

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CEREAIS VIA *Agrobacterium tumefaciens*

CEREAL GENETIC TRANSFORMATION VIA *Agrobacterium tumefaciens*

Cristine Luise Handel¹ Caroline Moor Wagner² Sandra Cristina Kothe Milach³
Luiz Carlos Federizzi⁴

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

A transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* é um método que permite a inserção de uma ou poucas cópias do transgene no DNA da planta hospedeira. Esta pode ser uma ferramenta importante para os melhoristas, pois, além de aumentar a variabilidade genética existente, torna possível criar variabilidade não disponível via métodos de melhoramento convencional. No entanto, ainda existem algumas dificuldades a serem superadas para que os genes de interesse agrônomo sejam incorporados no genoma dos cereais, como a identificação de estirpes de bactérias que infectem monocotiledôneas e a adequação da técnica. O objetivo deste trabalho é de revisar as potencialidades e problemas do uso da *A. tumefaciens* para transformação de cereais no presente momento e abordar suas perspectivas futuras. Trabalhos recentes com arroz e trigo indicam que estas culturas podem ser transformadas com *A. tumefaciens*, sendo que em arroz plantas transgênicas foram obtidas com este método. Esta tecnologia vem sendo aprimorada e a curto prazo possibilitará a transferência de genes para diversas espécies monocotiledôneas.

Palavras-chave: monocotiledôneas, incorporação de genes, melhoramento de plantas.

SUMMARY

The genetic transformation via *Agrobacterium tumefaciens* allows the insertion of one or few copies of a transgene into the host DNA. This can be an important tool to plant breeders because it expands the genetic variability in breeding programs, developing variability not readily available from traditional methods. However, there are some difficulties that have to be overcome before this technology may be used in cereals, as the identification of highly ineffective bacteria strains and the adjustments of the technique to various crops. The objective of this paper is to revise the potentialities and limitations of using *A. tumefaciens* to transform cereals and to indicate the future perspectives of this technology. Recent studies have indicated that it is possible to transform rice and wheat with *A. tumefaciens*, so that rice transgenic plants have been obtained with this method. This technology is being improved and in a short term will allow the transformation of many monocotyledonous species.

Key words: monocotyledonous, gene incorporation, plant breeding.

¹ Engenheiro Agrônomo, MsC. em Fitotecnia, aluna de Doutorado na Universidade de Minnesota, EUA.

² Engenheiro Agrônomo, Bolsista de Aperfeiçoamento no Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS.

³ Engenheiro Agrônomo, PhD, Professor Adjunto do Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Caixa Postal 776, 90501-970 - Porto Alegre, RS. Autor para correspondência.

⁴ Engenheiro Agrônomo, PhD, Professor Titular do Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS.

INTRODUÇÃO

O melhoramento genético de plantas envolve a criação de variabilidade, a seleção de genótipos com características desejáveis, e os testes para avaliação de genótipos superiores.

No desenvolvimento de variabilidade, a transformação genética possibilita a transferência de genes isolados de qualquer organismo para espécies vegetais, o que pode gerar variabilidade genética não disponível via métodos de melhoramento convencionais (JONES & CASSELLS, 1995).

Centenas de plantas já foram transformadas com sucesso por diversas técnicas, e para inúmeras características (DALE, 1995; DALE & IRWIN, 1995), contudo estas técnicas têm apresentado problemas e limitações. Alguns problemas básicos são os efeitos pleiotrópicos relacionados a expressão do transgene, pela falta de controle da posição de sua inserção (JONES & CASSELLS, 1995), além das interações com o metabolismo do genoma transformado (BUIATTI & BOGANI, 1995).

Vários métodos para transformação genética de plantas têm sido utilizados nas diferentes espécies vegetais. Em cereais, os mais estudados e utilizados têm sido a eletroporação e a biolística. O maior problema da eletroporação é a utilização de protoplastos, pois a regeneração dos mesmos é difícil, e não atinge níveis adequados para utilização destas plantas em programas de melhoramento ou em outros estudos. A biolística pode ser aplicada em qualquer tipo de tecido vegetal, porém requer equipamento apropriado tendo custo elevado, e pode inserir um grande número de cópias do gene de interesse nas células vegetais, provocando problemas na inserção e regulação dos mesmos. A técnica via *Agrobacterium tumefaciens* tem sido muito utilizada em dicotiledôneas, mas não em monocotiledôneas, pela dificuldade de identificar estirpes da bactéria que infectem estas plantas. Mesmo assim o uso desta bactéria é de grande interesse visto que uma ou poucas cópias do transgene é inserida no DNA da planta, diferente do que ocorre na biolística, e podendo ser um método mais eficiente e de menor custo para as espécies compatíveis com a bactéria (WEBB & MORRIS, 1992).

Nas universidades e centros de pesquisa, onde existem equipes formadas em biologia e genética molecular, cultura de tecidos e melhoramento vegetal, o método de transferência de genes via *A. tumefaciens*, parece ser a escolha adequada para a transformação de plantas, minimizando custos, espaço e tempo, através de trabalho conjunto de equipes multidisciplinares.

O objetivo deste artigo é o de revisar as potencialidades e problemas do uso de *Agrobacterium tumefaciens* para transformação de cereais no presente momento e abordar suas perspectivas futuras.

O Hospedeiro: Monocotiledôneas

Dentre as diversas famílias que compõe este grupo destaca-se a família Poaceae, ou mais conhecida como família das gramíneas, que abrange os cereais mais utilizados pelo homem. Os cereais mais conhecidos são o arroz, o trigo e o milho, que juntos são responsáveis por cerca da metade da produção mundial de alimentos. Quando considera-se outras espécies como aveia, centeio, cevada, sorgo e cana-de-açúcar, a importância econômica das gramíneas cresce ainda mais, e pela relativa facilidade de manipulação genética destas plantas elas têm sido alvo de grande esforços da pesquisa básica e aplicada (BENNETZEN & FREELING, 1993). Considerando a importância de várias plantas monocotiledôneas, fica evidente o quanto o melhoramento vegetal destas espécies é importante, sendo a transformação genética uma ferramenta que pode auxiliar este trabalho.

Até pouco tempo acreditava-se que espécies monocotiledôneas não formavam galhas quando submetidas a *A. tumefaciens*, sendo portanto consideradas como hospedeiros não naturais. Entretanto isto não descartava a possibilidade da *A. tumefaciens* transferir T-DNA para estas espécies (SMITH & HOOD, 1995).

O primeiro relato sobre a formação de tumores em espécies monocotiledôneas foi de De CLEENE & De LEY (1976) e trabalhos recentes detectaram a produção de opinas e hormônios envolvidos no crescimento de tumores, bem como a presença de T-DNA nestas plantas (SMITH & HOOD, 1995).

Dentre os cereais, os primeiros resultados foram obtidos com milho (GRIMSLEY *et al.*, 1987; GOULD *et al.*, 1991), o que indicou que o sistema de vetor *Agrobacterium* pode ser utilizado para engenharia genética destas plantas (POTRYKUS, 1991). Além destes trabalhos já foram obtidos resultados positivos com outras espécies (Tabela 1).

Embora os cereais não sejam hospedeiros naturais de *A. tumefaciens*, são considerados hospedeiros potenciais, como verificado em diversos trabalhos (Tabela 1), tornando viável a adoção da técnica de transformação de plantas via *Agrobacterium*. Os problemas a serem solucionados estão na identificação de estirpes mais virulentas e adequação da técnica em si.

Tabela 1 - Espécies monocotiledôneas utilizadas em estudos de transformação via *A. tumefaciens*.

Espécie	Referência
<i>Agave salmiana</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Allium cepa</i>	Langeveld <i>et al.</i> , 1995
<i>Aloe ferox</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Aloe densiflorus</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Anthurium andraeanum</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Arthropodium cirratum</i>	Conner & Dommissie, 1992
<i>Asparagus officinalis</i>	Langeveld <i>et al.</i> , 1995
<i>Asparagus sprengeri</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Asparagus tetragonus</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Avena sativa</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Calla</i> sp.	Smith & Hood, 1995
<i>Chlorophytum capense</i>	Langeveld <i>et al.</i> , 1995; Smith & Hood, 1995
<i>Chlorophytum comosum</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Commelina communis</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Convallaria majalis</i>	Conner & Hood, 1992
<i>Cordyline terminalis</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Cordyline rubra</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Dioscorea buulbifera</i>	Conner & Dommissie, 1992
<i>Gladiolus</i> sp	Smith & Hood, 1995
<i>Hemerocallis citrina</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Hippeastrum rutilum</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Hordeum vulgare</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Lilium</i>	Langeveld <i>et al.</i> , 1995
<i>Lycorum radiata</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Mostera deliciosa</i>	Conner & Dommissie, 1992
<i>Narcissus canaliculatus</i>	Smith & Hood, 1995
<i>Nerine bowdenii</i>	Conner <i>et al.</i> , 1992
<i>Oryza sativa</i>	Godwin <i>et al.</i> , 1992; Smith & Hood, 1995
<i>Philodendron</i> sp.	Smith & Hood, 1995
<i>Polygonatum x hybridum</i>	Conner & Dommissie
<i>Triticum aestivum</i>	Smith & hood 1995; Mahalakshmi & Khurana, 1995
<i>Tulipa</i> sp.	Conner & Dommissie
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Conner & Dommissie
<i>Zea maiz</i>	Smith & Hood, 1995

O vetor *Agrobacterium*

O gênero *Agrobacterium* pertence à família Rhizobiaceae, e possui diversas espécies, como: *A. tumefaciens*, que é o agente causal da doença conhecida como a galha da coroa ("crown gall"); *A. rhizogenes*, agente da síndrome da raiz em cabeleira ("hairy root"); *A. rubi*, que induz tumores nas partes aéreas da planta; *A. vitis*, que induz tumores somente em videiras e *A. radiobacter* que não é patogênica (BRASILEIRO, 1995).

Dentre estas a *A. tumefaciens*, bactéria de solo, aeróbica, gran-negativa, induz a formação de tumores devido a expressão de genes localizados no T-DNA, que é transferido para a célula vegetal. A virulência desta bactéria é causada pela presença, nas cepas patogênicas, de um plasmídeo de alto peso molecular (150-250 kb), chamado de Ti ("Tumor-inducing") (BRASILEIRO, 1995). O T-DNA também possui genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese de opinas, que são moléculas simples resultantes da condensação de um aminoácido com um carboidrato. As opinas produzidas pelas células transformadas servem como fonte de energia (carbono e nitrogênio) para a agroinfecção parasita. O tipo de opina produzido e excretado pelas células do tumor pode ser determinado pela bactéria indutora do tumor (WINNANS, 1992). Assim as cepas de *Agrobacterium* são classificadas de acordo com o tipo de opinas presente no tumor, como por exemplo, cepas do tipo octopina, nopalina, agropina ou succinanopina (BRASILEIRO, 1995 ; WEBB & MORRIS, 1992).

É possível excluir o T-DNA de *Agrobacterium* para desarmá-la, retirando os genes de síntese de fitohormônios, sem que isso afete o seu processo de transferência. Assim, o desenvolvimento de vetores baseados no sistema *Agrobacterium* requer que as bordas direita e esquerda sejam conservadas e que os genes de síntese de fitohormônios sejam removidos do T-DNA. Dessa maneira, qualquer sequência de DNA inserida entre as bordas do T-DNA pode ser transferida e integrada no genoma vegetal, sem afetar a regeneração de plantas (BRASILEIRO, 1995).

A transformação genética se dá pela transferência de uma cópia da fita simples do T-DNA da bactéria do plasmídeo Ti-desarmado para o núcleo da planta (TINLAND *et al.*, 1994; YUSIBOV *et al.*, 1994; CITOVSKY & ZAMBRYSKI, 1995; GURALNICK *et al.* 1996). A eficiência do processo de transformação via *A. tumefaciens* implica em poder selecionar e regenerar plantas a partir de uma única célula transformada, o mais rápido possível, para diminuir a manipulação *in vitro*, e evitar o aparecimento de plantas quiméricas (BRASILEIRO, 1995).

A faixa de hospedeiros de *Agrobacterium* é bastante ampla, incluindo mais de 643 espécies vegetais. Existe uma grande diferença de susceptibilidade à *Agrobacterium* mesmo em variedades pertencentes a uma mesma espécie (BINNS, 1990). A determinação da melhor combinação patógeno-hospedeiro para um dado genótipo é uma etapa inicial importante para o desenvolvimento de metodologias que visem a obtenção de plantas transgênicas através do sistema *Agrobacterium* (LACORTE & MANSUR, 1993).

Transformação via *Agrobacterium tumefaciens*

A obtenção de plantas transgênicas via *A. tumefaciens* iniciou em 1983, quando seu sucesso era restrito a plantas de fumo. Essa situação mudou muito durante a década seguinte, e hoje existem inúmeras culturas transformadas por esta bactéria (GOODMAN *et al.* 1987; GODWIN *et al.* 1992; LAL & LAL, 1993; JÄHNE *et al.* 1995). A transformação de plantas dicotiledôneas via *A. tumefaciens* já é um processo usual em diversos países, onde existem várias espécies transgênicas (Tabela 2).

A transferência e a integração do T-DNA são determinadas por vários genes localizados no cromossoma bacteriano; pelo conjunto de genes de virulência (os genes *vir*) localizados no plasmídeo Ti ou Ri e pelas bordas que delimitam o T-DNA (HOOYKAAS & BEIJERSBERGEN, 1994). O sistema de infecção das agrobactérias representa um elemento genético contendo informações complexas que permite a transferência de genes de um organismo procariótico para um eucarioto superior (BRASILEIRO, 1995).

Vários métodos já foram descritos para transformação via *Agrobacterium*, sendo que a maioria deles é uma modificação do método de co-cultura de discos foliares de fumo, descrito em 1985 por Horsch e colaboradores (BRASILEIRO, 1995) e por Pasqualli (1996 - informe verbal).

Tabela 2 - Espécies dicotiledônias transgênicas obtidas por transformação via *A. tumefaciens*.

Espécie	Referência
<i>Apium graveolens</i>	Horsch et al., 1988
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Horsch et al., 1988
<i>Brassica napus</i>	Horsch et al., 1988
<i>Citrus paradisi</i>	Mogilner et al., 1993
<i>Glycine max</i>	Horsch et al., 1988
<i>Gossypium sp.</i>	Horsch et al., 1988
<i>Helianthus annuus</i>	Ursic et al., 1983 e Horsch et al., 1988
<i>Lactuca sativa</i>	Horsch et al., 1988
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Horsch et al., 1988
<i>Medicago varia</i>	Horsch et al., 1988
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Horsch et al., 1988
<i>Nicotiana tabacum</i>	Horsch et al., 1988
<i>Persea sp.</i>	Mogilner et al., 1993
<i>Petunia</i>	Horsch et al., 1988
<i>Poncirus trifoliata</i> x <i>Citrus</i> <i>cinensis</i>	Mogilner et al., 1993
<i>Solanum tuberosum</i>	Horsch et al., 1988

Pesquisas recentes revelam que a polaridade do núcleo do complexo T-DNA da *Agrobacterium* pode ser importante para a subsequente integração da fita de T-DNA no genoma da planta. Estudos genéticos evidenciaram que esta integração é um processo polar (CITOVSKY & ZAMBRYSKI, 1995; TINLAND & HOHN, 1995; GURALNICK *et al.*, 1996). É possível que estes dados contribuam para elucidar o comportamento diferenciado da relação patógeno-hospedeiro entre plantas mono e dicotiledôneas.

Outro fator envolvido na capacidade de infecção é a quantidade de compostos fenólicos liberados pela planta hospedeira para interação com a bactéria. Células de fumo quando rompidas, liberam compostos fenólicos como acetosiringona e alfa-hidroxiacetoseringona que ativam os genes *vir*, responsáveis pela transferência do T-DNA da *A. tumefaciens* para as células feridas do hospedeiro (STACHEL *et al.*, 1985). Provavelmente os tecidos das monocotiledôneas não produzem estes compostos, ou o fazem em níveis insuficientes (SMITH & HOOD, 1995).

Muitos pesquisadores acreditam que a inoculação de *A. tumefaciens* em monocotiledôneas tratadas com compostos fenólicos trazem aumento significativo da transformação (SCHAFER *et al.*, 1987; GOULD *et al.*, 1991; CHAN *et al.*, 1993; SMITH & HOOD 1995).

Ao avaliar a indução da expressão do gene *vir* em trigo e aveia, USAMI *et al.* (1988) concluíram que estes cereais apresentavam uma substância que induzia o gene, diferindo do composto fenólico usual, a acetoseringona, com milhares de vezes o seu peso molecular e sua propriedade hidrofílica. Os autores não concluíram se este indutor é uma, ou mais substâncias.

Situação atual da transformação via *A. tumefaciens* em cereais

Em monocotiledôneas a maioria dos estudos estão na fase da agroinfecção, e o maior esforço tem sido voltado para a identificação de estirpes de bactérias que infectem diferentes genótipos e espécies de plantas, bem como plasmídeos que sejam mais eficazes na incorporação de genes de interesse agrônomo no genoma do hospedeiro.

MAHALAKSHMI & KHURANA (1995), demonstraram que a estirpe GV2260 de *A. tumefaciens*, plasmídeos A281 e A348, consegue infectar alguns genótipos de trigo. O sucesso da transformação de monocotiledôneas via *A. tumefaciens* depende do uso da estirpe adequada, pois

existe interação significativa entre o genótipo vegetal e a estirpe da bactéria, tanto para mono como para dicotiledôneas (SMITH & HOOD, 1995). Até pouco tempo acreditava-se não ser possível o uso de *A. tumefaciens* para obter cereais transgênicos (JÄHNE *et al.* 1995). Entretanto HIEI *et al.* (1994) obtiveram plantas transgênicas de arroz, utilizando a bactéria LBA4404 com o plasmídeo pTok233.

Alguns estudos têm indicado a associação de técnicas de transformação para incrementar a frequência de plantas transformadas. BIDNEY *et al.* (1992) obtiveram este incremento associando biolística com *A. tumefaciens*, seja bombardeando as células com partículas recobertas por bactérias desidratadas, ou apenas ferindo as células via biolística e posteriormente co-cultivando-as com a bactéria.

Passos para obtenção de linhagens de cereais transformadas via *Agrobacterium tumefaciens*

- Identificar claramente os objetivos para trabalhar com manipulação genética, se para estudos fisiológicos ou bioquímicos ou para gerar variabilidade não obtida por métodos convencionais em programas de melhoramento;
- Avaliar as possíveis conseqüências que estas plantas modificadas podem trazer ao ambiente antes de proceder a transformação genética (HANDEL *et al.* 1996);
- Identificar qual o tipo de explante vegetal mais adequado para a infecção e a regeneração de plantas da espécie vegetal em questão;
- Avaliar a resistência ou susceptibilidade do tecido vegetal aos agentes seletivos;
- Avaliar o efeito dos antibióticos que eliminam a bactéria após a infecção dos explantes utilizados na transformação;
- Identificar as estirpes de *A. tumefaciens* adequadas para infectar os tecidos dos cereais;
- Estabelecer o tempo de subcultivo necessário em meio com antibióticos para eliminar totalmente a bactéria;
- Estabelecer controles positivos e negativos que possibilitem a identificação correta dos explantes transformados;
- Obter plantas regeneradas de explantes resistentes aos agentes seletivos; e,
- Testar as progênie de plantas potencialmente transformadas com agentes seletivos, e realizar testes com marcadores moleculares para confirmar a transformação estável.

Considerações Finais

A transformação de cereais via *A. tumefaciens* é uma tecnologia que vêm sendo aprimorada e a curto prazo deve possibilitar a incorporação de genes diferenciados nas culturas de interesse agrônomo. Dentre as características a serem incorporadas estão algumas características específicas de qualidade de grãos como altos teores de aminoácidos essenciais e produção de um único tipo de amido, a resistência a insetos praga, a moléstias de difícil controle e a tolerância a estresses ambientais.

Para o sucesso da técnica, os principais pontos a serem aprimorados são o desenvolvimento de novas estirpes "super virulentas" da bactéria, que serão capazes de infectar prontamente as células das espécies cereais, e os testes de regeneração *in vitro* de células transformadas (HIEI *et al.* 1994; ZANETTINI, 1996 - informe verbal). A regeneração *in vitro* de diversas cultivares nacionais de cereais está bem estabelecida (MILACH *et al.* 1991; BERED *et al.* 1996; LANGE *et al.* 1995; HANDEL *et al.* 1995), sendo fundamental para a implementação do processo de transformação. A regeneração de células transformadas via *A. tumefaciens* deve ser aprimorada. Outros pontos da metodologia, como a temperatura e presença ou ausência de luz durante a transformação com *Agrobacterium* devem ser cuidadosamente observados. Por exemplo, quando os explantes vegetais expostos a bactéria são subcultivados sob luz contínua dificilmente ocorre contaminação pela *Agrobacterium* deste meio de cultura com antibiótico. Contudo, quando este subcultivo é realizado no escuro a bactéria pode apresentar desenvolvimento acentuado, sendo necessário alterar a dose ou a combinação dos antibióticos utilizados (dados não publicados).

A confirmação da ocorrência de transformação do tecido vegetal via *A. tumefaciens* deve ser feita com uma combinação de testes, como o teste GUS (beta-glucuronidase), testes com marcadores moleculares para detectar a presença do gene de interesse, e testes de expressão do transgene, para assegurar a seleção correta de linhagens transgênicas. Estes testes de expressão do transgene também devem ser aplicados na progênie destas plantas transformadas, para que seja confirmada a transformação estável do gene de interesse.

A transformação de cereais via *A. tumefaciens*, permitirá o desenvolvimento das primeiras linhagens transgênicas em um futuro próximo. Assim que esta metodologia estiver totalmente estabelecida, poderá auxiliar concretamente programas de melhoramento de cereais, aumentando a variabilidade genética para caracteres de alto valor agregado.

Informação verbal

GIANCARLO PASQUALLI, Prof. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9300, Porto Alegre, RS CEP 91501-970.

MARIA HELENA ZANETTINI, Profª. Depto. de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9300, Porto Alegre, RS CEP 91501-970.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENNETZEN, J.L., FREELING, M. Grasses as a single genetic system: genome composition, collinearity and compatibility. *Trends in Genetics*, Amsterdam, v. 9, n. 8, p. 259-261, 1993.
- BERED, F., SERENO, M.J.C.M., CARVALHO, F.I.F., *et al.* Regeneração de plantas de aveia (*Avena sativa* L.) a partir de calos embriogênicos e organogênicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 1996 (no prelo).
- BIDNEY, D., SCELONGE, C., MARTICH, J., *et al.* Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 18, p. 301-313, 1992.
- BINNS, A.N. *Agrobacterium* - mediated gene delivery and the biology of host range limitations. *Physiol Plant.*, Copenhagen, v. 79, p. 135 - 139, 1990.
- BRASILEIRO, A.C.M. Transformação mediada por *Agrobacterium* sp. In: *Métodos de transferência e análise da expressão de genes em plantas*. CENARGEM, Brasília, 1995. Cap. 3. p. 7 - 22.
- BUIATTI, M., BOGANI, P. Physiological complexity and plant genetic manipulation. *Euphytica*, Wageningen, v. 85, p. 135-147, 1995.
- CHAN, M.T., CHANG, H.H., HO, S.C., *et al.* *Agrobacterium* - mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α - amylase promoter/ β - glucuronidase gene. *Plant Mol. Biol.*, Dordrecht, v. 22, p. 491 - 506, 1993.
- CITOVSKY, V., ZAMBRYSKI, P. Transport of protein - nucleic acid complexes within and between plant cells. *Membr Protein Transport* v. 1, p. 39 - 57, 1995.
- CONNER, A.J., DOMMISSE, E.M. Monocotyledonous plants as host for *Agrobacterium*. *International Journal of Plant Sciences*, Chicago, v. 153, n. 4, p. 550 - 555, 1992.
- DALE, P.J. R&D regulation and field trialling of transgenic crops. *Tibtech*, Cambridge, v. 13, p. 398-403, 1995.
- DALE, P.J., IRWIN, J. The release of transgenic plants from containment, and the move towards their widespread use in agriculture. *Euphytica*, Wageningen, v. 85, p. 425-431, 1995.
- DE CLEENE, M., DE LEY, J. The host range of crown gall. *Bot Rev*, Bronx, v. 42, n. 4, p. 389 - 466, 1976.
- GODWIN, I.D., FORD - LLOYD, B.V., NEWBURY, H.J. In Vitro approaches to extending the host - range of *Agrobacterium* for plant transformation. *Aust J Bot*, Melbourne, v. 40, p. 751 - 763, 1992.
- GOODMAN, R.M., HAUPTLI, H., CROSSWAY, A., *et al.* Gene transfer in crop improvement. *Science*, Washington, v. 236, p. 48 - 54, 1987.
- GOULD, J., DEVEY, M., HESEGAWA, O., *et al.* Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiology*, Rockville, v. 95, p. 426-434, 1991.
- GRIMSLEY, N., HOHN, T., DAVIES, J.W., *et al.* *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature*, London, v. 325, n. 8, p. 177-179, 1987.
- GURALNICK, B., THOMSEN, G., CITOVSKY, V. Transport of DNA into the nuclei of *Xenopus oocytes* by a modified *virE2* protein of *Agrobacterium*. *The Plant Cell*, Rockville, v. 8, p. 363 - 373, 1996.
- HANDEL, C.L., FEDERIZZI, L.C., BERED, F., *et al.* Regeneração de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) de linhas isogênicas do genótipo maringá com genes de porte baixo (Rht1 e Rht2). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 367 - 370, 1995.
- HANDEL, C.L., FEDERIZZI, L.C., MILACH, S.C.K. Riscos e benefícios do uso de plantas transgênicas na agricultura. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 26, n. 3, p. 511 - 517, 1996.
- HIEI, Y., OHTA, S., KOMARI, T., *et al.* Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, Oxford, v. 6, n. 2, p. 271 - 282, 1994.
- HOOYKAAS, P.J.J., BEIJERSBERGEN, A.G. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annu Rev Phytopathol*, v. 32, p. 157 - 179, 1994.
- HORSCH, R.B., FRY, J., HOFFMANN, N., *et al.* Leaf disc transformation. In : *Plant Molecular Biology Manual A 5*, p. 1-9. Kluwer Academic Publishers, 1988.
- JÄHNE, A., BECKER, D., LÖRZ, H. Genetic engineering of cereal crop plants: a review. *Euphytica*, Wageningen, v. 85, p. 35 - 44, 1995.
- JONES, P.W., CASSELLS, A.C. Criteria for decision making in crop improvement programmes - Technical considerations. *Euphytica*, Wageningen, v. 85, p. 465-476, 1995.
- LACORTE, C., MANSUR, E. Transferência de genes através da *Agrobacterium tumefaciens*: avaliação da compatibilidade patógeno - hospedeiro. *ABCTP Notícias*, Brasília, v. 21, p. 2 - 7, 1993.
- LAL, R., LAL, S. *Genetic engineering of plants for crop improvement*. Flórida: CRC Press Inc., 1993. 246 p.
- LANGE, C.E., FEDERIZZI, L.C., CARVALHO, F.I.F., *et al.* Genetic analysis of somatic embryogenesis and plant regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Genetics & Breeding*, Itália, v. 49, p. 195 - 200, 1995.
- LANGEVELD, S.A., GERRITS, M.M., DERKS, A.F.L.M., *et al.* Transformation of lily by *Agrobacterium*. *Euphytica*, Wageningen, v. 85, p. 97 - 100, 1995.
- MAHALAKSHMI, A., KHURANA, P. *Agrobacterium* - mediated gene delivery in various tissues and genotypes of wheat

- (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 55 - 59, 1995.
- MILACH, S.C.K., FEDERIZZI, L.C., CARVALHO, F.I.F., *et al.* Regeneração de plantas no cultivo de calos de genótipos brasileiros de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 11/12, p. 1947 - 1956, 1991.
- MOGILNER, N., ZUTRA, D., GAFNY, R., *et al.* The persistence of engineered *Agrobacterium tumefaciens* in agroinfected plants. **Molecular Plant - Microbiology Interaction**, St. Paul, v. 6, n. 5, p. 673 - 675, 1993.
- POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. **Annu Rev Plant Physiol**, Palo Alto, v. 42, p. 205 - 225, 1991.
- SCHAFER, W., GORZ, A., KAHL, G.T - DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium*. **Nature**, London, v. 327, p. 529 - 532, 1987.
- SMITH, R.H., HOOD, E.E. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 301-309, 1995.
- STACHEL, S.E., MESSENS, E., VAN MONTAGU, M., *et al.* Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T - DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, London, v. 316, p. 624 - 629, 1985.
- TINLAND, B., HOHN, B., PUCHTA, H. *Agrobacterium tumefaciens* transfers single - stranded transferred DNA (T - DNA) into the plant cell nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, p. 8000 - 8004, 1994.
- TILAND, B., HOHN, B. Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA : Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T - DNA into the plant genome. **Genet Eng**, New York, v. 17, p. 209 - 229, 1995.
- URSIC, D., SLIGHTOM, J.L., KEMP, J.D. *Agrobacterium tumefaciens* T - DNA integrates into multiple sites of the sunflower crown gall genome. **Molecular General Genetics**, New York, 190: 494 - 503, 1983.
- USAMI, S., OKAMOTO, S., TAKEBE, I., *et al.* Factor inducing *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression is present in monocotyledonous plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 85, p. 3748-3752, 1988.
- WEBB, K.J., MORRIS, P. Methodologies of plant transformation. In: GATEHOUSE, A.M.R., HILDER, V.A., BOULTER, D. **Plant Genetic Manipulation for Crop Protection: Biotechnology Agriculture nº 7**, CAB International, 1992. Cap. 2 p. 8 - 44.
- WINNANS, S.C. Two - way chemical signaling in *Agrobacterium* - plant interaction. **Microbiol Rev**, v. 56, p. 12 - 31, 1992.
- YUSIBOV, V.M., STECK, T.R., GUPTA, V., GELVIN, S.B. Association of single stranded transferred DNA from *Agrobacterium tumefaciens* With tobacco cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, p. 2994 - 2998, 1994.