

Métodos Eficientes para a Transformação Genética de Plantas

Efficient Methods for Genetic Plants Transformation

ELIANE ROMANATO SANTARÉM

Universidade de Cruz Alta
Santarem@azcomnet.com.br

RESUMO – A tecnologia de transferência de genes tem criado novas alternativas para a produção de plantas mais adaptadas ao ambiente de cultivo e com maior capacidade de produção. Os métodos utilizados na produção de plantas geneticamente modificadas podem ser classificados como diretos e indiretos. Os métodos diretos são aqueles que provocam modificações nas paredes e membranas celulares para introdução de DNA exógeno, através de processos físicos ou químicos. Entre eles, os mais eficientes são a eletroporação de protoplastos, a transformação mediada por PEG e o bombardeamento de partículas. O método indireto requer a utilização de um vetor biológico para a introdução do DNA na planta. Os vetores mais utilizados são a *Agrobacterium tumefaciens* e *rhizogenes*, patógenos vegetais com a capacidade de transferir parte de seu DNA para o genoma da planta. A transferência de genes mediada por *agrobacterium* tem sido bastante empregada, em razão de sua conveniência e da alta probabilidade de integração de uma ou poucas cópias do gene introduzido. Plantas transgênicas têm sido produzidas nas principais espécies cultivadas e levadas ao mercado consumidor, expressando aumento da qualidade nutricional ou resistência a herbicidas, insetos ou fungos.

Palavras-chave: AGROBACTERIUM – BIOBALÍSTICA – ELETROPORAÇÃO – PLANTAS TRANSGÊNICAS – TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA.

ABSTRACT – The available gene transfer systems have been able to generate new plant varieties, better adapted to the environment and exhibiting improved crop productivity. The production of transgenic plants relies on the use of physical/chemical or biological means to introduce the transgene into the plant cells. Physical/chemical methods cause modifications to cell walls and plasma membranes, and foreign DNA is then delivered into the cell. Electroporation, PEG-mediated transformation and particle bombardment are the more efficient and relevant direct techniques of transferring DNA into plant. Biological method requires the use of plant pathogens for the DNA introduction. *Agrobacterium tumefaciens* and *a. Rhizogenes* are the main pathogens used, which are able to infect and introduce part of their DNA into a receptive host. *Agrobacterium*-mediated gene transfer has been the method of choice due to convenience and high probability of single or low copy number integration. Transgenic plants have been obtained for the major crop species and introduced to the market, expressing improved nutritional value, resistance to herbicides, insect or fungal pathogens.

Keywords: AGROBACTERIUM – ELECTROPORATION – GENETIC TRANSFORMATION – PARTICLE BOMBARDMENT – TRANSGENIC PLANTS.

INTRODUÇÃO

Por muitos anos, o único método disponível para a introdução de características de interesse em plantas foi o melhoramento clássico, envolvendo cruzamentos, seguidos pela seleção de plantas com fenótipo desejável. Porém, esse processo é lento, necessitando vários anos para produzir e liberar comercialmente uma nova variedade (Christou, 1992). A engenharia genética de plantas não só acelera o processo de melhoramento, como permite transpor as barreiras de incompatibilidade sexual através da hibridização somática ou da introdução de genes específicos em células vegetais, utilizando os métodos de transformação (Moraes & Fernandes, 1987). A transformação genética é o processo de introdução controlada de ácidos nucleicos exógenos em um genoma receptor, sem comprometer a viabilidade das células. Com os avanços da tecnologia de DNA recombinante, é possível transferir para plantas genes isolados de outras plantas, ou mesmo de animais e microrganismos (Perani *et al.*, 1986), permitindo a criação de novas variedades que podem ser usadas em programas de melhoramento convencional. Até o presente, diversos genes foram introduzidos estavelmente em plantas, conferindo resistência a herbicidas, fungos, bactérias, vírus e insetos e resistência a estresses ambientais.

Para que o processo de transformação seja efetivo, o DNA deve ser introduzido em células ou tecidos vegetais aptos a regenerar plantas completas. Um dos fatores limitantes na transformação genética tem sido a baixa eficiência das técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro*. Aliado a isso, em muitas situações, a esterilidade total ou parcial das plantas transgênicas obtidas pode consistir em uma barreira para a finalização desse processo. Portanto, para iniciar os trabalhos de transformação, os aspectos relacionados à regeneração de plantas, através da cultura de tecidos, devem ser completamente elucidados.

DESENVOLVIMENTO

A transferência de genes para espécies vegetais tem sido possível graças à manipulação genética de células, utilizando métodos diretos ou indiretos de transformação. O método indireto é aquele no qual se utiliza um vetor, como *Agrobacterium tumefaciens*

(Chilton *et al.*, 1977) ou *Agrobacterium rhizogenes* (Chilton *et al.*, 1982), de forma a intermediar a transferência de genes. Esse método tem sido bastante usado na obtenção de plantas transgênicas. Entretanto, algumas dicotiledôneas e a maioria das monocotiledôneas e gimnospermas não são suscetíveis, ou apresentam pouca suscetibilidade, à infecção pela *Agrobacterium* (Potrikus, 1990). Em alguns casos, a eficiência do processo de transformação pode ser aumentada com o uso de cepas supervirulentas de bactéria (Hansen *et al.*, 1994) ou com a adição de compostos fenólicos ao meio de cultivo, como indutor da transferência do DNA bacteriano (Stachel *et al.*, 1985). Os métodos diretos, também extensivamente adotados, não requerem a utilização de vetores biológicos, mas em muitos casos utilizam protoplastos, o que dificulta a regeneração de plantas. A eficiência do método de transformação vai depender da espécie em estudo e do tecido usado como alvo da transformação e, de maneira geral, os parâmetros devem ser otimizados para cada técnica.

MÉTODOS DIRETOS

Os métodos de transferência direta de genes utilizam processos físicos ou químicos que causam modificações nas paredes e membranas celulares, facilitando a introdução de DNA exógeno. Diversos métodos diretos têm sido propostos, variando em sua eficiência e praticidade. Entre eles, os métodos que resultaram em maior número de espécies transformadas foram a eletroporação de protoplastos, a transformação por polietilenoglicol e a aceleração de partículas (Fisk & Dandekar, 1993). As demais técnicas, como micro e macroinjeção, utilização de raios laser, microfibras de carboneto de silício e ultra-som, foram testadas para produção de plantas transgênicas. Porém, apresentaram baixa eficiência ou não foram reproduzíveis (Southgate *et al.*, 1998).

Eletroporação de Protoplastos

Protoplastos são definidos como células desprovidas de paredes celulares (Evans, 1991). Para a introdução de DNA usando a eletroporação, os protoplastos são expostos a pulsos curtos de corrente contínua e alta voltagem, em presença do DNA exógeno (Fromm *et al.*, 1985). Esse tratamento induz

uma alteração reversível da permeabilidade da membrana plasmática e poros temporários são formados, permitindo a entrada do DNA nas células. A extensão da formação de poros é determinada pela intensidade e duração do pulso elétrico e pela concentração iônica do tampão de eletroporação. Os poros aumentam em tamanho e número com o aumento da duração e intensidade dos pulsos (Joersbo & Brunstedt, 1991; Finer *et al.*, 1996). Parâmetros como tipo e duração dos pulsos elétricos, intensidade do campo elétrico, concentração e forma do DNA, presença ou ausência de DNA carreador, composição do tampão de eletroporação e temperatura de incubação dos protoplastos devem ser determinados.

A transformação genética de plantas por eletroporação de protoplastos oferece a vantagem de não necessitar de um vetor biológico e de não haver barreira física para a introdução de DNA. É uma técnica rápida, simples e realizada sem agentes tóxicos às células, embora os pulsos elétricos possam ter efeito deletério na sobrevivência dos protoplastos e subsequente regeneração de plantas. Algumas plantas transgênicas foram obtidas utilizando essa técnica (Shimamoto *et al.*, 1989; Dale *et al.*, 1993). O maior obstáculo do método está na dificuldade de regeneração de plantas a partir de protoplastos transformados. Mesmo quando a regeneração é obtida, as plantas podem apresentar problemas de redução de fertilidade (Rhodes *et al.*, 1989), além de várias espécies ainda serem consideradas recalcitrantes para essa tecnologia (Birch, 1997).

Uma alternativa para aumentar a eficiência da eletroporação tem sido a redução do tratamento enzimático para a retirada da parede celular. D'Halluin *et al.* (1992) obtiveram plantas transgênicas mediante a eletroporação de calos embriogênicos de *Zea mays*, com ferimento mecânico do tecido alvo. Mais recentemente, foi sugerido que a indução de plasmólise parcial das células, imediatamente antes da eletroporação, substituiria o tratamento enzimático (Sabri *et al.*, 1996). A associação de plasmólise e eletroporação permite a difusão do DNA em espaços intercelulares ou a penetração lenta do DNA pelos poros das paredes celulares, sendo o choque elétrico necessário apenas para permeabilizar a membrana plasmática (Dekeyser *et al.*, 1990). Esse método poderia evitar os problemas

relacionados com o uso de protoplastos (Sabri *et al.*, 1996).

Absorção de DNA Mediada por PEG

Poli(etil)enoglicol (PEG), usado em combinação com Ca²⁺, Mg²⁺ e pH alcalino, promove a ligação do DNA exógeno à superfície dos protoplastos. O DNA é absorvido pela célula por endocitose. O PEG pode atuar, também, na proteção do DNA contra a atividade das nucleases (Finer *et al.*, 1996).

A frequência de transformação, usando PEG, é de aproximadamente 1% e restrita a algumas espécies (Raybould & Gray, 1993). O tratamento com PEG pode danificar grande número de células, reduzindo a capacidade de regeneração. O peso molecular e a concentração do PEG são parâmetros que devem ser estabelecidos. Geralmente, é usado PEG 6000 em concentrações variando entre 15% e 25% (Finer *et al.*, 1996). Outras variáveis devem, ainda, ser otimizadas, como pH, forma do DNA e concentração de Ca²⁺ ou Mg²⁺. O pré-tratamento dos protoplastos por 5 min a 45°C pode aumentar a frequência de transformação por inibir a atividade das nucleases (Finer *et al.*, 1996).

A desvantagem dessa técnica é a dependência de um sistema eficiente de regeneração de plantas completas a partir de protoplastos, atualmente restrito a poucas espécies. Apesar das limitações da técnica, algumas espécies, como fumo, arroz e *Citrus*, foram transformadas (Fisk & Dandekar, 1993).

Bombardeamento de Partículas

Esse método consiste na aceleração de micropartículas de metal, que atravessam a parede celular e a membrana plasmática, carreando DNA para o interior da célula (Sanford, 1988). O termo bombardeamento de partículas pode ser substituído por aceleração de microprojéteis ou método biolístico (Sanford, 1988). O método baseia-se no uso de um equipamento que produz uma força propulsora, usando pólvora, gás ou eletricidade, para acelerar micropartículas inertes, cobertas com DNA, em direção às células alvo. Após o bombardeamento, uma proporção de células atingidas permanece viável; o DNA é integrado no genoma vegetal e incorporado aos processos celulares de transcrição e

tradução, resultando na expressão estável do gene introduzido (Finer *et al.*, 1996).

A maioria dos modelos biolísticos atuais emprega macroprojéteis, usados como veículo para aceleração dos microprojéteis colocados na sua superfície. Tipicamente, os macroprojéteis têm a forma de um cilindro plástico ou disco de metal (Finer *et al.*, 1996).

Um microprojétil é definido como qualquer partícula capaz de ser acelerada, de maneira que penetre nas células (Sanford, 1990). Deve ser pequeno o suficiente para entrar na célula sem ser letal, deve ser capaz de carregar DNA na sua superfície e ser denso a fim de atingir a energia cinética requerida para penetração das paredes celulares (Uchimiya *et al.*, 1989). Os microprojéteis são fabricados usando metais de alta densidade, como tungstênio e ouro; são mais ou menos esféricos e medem cerca de 0,4 a 2,0 cm de diâmetro (Sanford, 1990). Os metais utilizados na produção de partículas devem ser quimicamente inertes para evitar reações adversas com o DNA exógeno ou componentes celulares. As partículas de tungstênio são mais baratas, porém, mais heterogêneas em tamanho e forma, quando comparadas com as de ouro (Hunold *et al.*, 1994).

A desvantagem do tungstênio está na possibilidade de as partículas sofrerem degradação catalítica com o passar do tempo, sendo tóxicas para alguns tipos de células (Russell *et al.*, 1992). São também sujeitas à oxidação, o que afeta a adesão do DNA ou degrada o DNA aderido (Russell *et al.*, 1992). As partículas de ouro são mais uniformes e inertes biologicamente, não causando danos às células. No entanto, elas tendem a se aglomerar irreversivelmente em soluções aquosas, reduzindo a eficiência do processo de introdução de DNA (Kikkert, 1993). As partículas de ouro, em razão da sua mais alta densidade, penetram no tecido até as camadas celulares mais profundas, ao passo que a maioria das partículas de tungstênio não penetra além das camadas superficiais (Hunold *et al.*, 1994). Sendo assim, a relação entre o tipo de microprojéteis usado para o bombardeamento e a expressão temporária ou estável do gene introduzido deve ser avaliada para cada espécie e tecido estudados.

Existem vários modelos de aceleradores de partículas. O modelo mais utilizado, o PDS 1000/He (Sanford *et al.*, 1991), usa uma descarga de gás hélio em alta pressão (1.000-1.200 psi) para acelerar microprojéteis. Modificações nesse sistema permitiram a idealização de um aparelho de aceleração de partículas mais simplificado, utilizando pressões muito mais baixas do que a anteriormente descrita, chegando a 60 psi. Esse modelo, Influxo de Partículas (Finer *et al.*, 1992) apresenta a vantagem de reduzir o dano causado aos tecidos. Modelos que não utilizam gás como força propulsora incluem o modelo Accell ' (McCabe & Christou, 1993) e o bombardeador a ar (Oard, 1993). O primeiro emprega a energia gerada pela vaporização de uma gota d'água através de uma descarga elétrica e o segundo usa ar comprimido para acelerar os microprojéteis.

O uso do processo biolístico é bastante amplo e, quando comparado com a maioria dos métodos diretos de introdução de DNA em plantas, o bombardeamento de partículas apresenta várias vantagens. É uma técnica altamente versátil e de fácil adaptação, podendo ser aplicada a grande variedade de células e tecidos, incluindo suspensões (Klein *et al.*, 1989; Fromm *et al.*, 1990), calos (Vasil *et al.*, 1985), tecidos meristemáticos (McCabe & Martinelli, 1993), embriões imaturos (Southgate *et al.*, 1998) e embriões somáticos (Finer & McMullen, 1991; Santarém & Ferreira, 1997). Essa técnica tem permitido a regeneração de plantas transgênicas de maneira reproduzível e com menos variabilidade entre experimentos (Luthra *et al.*, 1997). As metodologias empregadas são simples, eficientes e essencialmente idênticas, independentemente do tecido vegetal e do DNA exógeno empregado.

Em adição ao seu uso para obtenção de organismos geneticamente transformados, o processo de bombardeamento de microprojéteis tem contribuído para os estudos dos mecanismos de expressão e regulação gênica (Birch, 1997).

Algumas adaptações da biobalística têm sido propostas associando o bombardeamento ao método da *Agrobacterium*. Os microferimentos produzidos pela penetração das partículas nos tecidos bombardeados ampliam a área de infecção pela bactéria, aumentando a eficiência de transformação (Bidney *et*

al., 1992; Droste, 1998). Outro sistema que combina as vantagens da transformação por *Agrobacterium* com a alta eficiência do sistema biolístico foi descrito por Hansen & Chilton (1996). Essa técnica, denominada “agrolística”, permite a transferência do gene de interesse para o genoma da planta, sem que haja a integração das seqüências dos vetores. Isso ocorre em virtude da co-transformação de dois dos genes de virulência, juntamente com um marcador de seleção flanqueado pelas seqüências de bordas do T-DNA.

MÉTODO INDIRETO

Agrobacterium

Agrobacterium é uma bactéria de solo, Gram negativa, aeróbica, pertencente à Família *Rhizobiaceae* (Zambrisky, 1988). Sua importância para os estudos de transformação de plantas reside na capacidade natural que esses patógenos possuem de introduzir DNA em plantas hospedeiras. Esse DNA é integrado e passa a ser expresso como parte do genoma da planta (Hohn, 1992). Como consequência dessa expressão, o padrão normal de desenvolvimento é alterado: *A. tumefaciens* causa a formação de tumores, ao passo que a infecção por *A. rhizogenes* resulta na proliferação de raízes (Lipp-Nissinen, 1993).

As bactérias possuem plasmídeos que recebem denominações de acordo com a alteração de desenvolvimento vegetal que provocam: *Ti*, indutor de tumores, e *Ri*, indutor de raízes. Atualmente, a *A. tumefaciens* é a mais usada para estudos de transformação. Durante a infecção por *A. tumefaciens*, uma parte do plasmídeo *Ti*, denominada T-DNA ou DNA de transferência, é transferida para a célula vegetal e integrada no genoma (Hohn, 1992). Essa região contendo o T-DNA é definida por duas seqüências imperfeitas, conservadas e repetidas de 25 pares de bases, denominadas bordas direita e esquerda. Os genes do T-DNA são expressos somente nas células vegetais e são responsáveis pela produção excessiva de hormônios (auxinas e citocininas) ou pelo aumento da sensibilidade das células vegetais a esses compostos, levando à formação de tumores.

Esses genes também são responsáveis pela produção de opinas, compostos usados como fonte

de carbono e nitrogênio pela bactéria (Willmitzer *et al.*, 1980). Em muitos casos, a presença desses genes em células ou tecidos transformados é indesejável, pois impede a regeneração de plantas com fenótipo normal. Esse problema pode ser contornado por meio da técnica de “desarmamento” da *Agrobacterium*, na qual os genes podem ser inativados ou removidos. Na ausência de genes que regulem as rotas biossintéticas dos hormônios, as células transformadas podem ser identificadas pela inclusão de genes marcadores no T-DNA (*uidA*- β-glucuronidase) ou genes de resistência a antibióticos, como, por exemplo, *hpt* II (higromicina) ou *npt* II (canamicina).

A infecção por *Agrobacterium* requer um ferimento no tecido vegetal (Sangwan *et al.*, 1992). Primeiramente, acreditava-se que o ferimento teria a função de remover a barreira física imposta pela parede celular. Atualmente, sabe-se que as células feridas, mas metabolicamente ativas, excretam compostos fenólicos de baixo peso molecular, especificamente reconhecidos pela bactéria no momento da infecção. Essas moléculas foram identificadas como acetosiringona (AS) ou a-hidroxi-acetosiringona (OH-AS) (Stachel *et al.*, 1985), chalconas e derivados do ácido cinâmico (Stachel *et al.*, 1986) e são responsáveis pela iniciação da transferência do T-DNA (Zambryski *et al.*, 1989).

Acredita-se que a transferência do T-DNA para as células vegetais ocorra de maneira semelhante à conjugação bacteriana (Zupan & Zambrisky, 1995) e os genes responsáveis pela transferência estejam localizados na região de virulência (*vir*) do plasmídeo *Ti* (Zambryski, 1988; Zambryski *et al.*, 1989). A região *vir* é composta de seis grupos de genes, essenciais para transformação (*virA*, *virB*, *virD* e *virG*) ou que aumentam a eficiência desse processo (*virC* e *virE*). Alguns dos genes de virulência, *chvA*, *chvB*, *cel*, *att* e *pscA*, localizam-se no cromossoma bacteriano, expressam-se constitutivamente e são responsáveis pelo reconhecimento e contato das células vegetais com a bactéria durante o processo de infecção (Zambryski *et al.*, 1989; Hohn, 1992). Os genes *chvA*, *chvB* e *pscA* são responsáveis pela síntese de β-1,2-glucano (Douglas *et al.*, 1985), o *cel*, pela síntese de fibras de celulose e

o *att* regula a síntese das proteínas de membrana (Matthysse, 1987).

A interação bactéria/parede celular vegetal foi estudada em *Arabidopsis thaliana* por Sangwan *et al.* (1992). Os autores sugerem que, durante o período de cultivo, as células estejam em divisão e diferenciação, e novas paredes celulares sejam sintetizadas. Nesse mesmo período, a bactéria produz grandes quantidades de material celulósico e os resultados sugerem uma interação entre os polissacarídeos da parede celular vegetal e as fibras de celulose produzidas pela bactéria.

A ativação dos genes da região *vir* é seguida por drásticas mudanças no T-DNA, resultando na sua completa transferência para o núcleo da célula vegetal. A incorporação do T-DNA no genoma da planta não está completamente elucidada, mas sugere-se que ocorra de maneira aleatória. A integração pode ser explicada como um evento de recombinação ilegítima ou não homóloga (Mayerhofer *et al.*, 1990). Gharthi-Chhetri *et al.* (1990) sugeriram que a integração do DNA exógeno ocorre entre as duas primeiras divisões celulares, durante a fase de replicação do DNA. Frequentemente, uma a três cópias do T-DNA estão presentes, algumas vezes em arranjos tandem (Zambryski *et al.*, 1989).

A *A. rhizogenes* é outra espécie do gênero *Agrobacterium*, que causa a proliferação de raízes a partir de tecidos feridos e infectados pela bactéria. Essas raízes podem ser cultivadas *in vitro* em ausência de reguladores de crescimento (Lipp-Nissinen, 1993). Assim como a *A. tumefaciens*, a *A. rhizogenes* possui um plasmídeo de alto peso molecular, o *Ri*, do qual o T-DNA é transferido para a célula vegetal (Brasileiro & Dusi, 1999). Culturas de raízes transformadas por *A. rhizogenes* podem ser utilizadas para a produção de metabólitos secundários de interesse farmacêutico, como produtos naturais biologicamente ativos.

A técnica de transformação por *Agrobacterium* tem sido aprimorada desde 1988, quando Zambryski e colaboradores relataram o uso de *Agrobacterium tumefaciens* modificada geneticamente para introdução de genes exógenos em plantas. Na transformação utilizando esse vetor, vários parâmetros devem ser considerados, entre eles, presença de substâncias fenólicas para indução da trans-

ferência do T-DNA, pH, temperatura, açúcares, período de co-cultivo e antibióticos para controle do crescimento da bactéria (Stachel *et al.*, 1986; Holford *et al.*, 1992).

Várias espécies de importância comercial têm sido alvo dessa técnica com resultados positivos (Fisk & Dandekar, 1993; Brasileiro & Dusi, 1999). Recentemente, foi proposto o uso de pulsos curtos de ultra-som para ferir e modificar o tecido alvo da transformação, visando o aumento da infecção por *Agrobacterium*. Essa técnica foi denominada SAAT (Sonication Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation; Trick & Finer, 1997) e permitiu uma maior eficiência no processo de transformação de várias espécies, antes recalcitrantes para *Agrobacterium*. A aplicação da SAAT em tecidos cotiledonares de soja resultou no aumento da frequência de expressão do gene repórter utilizado (Santarém *et al.*, 1998) e plantas transgênicas dessa espécie foram obtidas aplicando-se SAAT em suspensões embriogênicas (Trick & Finer, 1998).

EXPRESSÃO DOS TRANSGENES

Apesar da otimização das técnicas de transformação genética, os sítios de integração do DNA exógeno e o número de cópias integradas no genoma da planta são, ainda, imprevisíveis (Vaucheret *et al.*, 1998). A princípio, as moléculas de DNA integram-se ao acaso no genoma, embora haja indicações de que se integrem em regiões com alta atividade transcricional (Brasileiro & Dusi, 1999).

O número de cópias dos transgenes inseridos no genoma varia de acordo com a metodologia empregada na transferência de genes. Com os métodos diretos, foram detectadas múltiplas cópias, como também a fragmentação e recombinação do transgene (Hadi *et al.*, 1996; Siemens & Schieder, 1996). Por sua vez, a transformação por *Agrobacterium* é considerada um processo mais preciso, com integração de uma ou poucas cópias no genoma da planta (De Block, 1993).

Há uma variação considerável na expressão dos transgenes em plantas transformadas, que não decorre necessariamente da diferença no número de cópias. Assim, a atividade do gene não é exclusivamente determinada pelos níveis de transcrição.

Fatores epigenéticos podem influenciar os níveis de expressão, podendo levar à inativação do gene por inibição da transcrição ou do acúmulo do RNAm. Esse fenômeno, denominado silenciamento de genes, pode ser influenciado pelo local de inserção do transgene e está associado à metilação do DNA receptor (Vaucheret *et al.*, 1998).

CONCLUSÃO

As técnicas de transformação genética de plantas têm permitido acelerar o melhoramento vegetal, gerando variedades com desempenho superior e adaptadas ao ambiente de cultivo. Os métodos de transferência de genes podem variar em eficiência e aplicabilidade, dependendo da espécie e/ou do tecido alvos da transformação. Entre os

métodos diretos mais usados, o bombardeamento de partículas tem resultado no maior número de espécies transformadas, principalmente nos cereais, em que a transformação por *Agrobacterium* é pouco eficiente. O uso de *Agrobacterium* como vetor para a transferência de genes apresenta vantagens sobre os métodos diretos por ser uma metodologia mais precisa, resultando na integração de um menor número de cópias do transgene. A transformação genética não encerra com a obtenção de plantas transgênicas que expressam o fenótipo desejado. São necessárias exaustivas pesquisas para garantir que essas plantas não apresentem riscos à saúde e ao ambiente, permitindo que sejam inseridas no sistema produtivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIDNEY, D. *et al.* Microprojectile Bombardment of Plant Tissues increases Transformation Frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v.18, pp. 301-313, 1992.
- BIRCH, R.G. Plant Transformation: problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Stanford, v.48, pp. 297-326, 1997.
- BRASILEIRO, A.C.M. & DUSI, D.M.A. Transformação Genética de Plantas. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa, 1999.
- CHILTON, M.D. *et al.* Stable Incorporation of Plasmid DNA into Higher Plant Cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, Cambridge, v.11, pp.263-271, 1977.
- _____. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into Genomes of Host Plant Root Cells. *Nature*, Londres, 295: 432-434, 1982.
- CHRISTOU, P. Soybean and Other *Glycine* species. In: _____. *Genetic Engineering and in Vitro Culture of Crop Legumes*. Lancaster: Technomic Publ. Co., 1992.
- DALE, P.J.; IRWIN, J.A. & SCHEFFLER, J.A. The Experimental and Commercial Release of Transgenic Crops Plants. *Plant Breeding*, Berlin, v. 111, pp. 1-22, 1993.
- DEKEYSER, R.A. *et al.* Transient Gene Expression in Intact and Organized Rice Tissues. *The Plant Cell*, Rockville, 2: 591-602, 1990.
- DE BLOCK, M. The Cell Biology of Plant Transformation: current state, problems, prospects and the implications for plant breeding. *Euphytica*, Wägeningen, 71: 1-14, 1993.
- D'HALLUIN, K. *et al.* Transgenic Maize Plants by Tissue Electroporation. *The Plant Cell*, Rockville, 4: 1.495-1.505, 1992.
- DOUGLAS, C.J. *et al.* Identification and Genetic Analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* Chromosomal Virulence Region. *Journal of Bacteriology*, Washington, 161: 850-860, 1985.
- DROSTE, A. Embriogênese Somática, Transformação e Regeneração de Plantas Fértis de Cultivares Brasileiras de Soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. Porto Alegre, p. 105, 1998. [Tese de pós-graduação em genética e biologia molecular, UFRS].
- EVANS, D.A. Use of Protoplast Fusion for Crop Improvement. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R. & MELO, M. *Biotecnologia para a Produção Vegetal*. Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991.
- FINER, J.J.; FINER, K.R. & SANTARÉM, E.R. Plant Cell Transformation, physical methods for. In: MEYERS, R.A. *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*. Weinheim: VCH Publishers, 1996.
- FINER, J.J. & MCMULLEN, M.D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, Mariland, 27: 175-182, 1991.
- FINER, J.J.; VAIN, P.; JONES, M.W. *et al.* Development of Particle Inflow Gun for DNA Delivery To Plant Cells. *Plant Cell Reports*, Berlin, 11: 323-328, 1992.

- FISK, H.J. & DANDEKAR, A.M. The Introduction and Expression of Transgenes in Plants. *Scientia Horticulture*, Amsterdã, 55: 5-36, 1993.
- FROMM, M.E.; MORRISH, F.; ARMSTRONG, C. *et al.* Inheritance and Expression of Chimeric Genes in the Progeny of Transgenic Maize Plants. *Bio/Technology*, v.8, pp.883-839, 1990.
- FROMM, M.E., TAYLOR, L.P. & WALBOT, V. Expression of Genes transferred into Monocot and Dicot Plant Cells by Electroporation. *Proceedings of the National Academy of Science*, Washington, 82: 5.824-5.828, 1985.
- GHARTHI-CHHETRI, G.B. *et al.* Hybrid Genes in the Analysis of Transformation Conditions: 3. Temporal/spatial fate of NPTII gene integration, its inheritance and factors affecting these factors in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, 14: 687-696, 1990.
- HADI, M.Z.; MCMULLEN, M.D. & FINER, J.J. Transformation of 12 Different Plasmids into Soybean via Particle Bombardment. *Plant Cell Reports*, Berlin, 15: 500-505, 1996.
- HANSEN, G.; DAS, A. & CHILTON, M.D. Constitutive Expression of the Virulence Genes improves the Efficiency of Plant Transformation by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Science*, Washington, 91: 7.603-7.607, 1994.
- HANSEN, G. & CHILTON, M.D. Agrolistics Transformation of Plant Cells: integration of T-strands generated *in planta*. *Proceedings of the National Academy of Science*, Washington, 93: 14.978-14.983, 1996.
- HOHN, B. Exploration of *Agrobacterium tumefaciens*. In: RUSSO, V.E.A. *et al.* *Development: the molecular genetic approach*. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
- HOLFORD, P.; HERNANDEZ, N. & NEWBURY, H.J. Factors influencing the Efficiency of T-DNA Transfer during Co-cultivation of *Antirrhinum majus* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, Berlin, 11: 196-199, 1992.
- HUNOLD, R.; BRONNER, R. & HAHNE, G. Early Events in Microprojectile Bombardment: cell viability and particle location. *The Plant Journal*, Oxford, 5: 593-604, 1994.
- JOERSBO, M. & BRUNSTEDT, J. Electroporation: mechanism and transient expression, stable transformation and biological effects in plant protoplasts. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 81: 256-264, 1991.
- KIKKERT, J.R. The Biolistics® PDS-1000/He device. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 33: 221-226, 1993.
- KLEIN, T. M. *et al.* Genetic Transformation of Maize Cells by Particle Bombardment. *Plant Physiology*, Rockville, 91: 440-444, 1989.
- LIPP-NISSINEN, K. Molecular and Cellular Mechanisms of *Agrobacterium*-mediated Plant Transformation. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 45: 104-111, 1993.
- LUTHRA, R. *et al.* Microprojectile mediated Transformation: a bibliographic search. *Euphytica*, Wageningen, 95: 269-294, 1997.
- MATTHYSSE, A.G. Initial Interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with Plant Host Cell. *Critical Reviews on Microbiology*, Boca Raton, 13: 281-307, 1987.
- MAYERHOFER, R. *et al.* T-DNA Integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO Journal*, Oxford, 10: 697-704, 1990.
- MCCABE, D.E. & CHRISTOU, P. Direct DNA Transfer using Electric Discharge Particle Acceleration (ACCELL technology). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.33, pp. 227-236, 1993.
- MCCABE, D.E. & MARTINELLI, B.J. Transformation of Elite Cotton Cultivars by Particle Bombardment of Meristems. *Bio/Technology*, Nova York, v.11, pp. 596-598, 1993.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B. Perspectivas da Biotecnologia para o Melhoramento de Plantas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.22, pp. 881-896, 1987.
- OARD, J. Development of an Airgun Device for Particle Bombardment. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.33, pp. 247-250, 1993.
- PERANI, L. *et al.* Gene Transfer Methods of Crop Improvement: introduction of foreign DNA into plants. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.68, pp. 566-570, 1986.
- POTRYKUS, I. Gene Transfer to Plants: assessment and perspectives. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 79: 125-134, 1990.
- RAYBOULD, A.F. & GRAY, A.J. Genetically Modified Crops and Hybridization with Wild Relatives: a UK perspective. *Journal of Applied Ecology*, Oxford, 30: 199-219, 1993.
- RHODES, C.A.; PIERCE, D.A.; METTLER, L.J. *et al.* Genetically Transformed Maize Plants from Protoplasts. *Science*, Washington, 240: 204-207, 1989.
- RUSSELL, J.A.; ROY, M.K. & SANFORD, J.C. Physical Trauma and Tungsten Toxicity Reduce The Efficiency of Biolistic Transformation. *Plant Physiology*, Rockville, 98: 1.050-1.056, 1992.
- SABRI, N.; PELISSIER, B. & TEISSIE, J. Transient and Stable Electrotransformation of Intact Black Mexican Sweet Maize Cells Are Obtained After Plasmolysis. *Plant Cell Reports*, Berlin, 15: 924-928, 1996.

- SANFORD, J.C. The Biolistic Process. *Trends in Biotechnology*, Cambridge, 6: 299-302, 1988.
- _____. Biolistic Plant Transformation. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 79: 206-209, 1990.
- SANFORD, J.C.; DEVIT, M.J.; RUSSELL, J.A. *et al.* An Improved Helium-driven Biolistic Device. *Technique*, Beckenham, 3: 3-16, 1991.
- SANGWAN, R.S.; BOURGEOIS, Y.; BROWN, S. *et al.* Characterization of Competent Cells and Early Events of *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, Berlin, 188: 439-456, 1992.
- SANTARÉM, E.R. & FERREIRA, A.G. Transformação de Soja via Bombardeamento de Partículas. *ABCTP Notícias*, Brasília, 9: 2-9, 1997.
- SANTARÉM, E.R. *et al.* Sonication-Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation of Soybean Immature Cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Reports*, Berlin, 17: 752-759, 1998.
- SIEMENS, J. & SCHIEDER, O. Transgenic Plants: genetic transformation-recent developments and the state of art. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, Rehovot, 2: 66-75, 1996.
- SHIMAMOTO, K. *et al.* Fertile Rice Plants Regenerated from Transformed Protoplasts. *Nature*, Londres, 338: 274-276, 1989.
- SOUTHGATE, E.M. *et al.* A Comparison of Methods for Direct Gene Transfer into Maize (*Zea mays* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, Mariland, 34: 218-224, 1998.
- STACHEL, S.E. Identification of Signal Molecules Produced by Wounded Plant Cells which activate the T-DNA Transfer Process in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, Londres, 318: 624-629, 1985.
- STACHEL, S. E.; TIMMERMAN, B. & ZAMBRYSKI, P. Generation of Single-strand T-DNA Molecules During the Initial Stages of T-DNA Transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to Plant Cells. *Nature*, Londres, 322: 706-712, 1986.
- TRICK, H.N.; FINER, J.J. & SAAT. Sonication Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation. *Transgenic Research*, Dordrecht, 6: 329-337, 1997.
- TRICK, H.N. & FINER, J.J. Sonication Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation of Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Reports*, Berlin, 17: 482-488, 1998.
- UCHIMIYA, H.; HANDA, T. & BRAR, D.S. Transgenic Plants. *Journal of Bacteriology*, Washington, 12: 1-20, 1989.
- VASIL, V.; LU, C.Y. & VASIL, I.K. Histology of Somatic Embryogenesis in Cultured Immature Embryos of Maize. *Protoplasma*, Wien, 127: 1-8, 1985.
- VAUCHERET, H. *et al.* Transgene-induced Gene Silencing in Plants. *The Plant Journal*, Oxford, 16: 651-659, 1998.
- WILLMITZER, L.; DE BEUCKELEER, M. & LEMMERS, M. DNA from Ti Plasmid Present in Nucleus and Absent from Plastids of Crown Gall Plant Cells. *Nature*, Londres, 287: 359-361, 1980.
- ZAMBRYSKI, P. Basic Processes Underlying *Agrobacterium*-mediated DNA Transfer to Plant Cells. *Annual Review of Genetics*, Cambridge, 22: 1-30, 1988.
- ZAMBRYSKI, P.; TEMPE, J. & SCHELL, J. Transfer and Function of T-DNA Genes from *Agrobacterium* Ti and Ri Plasmids in Plants. *Cell*, Cambridge, 56: 193-201, 1989.
- ZUPAN, J.R. & ZAMBRYSKI, P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the Plant Cell. *Plant Physiology*, Rockville, 107: 1.041-1.047, 1995.

