem menos de um hectare, não têm irrigação, e utilizam pouco ou nenhum fertilizante e agroquímicos (CIAT, 2000). Uma grande parte da produção de feijão na América Latina ocorre em fazendas pequenas que variam de 1-10 ha de área, em geral, em terrenos inclinados e de baixa fertilidade (CIAT, 2000).

No Brasil, cerca de 80% da área plantada encontra-se em propriedades menores que 100 hectares (Aragão et al., 1998). No México, calcula-se que 67% da produção é proveniente de fazendas de menos de 5 ha. Até mesmo no Chile, que exporta grande parte de sua produção, o feijoeiro é cultivado por cerca de 50.000 fazendeiros cujas fazendas variam de 2 a 6 ha e um número menor de produtores de médio-tamanho que utilizam de 20 a 30 ha. Em

síntese, mais da metade da produção é proveniente de fazendas menores que 20 ha e mais de 20% em fazendas com menos de 5 ha. Os casos extremos são representados por países como Haiti, Antilhas, e Paraguai, onde a produção está quase exclusivamente nas mãos de famílias de pequenos fazendeiros (CIAT, 2000). Com a predominância do cultivo em pequenas propriedades, o feijoeiro tem grande importância na absorção de mão de obra agrícola, especialmente familiar. Em Minas Gerais, a cultura chega a empregar sete milhões de homens/dia-ciclo de produção envolvendo cerca de 295.000 produtores (Borém & Carneiro, 1998).

A produção de feijão ocorre principalmente na América Latina e no África (Saara), onde $\frac{3}{4}$ da cultura são cultivadas em regiões de encosta, sujeitas à erosão e à baixa fertilidade. Entretanto, a produção do feijão vem, aos poucos, apresentando uma nova dinâmica, isto é, está deixando de ser uma lavoura de subsistência para transformar-se numa cultura tecnificada com plantações irrigadas e semimecanizadas (Santos & Braga, 1998). No México, Brasil, Chile e Cuba, é possível encontrar pequenos, médios e grandes produtores de feijão. Porém, até mesmo no Brasil, onde a agricultura de larga escala tem sido estimulada, somente 4% da área plantada e 15% da produção de feijão são provenientes de sistemas de plantio irrigado (CIAT, 2000).

A produtividade em toda América Latina situa-se bem abaixo do potencial da cultura. A maioria dos países registra médias nacionais entre 500 e 800 kg/ha. Melhorar o rendimento é imperativo. Nicarágua e Colômbia melhoraram as variedades e registraram produtividade mais alta e, conseqüentemente, aumentaram os lucros para os fazendeiros (CIAT, 2000). Nos últimos 10 anos, países da América Central lançaram 29 novos cultivares de feijoeiro melhorados. O aumento em produtividade em função da utilização das novas variedades foi de 205 kg/ha. Informações provenientes dos programas nacionais sugerem que as novas variedades são plantadas em pelo menos 40% da área cultivada com feijoeiro na América Central (CIAT, 2000). O aumento em produtividade resultou em um aumento em produção de 39.400

t/ano, que é suficiente para alimentar 3.283.000 pessoas durante um ano, se considerarmos um consumo médio por pessoa de 12 kg/ano (Viana, 1998).

A produtividade brasileira é muito baixa quando comparada à produtividade de países como EUA, China e Canadá. O rendimento médio da cultura de feijão no Brasil é de, aproximadamente, 550 kg/ha. Essa baixa produtividade é resultante do uso generalizado do cultivo consorciado com outras plantas, muito comum entre os pequenos agricultores (Vieira et al., 1999). O tipo de consórcio depende da região e das espécies disponíveis para associação. Por exemplo, no Norte e Nordeste, o feijão é plantado com algodão; mandioca, cana-de-açúcar, mamona e outras culturas, enquanto no Centro Sul e Sul emprega-se café, cana de açúcar entre outros. Em todo o país, no entanto, a associação com o milho é a mais comum (Medina, 1972; Oliari et al., 1975; Vieira, 1980, 1985; Araújo, 1986, Vieira et al., 1999).

Phaseolus vulgaris é uma espécie muito bem adaptada à condição de cultivo em consórcio. Isto ocorre principalmente devido à redução da taxa respiratória em função da baixa densidade de fluxo radiante, com consequente redução do ponto de compensação luminoso (Lopes, 1988). As plantas submetidas às condições de baixa luminosidade apresentam três mecanismos de adaptação ao estresse de luz, de modo a manter um balanço positivo de carbono, tais como:

1. Redução da taxa respiratória, para a diminuir o ponto de compensação luminoso;
2. Aumento da área foliar, para promover maior superfície de interceptação e absorção de luz;
3. Aumento da taxa fotossintética por unidade de área foliar e por unidade de energia luminosa (Lopes, 1988).

Normalmente, a área foliar do feijoeiro aumenta em função do sombreamento, porém isto não compensa a diminuição da taxa assimilatória, principal fator de redução da produtividade do feijoeiro cultivado em consórcio (Lopes, 1988). No entanto, em monocultivo, com a utilização de alta tecnologia,

tem-se obtido, em parcelas experimentais, mais de 4.000kg/ha de produção. A utilização de técnicas de manejo, irrigação, agricultura mecanizada e cultivo na entressafra refletiu em um aumento sistemático da produtividade brasileira nesta última década (FAOSTAT, 2000). O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão, com consumo per capita de 20,3 kg/ha. Os principais estados produtores são: Paraná, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Goiás. Uma fronteira agrícola que está sendo utilizada para a cultura do feijoeiro é o cerrado. Dentro do quadrilátero formado pelos pólos de Guairá (SP), Jussara (GO), Barreiras (BA) e Paracatu (MG), desenvolveram-se lavouras modernas, plantadas em grandes extensões, e responsáveis pelo abastecimento durante a entressafra, pois utilizam o cultivo irrigado (Santos & Braga, 1998). Embora o cultivo durante a entressafra tenha sido obtido através da utilização de tecnologias de manejo, a exploração do potencial produtivo do feijoeiro ainda exige um melhoramento visando resistência a pragas e doenças, maior produtividade, estabilidade, e adaptação às adversidades ambientais.

2.2 Melhoramento do feijoeiro

O melhoramento do feijoeiro utiliza principalmente a seleção de plantas individuais, dentro do germoplasma dos próprios produtores, seguido de teste de progênie, ou seleção massal (Abreu, 1998). O germoplasma melhorado tem potencialidade de contribuir para todos os sistemas de cultivo, particularmente com o objetivo de aumentar a resistência a doenças, e também a resistência ao estresse abiótico. No Brasil os programas de melhoramento visam, além do aumento da resistência a doenças, o aumento da produção de sementes (Vieira et al., 1999). Entretanto, outros objetivos como a resistência à seca e criação de cultivares mais propensos à colheita mecanizada tem recebido atenção dos melhoristas (Vieira et al., 1999).

O feijoeiro é susceptível a várias doenças. Vieira (1983) listou cerca de 45 dessas produzidas por fungos, bactérias, vírus e nematóides. As mais importantes são o mosaico dourado (VMDF), o crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*), a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) e mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) (Vieira et al., 1999; CIAT, 2000). Estas doenças constituem algumas das principais causas da baixa produtividade no Brasil, sendo que muitas podem causar perda total da produção ou mesmo inviabilizar uma determinada área para plantio (Paula Jr & Zambolim, 1998). Os melhoristas têm trabalhado no sentido de aumentar a resistência a doenças, e estão obtendo sucesso. Entretanto os patógenos podem apresentar raças fisiológicas ou estirpes diferentes, podendo até mesmo, ocorrer o surgimento de novas raças. Estes fatores têm limitado a vida útil dos cultivares e exigido um esforço contínuo dos pesquisadores (Vieira et al., 1999).

As pragas que prejudicam o feijoeiro são várias, e podem afetar a produção antes ou após a colheita. Existe uma diversidade de espécies que se nutrem do feijoeiro, tornando a planta completamente susceptível. Os insetos atacam desde a planta em desenvolvimento até folhas, caules, raízes e vagens, além da semente armazenada. Entretanto, poucas espécies são de importância econômica, como por exemplo: cigarrinha verde, carunchos, crisomelídeos, lagarta-rosca, lagarta-elasma e mosca branca (Yokoyama, 1998; Vieira et al., 1999). As estimativas de perdas causadas pelas pragas são raras e antigas, variando de 33 a 86%, segundo Aruba (1960) e CIAT (1975) citados por Yokoyama (1998). São poucos os programas de melhoramento visando a criação de cultivares resistentes ou tolerantes a pragas. Os principais alvos de estudo são a cigarrinha verde (*Empoasca krameri*) e os carunchos (*Acanthoscelides obtecus* e *Zabrotes subfasciatus*) (Vieira et al., 1999).

Outro objetivo de estudo é o cultivo consorciado. O cultivo consorciado é extremamente comum, sendo o milho a principal cultura associada ao feijoeiro, entretanto, tanto os melhoristas de milho quanto os de feijoeiro não levam em

consideração este fator. Francis (1981), citado por Vieira et al. (1999), questiona a utilização de um programa de melhoramento específico para o consórcio, uma vez que são programas longos e dispendiosos. Por outro lado, Hamblim & Zimmermann (1986) acreditam que o desenvolvimento de cultivares adaptados ao cultivo consorciado levaria a utilização plena de todo o potencial das culturas. No entanto, Furtado (1991), estudando a interação linhagens x sistema de consórcio verificou que não é necessário conduzir dois programas separados de melhoramento. Segundo o autor, é possível selecionar os melhores materiais em condições de monocultivo, e avaliar o desempenho das linhagens em sistemas consorciados. Com o advento das técnicas de biotecnologia é possível a transformação genética de materiais elite com intuito de aumentar a capacidade fotossintética em condições adversas. A superexpressão do gene quimérico *Lhcb1*2*, que codifica para a proteína CAB do tipo I, em *Nicotiana tabacum* promoveu o aumento na capacidade fotossintética das plantas transgênicas em condições limitantes de luz (Ko et al. 1992; Real, 1997). A superexpressão desta proteína em plantas de feijão poderá representar uma importante contribuição para aumentar a eficiência de sistemas de cultivo consorciado.

A qualidade das sementes é também um ponto de interesse no melhoramento do feijoeiro. Três fatores compõem esta característica: a qualidade comercial, culinária e valor nutritivo. Por qualidade comercial, entende-se o tipo de grão, isto é, cor, brilho, forma e tamanho, sendo que a preferência da população por um dos vários tipos comerciais é uma característica bastante regional. Qualidade culinária, tão importante quanto a qualidade comercial, diz respeito ao tempo de cocção, ao sabor, tipo de caldo e cor após o cozimento. Já o valor nutritivo está relacionado à fonte de proteínas, vitaminas e sais minerais. O feijão, embora seja considerado um alimento quase perfeito, possui uma baixa qualidade protéica, devido à ausência de aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) (Borém & Carneiro, 1998; Vieira et al., 1999).

No Brasil, o desenvolvimento de cultivares de feijoeiro é uma tarefa quase exclusiva do setor público. Universidades federais (UFV, UFLA) e estaduais, empresas estaduais de pesquisa agropecuária (EPAMIG, IAPAR, IAC, IPA) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Arroz e Feijão e Clima Temperado) vêm desenvolvendo cultivares para diversas regiões do país. O quadro 1 apresenta os principais métodos utilizados para o melhoramento do feijoeiro.

Quadro 1 - Perfil dos programas de melhoramento do feijoeiro no Brasil (Vieira et al., 1999)

Aspecto	Classe Modal (frequência)			
	Alta	Média	Moderada	Baixa
Métodos de melhoramento	Genealógico	SSD e SPD	<i>Bulk</i> dentro de família F ₂	Seleção Gamética
Tipos de Genitores	Variedade comercial	Linhagens melhoradas	Inter- raciais	Acessos ao germoplasma
Tipos de cruzamentos Princípios objetivos	Simple Rend. Grãos e Qual. Sementes	Duplos Resist. Doenças	Múltiplos Arquitetura	Triplos Tolerância ao frio
Número de anos necessários para desenvolver um novo cultivar	5 a 8	>12	8-12	<5

SSD = *Single Seed Descent* (descendente de uma única semente); SPD = *Single pod descent* (descendente de uma única vagem); Rend. = Rendimento; Qual. = qualidade; Resist. = Resistência.

O feijoeiro é uma planta autógama, isto é, a autopolinização é o processo de fecundação predominante. Em razão do seu sistema de polinização, infere-se que o cultivar de feijoeiro é constituído de uma linhagem pura ou uma mistura de linhas puras. Em geral os agricultores usam os grãos colhidos como sementes para um novo plantio, ocorrendo uma variabilidade devido às

misturas mecânicas, mutações e cruzamentos naturais. Essa variabilidade genética pode e deve ser utilizada pelos melhoristas, pois espera-se que só sobrevivam aquelas linhas que possuem alguma vantagem adaptativa. A seleção de linhas puras nas populações dos agricultores contribuiu para obtenção de alguns cultivares, entre eles o Carioca (Ramalho & Abreu, 1998; Vieira et al. 1999).

A introdução de linhagens de programas de outros estados e países, especialmente do CIAT, foi, até bem pouco tempo, o principal método utilizado em muitos estados. Os cultivares introduzidos eram avaliados intensamente, e os que se destacavam após experimentos conduzidos em diversas regiões, eram recomendados (Ramalho & Abreu, 1998; Vieira et al., 1999).

Quando o objetivo do programa é reunir em um único genótipo, alelos favoráveis, que se encontram em materiais distintos, a alternativa existente é a hibridação, seguida de seleção recorrente. Por meio desta, os alelos desejáveis são acumulados gradativamente através de ciclos sucessivos de seleção, seguidos de recombinação, em um processo contínuo (Allard, 1971). O emprego da hibridação no melhoramento do feijoeiro é atualmente a principal fonte de novas linhagens.

Estas técnicas de melhoramento convencional resultaram em aumento drástico na produção de várias espécies cultivadas. Muitas disciplinas desenvolvidas durante o último século contribuíram para este fim: a genética básica, a genética quantitativa, estatística, genética molecular, patologia e fisiologia, para nomear as mais óbvias. Melhoristas e pesquisadores relacionados tem trabalhado com o intuito de aperfeiçoar a qualidade e aumentar a produtividade pelo emprego de várias técnicas. Tentar classificar melhoramento como tradicional, convencional, moderno ou molecular pode ocultar o fato de que, enquanto estas são metodologias que empregam ferramentas diferentes, elas não são mutuamente excludentes. Existe uma forte pressão para que melhoramento futuro seja direcionado à qualidade e quantidade da produção, em função do crescimento da população, demandas

sociais, requerimentos de saúde, estresses ambientais e impacto ambiental (Kung, 1993). O melhorista vegetal está enfrentando o desafio de identificar e coordenar o uso das várias ferramentas desenvolvidas para a melhoria das espécies cultivadas e responder às exigências de agricultores e consumidores. As ferramentas derivadas da biotecnologia têm recebido atenção nos últimos anos, entre as que se destacam estão a hibridação *in vitro*, a seleção assistida por marcadores, e a transformação genética.

Cruzamentos sexuais entre espécies silvestres e espécies cultivadas, que normalmente são incompatíveis, são possíveis através de técnicas de hibridação *in vitro*. Estas técnicas permitem a regeneração rápida de várias espécies vegetais úteis, que seriam obtidas após anos de ciclos de melhoramento intensivo. A seleção assistida por marcadores, permite a seleção precoce dos indivíduos que carregam um determinado carácter de interesse, sendo considerada uma ferramenta importante, principalmente no melhoramento de espécies perenes. E, finalmente, a transformação genética, que consiste da habilidade de transferir genes entre organismos sem a necessidade de cruzamentos, disponibiliza ao melhorista uma grande oportunidade de aumentar a eficiência da produção e a qualidade das culturas. A biotecnologia não substitui ou desloca o melhoramento convencional, ao contrário, aumenta a eficiência do mesmo. A maior diferença entre eles não reside nos objetivos e processos, mas na rapidez, precisão, confiabilidade (Kung, 1993).

2.3 Transformação genética de plantas

O desenvolvimento de métodos de transformação, através da introdução de genes exógenos ao genoma do organismo, gera possibilidades de grandes avanços no melhoramento de plantas. Em teoria, a transformação de plantas fornece a oportunidade de introduzir um gene de qualquer origem em células

vegetais. Essas células podem, então, ser regeneradas para produzir plantas transgênicas que contenham a nova informação gênica. Plantas transgênicas são definidas como aquelas que apresentam genes diferentes do genoma original parental. O gene adicional pode ser proveniente de uma planta da mesma espécie ou não, uma bactéria ou até um animal (Ribeiro et al., 1991; Jenes et al., 1993; Gander & Marcellino, 1997).

A obtenção de plantas transgênicas não só abre um novo caminho a ser explorado no melhoramento vegetal, mas também permite o estudo da fisiologia vegetal, metabolismo e bioquímica, regulação e a expressão de genes. Também pode ser utilizada para extração de produtos medicinais, produção de anticorpos e metabólitos de interesse específico (Astolfi Filho & Azevedo, 1987; Ribeiro et al., 1991; Gander & Marcellino, 1997).

Existem diversos métodos de transformação, sendo que a escolha do melhor método depende da espécie a ser transformada, do tipo de material utilizado (célula, tecido, protoplastos, etc), da capacidade de regeneração da espécie, da disponibilidade de materiais, etc. Entre os principais métodos de transformação estão, a eletroporação, a biobalística e a transformação via *Agrobacterium*.

2.3.1 Eletroporação

Esta técnica consiste do emprego de pulsos elétricos curtos de alta voltagem que modificam, temporariamente, a estrutura da membrana plasmática, induzindo a formação de poros ao longo de sua superfície, possibilitando a entrada de DNA exógeno. As condições de eletroporação precisam ser escolhidas de modo que a formação de poros seja reversível e haja recuperação dos protoplastos após o tratamento (Ribeiro et al., 1991; Jenes et al., 1993; Jones, 1995; Gander & Marcellino, 1997).

Os parâmetros ótimos de qualquer tipo particular de protoplasto são determinados empiricamente, e dependem do diâmetro da célula; qualidade (sobrevivência do tecido a altas voltagens, fase do ciclo da célula); fonte (por exemplo, células do mesófilo, ou de uma suspensão celular); meio de eletroporação (pH, condutividade elétrica, poder do tampão utilizado); estado fisiológico e composição da membrana; forma do DNA introduzido (super enrolado, lineares ou relaxados); e do plasmídeo utilizado. Em geral, o número de pulsos elétricos consecutivos a serem administrados, bem como sua intensidade e duração, devem inviabilizar 50% das células (DL50), pois assim considera-se que a formação dos poros e a absorção de material exógeno seriam maximizados (Ribeiro et al., 1991; Jenes et al., 1993; Jones, 1995).

Através da técnica de eletroporação, pode-se introduzir moléculas de vários tamanhos em protoplastos ou células intactas, como por exemplo DNA e RNA. Além disto, esta técnica, pode ser utilizada para a extração de metabólitos secundários de uma suspensão celular (Ribeiro et al., 1991).

As limitações referentes à esta técnica são: obtenção de protoplastos; regeneração do material transformado; tampão de transferência que pode afetar a eficiência da transferência do gene, bem como, a sobrevivência do protoplasto (Ribeiro et al., 1991; Jenes et al., 1993). Fatores que ainda não estão estabelecidos para determinadas culturas.

2.3.2 Biobalística

A biobalística, também conhecida como aceleração de partículas ou bombardeamento com microprojéteis, é uma das técnicas mais promissoras para a transformação de plantas. O método consiste em “bombardear” células ou tecidos com micropartículas de tungstênio ou ouro carregando o DNA exógeno, arremessadas a partir de um acelerador através de uma câmara

especial de bombardeamento em condições de vácuo (Ribeiro et al., 1991; Jenes et al., 1993; Rech & Aragão, 1997).

Diferentes sistemas foram desenvolvidos com o intuito de acelerar as micropartículas (0,2 a 4 μm de diâmetro) cobertas com sequências de ácidos nucléicos, a velocidades superiores a 1.500 km/h. As partículas penetram a parede e a membrana celular de maneira não letal, localizando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Uma vez dentro da célula, o DNA precipitado sobre às partículas é dissociado destas através da ação do líquido celular, e integrado ao genoma do organismo a ser modificado (Potrykus, 1990; Rech & Aragão, 1997).

O processo consiste de uma fonte que produz uma onda de choque para acelerar as partículas. A onda de choque pode ser gerada através de uma explosão química (pólvora seca), por uma descarga de hélio à alta pressão, ou pela vaporização de uma gota de água. Os sistemas que utilizam gás hélio, sob alta pressão e descarga elétrica, têm demonstrado serem os mais eficientes na obtenção dos transformantes (Rech & Aragão, 1997).

É um processo efetivo e simples para introdução de genes em bactérias, protozoários, fungos, algas, insetos, tecidos animais e vegetais. Em vegetais pode-se bombardear embriões, hipocótilos, cotilédones, discos foliares, calos ou suspensões celulares. Virtualmente, qualquer tipo de célula ou tecido pode ser utilizados para transformação. É, também, uma técnica útil na introdução e expressão de genes em animais *in vivo*, e na indução da resposta imune utilizando DNA, através do processo denominado imunização genética (Ribeiro et al., 1991; Jenes et al., 1993; Rech & Aragão, 1997).

Segundo McCabe & Christou (1993), as vantagens do bombardeamento de partículas por descargas elétricas são:

1. A habilidade de transformar tecido organizado, sem a necessidade do uso de suspensão de células embriogênicas e outros complexos sistemas de cultura de células, aumentando, desse modo, a utilidade e o potencial desta técnica;

2. Ocorrência de transformação, independente da variedade utilizada, descartando-se a necessidade de longos programas de retrocruzamentos para introgressão de genes exógenos em variedades que não são manipuláveis por outros procedimentos (arroz, algodão, soja);
3. O uso da cultura de tecidos é reduzido ao mínimo, diminuindo-se ou eliminando-se a variação somaclonal;
4. Possibilidade de encurtar os ciclos dos programas de melhoramento e os testes de campo, como resultado de engenharia direta dos cultivares elites;
5. Ocorrência mínima de danos na estrutura dos tecidos devido à possibilidade de modular a força de aceleração das partículas.

A grande vantagem da biobalística é que permite a transformação de células, tecidos intactos, de qualquer espécie de forma direta, simples e rápida, sendo aplicável à transferência de genes em espécies onde os outros métodos são falhos. A eficiência de obtenção de transformantes estáveis é de cerca de 2-5% dos transformantes transitórios (Ribeiro et al., 1991).

O material bombardeado tem que ser criteriosamente detectado, separado e regenerado para a obtenção de progênies estabilizadas. Para isto pode-se utilizar um gene marcador que possa ser facilmente detectado. Este cuidado deve ser tomado, pois, em geral, são obtidas quimeras dos genes introduzidos devido ao bombardeamento ao acaso de um pequeno número de células, num sistema múltiplo (Jenes et al., 1993). Outra desvantagem se refere ao número de cópias, é frequente a integração de cópias múltiplas, em geral, fortemente ligadas; as cópias podem estar fragmentadas com os genes e vetores em diferentes posições no genoma (Block, 1993).

2.3.3 Transformação via *Agrobacterium*

As bactérias do gênero *Agrobacterium* são fitopatógenos com a capacidade natural de infectar algumas espécies de dicotiledôneas e induzir a formação de um tumor conhecido como galha da coroa ("crown gall") ou a síndrome da raiz em cabeleira ("hairy root"). Os fitopatologistas descobriram que mesmo após a desinfecção das plantas, os sintomas permaneciam, sugerindo que um fator determinante permanecia nas plantas infectadas. Mais tarde, determinou-se que este fator era o plasmídio oriundo da bactéria. Com base nestas descobertas desenvolveu-se o método de transformação via *Agrobacterium* (Armitage et al., 1988; Ribeiro et al., 1991; Brasileiro, 1993). Em 1983, Fraley et al. iniciaram a era da transformação, quando relataram o transferência genética mediada por *Agrobacterium* em tabaco.

As bactérias da espécie *Agrobacterium tumefaciens* apresentam o plasmídio tipo T_i (tumor-inducing), e as da espécie *Agrobacterium rhizogenes* o plasmídio R_i (root-inducing). Tanto o plasmídio T_i (pT_i) quanto o R_i (pR_i) podem ser integrados ao genoma da planta, sendo o sistema pT_i o mais conhecido e efetivo, pois abrange um maior número de espécies hospedeiras (Souza, 1987; Armitage et al., 1988; Ribeiro et al., 1991; Brasileiro, 1993; Gander & Marcellino, 1997).

A manipulação do DNA plasmidial permite a integração de diversos tipos de genes. Esta manipulação consiste, basicamente, na deleção dos oncogenes do T-DNA, e, a manutenção dos genes relacionados à transferência e à replicação do plasmídio, isto é, a região vir e as extremidades do T-DNA. Assim, obtém-se linhagens "desarmadas", ou seja, ainda virulentas, mas não mais fitopatogênicas. Dessa forma, genes de interesse podem ser introduzidos dentro da planta através da ligação com a região "desarmada" do T-DNA via recombinação (vetor de integração) ou, pela clonagem com a borda repetida e replicon independente (vetor binário), em substituição à região T (Armitage,

1988; Draper, 1988; Hooykaas, 1995; Gander & Marcellino, 1997). A primeira publicação de uma transferência de genes para plantas utilizando linhagens desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens* foi a de Zambryski et al. (1983).

A indução dos genes *vir* é uma etapa primordial para o sucesso da transferência do T-DNA. A expressão destes genes é induzida pelo processo de resposta aos ferimentos produzidos nas células vegetais, em particular, pela produção de compostos fenólicos, tais como a acetoceringona. A indução destes genes é mediada pelo locus *virA*, o qual é sensor primário de fenóis vegetais e, em resposta ao estímulo, se autofosforila. A proteína VirA, por sua vez, fosforila a proteína VirG que leva a ativação da transcrição gênica dos demais genes do operon *vir*, os quais mediam a produção das cópias do T-DNA e a transferência do mesmo (Godwin et al., 1992; Zupan & Zambryski, 1995).

Embora, aparentemente simples, esta técnica possui algumas limitações. A principal refere-se ao tipo de hospedeiro. A *Agrobacterium* pode colonizar um amplo espectro de espécies de dicotiledôneas, porém coloniza somente poucas espécies de monocotiledôneas, como por exemplo, os cereais. Mesmo entre as dicotiledôneas, a susceptibilidade difere muito entre e dentro das espécies, variando em função da interação com o hospedeiro. A razão desta limitação não é bem conhecida, mas pode ser devida à ausência de sítios de reconhecimento para a bactéria na superfície da planta; ou inibição da indução dos genes *vir*, ou balanço hormonal de auxinas e citocininas “anormal” das células monocotiledôneas (Grant et al., 1993). Portanto uma etapa inicial importante para obtenção de transformantes através de *Agrobacterium* é a determinação da melhor combinação patógeno-hospedeiro para uma determinada espécie (Draper et al., 1988; Lacorte & Mansur, 1993).

Estudos mais recentes relatam a susceptibilidade de espécies consideradas recalcitrantes à *Agrobacterium*, como o milho, arroz e feijoeiro (Brasileiro & Lacorte, 1998). Segundo Trick & Finer (1997), tanto a bactéria, como o tecido alvo, podem ser manipulados para obter a transformação destas plantas. Modificações no vetor binário da *Agrobacterium* capacitou a

transformação eficiente de arroz e milho. A adição de anti-oxidantes no meio de co-cultivo aumentou as taxas de transformação pela redução da resposta hipersensível, assim como, diferentes métodos de ferimento do tecido alvo também têm sido empregados para aumentar a infecção por *Agrobacterium* (Godwin et al., 1992).

Havendo interesse em ajustar a interação entre *Agrobacterium* e um hospedeiro no qual não existem descrições prévias de transferência do T-DNA, deve-se levar em consideração os seguintes fatores: a) cepa da bactéria; b) genótipo do hospedeiro e fisiologia do explante; c) condições de co-cultivo; d) marcadores de seleção utilizados. Parâmetros chaves para a transferência por *Agrobacterium* incluem o genótipo da bactéria e da planta; tratamento com indutores dos genes *vir* (acetoceringona, extrato de células feridas, células alimentadoras, açúcares), pH, temperatura, concentração das células, condições de luminosidade, duração do tempo de co-cultivo, tipo de explante, qualidade da pré-cultura, tratamento com fitohormônios (Godwin et al., 1992; Grant et al., 1993; Birch, 1997).

Um segundo ponto limitante da técnica é a capacidade de regeneração do tecido transformado. A eficiência da transferência via *Agrobacterium* varia drasticamente para diferentes espécies vegetais, cultivares ou tecidos. É frequente obter culturas de células *in vitro* com alta capacidade de transformação, porém estas não são totipotentes, como por exemplo, células derivadas de protoplastos ou suspensões bem estabelecidas de cultura celular de tecidos. Esta ampla variação da eficiência de transformação pode ser devida ao regime de cultura de tecido, às condições nas quais as plantas estão crescendo ou mesmo à linhagem de *Agrobacterium* utilizada (Draper et al., 1988; Hooykaas, 1995;).

Em sistemas de cultura de tecidos para transformação, o mais importante é uma grande quantidade de células regeneráveis acessíveis à transferência gênica. Estas células devem manter a capacidade de regeneração durante todo o período de preparação, proliferação e seleção das células transgênicas

(Birch, 1997). Neste processo não existe razão para preferir regeneração por organogênese ou embriogênese, a escolha do processo deve ser baseada na conveniência, eficiência, disponibilidade de explantes e tempo mínimo de cultura de tecidos (Grant et al., 1993; Birch, 1997). Segundo Godwin et al. (1992), a manipulação da cultura de tecidos para aumentar a eficiência de transformação reflete a habilidade de: a) promover o acoplamento da bactéria nas células vegetais; b) disponibilizar as células vegetais competentes para a infecção da bactéria; c) pré-condicionar tecidos com fitohormônios exógenos ou outras substâncias para aumentar a produção de moléculas sinalizadoras para a indução dos genes *vir* e competência celular; d) utilizar aditivos químicos e indutores de virulência.

Por fim, o tamanho e a complexidade do plasmídeo T_i também interferem na capacidade de transformação. Genes destinados à transferência são, primeiramente, manipulados *in vitro* e, em seguida, incorporados em um simples plasmídeo transportador (sistema co-integrado) ou, num plasmídeo mais complexo e sofisticado e com maior limite de hospedeiro (sistema binário) (Draper et al., 1988).

Os vetores co-integrados resultam de um simples evento de recombinação, o produto obtido posiciona o gene de interesse entre as bordas do T-DNA do plasmídeo desarmado nativo. O sistema de vetores binários consiste de dois plasmídios de replicação autônoma dentro da *A. tumefaciens* desarmada, um vetor “carregador” que contém o gene de interesse entre as bordas do T-DNA e um plasmídeo que contém os genes *vir* para facilitar a transferência para as células vegetais (Walkerpeach & Velten, 1994).

A grande vantagem do vetor co-integrado é sua estabilidade na *Agrobacterium*. Entretanto, é necessário o conhecimento detalhado do plasmídeo T_i antes de manipulá-lo. Além disto, a taxa de formação do plasmídeo co-integrado é relativamente baixa (cerca de 10^{-5}). Vetores binários envolvem genes exógenos localizados em um plasmídeo adicional com replicação autônoma dentro da *Agrobacterium*. Estes vetores não requerem região de

homologia com o plasmídio T_i ou R_i residente, e necessitam de pelo menos uma sequência de borda, embora, em geral, possuam ambas. A principal vantagem do vetor binário é sua independência de um plasmídio T_i ou R_i específico e a alta frequência de introdução dentro da *Agrobacterium* (cerca de 10^{-1}) (Grant et al., 1993).

No entanto, as vantagens relacionadas com a habilidade natural da *Agrobacterium* em transferir sequências definidas de DNA, podem ser exploradas com o intuito de desenvolver novas variedades de plantas transformadas (Armitage, 1988). Além do mais, após a transformação e obtenção de plantas adultas, os novos genes integrados ao genoma hospedeiro são transmitidos às progêneses seguindo uma herança mendeliana (Armitage, 1988).

2.4 Transformação do feijoeiro

O feijoeiro, bem como várias espécies de leguminosas, apresentava inúmeras dificuldades para transformação genética. As dificuldades variavam desde o fato de ser recalcitrante à transformação por *Agrobacterium* até à regeneração e cultura de tecidos, passando por problemas de reprodutibilidade, aplicação a todos os genótipos, e baixa eficiência de transformação (Nagl et al., 1997).

↳ O primeiro passo para o sucesso na obtenção de plantas transgênicas é o desenvolvimento de um protocolo de regeneração. Inúmeras tentativas de regeneração *de novo* de plantas férteis de feijoeiro a partir de hipocótilo, folhas, meristemas apicais foram realizadas (Mariotti et al., 1989; Mohamed et al., 1992a, 1992b; Malik & Saxena, 1992). Ramsay (1993) sugeriu que técnicas que utilizam a multibrotação ao redor de um meristema pré-existente fornecem o sistema ideal para a transformação e multiplicação de leguminosas. Com isto, diversos protocolos foram desenvolvidos para organogênese de *Phaseolus*

vulgaris, a partir de meristemas apicais e laterais (McClean & Grafton, 1989; Malik & Saxena, 1992; Mohamed et al., 1992a, 1992b). Assim, a utilização de meristemas apicais de embriões maduros, como alvo da transformação, permitiu a obtenção de plantas transgênicas de feijoeiro através da biobalística (Russell et al., 1993; Aragão et al., 1996).

O primeiro relato de transformação estável de *Phaseolus vulgaris* data de 1993, quando Russell et al. obtiveram plantas transgênicas de feijoeiro através da biobalística. O método consistia em bombardear duas vezes os meristemas apicais de sementes maduras utilizando-se um aparelho de descarga elétrica para a aceleração de micropartículas, seguido de indução em meio de multibrotação e seleção com herbicida. Entretanto, a eficiência de transformação foi muito baixa, em torno de 0,03% de plantas transgênicas/embriões bombardeados. A partir deste resultado, um grupo da EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia, chefiado pelos Drs. Francisco Aragão e Elíbio Rech, trabalhou sobre diversos parâmetros do protocolo de transformação por biobalística: concentração de micropartículas e de DNA, tampão de precipitação do DNA, distância entre microcarreador e explante alvo, vácuo na câmara e tipo de aparelho de aceleração (Aragão et al., 1993; Aragão et al., 1996). Em 1996, utilizando um aparelho de aceleração por alta pressão de hélio, Aragão et al. obtiveram transformação de feijoeiro a uma frequência de cerca de 1%. Desde então, a transformação de feijoeiro por biobalística ficou facilitada, e através deste método obtiveram plantas de feijão resistentes ao vírus do mosaico dourado (Aragão et al., 1995; Aragão et al., 1998) e outras que expressam uma proteína rica em albumina (Aragão et al., 1992; 1996).

A transformação genética, via bombardeamento de partículas (biobalística), tem a vantagem de permitir a transformação de diferentes tipos de tecidos em qualquer espécie, pois evita a principal barreira da transformação por *Agrobacterium*, a especificidade *Agrobacterium*-hospedeiro. Entretanto, esta técnica possui a desvantagem de ter baixa eficiência e, em geral, permitir a introdução de mais de uma cópia do gene de interesse, além de produzir uma

alta porcentagem de quimeras (Russell et al., 1993; Aragão et al., 1996). A transformação por *Agrobacterium* possui a vantagem de, em geral, introduzir poucas cópias do gene, em geral uma ou duas, e integrá-lo mais facilmente ao genoma da planta. Nos últimos anos houve um ressurgimento do interesse quanto ao uso da *Agrobacterium* para obtenção de plantas transgênicas (Trick & Finer, 1997). Entretanto, a transformação genética do feijoeiro via *Agrobacterium* tem apresentado alguns problemas: interação entre a *Agrobacterium* e o hospedeiro, maturidade do explante, condições de pré-cultura e co-cultivo, e esquemas de seleção baseados na expressão transitória do gene *uidA* (GUS) (Zhang et al., 1997). Alguns autores têm relatado a susceptibilidade de *Phaseolus vulgaris* a algumas linhagens de *Agrobacterium* (Mariotti et al., 1989; McClean et al., 1991; Franklin et al., 1993; Lewis & Bliss, 1994; Brasileiro et al., 1996), porém, até o presente momento, nenhuma planta transgênica de feijoeiro foi obtida por esta metodologia.

O primeiro relato de transformação de feijoeiro por *Agrobacterium* foi em 1989, quando Mariotti et al. descreveram a obtenção de plântulas resistentes à canamicina, após o co-cultivo do ápice caulinar de feijoeiro em suspensão de *Agrobacterium*, seguido de seleção em canamicina (50mg/L). Entretanto, nenhuma prova da transformação foi obtida, sugerindo que estas plântulas eram falsos positivos. Como citado anteriormente, o método de seleção também é um ponto chave para obtenção de plantas transgênicas. Dentre os vários marcadores de seleção disponíveis incluem-se os de resistência a antibióticos e a herbicidas (Godwin et al., 1992). A seleção por antibióticos ou herbicidas pode permitir uma maior proporção de células transformadas para multiplicação e regeneração, em adição à facilidade de reconhecimento dos transformantes. O mais utilizado é o gene *nptII* de um transposon de bactéria que codifica para resistência a uma faixa de antibióticos aminoglicosídicos, incluindo canamicina e geneticina (G418) (Godwin et al., 1992). No entanto, é importante considerar a fisiologia da ação do antibiótico e o mecanismo de resistência quando se escolhe ou se modifica o protocolo de seleção, pois o uso

do *nptII* depende da viabilidade do processo de seleção devido à problemas em espécies que apresentam resistência endógena à canamicina (Godwin et al., 1992; Birch, 1997;).

O feijoeiro foi, durante muito tempo, considerado uma espécie recalcitrante à transformação por *Agrobacterium*, porém diversos estudos têm demonstrado o contrário. McClean et al. (1991) estudaram a susceptibilidade de 19 genótipos de feijoeiro contra três linhagens da *Agrobacterium tumefaciens*, e determinaram que todos os genótipos foram susceptíveis aos diferentes biótipos de *A. tumefaciens*. Em 1994, Lewis & Bliss, relataram a susceptibilidade de mais 10 variedades de *P. vulgaris* à linhagem C48 de *Agrobacterium*. Brasileiro et al. (1996), demonstraram a susceptibilidade de seis variedades brasileiras a 8 linhagens de *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*. Embora estes trabalhos tenham sugerido diferentes métodos de ferimento: inoculação do segmento nodal com seringa (McClean et al., 1991), corte e inoculação das gemas meristemáticas (Lewis & Bliss, 1994) e bombardeamento de meristemas apicais seguido de inoculação (Brasileiro et al., 1996), não houve relato da obtenção de plantas transgênicas.

Franklin et al. (1993) obtiveram calos de feijoeiro resistentes à canamicina, a partir de discos foliares e segmentos de hipocótilo de *P. vulgaris* cultivar Dark Red Kidney, inoculados com a linhagem da *A. tumefaciens* EHA101:pKYLX71GUS. A transformação foi comprovada por ELISA e Southern Blot, entretanto, devido à ausência de um protocolo de regeneração a partir de calos, não foi possível obter plantas transgênicas de feijoeiro.

O desenvolvimento de um protocolo de regeneração a partir de folhas poderia levar a obtenção de plantas transgênicas de feijoeiro via *Agrobacterium*. Kapila et al. (1997) desenvolveram um sistema de transformação de folhas intactas para o estudo da expressão transitória. O sistema consistia de pré-indução da *Agrobacterium* em meio com acetoceringona seguido de infiltração a vácuo das folhas. O objetivo do trabalho foi desenvolver um sistema para estudo da expressão transitória em espécies recalcitrantes. Todas as folhas

infiltradas, de sete experimentos diferentes, apresentaram setores expressando a atividade da β -glucoronidase; setores estes, que representavam de 20 a 90% da área foliar.

A expressão gênica, detectada após 12 a 72 horas, é considerada transitória. Considera-se como expressão estável, quando é possível detectar a expressão do gene exógeno 7 dias após o processo de transferência. Neste caso, é aceito que houve integração do gene introduzido no genoma da planta (Birch & Franks, 1991). Não existe uma relação direta entre o nível de expressão transitória e a frequência de integração (Birch & Franks, 1991; Jenes et al., 1993). Ainda assim, por razões práticas, as condições para transformação ainda são determinadas com base nesse tipo de expressão (Birch, 1997).

2.5 “Sonication assisted *Agrobacterium* transformation” (SAAT)

O princípio básico da transformação por *Agrobacterium* é a necessidade de uma “porta de entrada”, normalmente um ferimento na planta, pois as bactérias são atraídas para a célula vegetal por quimiotactismo positivo em relação a compostos fenólicos, açúcares e aminoácidos, produzidos pelo ferimento (Brasileiro, 1993). Os métodos de produção de ferimentos variam desde a utilização de seringas até o bombardeamento com micropartículas nuas. Entretanto, existem poucos trabalhos que utilizam sonicação. A sonicação provoca formação de cavitações que são responsáveis pelos microferimentos. Com base nisto, Trick & Finer (1997) desenvolveram uma metodologia denominada SAAT (“Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation”), na qual o explante é sonicado por curto período de tempo na presença de *Agrobacterium*. Esta sonicação produz uma série de microferimentos, aumentando, assim, a eficiência de transformação (Santarém et al., 1998). O tempo de sonicação deve ser suficiente para obter a maior

eficiência de transformação, isto é, a maior expressão da atividade da β -glucoronidase, com o mínimo de danos ao tecido (Trick & Finer, 1997). Através desta técnica, já foram obtidas plantas transgênicas de soja a partir de culturas de embriões (Trick & Finer, 1998; Santarém et al., 1998).

Em 1997 Trick & Finer relataram um estudo do efeito do tratamento SAAT em diversas espécies e tecidos vegetais. Os tecidos avaliados foram folhas, cotilédones imaturos, embriões somáticos e zigóticos, ápices caulinares, células embriogênicas em suspensão e plântulas inteiras. As espécies foram soja, "Ohio buckeye", feijão de vaca, "White Spruce", trigo e milho. Várias destas espécies são consideradas recalcitrantes à *Agrobacterium*. Entretanto, trabalhando com tempos de sonicação que variaram de 0,2 a 130 segundos, determinaram um aumento de 100 a 1400 vezes na expressão transitória da β -glucoronidase. Em todos os tecidos testados o tratamento com SAAT aumentou a expressão transitória.

Em 1998, trabalhando com cultura de embriões de soja em suspensão, Trick & Finer obtiveram plantas transgênicas de soja, entretanto, todas as plantas recuperadas eram estéreis. Segundo os autores, isto se deve ao tipo de explante, que, após longos períodos de cultivo, pode levar à regeneração de plantas estéreis. No mesmo ano, Santarém et al. obtiveram plantas transgênicas através de SAAT de cotilédones imaturos de soja. Estes explantes foram sonicados por 2 segundos, co-cultivados com *Agrobacterium* e regenerados através da formação de embriões somáticos transgênicos.

3 Material e Métodos

3.1 Material vegetal

Sementes de *Phaseolus vulgaris* cv. Olathe Pinto, gentilmente cedidas pelo Dr. Francisco Aragão (EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia), foram multiplicadas em uma mistura de substrato e vermiculita (1:1), em casa de vegetação.

3.2 Explantes vegetais

Sementes de feijão foram lavadas em álcool 70% por 5 minutos, e imersas por 15 minutos em hipoclorito de sódio 1%. A seguir, enxaguadas abundantemente (5 a 6 vezes) em água deionizada estéril e incubadas por 18-20 h em água estéril, à temperatura ambiente.

Após este período as sementes foram abertas, os embriões excisados. Estes, foram desinfectados por 5 minutos em hipoclorito de sódio 0,1%, e enxaguados abundantemente (5 a 6 vezes) em água deionizada estéril. Parte da radícula foi cortada e o meristema apical exposto, cortando-se as folhas primárias (Aragão et al., 1996). Os explantes foram inoculados com *Agrobacterium* imediatamente após a exposição dos meristemas, ou após a permanência dos mesmos por períodos determinados em meio de multibrotação (Anexo 1).

3.3 Linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*

Em todos os experimentos utilizou-se a linhagem LBA4404, obtida através do Dr. Antônio Figueira (CENA/USP), gentilmente cedida pelo Dr. Ishida. Esta linhagem contém o plasmídeo pTiAch5 (Hoekema et al. 1983) e o vetor binário pTOK 233 (Figura 1) (Ishida et al., 1996) contendo o gene *uidA*, interrompido por uma sequência INTRON (GUS-INTRON), e os genes *nptII* e *hpt*. O gene *uidA* expressa para a proteína β -glucoronidase que, em presença do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indol glucoronico (X-Gluc) (Anexo 1) produz uma dimerização oxidativa do mesmo, e forma um precipitado de intensa cor azul e insolúvel (Jefferson, 1987). O gene *nptII* induz a resistência ao antibiótico canamicina e geneticina, enquanto o *hpt* resistência à higromicina.

A *Agrobacterium* foi cultivada em meio AB (Anexo 1) acrescido de 50 mg/L de canamicina e 100 mg/L de higromicina, a 28°C até atingir densidade óptica a 600 nm (OD₆₀₀) entre 0,7-0,8. A seguir foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos, e ressuspensa em meio de multibrotação (Anexo 1) líquido, sempre em volume igual ao de cultivo.

Figura 01 - Mapa do vetor binário pTOK233 (Ishida et al., 1996) contendo o inserto dos genes quiméricos *uidA* (25S-IG-NOS) e *nptII* (NOS-NPT-NOS).

3.4 Aparelho de sonicação

Utilizou-se o sonicador ULTRA-SON, Modelo T14, 40 kHz (Thornton INPEC Eletrônica, Piracicaba/SP).

3.5 Transformação por SAAT

O protocolo utilizado para transformação do feijoeiro foi modificado a partir do método SAAT (“Sonication-Assisted *Agrobacterium*-mediated transformation”), descrito por Trick & Finer (1997). Foram desenvolvidos, inicialmente, alguns experimentos pilotos para determinar-se a eficácia da metodologia para transformação do feijoeiro. Em seguida vários parâmetros foram ajustados com o intuito de aumentar a eficiência de transformação e obtenção de plantas transgênicas.

3.5.1 Experimentos pilotos de transformação por SAAT

3.5.1.1 Sobrevivência dos explantes em meio contendo antibióticos

Este experimento foi realizado com o objetivo de verificar qual a melhor estratégia de seleção dos explantes transformados. Os embriões foram isolados conforme descrito previamente (Item 3.2), e transferidos para meio de multiplicação (Anexo 1) de brotos. Após este período foram transferidos para meio de regeneração (Anexo 1) contendo o agente seletivo nas seguintes concentrações: geneticina (5, 10, 20, mg/L) ou canamicina (50 e 100 mg/L). As análises foram realizadas após 40 dias em meio seletivo.

3.5.1.2 Efeito do pré-tratamento na eficiência de transformação

Os embriões foram isolados conforme descrito no item 3.2 e transferidos para meio de multibrotação (Anexo 1), onde permaneceram de 1 a 15 dias. Após este período de pré-tratamento, os explantes foram sonicados durante 2 segundos em 25 ml de suspensão de *Agrobacterium* (Item 3.3), cultivados nesta suspensão por 15 minutos, e transferidos para meio de multibrotação (Anexo 1) sólido, incubados em câmara de crescimento a 28°C, no escuro, por 48 horas. Após este período, os explantes foram submetidos ao ensaio histoquímico, para determinarmos a atividade da β -glucoronidase. A eficiência de transformação foi medida com base no número de explantes que apresentaram atividade da β -glucoronidase, pelo total de embriões inoculados.

3.5.1.3 Teste da eficiência de transformação por SAAT

Embriões excisados e estéreis conforme descrito previamente (Item 3.2), foram transferidos para meio de multibrotação (Anexo 1). Após 15 dias, grupos de 10 explantes foram submetidos aos seguintes testes:

Tabela 01 - Descrição dos tratamentos para estudo do efeito da SAAT em explantes de feijoeiro cv. Olathe Pinto.

Tratamentos	Descrição
1	Com sonicação em MS3% líquido, sem inocular (Controle)
2	Com inóculo, sem sonicação, co-cultivo em ausência de luz
3	Com inóculo, sem sonicação, co-cultivo em presença de luz
4	Com sonicação e posterior inoculação, co-cultivo em ausência de luz
5	Com sonicação e posterior inoculação, co-cultivo em presença de luz
6	Com sonicação em conjunto com a suspensão de <i>Agrobacterium</i> , co-cultivo em ausência de luz
7	Com sonicação em conjunto com a suspensão de <i>Agrobacterium</i> , co-cultivo em presença de luz

Os explantes foram sonicados em 25 ml de meio de co-cultivo líquido por 2 segundos, conforme descrito por Santarém et al. (1998), incubados durante 5 minutos, seguido de 48 horas de co-cultivo em meio de multibrotação (Anexo 1) sólido à 28°C. A seguir, os explantes foram submetidos ao ensaio histoquímico para determinar a atividade da enzima β -glucoronidase. A eficiência de transformação foi avaliada com base no número de explantes que apresentavam pontos azuis, pelo total de explantes inoculados, e também com base na estimativa das médias (número total de pontos/número total de explantes).

3.5.1.4 Teste de expressão estável

Embriões de feijoeiro, isolados conforme descrito previamente (Item 3.2) e pré-tratados por 10 a 20 dias em meio de multibrotação (Anexo 1), foram submetidos à sonicação por 2 segundos em 25 ml de suspensão de *Agrobacterium* (Item 3.3). Em seguida, foram co-cultivados neste meio por 15 minutos, transferidos para meio de multibrotação (Anexo 1) e incubados em câmara de crescimento a 28°C, na ausência de luz, por 48 horas. Após o co-cultivo, os embriões foram lavados em 25 ml de meio MS 3% líquido contendo 200 mg/L de cefotaxima, durante 2 horas. Os explantes foram transferidos para meio de multibrotação (Anexo 1) contendo agente seletivo (geneticina 10 mg/L) e cefotaxima (100 mg/L) até completarem 21 dias de idade. A seguir, foram transferidos para meio de regeneração (Anexo 1) contendo agente seletivo (geneticina 10 mg/L) e cefotaxima (100 mg/L) e, então, submetidos ao ensaio histoquímico para detecção da atividade da β -glucoronidase aos 15 e 30 dias após a inoculação. A eficiência de transformação foi medida com base no número de embriões que apresentaram pontos azuis em relação ao total de embriões inoculados.

3.5.2 Desenvolvimento do protocolo de transformação por SAAT

3.5.2.1 Efeito do tempo de co-cultivo

Os embriões excisados conforme descrito no item 3.2 foram pré-tratados por 12 dias, sonificados durante 10 segundos em 25 ml de suspensão de *Agrobacterium* (Item 3.3) e co-cultivados conforme descrito na tabela 2. Após este período, os embriões foram submetidos ao ensaio histoquímico para a determinação da expressão transitória.

Tabela 02 - Descrição dos tratamentos utilizados no estudo do efeito do tempo de co-cultivo em meio líquido e sólido (min=minuto; h=horas).

Tratamentos	Meio multibrotação líquido (min)	Meio multibrotação sólido (h)
1	15	24
2	15	48
3	15	72
4	120	24
5	120	48
6	120	72
7	1440	24
8	1440	48
9	1440	72

3.5.2.2 Efeito da acetoceringona

Os embriões, isolados conforme descrito anteriormente, foram transferidos para meio de multibrotação (Anexo 1), onde permaneceram por 12 dias. Após este período, os embriões foram sonificados por 60 segundos em 25 ml de suspensão de *Agrobacterium* (Item 3.3) e, então, co-cultivados conforme descrito na tabela 3.

Tabela 03 - Descrição dos tratamentos utilizados nos experimentos de efeito da acetoceringona (20 mg/L).

Tratamentos	Co-cultivo líquido (horas)	Acetoceringona Co-cultivo líquido	Acetoceringona Co-cultivo sólido
1	2	Ausente	Ausente
2	2	Ausente	Presente
3	2	Presente	Ausente
4	2	Presente	Presente
5	24	Ausente	Ausente
6	24	Ausente	Presente
7	24	Presente	Ausente
8	24	Presente	Presente

3.5.2.3 Efeito do tempo de sonicação – Expressão transitória

O objetivo deste experimento foi estudar o efeito do tempo de sonicação na eficiência de transformação por *Agrobacterium*. Os embriões excisados e esterilizados (Item 3.2) foram pré-tratados em meio de multibrotação por 12 dias, e submetidos à transformação via SAAT. Os explantes foram sonicados durante vários períodos de tempo em 25 ml da suspensão de *Agrobacterium* (Item 3.3). Os tempos de sonicação utilizados foram: 0, 2, 4, 10, 30 e 60 segundos. Após a sonicação, os embriões foram cultivados no mesmo meio de tratamento por 15 minutos, transferidos para meio de multibrotação (Anexo 1), e incubados em câmara de crescimento à 28°C, no escuro, por 48 horas, e, então, submetidos ao ensaio histoquímico para determinação da expressão transitória da β -glucoronidase.

3.5.2.4 Efeito do tempo de sonicação – Expressão estável

Embriões, previamente excisados e esterilizados (Item 3.2), foram pré-tratados em meio de multibrotação por 12 dias, e então submetidos à transformação por *Agrobacterium*, via SAAT. Os tempos de sonicação foram: 0, 2, 4, 10, 30 e 60 segundos. Após o tratamento, foram co-cultivados por duas horas em 25 ml de suspensão de *Agrobacterium* (Item 3.3), seguido de 48 horas em meio de multibrotação (Anexo 1) sólido à 28 °C, no escuro. A seguir, foram lavados em 25 ml de meio MS3% líquido contendo 300 mg/L de cefotaxima durante 2 horas, e transferidos para meio de regeneração contendo agente seletivo (geneticina 10 ml/L) e cefotaxima (100 mg/L). Após 30 dias da inoculação os explantes foram submetidos ao ensaio histoquímico para determinação a expressão estável da β -glucoronidase.

3.5.2.5 Efeito da pré-incubação

Foi realizado um experimento para evidenciar o efeito da pré-incubação na eficiência de transformação. Embriões, excisados conforme descrito no item 3.2, foram transferidos para meio de multibrotação (Anexo 1), onde permaneceram por 12 dias. Após este período, foram sonicados em 24 ml de meio MS3% líquido conforme descrito na tabela 04. Após 24 horas da incubação acrescentou-se 1 ml de suspensão de *Agrobacterium* (Item 3.3). A seguir os explantes foram submetidos à SAAT (Tabela 4), co-cultivados por 24 horas em 25 ml de suspensão de *Agrobacterium* ($OD_{600} = 0,750$) e 48 horas em meio de multibrotação sólido, a 28 °C, no escuro. Em seguida, foram submetidos ao ensaio histoquímico para determinação da expressão transitória da β -glucoronidase.

Tabela 04 - Descrição dos tratamentos para estudo do efeito da pré-incubação. s= segundos.

Tratamentos	Pré-incubação (s)	SAAT (s)
1	0	30
2	0	60
3	30	30
4	30	60
5	60	30
6	60	60

3.5.2.6 Análise estatística

Os experimentos foram realizados considerando-se cada frasco de vidro contendo 10 embriões como uma unidade de repetição. Os resultados foram expressos em porcentagem de embriões transformados (n° de embriões que apresentaram atividade da β -glucoronidase/ n° total de embriões avaliados). As análises estatísticas foram realizadas de acordo com o modelo linear generalizado (Nelder & Wededlburn, 1972).

3.6 Análises de microscopia

3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura

Os explantes inoculados, foram previamente pré-tratados em meio de multibrotação (Anexo 1) e inoculados com 25 ml de suspensão de *Agrobacterium* (Item 3.3) nos tempos de sonicação de 0 e 60 segundos. A seguir foram co-cultivados por 24 horas em meio MS3% líquido (Anexo 1) contendo acetoceringona (20 mg/L), seguido de 48 horas de co-cultivo em meio

de multibrotação sólido acrescido de acetoceringona (20 mg/L). Após este período, foram fixados em solução Karnovsky (Anexo 1) (Karnovsky, 1965), seguido de 20 horas de pós-fixação em vapor de tetróxido de ósmio. Desidratados em câmara contendo sílica gel por uma hora e metalizados por 200 segundos (MED 010, Balzers) e imediatamente analisados em microscópio de varredura (Zeiss DSM 940A).

3.6.2 Microscopia óptica

Explantos inoculados, conforme descrito no item 3.6.1, foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratados em série etílica (10 a 100%) e infiltrados com resina glicol metacrilato (Reichert-Jung). As amostras foram seccionadas com 5 µm de espessura em micrótomo (RM2045, Leica), coradas em solução de azul de toluidina 0,1% por 15 minutos e montadas em entelan (Merck).

3.7 Transformação de *Phaseolus vulgaris* via SAAT

3.7.1 Transformação com o gene *uidA*

Foi realizado um experimento de transformação com a linhagem da *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404:pTOK (Item 3.3) utilizando-se SAAT por 30 e 60 segundos, para verificar a taxa de sobrevivência dos explantes e a eficiência dessa técnica na transformação estável. Estes períodos de duração SAAT foram escolhidos baseados nos resultados do experimento de expressão transitória (3.5.2.3). Cem embriões, excisados, conforme descrito no item 3.2, foram transferidos para meio de multibrotação por 12 dias. Passado este período, 50 explantes foram submetidos à SAAT por 30 segundos e os outros

50 por 60 segundos. Após co-cultivo de 24 horas em 25 ml de meio de multibrotação líquido, seguido de 48 horas em meio de multibrotação sólido, ambos contendo acetoceringona (20 mg/L), os explantes foram lavados em 25 ml de meio de multibrotação líquido contendo 500mg/L de cefotaxima e transferidos para meio de regeneração contendo agente seletivo (geneticina 20 mg/L). Os explantes permaneceram neste meio por 4 semanas, e foram, então submetidos ao ensaio histoquímico para determinar a atividade da β -glucoronidase.

3.7.2 Transformação com *Lhcb1*2*

Foi realizado um experimento de transformação com o gene *Lhcb1*2*, utilizando a SAAT por 30 segundos. Duzentos embriões obtidos conforme descrito no item 3.2, foram transferidos para meio de multibrotação por 12 dias. Após esse período, 150 explantes foram inoculados com a linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404:*Lhcb1*2*, e os 50 restantes não inoculados, foram utilizados como controle. Os explantes inoculados foram co-cultivados por 2 horas em 25 ml de suspensão de *Agrobacterium*, preparado conforme descrito no item 3.3, seguido de 48 horas em meio de multibrotação sólido (Anexo 1). O material controle foi co-cultivado pelo mesmo período, porém utilizando para co-cultivo líquido o meio de multibrotação (Anexo 1). Após o co-cultivo, os explantes foram lavados com 25 ml de meio MS3% líquido contendo 500mg/L de cefotaxima e transferidos para meio de regeneração (Anexo 1) contendo agente seletivo (geneticina 10 mg/L) e cefotaxima (100 mg/L), onde permaneceram por 4 semanas antes de serem transferidos para meio de regeneração contendo cefotaxima (100 mg/L), mas sem o agente seletivo. Após 4 semanas, os brotos que sobreviveram foram isolados e transferidos para meio de enraizamento (Anexo 1). Uma amostra de cada material foi coletada para análise por PCR.

3.7.2.1 Vetor de transformação pENDK4:*Lhcb1*2*

O gene quimérico *Lhcb1*2* (Figura 2) utilizado é composto por uma fusão entre a seqüência do gene *ss3.6* de ervilha, que codifica para o peptídio transito da subunidade menor da RUBISCO (*rbcS*), e a seqüência do gene *Lhcb1*2*, que codifica para a proteína CAB madura tipo I do LHCIIb. Trinta pares de bases (30pb) da seqüência 5' não traduzida, do gene *ss3.6* da RUBISCO servem de intensificador da tradução. Ambos os genes estão sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e o sinal de terminação da transcrição é do gene *Lhcb1*2* tipo I da ervilha. Esse gene quimérico está disponível tanto no vetor multicópias de *Escherichia coli* pGEM4, como no vetor binário pEND4K de transformação por *Agrobacterium tumefaciens* (Klee et al., 1985). A seleção dos transformantes foi realizada pelo gene *nptII* (Bevan et al., 1983), também sob o controle do promotor 35S do CaMV (Kay et al., 1987) e da seqüência "leader" (seqüência 5' não traduzida do RNA) do vírus do mosaico da alfafa (ativador da tradução). Este marcador (*nptII*) permite selecionar plantas transgênicas resistentes à canamicina e geneticina. O vetor binário pEND4K contendo o gene quimérico *Lhcb1*2* foi introduzido na linhagem LBA4404 da *Agrobacterium tumefaciens* por eletroporação de acordo com o protocolo de Lilley (1993).

Figura 02 - Mapa do vetor binário pENDK4 (Kloe et al., 1985) contendo o inserto do gene quimérico *Lhcb1*2* (35SCaMV–TPRBCS–*Lhcb1*2*).

3.7.2.2 Identificação dos transformantes por PCR

As plantas selecionadas em meio contendo geneticina foram submetidas à técnica de amplificação por PCR ("Polymerase Chain Reaction") para confirmação da transformação. A extração do DNA genômico foi realizada pelo método de Edwards (1996), sendo o DNA quantificado em gel de agarose 1%. As reações de amplificação foram conduzidas utilizando-se um volume total de 50 μ l, contendo 70 ng de DNA, 1x o tampão de reação, 1,5 μ M de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs, 50 pmol de cada primer (tabela 5) e 1 unidade de Taq polimerase. A mistura de reação foi coberta com 20 μ l de óleo mineral estéril e desnaturada por 3 minutos a 94 °C, sofrendo, em seguida, 35 ciclos de amplificação (45 segundos a 92 °C, 1 minuto a 58 °C, 2 minutos a 72 °C). O

volume de 8 µl de cada reação foi aplicado no gel de agarose 1 %, e submetido a 80 v por 3 horas (Sambrock et al., 1989). O produto da amplificação com os primers específicos para o transgene *Lhcb1*2* está descrito na Figura 3.

Tabela 05 - Conjunto de primers utilizados para amplificação por PCR.

Conjunto	Seqüência (de 5'para 3')	Produto da Amplificação
rtc1	CCT TGA ACC ACA CAG CTT CG	± 500 pb
35S-1	CCA CTA TGC TTG GGA AGA CC

Figura 03 - Posição de hibridização dos primers com o gene quimérico *Lhcb1*2*, para amplificação por PCR.

4 Resultados e Discussão

4.1 Experimentos pilotos de transformação por SAAT

4.1.1 Teste de resposta aos antibióticos

Uma condição essencial para o sucesso na obtenção de tecido transgênico é a eficiência na seleção do mesmo. O agente de seleção deve inibir totalmente o crescimento das células vegetais não transformadas, entretanto, a influência sobre as células transformadas deve ser mínima (Angenon et al., 1994). A seleção pode ser realizada pela utilização de genes que conferem resistência a herbicidas ou antibióticos. O vetor binário pTOK (Figura 1), utilizado nos experimentos de crescimento do feijoeiro, possui o gene *nptII* que confere resistência para antibióticos aminoglicosídeos, entre eles canamicina e geneticina, G418 (Ishida et al., 1996).

Um dos problemas da seleção por antibióticos é o aparecimento de 'escapes', ou seja, plantas que apresentam resistência ao antibiótico, mas que não são transgênicas. Com o intuito de determinar a melhor estratégia de seleção, foi realizado um experimento de sobrevivência dos explantes a diferentes concentrações de canamicina e geneticina. Os resultados demonstram que o cultivar Olathe Pinto não responde à canamicina nas concentrações utilizadas (Figura 4). Ocorre crescimento da plântula com o aumento da concentração de canamicina no meio, embora ocorra uma inibição do enraizamento, quando comparado ao controle (sem antibiótico). Angenon et al. (1994) consideram a canamicina um marcador eficiente para várias espécies

vegetais, entretanto algumas leguminosas e gramíneas apresentam resistência endógena, tornando-a ineficiente como agente seletivo para estas espécies. Tem sido relatado um efeito estimulatório de antibióticos no crescimento de algumas espécies vegetais. Paramomicina e neomicina estimularam a regeneração de discos foliares de maçã apresentando um efeito similar a reguladores de crescimento (Norelli & Aldwinckle, 1993), geneticina (G418) estimulou a regeneração de eucalipto, em concentrações muito próximas à concentração de seleção (He, 1997), e cefotaxima apresentou efeito estimulatório na regeneração de trigo e maçã (Norelli & Aldwinckle, 1993).

Os antibióticos aminoglicosídeos ligam-se a subunidade ribossômica 30S, inibindo a iniciação da tradução, e, conseqüentemente a síntese protéica. O efeito visível é a clorose da planta, amarelecimento das folhas, causada pela falta de síntese de clorofila (Wilmink & Dons, 1993). A enzima neomicina fosfatase II (NPTII), também designada como aminoglicosídeo-3-fosfotransferase (APH(3')II), fosforila um grupo hidroxila específico destes antibióticos, inibindo a ligação com o ribossomo (Wilmink & Dons, 1993).

A geneticina (G418) demonstrou ser mais eficiente (Figura 4), havendo inibição do crescimento em todas as concentrações testadas. Em monocotiledôneas resistentes a canamicina, como arroz, *Lolium* e outras gramíneas, geneticina tem sido mais eficiente na seleção, provavelmente por se ligar mais eficientemente ao ribossomo (Wilkimin et al., 1993; Angenon et al., 1994). Entretanto, seu efeito sobre o crescimento é muito mais tóxico. Em maçã (Wilmink & Dons, 1993), arroz (Dekeyser et al., 1989), beterraba (Catlin, 1990) e tulipa (Wilmink et al., 1995) seu efeito foi extremamente tóxico para ser utilizado como agente seletivo. Inicialmente, trabalhamos com a concentração de 10 mg/L, entretanto, todas as plântulas obtidas foram transformantes falso positivos (escapes). A partir deste ponto, passamos, então, a utilizar 20 mg/L de geneticina.

Figura 04 - Explantes de feijão cv. Olathe Pinto submetidos ao teste de sobrevivência à geneticina (Gen) ou à canamicina (Kan), após 30 dias de exposição ao agente seletivo.

4.1.2 Teste para eficiência do pré-tratamento em meio de multibrotação

O estado fisiológico e de desenvolvimento das células-alvo estão entre os parâmetros que afetam tanto a expressão transitória quanto a integração estável e regeneração de plantas transgênicas. Em geral, são mais apropriadas as células vigorosas, com alta taxa de divisão e capazes de suportar estresse (Lida et al., 1991; Block, 1993). O sucesso na recuperação de plantas transgênicas é dependente, entre outros fatores, da susceptibilidade do tecido alvo à *Agrobacterium*, e da capacidade de regeneração deste tecido (Block, 1993). A transformação de meristemas apicais e células embriogênicas tem sido mais eficiente para a obtenção de plantas transgênicas (Christou, 1994a, b; Block, 1993; Aragão et al., 1996; Birch, 1997). Entretanto, tem sido relatado que regiões meristemáticas, em geral, são recalcitrantes à transformação por

Agrobacterium (Gould et al., 1991; Lewis & Bliss, 1994; Smith & Hood, 1995). Lewis e Bliss (1994) sugerem que algum mecanismo de exclusão, como ocorre em casos de infecção viral, possa ocorrer no processo de infecção do meristema. Em milho, Sahi et al. (1990), descobriram que as células do meristema produziam um metabólito secundário com ação bacteriostática, que inibe a indução dos genes *vir*. Entretanto, como o composto é instável, um período de pré-cultura elimina este efeito. Hiei et al. (1994) obtiveram plantas transgênicas de arroz através da transformação de calos por *Agrobacterium*, entretanto não foram obtidos nenhum transformante proveniente de ápices caulinares, embora tenha sido relatado por outros autores previamente. Smith & Hood (1995) sugerem que a dificuldade em transformar o meristema via *Agrobacterium* esteja envolvida com alterações nas paredes celulares que reduzem ou inibem o acoplamento da *Agrobacterium*. Testes prévios com explantes de feijoeiro realizados em nosso laboratório demonstraram a ineficiência de transformação do meristema apical quando o explante era recém retirado do embrião.

Baseados nestes fatos, desenvolveu-se um teste para identificar a melhor fase de desenvolvimento dos explantes de feijão para efetuar a inoculação. Os embriões de feijão foram submetidos a diferentes dias de pré-tratamento em meio de multibrotação, e, então inoculados com a *Agrobacterium*. A tabela 6 apresenta a expressão transitória da atividade da β -glucoronidase. Considerou-se a presença ou ausência de pontos azuis, bem como, se as regiões onde se apresentavam estes pontos eram capazes de regenerar brotos. Neste caso, observou-se que não houve expressão transitória em embriões recém retirados dos cotilédones. Zhang et al. (1997) também encontraram uma baixa taxa de transformação da região meristemática em diferentes genótipos de *Phaseolus vulgaris*. Embora a eficiência de transformação após 5 a 7 dias em meio de multibrotação tenha sido entre 10% a 11%, não é possível regenerar plantas a partir das regiões transformadas, pois não são meristemáticas. Assim estabelecemos que 10 a 15 dias de pré-

tratamento como melhor fase de inoculação com *Agrobacterium*. A eficiência de transformação variou de 7,5 a 10,5% nos explantes tratados durante este período, e a atividade da β -glucoronidase estava presente nos brotos que regeneravam e nas regiões meristemáticas, o que não foi observado nos explantes tratados com os demais períodos de pré-tratamento. Estes resultados contradizem McClean et al. (1991) que desenvolveram um experimento para estudar a susceptibilidade de *Phaseolus vulgaris* cv. Othello, a diferentes biovars de *A. tumefaciens*. Eles infectaram o ápice caulinar em diferentes estágios de desenvolvimento, após a germinação, e observaram que plântulas de 1 a 3 dias são mais susceptíveis e formam tumores maiores que plântulas inoculadas após 5 a 7 dias da germinação. Entretanto, foi utilizado um cultivar diferente e inoculação direta nos ápices caulinares das plântulas em casa de vegetação. A ausência da cultura de tecidos e as diferenças genéticas e fisiológicas das variedades podem resultar em respostas divergentes à infecção pela *Agrobacterium* (Binns, 1990; Godwin et al., 1992).

Tabela 06 - Efeito do pré-tratamento dos embriões na eficiência de transformação de células de feijão cv. Olathe Pinto por *Agrobacterium tumefaciens*. Tempo de sonicação = 2 segundos.

Pré-tratamento (dias)	Nº total de embriões inoculados	Nº de embriões GUS* positivo	% de transformação	Observação
15	53	4	7,5	Atividade da β -glucoronidase nos brotos
13	51	2	3,9	Atividade da β -glucoronidase nos brotos
11	48	5	10,4	Atividade da β -glucoronidase nos brotos
9	47	5	10,6	Atividade da β -glucoronidase nos talos
7	59	6	10,2	Atividade da β -glucoronidase nos primórdios
5	60	7	11,7	Atividade da β -glucoronidase nos primórdios
3	65	3	4,6	Atividade da β -glucoronidase nos talos
1	57	-	0,0	-

* GUS positivo: que apresentavam regiões do tecido com coloração azulada (positiva para a atividade da β -glucoronidase).

4.1.3 Teste da eficiência de transformação por SAAT

Phaseolus vulgaris, até recentemente, era considerada uma espécie recalcitrante à transformação via *Agrobacterium*. Entretanto, a utilização de diferentes tipos de explantes, alterações nas condições de co-cultivo, e estudos com linhagens variadas de *Agrobacterium* demonstraram a susceptibilidade do feijoeiro, porém, ainda não foi descrito um método eficiente de transformação do feijoeiro via *Agrobacterium* (Mariotti et al., 1989; McClean & Grafton, 1989; Mohamed et al. , 1992a, 1992b; Malik & Saxena, 1992).

As variáveis que afetam a eficiência de transformação são estudadas caso a caso e determinadas para cada espécie, variedade e tipo de explante (Birch, 1997). Em geral estes estudos são realizados por meio de sistemas de expressão transitória, pois desta maneira, a expressão gênica pode ser observada imediatamente após a transferência do DNA, além disto, não é afetada por efeito de posição e pode ser estudada independente da regeneração das células transformadas, especialmente em espécies recalcitrantes (Kapila et al., 1997). Assim, testou-se a eficiência do método SAAT (Trick & Finer, 1997) na transformação do feijoeiro baseado nos resultados de expressão transitória da β -glucoronidase.

Foi encontrado em explantes de feijão (Tabela 2), que a inoculação de *Agrobacterium* sem sonicação resultou em baixa expressão transitória. Resultado similar foi encontrado por Trick & Finer (1998), quando estudaram o efeito do SAAT na eficiência de transformação de suspensão embriogênica de soja. Embora a eficiência de transformação (n° de embriões que apresentavam pontos azuis/ n° total de embriões inoculados) no caso do tratamento sem sonicação (tratamento 2) tenha sido cerca de 89%, a média de pontos azuis por embrião aumenta cerca de 4 vezes quando o explante é sonicado (Tratamentos 2 e 3 x Tratamentos 4 e 5).

Analisando a estimativa das médias dos pontos, observamos uma maior eficiência de transformação quando os embriões foram sonicados em conjunto com a *Agrobacterium*. Entretanto, Trick e Finer (1997) observaram, em diversas espécies, que a sonicação na presença de *Agrobacterium* não apresentava diferenças no nível de expressão transitória dos explantes sonicados antes da inoculação. Eles sugerem a sonicação conjunta por facilitar o trabalho.

As condições de luminosidade também estão entre os fatores que afetam a eficiência de transferência do T-DNA, juntamente com o pH e temperatura (Birch, 1997). Embora os protocolos de transformação sugiram que o co-cultivo do explante com o *Agrobacterium* seja realizado na ausência de luz, não foi encontrada nenhuma explicação disponível na literatura. Entretanto nossos

resultados demonstram um aumento do número de pontos de infecção quando os embriões são co-cultivados no escuro. Assim adotamos este critério no protocolo de co-cultivo.

Tabela 07 - Efeito da sonicação na eficiência de transformação de plântulas de feijoeiro cv. Olathe Pinto via *Agrobacterium*.

Tratamentos	Total de embriões	Nº de embriões infectados	Média de pontos por embriões
1	10	0	-
2	9	8	2,8
3	7	3	2,9
4	11	10	15,4
5	9	7	7,7
6	9	9	66,0
7	10	10	35,2

Tratamento 1=controle sonicado, não inoculado; 2=explante sem sonicar, inoculado e cultivado na ausência de luz por 48 horas; 3= explante sem sonicar, inoculado e cultivado na presença de luz por 48 horas; 4= explante sonicado, inoculado e cultivado na ausência de luz por 48 horas; 5= explante sonicado, inoculado e cultivado na presença de luz por 48 horas; 6= explante sonicado em conjunto com *Agrobacterium* e cultivado na ausência de luz por 48 horas; 7= explante sonicado em conjunto com *Agrobacterium* e cultivado na presença de luz por 48 horas

4.1.4 Teste da expressão estável

Ensaio da expressão transitória de genes repórter introduzidos nas células vegetais pode fornecer evidências claras da transferência gênica (Birch, 1997). Entretanto, segundo Kapila et al. (1997), cópias não integradas do T-DNA podem permanecer transitoriamente presentes no núcleo, podendo ser transcritas. Para haver transformação estável é necessária a integração do T-DNA dentro do genoma vegetal, por isto a expressão estável é menos eficiente que a expressão transitória (Kapila et al., 1997).

Com o intuito de estudar a eficiência do método SAAT na obtenção de transformação estável de tecidos de feijoeiro, desenvolveu-se um experimento

no qual sonicou-se os explantes por dois segundos, em conjunto com a *Agrobacterium*, e analisou-se a expressão da β -glucoronidase após 0, 15 e 30 dias da inoculação. A expressão da β -glucoronidase foi detectada em explantes em todas as fases de pós-inoculação estudadas, em sua maioria esta atividade apareceu dispersa em pontos nas folhas (Figura 5). Apenas 2 brotos transformados foram observados (Figuras 6 e 7). Trick & Finer (1997, 1998) obtiveram expressão estável em soja e grão de bico, somente quando tratados com este método. Plantas transgênicas de soja foram obtidas a partir da transformação de tecidos embriogênicos em suspensão (Trick & Finer, 1998). Entretanto, todas eram estéreis devido ao tipo de explante utilizado. Em 1998, Santarém et al., utilizando SAAT em cotilédones imaturos de soja obtiveram plantas transgênicas, a partir da regeneração de embriões somáticos. Como já descrito anteriormente, o tipo de tecido, o estágio fisiológico, a idade e a capacidade de regeneração alteram a eficiência de obtenção das plantas transgênicas (Birch, 1997).

Tabela 08 - Atividade da β -glucoronidase em explantes de feijoeiro cv. Olathe Pinto pré-tratados em meio de multibrotação. Resultados expressos em porcentagem (total de explantes apresentando atividade da β -glucoronidase/total de explantes inoculados).

Tempo de pré-tratamento (dias)	Dias após inoculação		
	0	15	30
10	66,7	76,9	55,0
12	55,0	89,5	74,4
14	70,6	90,0	47,4
18	30,0	50,0	37,5
20	75,0	47,4	31,6

Observando a tabela 8 pode-se notar que a expressão estável tende a diminuir nos explantes com tempos de tratamento superior a 14 dias. Esta redução ocorre, provavelmente, porque estes explantes já estão liberando os

primórdios foliares, que são transformados facilmente (0 dias), mas não resistem ao processo de seleção, pois não são capazes de regeneração. Assim, como já observado anteriormente (4.1.2), foi determinado que o tempo de pré-tratamento por 10 a 12 dias em meio de multibrotação é melhor para a expressão estável da β -glucoronidase em explantes de feijão tratados com SAAT.

Figura 05 - Atividade da β -glucoronidase em folhas de *Phaseolus vulgaris* cv. Olathe Pinto, após 30 dias de inoculação e 12 dias de pré-tratamento.

Figura 06 - Broto transgênico de *Phaseolus vulgaris* cv. Olathe Pinto, após 30 dias de inoculação e 14 dias de pré-tratamento.

Figura 07 - Broto transgênico de *Phaseolus vulgaris* cv. Olathe Pinto após 15 dias de inoculação e 10 dias de pré-tratamento.

4.2 Desenvolvimento do protocolo de transformação por SAAT

Os experimentos anteriores demonstraram a possibilidade de transformação estável de *Phaseolus vulgaris* via SAAT. A seguir foram ajustados diversos parâmetros que afetam a eficiência da transformação genética por este método. O objetivo foi desenvolver um protocolo de transformação do feijoeiro via SAAT.

4.2.1 Efeito do tempo de co-cultivo

Evidências têm demonstrado que a interação com o hospedeiro é dependente do protocolo utilizado para infectar o explante (Birch, 1997). Segundo Godwin et al. (1992) alterações das condições de co-cultivo podem levar ao sucesso da transferência do T-DNA para as espécies consideradas recalcitrantes, como monocotiledôneas e leguminosas. O tempo de co-cultivo determina as condições ideais para a proliferação das células vegetais competentes, como alvos potenciais de transformação e permite uma condição ótima para indução de virulência e transferência do gene (Godwin et al., 1992). Ele é definido empiricamente dependendo da espécie e do explante utilizado, em geral as maiores taxas de infecção correspondem aos maiores níveis de expressão do GUS (Zhang et al., 1997). Assim, foi desenvolvido um experimento para testar o efeito do tempo de co-cultivo líquido e sólido na eficiência de transformação, com o objetivo de aumentar as possibilidades de obtenção de plantas de feijão transgênicas via *Agrobacterium*.

A análise estatística dos resultados demonstra que houve diferença significativa entre todos os tratamentos (Tabela 9), ocorrendo uma interação entre co-cultivo líquido e sólido. O tempo de co-cultivo líquido em suspensão de *Agrobacterium*, por 15 minutos, não apresenta diferença significativa entre as médias, independente do tempo de co-cultivo sólido (Figura 8 e Tabela 10). As

médias dos tempos de co-cultivo líquido de 2 horas apresentam diferenças estatísticas em função dos tempos de co-cultivo sólido (Figura 8 e Tabela 10), o mesmo pode ser observado para o tempo de co-cultivo líquido de 24 horas. Em ambos os casos, quando o explante foi co-cultivado por 48 horas em meio sólido, a expressão transitória foi maior. Estes resultados indicam que o tempo de co-cultivo líquido por duas horas e 48 horas de co-cultivo sólido são os ideais para intensificar a expressão transitória do gene *uidA*. Neste experimento, não foi analisado o efeito da presença de acetoceringona.

Li et al. (1996) observaram, em cotilédones de mandioca, que o maior tempo de co-cultivo aumentou a eficiência de transformação transitória, entretanto, no nosso experimento, o aumento do tempo de co-cultivo diminuiu a eficiência de transformação (Figura 5). Segundo Draper & Scott, 1994, alguns tecidos são hipersensíveis à infecção e morrem após a exposição à *Agrobacterium*. Estes tecidos podem requerer uma menor concentração de *Agrobacterium*, ou a eliminação de antibióticos do inóculo, ou mesmo, um menor tempo de exposição ao patógeno de maneira a aumentar a vitalidade do explante (Mathis & Hinchey, 1994). Em trigo, foi demonstrado que diferentes tecidos e células apresentam níveis de sobrevivência variados após a inoculação com *A. tumefaciens* (Cheng et al., 1997).

Tabela 09 - Resumo da análise estatística baseada no modelo generalizado (Nelder & Wededlburn, 1972) para co-cultivo.

Fonte	Desvio Padrão	GL	χ^2	Probabilidade
Interseção	88,0468	0		
Líquido	73,4586	2	14,5882	0,0007***
Sólido	59,3285	2	14,1301	0,0009***
Interação	45,5142	4	13,8143	0,0079**

Obs: ***significativo a 0,1%; **significativo a 1%

Tabela 10 - Desdobramento da interação líquido/sólido.

Fonte	Desvio Padrão	GL	χ^2	Probabilidade
Interseção	88,0468	0		
Líquido	73,4586	2	14,5882	0,0007***
Sólido x líquido (15min)	29,4970	2	0,72	0,6972 ^{n.s.}
Sólido x líquido (120min)	6,2316	2	18,51	<0,0001***
24hs vs resto		1	12,89	0,0003***
48hs vs 72hs		1	5,54	0,0185*
Sólido x líquido (1440min)	9,7856	2	8,71	<0,0128*
24hs vs resto		1	0,54	0,4624 ^{n.s.}
48hs vs 72hs		1	7,16	0,0074**

Obs.: ***significativo a 0,1%; **significativo a 1%; *significativo a 5%; ^{n.s.} não significativo

Figura 08 - Efeito do tempo de co-cultivo na expressão transitória de explantes de feijão cv. Olathe Pinto. Tratamento 1= 15 minutos em meio líquido e 24 horas em meio sólido; 2= 15 minutos em meio líquido e 48 horas em meio sólido; 3 = 15 minutos em meio líquido e 72 horas em meio sólido; 4= 2 horas em meio líquido e 24 horas em meio sólido; 5= 2 horas em meio líquido e 48 horas em meio sólido; 6= 2 horas em meio líquido e 72 horas em meio sólido; 7= 24 horas em meio líquido e 24 horas em meio sólido; 8=24 horas em meio líquido e 48 horas em meio sólido; 9= 24 horas em meio líquido e 72 horas em meio sólido. Média de 3 repetições.

4.2.2 Efeito da acetoceringona

Algumas variáveis são importantes para a transformação por *Agrobacterium*, como por exemplo, o tratamento com indutores dos genes *vir*. Entre eles, o mais utilizado é a acetoceringona, um composto fenólico liberado por algumas espécies vegetais em resposta a um ferimento. A acetoceringona aumenta o processo de transformação e é rotineiramente utilizada nos protocolos de transformação via *Agrobacterium* (Trick & Finer, 1997). Os resultados mostram um efeito estimulador na expressão transitória, principalmente quando a acetoceringona estava presente no co-cultivo sólido (Figura 9 e Tabelas 11 e 12). Houve efeito significativo da acetoceringona, tanto em meio líquido quanto sólido, sendo que, em ambos os casos, a presença da acetoceringona propiciou uma maior eficiência de transformação. Como observado no experimento de co-cultivo, na ausência de acetoceringona, o co-cultivo líquido por 2 horas (tratamento 1, Figura 9) apresenta uma média da expressão transitória, superior ao tempo de 24 horas (tratamento 5, Figura 9). Entretanto, o tempo de co-cultivo líquido de 24 horas na presença da acetoceringona, foi considerado o melhor porque observamos que a extensão da expressão transitória nos tecidos vegetais foi maior que nos demais tratamentos (Figura 10).

A acetoceringona é inicialmente reconhecida pela proteína VirA (Godwin et al., 1992). Após o reconhecimento, a proteína VirA se autofosforila, em seguida fosforila a proteína VirG que irá ativar os demais genes do operon *vir*. O vetor binário utilizado (pTOK233) contém cópias dos genes *virB*, *virC*, *virG*. O gene *virB* codifica para proteínas localizadas na membrana que interagem para formar um poro ou canal através do qual o T-DNA é transferido (Weising & Kahl, 1996). A proteína VirC auxilia no processo de excisão da fita T e está relacionada ao aumento da eficiência de transferência do T-DNA (Weising & Kahl, 1996 ; Godwin et al., 1992). Estes vetores foram desenvolvidos para aumentar a eficiência de transferência do T-DNA ou para obter a transformação

de espécies consideradas recalcitrantes à *Agrobacterium*, como é o caso de *Phaseolus vulgaris* (Grant et al., 1993). Pelos resultados encontrados nos experimentos de co-cultivo (Figura 8) e de acetoceringona (Figura 9) podemos inferir que, à semelhança de algumas monocotiledôneas, *P. vulgaris* não produz indutores suficientes para ativar a expressão dos genes *vir* (Smith & Hood, 1995; Arencibia et al., 1998), sendo necessária a utilização de um indutor.

Tabela 11 - Resumo da análise estatística baseada no modelo generalizado (Nelder & Wededlburn, 1972) para efeito da acetoceringona.

Fonte	Desvio Padrão	GL	X ²	Probabilidade
Intercessão	164,7258	0	.	
Tempo	164,4437	1	0,2821	0,5953 n.s.
Aceto/Líquido	143,6684	1	20,7753	0,0001***
Aceto/Sólido	27,4677	1	116,2007	0,0001***
Aceto/líquido*Aceto/sólido	27,4677	1	0,0000	0,9735 n.s.
Tempo*Aceto/Líquido	23,5988	1	3,8689	0,0592 n.s.
Tempo*Aceto/Sólido	23,5980	1	0,0008	0,9777 n.s.
Tempo*Aceto/S*Aceto/L	21,1393	2	2,4586	0,2925 n.s.

Obs: S = sólido; L = Líquido; Aceto= Acetoceringona; n.s. = não significativo; *** significativo a 1%.

Tabela 12 - Média dos resultados em função da presença ou ausência de acetoceringona no meio sólido ou líquido

Acetoceringona	Acetoceringona líquido	
	Presente	Ausente
Sólido		
Presente	98,34	85,00
Ausente	53,34	9,99

Figura 09 - Efeito da acetoceringona na expressão transitória de explantes de feijão cv. Olathe Pinto. Tratamento 1= 2 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; 2= 2 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona; 3= 2 horas de co-cultivo líquido, com acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; 4= 2 horas de co-cultivo líquido, com acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona; 5= 24 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; 6= 24 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona; 7= 24 horas de co-cultivo líquido, com acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; 8= 24 horas de co-cultivo líquido, com acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona.

Figura 10 - Atividade β -glucoronidase em explantes de feijão cv. Olathe Pinto com 12 dias de pré-tratamento em meio de multibrotação. Tratamento **A**= 2 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; **B**= 2 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona; **C**= 2 horas de co-cultivo líquido, com acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; **D**= 2 horas de co-cultivo líquido, com acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona; **E**= 24 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; **F**= 24 horas de co-cultivo líquido, sem acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona; **G**= 24 horas de co-cultivo líquido, com acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido sem acetoceringona; **H**= 24 horas de co-cultivo líquido, com acetoceringona e 48 horas de co-cultivo sólido com acetoceringona.

4.2.3 Efeito da pré-incubação

A produção de ferimento no explante a ser transformado, seguido de incubação em meio líquido durante um determinado período de tempo, antes da inoculação com *Agrobacterium*, aumentou a eficiência de transformação em tabaco (Sunilkumar et al., 1999), *Arabidopsis thaliana* (Schmidt & Willmitzer., 1988; Shangwan et al., 1992), tomate (Fillati et al., 1987). Não se compreende exatamente qual o mecanismo envolvido neste processo, mas acredita-se que a intensa divisão celular em função do ferimento aumenta o acoplamento do *Agrobacterium* à parede celular recém formada, bem como a produção de compostos indutores dos genes *vir* (Sunilkumar et al., 1999). Este estudo visa observar o efeito da pré-incubação na eficiência de transformação transitória, por meio da sonicação dos explantes 24 horas antes da inoculação via SAAT.

Embora a análise estatística demonstre diferenças significativas entre os resultados da pré-incubação e da interação entre pré-incubação e SAAT (Tabela 13), o desdobramento da interação demonstra que estas diferenças são significativas somente na ausência de pré-incubação (Tabela 14). A Figura 11 representa melhor estes resultados, as diferenças ocorrem entre o tratamento 1 (ausência de pré-incubação e SAAT de 30 segundos) e demais tratamentos. O tratamento 2 (ausência de pré-incubação e SAAT de 60 segundos) não apresenta diferença significativa quando comparado aos tratamentos 3 a 6 (Figura 11 e Tabela 14). Os resultados, indicam que a pré-incubação não é essencial para o aumento da eficiência de transformação. Entretanto, este experimento foi realizado na ausência de acetoceringona. Sukilkumar et al. (1999) observaram um aumento da expressão transitória β -glucoronidase em discos foliares de tabaco pré-incubados por 24 horas, principalmente na presença de acetoceringona.

Tabela 13 - Resumo da análise estatística baseada no modelo generalizado (Nelder & Wededlburn, 1972) para pré-incubação.

Fonte	Desvio Padrão	GL	X ²	Probabilidade
Intercessão	35,0159	0		
Pré-incubação	27,8955	2	7,1204	0,0284*
SAAT	26,9076	1	0,9879	0,3203 n.s.
Pré*SAAT	20,9014	2	6,0063	0,0496*

Obs: * significativo a 5%; n.s. não significativo.

Tabela 14 - Desdobramento da interação Pré-incubação vs SAAT.

Fonte	Desvio Padrão	GL	X ²	Probabilidade
Intercessão	35,0159	0		
Pré-incubação	27,8955	2	7,1204	0,0284*
0 vs resto		1	4,17	0,0411*
30 vs 60		1	0,58	0,4463 n.s.
SAAT (0)	11,0156	1	5,50	0,0191*
SAAT (30)	3,3850	1	0,00	1,000 n.s.
SAAT (60)	6,5008	1	1,50	0,221 n.s.

Obs: * significativo a 5%; n.s. não significativo.

Figura 11 - Efeito da pré-incubação na expressão transitória de explantes de feijão cv. Olathe Pinto. Tratamento 1= 0 segundos de pré-incubação e 30 segundos de SAAT; 2= 0 segundos de pré-incubação e 60 segundos de SAAT; 3= 30 segundos de pré-incubação e 30 segundos de SAAT; 4= 30 segundos de pré-incubação e 60 segundos de SAAT; 5= 60 segundos de pré-incubação e 30 segundos de SAAT; 6= 60 segundos de pré-incubação e 60 segundos de SAAT.

3.2.4 Efeito do tempo de sonicação na expressão transitória da β -glucoronidase

Um dos fatores que afetam a eficiência da transformação via SAAT é a duração da sonicação. Em seu primeiro trabalho, Trick & Finer (1997) observaram, em todos os tecidos tratados, a presença de microferimentos que aumentavam em função do tempo de sonicação. Embora os tecidos tenham respondido a variados tempos de duração SAAT (1-100segundos), eles foram, em geral, danificados por longos períodos SAAT e a resposta a cultura de tecidos foi reduzida (Trick e Finer, 1997; 1998). Intensidades muito altas podem causar lise e consequente morte das células, influenciando na regeneração dos tecidos (Joersbo & Brunstedt, 1992). Assim, Trick & Finer (1997), sugerem que o tempo de sonicação seja suficiente para obter a maior eficiência de transformação, entretanto tendo-se cuidado para causar o mínimo de dano aos tecidos.

Dessa forma desenvolveu-se um experimento com os seguintes tempos de sonicação: 0, 2, 4, 10, 30, e 60 segundos. A Figura 12 mostra um aumento da eficiência de transformação quando os embriões são sonicados, embora a análise estatística não apresente diferenças significativas quando comparamos todas as médias (Tabela 15). Os tratamentos 1 a 5 apresentam médias muito próximas (Figura 12), e grande desvio padrão, não havendo diferenças significativas ($p=0,01$) (Tabela 16). Entretanto o contraste das médias entre sonicação dos explantes por 60 segundos (tratamento 6) e os explantes não sonicados (tratamento 1) apresenta diferença significativa ($p=0,01$) (Tabela 16).

A Figura 13 demonstra um crescimento da extensão da expressão transitória da β -glucoronidase em função do aumento do tempo de sonicação. A expressão transitória é visualizada em pequenas extensões dos primórdios foliares (Figura 13-B a D) ou na totalidade destes incluindo regiões meristemáticas (Figura 13-E e F). Segundo Joersbo & Brunstedt (1992), doses subletais de ultrassom resultam em moderada ruptura das paredes celulares

(Ítem 4.3), o que, aparentemente, é muito útil para a transformação via *Agrobacterium*. Estes ferimentos podem produzir moléculas sinais, e aumentar a acessibilidade de fatores ligantes à *Agrobacterium* na parede celular recém formada (Santarém et al., 1998). Os resultados indicam que o tempo de 60 segundos de sonicação foi melhor para a obtenção da maior expressão transitória da β -glucoronidase.

Figura 12 - Efeito do tempo de sonicação na expressão transitória de explantes de feijão cv. Olathe Pinto. Tratamento 1= sem sonicação; 2= 2 segundos; 3= 4 segundos; 4=10 segundos; 5= 30 segundos; 6= 60 segundos. Média de 3 repetições.

Tabela 15 - Resumo da análise estatística baseada no modelo linear generalizado (Nelder & Wededlburn, 1972).

Fonte	Desvio Padrão	GL	X ²	Probabilidade
Interseção	33,8277	0		
Tratamentos	29,7451	5	4,0826	0,5376 ^{n.s.}

Obs.: n.s. não significativo

Tabela 16 - Contraste entre os tempos de sonicação.

Contraste	GL	χ^2	Probabilidade	Tipo
0 vs outros	1	1,7573	0,1850 ^{n.s.}	LR
0 vs 60	1	3,8417	0,0500*	LR

Obs.: n.s. não significativo; * significativo a 5%

Figura 13 - Atividade da β -glucuronidase nos tecidos de explantes de feijão cv. Olathe Pinto sonicados em diferentes períodos de tempo. Tratamento **A**= 0 segundos, **B**= 2 segundos; **C**= 4 segundos, **D**= 10 segundos, **E**= 30 segundos, **F**= 60 segundos.

4.2.5 Efeito do tempo de sonicação na expressão estável da β -glucoronidase

As análises da expressão transitória indicam o tempo de 60 segundos como melhor para transformação dos embriões pré-tratados de *Phaseolus vulgaris* L. Entretanto, a maior duração do SAAT pode comprometer a regeneração dos tecidos mais sensíveis, pois podem causar super-aquecimento do tecido, além de lise e destruição celular (Joersbo & Brusntedt, 1992; Trick & Finer, 1997, 1998). Também devemos considerar que para a obtenção de plantas transgênicas é necessário, além da transferência do T-DNA pela *Agrobacterium*, a integração deste T-DNA no genoma da célula vegetal e a replicação deste DNA exógeno quando estas células se multiplicam. É possível que, durante o processo de multiplicação das células, este T-DNA seja reconhecido como exógeno sendo eliminado ou silenciado (Finnegan & McElroy, 1994; Stam et al., 1997).

Este experimento foi realizado com o intuito de identificar o melhor tempo de sonicação para obtenção da expressão estável da β -glucoronidase, 30 dias após a inoculação. Observamos pela Figura 14 que à medida em que aumentamos o tempo de sonicação, obtemos uma maior expressão estável, embora os resultados apresentem uma média semelhante para 10 e 30 segundos, a dispersão é maior. A análise de regressão com as estimativas das médias (Tabelas 17 e 18) foi significativa ao nível de 1%.

Figura 14 - Efeito do tempo de sonicação na expressão estável do gene *uidA*.
(◆) Dados observados; (■ — ■) Dados estimados

Tabela 17 - Análises dos parâmetros estimados (Nelder & Wededlburn, 1972).

Parâmetro	GL	Estimado	Erro Padrão	X ²	Probabilidade
Intercessão	1	-0,4147	0,2546	2,6516	0,1034 ^{n.s.}
Tratamento	1	0,0367	0,0112	10,6908	0,0011**
Escala	0	1,0000	0,0000		

Obs: n.s. não significativo; ** significativo a 1%

Tabela 18 - Resumo da análise estatística baseada no modelo generalizado (Nelder & Wededlburn, 1972) para expressão estável.

Fonte	Desvio Padrão	GL	X ²	Probabilidade
Intercessão	63,9320	0		
Tratamento	50,6520	1	13,2801	0,0003**

Obs.: ** significativo a 1%

Houve um efeito significativo do tempo de sonicação em segundos, sendo a relação entre o tempo de sonicação e a porcentagem de transformação dada pela seguinte equação:

$$\hat{y} = n \left(\frac{e^{63932 + 50652t}}{1 + e^{63932 + 50652t}} \right)$$

Pela equação, as médias estimadas apresentam uma relação linear, quando se aumenta o tempo de sonicação (Figura 14). O tempo de 60 segundos é o mais indicado para a obtenção de tecidos com expressão estável. Santarém et al. (1998) observaram, em cotilédones de soja, uma diminuição na formação de embriões somáticos em SAAT superiores a 5 segundos. Entretanto, Trick & Finer (1998), estudando o impacto da sonicação no crescimento de suspensões de tecidos embriogênicos, concluíram que, embora o tecido tenha sido originariamente danificado, após algumas semanas os tecidos sobrevivem e recuperam a proliferação em taxas similares ao controle não sonicado. Com isto, os autores sugerem que a duração do tratamento SAAT seja determinado empiricamente para cada tecido e espécie estudado.

Não observou-se a presença de nenhum broto transgênico, apenas extensas regiões nos tecidos foliares que apresentavam maior ou menor grau de expressão estável. A ausência de brotos completamente transgênicos pode ser devido ao método de seleção, ou à baixa concentração do antibiótico. Conforme discutido anteriormente, a seleção por antibióticos pode levar à produção de escapes, quando o tecido pode apresentar resistência endógena ao antibiótico (Godwin et al., 1992; Norelli & Aldwinckle, 1993; Angenon et al., 1994). Para contornar este problema pode-se aumentar a concentração do antibiótico, o tempo de exposição ao mesmo, substituição do antibiótico por análogos como paramomicina ou neomicina, ou utilizar vetores contendo genes específicos para resistência a outros agentes seletivos, como por exemplo herbicidas.

4.3 Análises de microscopia

4.3.1 Microscopia de varredura e óptica

Trick & Finer (1997) sugerem que o aumento da expressão transitória da β -glucoronidase em resposta ao tratamento SAAT é causado pelos microferimentos induzidos pela cavitação, os quais facilitam a infecção pela *Agrobacterium*. A cavitação pode ser transitória ou estável. Durante a cavitação transitória, pequenas bolhas são formadas, estas bolhas oscilam em tamanho até alcançar um ponto crítico no qual elas implodem. A implosão gera ondas de choque que podem ser fortes o suficiente para causar danos mecânicos nas células e macromoléculas (Joersbo & Brunstedt, 1992; Trick & Finer, 1997; Wyber et al., 1997). Cavitação estável resulta da oscilação rápida do tamanho de grandes bolhas, gerando um movimento instantâneo ao redor da bolha ("microstreaming"). A alta velocidade deste movimento resulta, também, em danos nos tecidos e moléculas vegetais (Joersbo & Brunstedt, Trick & Finer, 1997; 1992; Wyber et al., 1997). Provavelmente ambos os mecanismos ocorrem durante a sonicação dos tecidos.

As análises de microscopia óptica e de varredura demonstraram que o tratamento de sonicação causa microferimentos na superfície do tecido vegetal (Figuras 15, 16, 17 e 18). Na figura 14, é possível observar a presença de *Agrobacterium* na superfície dos primórdios foliares. No explante não sonicado a epiderme funciona como uma barreira à *Agrobacterium* (Figura 15-A), enquanto o material tratado apresenta microfissuras que permitem a invasão do *Agrobacterium* (Figura 15-B). Segundo Trick & Finer (1997), estes microferimentos podem variar de 1 μ m até 1 mm, dependendo da intensidade do tratamento. Esta amplitude é suficiente para permitir a invasão da *Agrobacterium* no interior das células ou nos espaços intercelulares do tecido vegetal (Figura 14). Trick & Finer (1997, 1998) também observaram, através da microscopia de varredura, que a superfície do tecido tratado apresentava

microfisuras que permitiam o acesso da *Agrobacterium* ao mesófilo, ao contrário do que acontecia com os primórdios foliares não tratados.

Observando a Figura 15 é possível notar que a sonicação altera o quimiotactismo da *Agrobacterium* pelo explante, inclusive sendo possível observar a proximidade da bactéria nas regiões meristemáticas (Figura 16 e 17). A sonicação causa rompimento na parede celular, o que permite a invasão da *Agrobacterium* (Figura 18). É possível observar células intactas próximas às regiões colonizadas (Figuras 16, 17 e 18) como estas células são os possíveis alvos para a transferência do T-DNA, aumenta-se a extensão do tecido atingido, conseqüentemente a eficiência da transformação. Resultado semelhante foi observado por Trick & Finer (1998) em soja. As paredes celulares do tecido embrionário não tratado estavam intactas, não havendo invasão do mesófilo, entretanto, o tecido tratado apresentava rupturas nas células epidérmicas e subepidérmicas, podendo ser observada a colonização da bactéria em ambos os tecidos, bem como células intactas na camada subepidérmica.

A grande vantagem de atingir o interior dos tecidos ocorre quando os alvos são os nós cotiledonares ou os meristemas apicais que, em geral, costumam estar protegidos sob diversas camadas celulares (Trick & Finer, 1997, 1998). Segundo Aragão & Rech (1997), alguns dos fatores que afetam a transformação de certas variedades de feijão é a impossibilidade de se atingir o meristema apical, pois este está protegido pelos primórdios foliares. A utilização do SAAT poderia resolver este problema, permitindo a transformação das variedades comerciais brasileiras. Santarém et al. (1998) demonstraram, em cotilédones de soja, que o tratamento SAAT não é genótipo específico. A resposta diferenciada à *Agrobacterium* apresentada pelos cultivares pode ser causada por reações diferentes ao estresse do ferimento, segundo os autores a sonicação pode minimizar estas diferenças.

Figura 15 - Análise da superfície dos primórdios foliares de explante de feijoeiro ao microscópio de varredura, 14 dias após pré-tratamento em meio de multibrotção. **A**= não sonicado, inoculado (barra = 5µm), **B**= sonicado 60 segundos, inoculado (barra = 5 µm), seta indica a microfissura e invasão da *Agrobacterium*.

Figura 16 - Cortes longitudinais do ápice caulinar de feijoeiro (*P. vulgaris* L.) pré-tratado por 14 dias em meio de multibrotação. **A**= controle, não sonicado, inoculado; **B**= sonicado 60 segundos, inoculado.

Figura 17 - Detalhe do meristema apical caulinar do explante sonificado por 60 segundos em conjunto com *Agrobacterium*. A seta indica a presença da *Agrobacterium* na região do domo meristemático.

Figura 18 – Cortes transversais de primórdios foliares do explante. **A**= controle, não sonificado, inoculado (barra= 19 μm); **B**= sonificado por 60 segundos e inoculado, no qual observam-se células epidérmicas e subepidérmicas rompidas e apresentando *Agrobacterium* no seu interior (barra= 7,5 μm).

4.6 Transformação de *Phaseolus vulgaris* via SAAT

4.6.1 Transformação com o gene *uidA*

Embora, 77,5% dos explantes submetidos a SAAT por 30 segundos tenha apresentado uma expressão estável em primórdios foliares, nenhum broto transgênico foi obtido. Apenas as folhas externas apresentavam regiões de coloração azul (Figura 19). Já com SAAT por 60 segundos, 70% dos explantes inoculados apresentaram expressão estável da β -glucoronidase. Desses, observamos seis brotos completamente transgênicos depois de 30 dias em meio contendo 20 mg/L de geneticina, provenientes de 2 explantes diferentes (Figuras 20 e 21). Segundo Aragão & Rech (2001), a região meristemática apical do feijoeiro é composta pelo meristema apical, o primórdio foliar e as folhas primárias. O meristema apical apresenta 3 camadas de células distintas (L1, L2 e L3). Os brotos recém formados se originam das camadas sub-epidérmicas (L2 e L3), e a camada L1 pode participar de sua formação.

Os resultados de microscopia óptica (Figuras 16, 17 e 18) demonstram que o tempo de sonicação de 60 segundos permite a penetração da *Agrobacterium* no tecido, em alguns casos alcançando regiões próximas ao meristema (Figura 16). É possível que esta duração SAAT permita que o *Agrobacterium* alcance as camadas L2 e L3 do meristema apical, o que não ocorreria em tempos SAAT inferiores a 60 segundos. Os resultados confirmam que 60 segundos é o tempo recomendado para transformação via SAAT de embriões de feijão pré-tratados em meio de multibrotação.

Figura 19 - Explantes de feijão cv. Olathe Pinto submetido à SAAT por 30 segundos, mantidos por 30 dias em meio seletivo contendo 20 mg/L de geneticina.

Figura 20 - Explantes de feijão cv. Olathe Pinto submetido à SAAT por 60 segundos, mantidos por 30 dias em meio seletivo contendo 20 mg/L de geneticina.

Figura 21 - Explantes de feijão cv. Olathe Pinto submetido à SAAT por 60 segundos, mantidos por 30 dias em meio seletivo contendo 20 mg/L de geneticina.

4.6.2 Transformação com o gene *Lhcb1*2*

O experimento teve por objetivo obter plantas transgênicas de feijão superexpressando o gene quimérico *Lhcb1*2*, através da transformação gênica via SAAT. O gene *Lhcb1*2* codifica para a proteína CAB ("Chlorophyll a/b binding protein"), principal componente do sistema coletor do fotossistema II. Em plantas de tabaco a superexpressão desse gene levou a um aumento da capacidade fotossintética em condições limitantes de luz (Ko et al., 1992; Real, 1997). A obtenção de feijoeiro transgênico que superexpressam a proteína CAB poderá representar uma importante contribuição para aumentar a eficiência de sistemas de cultivo consorciado

Dos 150 explantes submetidos a SAAT por 30 segundos, regeneramos 28 plântulas resistentes à geneticina (geneticina 10 ml/L) e proveniente de embriões diferentes. Amostras de folhas destas plântulas foram coletadas para

extração do DNA e análise por PCR, imediatamente antes de serem transferidas para vasos. Do total de plântulas analisadas, 20 apresentaram resultado positivo, ou seja o produto da amplificação com primers específicos para o transgene (Figura 22). Após 3 semanas de aclimação em câmara de crescimento, as plantas foram transferidas para casa de vegetação. Novos discos foliares foram coletados para nova extração de DNA e análise confirmativa por PCR, entretanto, após este período, não observou-se amplificação do transgene *Lhcb1*2*.

Este experimento foi realizado antes de estudarmos todos os parâmetros que poderiam afetar a eficiência da transformação do feijoeiro via SAAT. Assim, baseado em todos os estudos realizados podemos inferir que o fracasso na obtenção de plantas transgênicas de feijoeiro contendo o gene *Lhcb1*2*, se deve: a) à utilização do tempo de 30 segundos de sonicação pois, conforme observado no experimento de transformação com gene *uidA* (Figura 19), atinge apenas as folhas superficiais, não havendo formação de brotos transgênicos; b) a não utilização de acetoceringona; c) à seleção realizada com geneticina na concentração de 10 mg/L.

Figura 22 - Transformação de Feijão cv. Olathe Pinto via SAAT. Análise de PCR para o gene *Lhcb1*2*. Amostra 1 = controle dos componentes de reação, sem DNA; 2= Controle negativo (Feijão selvagem); 3 a 34 = transformantes putativos; 35 = controle positivo (tabaco cab). Setas apontam região de amplificação do gene por PCR, na altura de 500pb.

5 Conclusões

- ➔ Os embriões de *Phaseolus vulgaris*, cultivar Olathe Pinto, necessitam de pré-tratamento de 10 a 12 dias em meio de multibrotação (MS3% contendo 44,3 μ M de benzilaminopurina - BAP) antes de serem submetidos à transformação via SAAT.
- ➔ Na ausência de acetoceringona, os tempos de co-cultivo líquido de 2 horas e sólido de 48 horas são os mais eficientes para a transformação transitória de embriões de *P. vulgaris*, cultivar Olathe Pinto pré-tratados por 10 a 15 dias em meio de multibrotação.
- ➔ A utilização de 20 mg/L de acetoceringona no meio líquido e sólido aumentou a eficiência de transformação transitória, e alterou o efeito do tempo de co-cultivo. Sendo considerado melhor o tempo de 24 horas em meio líquido e 48 horas em meio sólido.
- ➔ A pré-incubação dos explantes 24 horas antes da inoculação via SAAT, com o intuito de induzir os genes *vir*, não aumenta a expressão transitória.
- ➔ A sonicação induz a formação de fissuras no tecido vegetal e aumenta a exposição do interior das células à *Agrobacterium*.

- ➔ O tempo de sonicação de 60 segundos é o mais eficiente para a expressão transitória e estável de *P.vulgaris*, cultivar Olathe Pinto, pré-tratados por 10 a 12 dias em meio de multibrotação.

Referências Bibliográficas

- ABREU, A.F.B. Avaliação de progênies de feijoeiro do cruzamento “carioca 80” x “rio tibagi” em diferentes densidades de plantio. Lavras, 1998. 63p. Dissertação (M.S.) Escola Superior de agricultura de Lavras.
- ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas.** Rio de Janeiro: Usaid, 1991. 381p.
- ANGENON, G.; DILLEN, W.; VANMONTAGU, M. Antibiotic resistance markers for plant transformation. In: **Plant Molecular Biology Manual.** v.C1. Belgium: Kluwer Academic Publishers, 1994., p.1-13.
- ARAGÃO, F.J.L.; BARROS, L.M.G.; BRASILEIRO, A.C.M.; FARIA, J.C.; RECH, E.L.. Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an electrical particle acceleration device. **Plant Cell Reports.**, v. 12, p.483-490. 1993.
- ARAGÃO, F.J.L.; BARROS, L.M.G.; BRASILEIRO, A.C.M.; RIBEIRO, S.G.; SMITH, V.; SANFORD, J.C.; FARIA, J.C.; RECH, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical Applied Genetics**, v.93, p.142-150. 1996.
- ARAGÃO, F.J.L.; BRASILEIRO, A.C.M.; RIBEIRO, S.G.; FARIA, J.C.; RECH, E.L.. Inoculation of bean and soybean with cloned bean golden mosaic virus (BGMV) DNA using particle acceleration. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.642-644. 1995.

- ARAGÃO, F.J.L.; RECH, E.L. Morphological factors influencing recovery of transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of carioca cultivar. **International Journal of Plant Science**, v.15, p. 157-163. 1993.
- ARAGÃO, F.J.L.; RECH, E.L. Transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris*). In: BAJAS, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Transgenic Crops II**, v.47. berlin: springer-Verlag, 2001. P.269-283.
- ARAGÃO, F.J.L.; VIANNA, G.R.; RECH, E.L. Feijão transgênico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.5, p.46-49. 1998.
- ARAÚJO, G.A. de A.; FONTES, L.A.N.; LOPES, N.F.; GALVÃO, J.D. Produção e componentes da produção em sistemas de cultivos associados e exclusivos de milho e feijão. **Revista Ceres**, v.33, p.142-150. 1986.
- ARENCIBIA, A.D.; CARMONA, E.R.; TÉLLEZ, P.; CHAN, M-T.; YU, S-M.; TRUJILLO, L.E.; ORAMAS, P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, v.7, p.213-222. 1998.
- ARMITAGE, P.; R. WALDEN; J. DRAPER. Vectors for Transformation of Plant Cells Using *Agrobacterium*. In: J. DRAPER et al. (Ed.). **Plant Genetic Transformation and Gene Expression; A Laboratory Manual**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988. p. 1-67.
- ASTOLFI FILHO, S.; M.O. AZEVEDO. A Engenharia Genética pela Tecnologia do DNA Recombinate. In: S.O.P. COSTA (Ed.). **Genética Molecular e de Microorganismos**. São Paulo: Ed. Manoli, 1987. p.511-532.
- BEVAN, M.W.; FALVELL, R.B.; CHILTON, M.D. A chimeric antibiotic resistant gene as a selectable marker for plant cell transformation. **Nature**, v.1345. p.184-187. 1983.
- BINNS, A.N. *Agrobacterium*-mediated gene delivery and biology of host range limitations. **Physiologia Plantarum**, v.79, p.135-139. 1990.

- BIRCH, R.G. Plant Transformation: Problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.297-326. 1997.
- BIRCH, R.G.; FRANKS, T. Development and optimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.453-469. 1991.
- BLOCK, M.D. The cell biology of plant transformation: Current state, problems prospects and the implications for plant breeding. **Euphytica**, v.71, p.1-14. 1993.
- BORÉM, A.; CARNEIRO, J.E.S. A Cultura. In: T. J. PAULA. Jr.; C. VIEIRA, A. BORÉM (Ed.) **Feijão: Aspectos Gerais e Cultura no Estado de Minas**. Viçosa: Editora UFV, 1998. p.13-17.
- BRASILEIRO, A.C.M. Biologia de *Agrobacterium* sp. **ABCTP-Notícias**, V.20, p.2-10. 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* ssp. strains and improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation using microprojectile bombardment. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v.121, p.810-815. 1996.
- CATLIN, D.W. The effect of antibiotics on the inhibition of callus induction and plant-regeneration from cotyledons of sugar-beet (*Beta vulgaris* L.). **Plant Cell Report**, v.9, p.285-288. 1990.
- CHENG, M.; FRY, J.E.; PANG, S.; ZHOU, S.; HIRONAKA, C.M.; DUNCAN, D.R.; CONNER, T.W.; WAN, Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, v.115, p.971-980. 1997.
- CHRISTOU, P. Gene transfer to plants via particle bombardment. In: **Plant Molecular Biology Manual**. v.A2. Belgium: Kluwer Academic Publishers, 1994. p.1-15.

- CHRISTOU, P. Strategies for variety-independent genetic transformation for important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. **Euphytica**, v.85, p.13-27. 1995.
- CHRISTOU, P. The biotechnology of crop legume. **Euphytica**, v.74, p.165-185. 1994.
- CIAT. Common bean: The nearly perfect food improved beans for Africa and Latin America. <http://www.ciat.cgiar.org/projects/ip-1/bar-ip1.htm>. (5Set. 2000)
- DEKEYSER, R.; CLAES, B.; MARICHAL, M.; VANMONTAGU, M.; CAPLAN, A. Evaluation of selectable markers for rice transformation. **Plant Physiology**, v.90, p.217-223. 1989.
- DRAPER, J.; SCOTT, R. Gene transfer to plants. In: D. GRIERSON (Ed.) **Plant Genetic Engineering**. Glasgow: Black Academic Professional, 1994. vol. 1, p. 961-970.
- DRAPER, J.; SCOTT, R.; KUMAR, A.; DURY, G. Transformation of Plants Cells by DNA-mediated gene transfer. In: J. DRAPER et al. (Ed.), **Plant Genetic Transformation and Gene Expression; A Laboratory Manual**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1988.p. 161-198.
- EDWARDS, K.; JOHSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid methos for the preparation of genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids research**, v.19, p.1349. 1991.
- FAOSTAT. FAO Statistical Databases. <http://apps.fao.org/> (Set. 2000)
- FILLATTI, J.J.; KISER, J.; ROSE, R.; COMAI, L. Efficient transfer of glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. **Biotechnology**, v.5, p.726-730. 1987.
- FINNEGAN, J.; McELROY., D. Transgene Inactivation: Plants Fight Back! **Bio/Technology**, v.12, p.883-888. 1994.

- FRALEY, R.T.; ROGERS, S.C.; HORSCH, R.B.; SANDERS, P.R.; FLICK, J.S.; FINK, C.; HOFFMAN, N.; SANDERS, P. Expression of bacterial genes in plant cells. **Proceeding of National Academic Science USA**, v.80, p.4803-4807. 1983
- FRANKLIN, C.I.; TRIEU, T.N.; CASSIDY, B.G.; DIXON, R.A.; NELSON, R.S. Genetic transformation of green bean callus via *Agrobacterium* mediated DNA transfer. **Plant Cell Reports**, v.12, p.74-79. 1993.
- FURTADO, M.R. Linhagens de feijão obtidas nos sistemas de monocultivo e de consórcio com a cultura do milho e seu comportamento nestes dois sistemas de cultivo. Viçosa, 1991. 74p. Dissertação (M.S.) -Universidade Federal de Viçosa.
- GANDER, E.S.; L.H. MARCELLINO. Plantas Transgênicas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.1, p.34-37. 1997.
- GODWIN, I.D.; FORDLLOYD., B.V.; NEWBURY, H.J. *In vitro* approaches to extending the host-range of *Agrobacterium* for plant transformation. **Australian Journal of Botany**, v.40, p.751-763. 1992.
- GOULD, J.; DEVEY, M.; HASEGAWA, O., ULIAN, E.C.; PETERSON, G. SMITH, R.H. Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. **Plant Physiology**, v.95, p.426-434. 1991.
- GRANT, J.E.; DOMMISSE, E.M.; CRHISTEY, M.C.; CONNER, A.J. Gene transfer to plants using *Agrobacterium*. In: MURRAY, D.R. (Ed.) **Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology**. Oxon: C.A.B. International, 1993. v. 4.,p. 50-73.
- HAMBLIN, J.; ZIMMERMANN, M.J.O. Breeding common bean for yield in mixtures. **Plant Breeding Review**, v.19, p.44-46. 1986.

- HANSEN, G.; CHILTON, M.D. "Agrolistic" transformation of plant cells: Integration of T-strands generated in plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.14978-14983. 1996.
- 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.
- HOEKEMA, A.; HIRSCH, P.R.; HOOYKAAS, P.J.J.; SCHILPEROORT, R.A. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*-region and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. **Nature**, v.303, p.179-180. 1993.
- HOOYKAAS, P.J.J. Introduction I: *Agrobacterium tumefaciens*, a Natural Vector System. In: POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. (Ed.). **Gene Transfer to Plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p 3-4.
- HOOYKAAS, P.J.J.; MOZO, T. *Agrobacterium* molecular genetics. In: **Plant Molecular Biology Manual**, v.B3. Belgium: Kluwer Academic Publishers, 1994. p.1-9.
- IIDA, A.; YAMASHITA, T.; YAMADA, Y. MORIKAWA, H. Efficiency of particle bombardment-mediated transformation is influenced by cell-cycle stage in synchronized cultured-cells of tobacco. **Plant Physiology**, v.97, p.1585-1587. 1991.
- 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.
- JEFFERSON, R. A. Assaying chimeric genes in plant: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter**. v.5, 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: Engineering and Utilization**. v. 1. San Diego: Academic Press, 1993. p. 125-146.

- JOERSBO, M.; BRUNSTEDT, J. Sonication: A new method for genes transfer to plants. **Physiologia Plantarum**, v.85, p.230-234. 1992.
- JONES, M.G.K. Electroporation-Mediated Gene Transfer to Protoplast and Regeneration of Transgenic Plants. In: POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. (Ed.). **Gene Transfer to Plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 88-92.
- KAPILA, J.; DeRYCKE, R.; VANMONTAGU, M.; ANGENON, G. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. **Plant Science**, v.122, p.101-108. 1997.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.27, p.137. 1965.
- KAY, R.; DALY, M.; McPHERSON, J. Duplication of the CaMV 35S promoter sequences create a strong enhancer for plant genes. **Science**, v.236. p.1299-1302. 1987.
- KLEE, H.; YANOFSKY, M.F.; NESTER, E.W. Vectors for transformation of higher-plants. **Biotechnology**, v.3, p.637-642. 1985.
- KO, K.; KO, Z.W.; TURPIN, D.H.; LABATE, C.A.; MOHANTY, N.; GRANNEL, A. Overproduction of chlorophyll a/b binding protein enhances photosynthetic activity in transgenic tobacco. In MURATA, N. (Ed.) **Research in Photosynthesis**, v.2. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. p.445-448.
- KUNG, S.-D. Introduction: From hybrid plants to transgenic plants. In: Wu, S.K.R. (Ed.) **Transgenic Plants: Engineering and Utilization**, v.1. San Diego: Academic Press, 1993. p.1-12.
- LACORTE, C.; ARAGÃO, F.J.L.; ALMEIDA, E.R.; MANSUR, E.; RECH, E.L. Transient expression of GUS and 2S albumin gene from Brazil nut in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed explants using particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v.16, p.619-623. 1997.

- LACORTE, C.; MANSUR., E. Transferência de genes através da *Agrobacterium tumefaciens*: avaliação da compatibilidade patógeno-hospedeiro. **ABCTP Notícias**, v.21, p.2-6. 1993.
- LEWIS, M.E.; BLISS, F.A. Tumor formation and β -glucoronidase expression in *Phaseolus vulgaris* inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v.119, p.361-366. 1994.
- LI, H.-Q.; SAUTTER, C.; PORTYKUS, I.; PUONTI-KAERLAS, J. Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Nature Biotechnology**, v.14, p.736-740. 1996.
- LILLEY, G. Survey Number 007. In: **BIORAD. Methods in Electroporation. Gene Pulser Electroprotocols**. 1993.
- LOPES, N.F. Adaptabilidade fisiológica ao consórcio. In: ZIMMERMANN, M.J. de O.; M. ROCHA; T. YAMADA (Ed.). **Cultura do Feijoeiro: fatores que afetam a produtividade..** Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1988. p.375-395.
- MALIK, K.A.; SAXENA, P.K. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: High-frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N⁶-benzylaminopurine and thidiazuron. **Planta**, v.186, p.384-389. 1992.
- MARIOTTI, D.; FONTANA., G.S.; SANTINI, V. Genetic transformation of grain legumes: *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. **Journal of Genetics and Breeding**, v.43, p.77-82. 1989.
- MATHIS, N.C.; HINCHEE, M.W. *Agrobacterium* inoculation techniques for plant tissue. In: **Plant Molecular Biology Manual**, v.B6. Belgium: Kluwer Academic Publishers, 1994. p.1-9.

- McCABE, D.; P. CHRISTOU. Direct DNA transfer using electric discharge particle acceleration (ACCELL-Technology)-particle bombardment application to variety-independent transgenic plants construction. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. V.33, p.227-236. 1993.
- McCLEAN, P.; GRAFTON, K.F. Regeneration of dry bean (*Phaseolus vulgaris*) via organogenesis. **Plant Science**, v.60, p.117-122. 1989.
- McCLEAN, P.CHEE, P.; HELD, B.; SIMENTAL, J.; DRONG, R.F.; SLIGHTOM, J. Susceptibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Agrobacterium* infection: Transformation of cotyledonary and hypocotyl tissues. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.24, p.131-138. 1991.
- MEDINA, J.C. Aspectos Gerais. In: Simpósio Brasileiro de Feijão, 1, Campinas, 1971. **Anais do I Simpósio brasileiro de Feijão**. Viçosa: Editora UFV, 1972. p. 3-106.
- MOHAMED, M.F.; COYNE, D.P.; READ, P.E. Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of American Society of Horticulture Science**, v.118, p.158-162. 1993.
- MOHAMED, M.F.; READ, P.E.; COYNE, D.P. Dark Preconditioning, CPPU, and thiadiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. **Journal Of American Society of Horticultural Science**, v.117, p.668-672. 1992.
- MOHAMED, M.F.; READ, P.E.; COYNE, D.P. Plant Regeneration from in vitro culture of embryonic axis explants in common and tepary beans. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v.117, p.332-336. 1992
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapide growth and bioassay with tobacco cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497. 1962.

- NAGL, W.; IGNACIMUTHU, S.; BECKER, J. Genetic engineering and regeneration of *Phaseolus* and *Vigna*. State of the art and new attempts. **Journal of Plant Physiology**, v.150, p.625-644. 1997.
- NELDER, J.A; WEDELBURN, W.N. Generalized Linear Models. **Journal of The Royal Statistical Society**, v.135, p.370-84. 1972.
- NEUHAUS, G. Introduction V: Microinjection into Plant Cells: Methodology and Applications. In: POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. (Ed.). **Gene Transfer to Plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 173-175.
- NORELLI, J.L.; ALDWINCKLE, H.S. The role of aminoglycoside antibiotics in the regeneration and selection of neomycin phosphotransferase-transgenic apple tissue. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v.118, p.311-316. 1993.
- OLIARI, L.; VIEIRA, S.A.; THOMAZ, J. **Feijão diagnóstico**. Santa Catarina-Paraná-São Paulo. Goiânia: Centro Nacional de Pesquisa em Arroz e Feijão, 1975. 88p.
- PAULA JR., T.J.; ZAMBOLIN, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA Jr.; T.J.; BORÉM, A. (Ed.) **Feijão: Aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: Editora UFV, 1998. p. 375-433.
- POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessment and perspectives. **Physiologia Plantarum**, v.79, p.125-134. 1990.
- RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Cultivares. In: PAULA JR; T.J.; VIEIRA, C.; BORÉM, A. (Ed.) **Feijão: Aspectos Gerais e Cultura no Estado de Minas**. Viçosa: Editora UFV, 1998 p. 435-449.
- RAMSAY, G. Regeneration in grain legume tissue culture. **Grain Legume**, v. 2, p. 16-17. 1993.

- REAL, M.J.V.D. Efeito do aumento do complexo protéico clorofila a/b no metabolismo fotossintético de plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Piracicaba, 1997. 150p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- RECH, E.L.; ARAGÃO, F.J.L. Biolística. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T. (Ed.) **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília: SPI, 1998. p. 51-64.
- RIBEIRO, R.C.S.; CROCOMO, O.J.; COSTA, C. Plantas Transgênicas. In: CROCOMO, O.J. et al. (Ed.). **Biotecnologia Para Produção Vegetal**. Piracicaba: CEBETEC/FEALQ, 1991. P.495-539.
- RUSSELL, D.R.; WALLACE, K.M.; BATHE, J.H.; MARTINELL, B.J.; McCABE, D.E. Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. **Plant Cell Reports**, v.12, p.165-169. 1993.
- SAHI, S.V.; CHILTON, M.D.; CHILTON, W.S. Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, p.3879-3883. 1990.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Laboratory Press. 1989. 765p.
- SANTARÉM, E.R.; TRICK, H.N.; ESSIG, J.S.; FINER, J.J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. **Plant Cell Reports**, v.17, p.752-759. 1998.
- SANTOS, M.L.; BRAGA, M.J. Aspectos Econômicos. In: PAULA JR., T.J.; VIEIRA, C.; BORÉM, A. (Ed.) **Feijão: Aspectos Gerais e Cultura no Estado de Minas**. Viçosa: Editora UFV, 1998. p. 19-53.
- SMITH, R.H.; HOOD, E.E. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. **Crop Science**, v.35, p.301-309. 1995.

- SOUZA, E.C. Plasmídios Bacterianos. In: COSTA, S.O.P. (Ed.). **Genética Molecular e de Microorganismos**. São Paulo: Ed. Manoli, 1987. p.253-289.
- STAM, M.; MOL, J.N.M.; KOOTER, J.M. The silence of genes in transgenic plants. **Annals of Botany**, v.79, p.3-12. 1997.
- SUNILKUMAR, G.; VIJAYACHANDRA, K.; VELUTHAMBI, K. Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing *vir* gene induction. **Plant Science**, v.141, p.51-58. 1999.
- TRICK, H.N.; FINER, J.J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. **Transgenic Research**, v.6, p.329-336. 1997.
- TRICK, H.N.; FINER, J.J. Sonication-assited *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merril] embryogenic suspension culture tissue. **Plant Cell Reports**, v.17, p.482-488. 1998.
- VIANNA, A. Flujo de germoplasma e impacto del PROFRIJOL en Centroamérica:1987-1996. PROFIJOL. 1998.
- VIEIRA, C. **A cultura do feijão**. Viçosa: Editora UFV, 1983. 146p.
- VIEIRA, C. **O feijão em cultivos consorciados**. Viçosa: Editora UFV, 1985. 134p.
- VIEIRA, C. Plantio de feijão na cultura do milho. **Informe Agropecuário**, v.6, p.45-48. 1980.
- VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M.A.P. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p. 273-349.
- WALKERPEACH, C.R; VLASAK, J. *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. In: **Plant Molecular Biology Manual**, v.B1. Belgium: Kluwer Academic Press, 1994. 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 and Biotechnology**, v.12, p.327-325. 1996.
- WILMINK, A.; DONS, J.J. Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.11, p.165-185. 1993.
- WILMINK, A.; VANDESE, B.C.E.; CUSTERS, J.B.; NOLLEN, Y.; DONS, J.J.M. Adventitious shoot formation in tulip - histological analysis and response to selective agents. **Plant Science**, v.110, p.155-164. 1995.
- WYBER, J.A.; ANDREWS, J.; D'EMANUELLE, A. The use of sonication for efficient delivery of plasmid DNA into cells. **Pharmaceutical Research**, v.14, p.750-756. 1997.
- YOKOYAMA, M., 1998. Pragas. In: VIEIRA, C.; PAULA Jr, T.J.; BORÉM, A. (Ed.) **Feijão: Aspectos Gerais e cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: Editora UFV, 1998. p. 357-374.
- ZAMBRYSKI, P.; JOOS, H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; VANMONTAGU, M.; SCHELL, J. Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alterations in their normal regeneration capacity. **EMBO Journal**, v.2, p.2143-2151. 1983.
- ZHANG, Z.; COYNE, D.P.; MITRA, A. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of common bean. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v.122, p.300-305. 1997.
- ZUPAN, J.R.; ZAMBRYSKI, P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. **Plant Physiology**, v.107, p.1041-1047. 1995.

ANEXO

Anexo 1**1) Meio Murashige e Skoog (MS)****Macronutrientes:**

Componentes	g/L
NH ₄ NO ₃	1,65
CaCl ₂	0,44
KNO ₃	1,90
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37
KH ₂ PO ₄	0,17

Micronutrientes:

Componentes	g/L
H ₃ BO ₃	6,200
MnSO ₄ .H ₂ O	16,900
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600
KI	0,830
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	8,600
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCL ₂ .6H ₂ O	0,025

Fe-EDTA (solução estoques 200x)

Componentes	g/100ml
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,825
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,557

Utilizar 5 ml por litro de solução.

Autoclavar o meio preparado.

Vitaminas (Solução estoque 1000x)

Vitamina	g/100ml
Ácido Nicotínico	0,05
Piridoxina-HCl	0,05
Tiamina-HCl	0,01
D-Ca-Pantotenato	0,01

Filtrar a solução em Millipore 0,2 µm. Adicionar 1 ml/L ao meio estéril

2) Meio de multibrotação

Meio MS acrescido de 30 g/L de sacarose, 44,3 µM de benzilaminopurina (BAP) e 0,8% de ágar (meio sólido)

3) Meio de regeneração ou MS3%

Meio MS acrescido de 30 g/L de sacarose e 0,8% de ágar (meio sólido).

4) Meio de enraizamento

Meio MS acrescido de 10 mg/L de sacarose e 0,8% de ágar.

5) Meio AB

5.1) Tampão AB

Componentes	g/100 ml
KH_2PO_4	6
NaH_2PO_4	2
Autoclavar	

5.2) Sais AB

Componentes	g/100ml
NH_4Cl	2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,6
KCl	0,3
CaCl_2	0,02
FeSO_4	0,005
Autoclavar	

Para preparar 1 litro de meio, adiciona-se 5 g de glicose a 900 ml de água destilada e 15 g de ágar (meio sólido), autoclavar. Em seguida, em fluxo laminar, adiciona-se 50 ml de tampão AB, 50 ml de sais AB e os antibióticos.

6) X-Gluc

- Colocar em um becker 190 ml de água destilada;
- Adicionar os seguintes componentes:

Componentes	g/200ml
EDTA	0,744
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2,760
K ₄ Fe(CN) ₆ .3H ₂ O	0,042
Triton-X-100	0,200 ml

- c) Agitar por 10 minutos, para dissolver;
- d) Ajustar o pH para 7.0 com NaOH;
- e) Dissolver 100 mg de X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indol glucoronico) em 2 ml de DMSO;
- f) Adicionar a solução x-Gluc/DMSO à primeira solução;
- g) Filtrar em Millipore 0,2 µm;
- h) Aliquotar e guardar a – 20°C.

7) Solução de Kamovsky

Para preparar 1 litro de solução, acrescentar:

- a) 500 ml de glutaraldeído a 1% em tampão fosfato 0,1M pH 7.2;
- b) 200 ml de para formaldeído a 4%;
- c) 300 ml de tampão fosfato 0,2M pH 7.2;
- d) Conservar à 4°C, no escuro

Obs:

- a) Glutaraldeído a 1%

480 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7.2

20 ml de glutaraldeído a 25%

- b) Formaldeído a 4%

Aquecer 200 ml de água destilada à 60°C e manter estabilizada nesta temperatura durante todo o processo. Acrescentar 8 g de paraformaldeído, e

agitar por cerca de 2 horas ou até dissolver todo paraformaldeído.
Acrescentar gotas de hidróxido de sódio até a solução ficar límpida.