

Autores

Marie Ventura
CoutinhoMárcia Fernandes
da CostaGláucia Barbosa
CabralMaria Fátima
Grossel de Sá**REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE FEIJÃO AZUKI (*Vigna Angulkaris*) VIA ORGANOGÊNESE DIRETA**

A tribo Phaseoleae inclui muitas espécies economicamente importantes no mundo tais como soja (*Glicine Max* (L.) Merrill), feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), feijão azuki (*Vigna angularis* Willd. Ohwi & Ohashi), e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). O feijão comum é a mais importante leguminosa para os países em desenvolvimento, constituindo uma das principais fontes de proteína e calorias, mas é susceptível ao ataque de doenças e insetos-praga. As pragas de armazenamento são responsáveis, no Brasil, por perdas que atingem 10% da produção de grãos (Brasil, 1993). O manejo do controle de pragas de grãos armazenados envolve boa qualidade do armazenamento, controle químico e o uso de variedades resistentes. As plantas possuem fatores intrínsecos capazes de proteger suas sementes do ataque de insetos e esses fatores podem ser não protéicos (antibióticos, alcalóides, terpenos, glucosídeos cianogênicos) ou protéicos (quitinases, lectinas, arcelinas e inibidores de enzimas, por exemplo). Esses fatores podem ser incorporados a novos cultivares através de processos de melhoramento genético e de técnicas de biologia molecular, as quais tornam possível a transferência de informações genéticas entre espécies, ampliando desta forma as chances de sucesso na obtenção de novos cultivares resistentes a insetos-praga. Grande parte das pesquisas realizadas nesta área tem sido focada nos inibidores de α -amilase, uma vez que essas substâncias impedem a digestão de amido no trato digestivo dos bruquídeos e que estes são altamente dependentes de amido para seu suprimento de energia. Os mais importantes insetos-praga de feijão, no Brasil, são os bruquídeos *Zabrotes subfasciatus*, *Acanthoscelides obtectus* e *Callosobruchus maculatus*. Informações acerca da susceptibilidade de alguns feijões ao ataque desses insetos e à susceptibilidade destes à ação de algumas proteínas de defesa vegetal estão sumarizadas na tabela 1. Dentre as proteínas de defesa, o inibidor de α -amilase de trigo 0.53 é de interesse especial por ser uma das poucas proteínas com atividade contra as α -amilases de *A. obtectus* e por mostrar baixa atividade inibitória contra α -amilases de mamíferos (Franco et al., 2002), o que a torna provavelmente viável para programas de melhoramento através de transformação genética de plantas, sem risco de danos à saúde humana.

Tabela 1. Susceptibilidade de feijões a bruquídeos e presença ou ausência de atividade de proteínas de defesa vegetal contra as amilases destes bruquídeos.

NSA - não se aplica.

¹ – α -amilase pancreática de porco

		<i>Z. subfasciatus</i>	<i>A. obtectus</i>	<i>C. maculatus</i>	<i>C. chinensis</i>	PPA ¹
CULTURAS	<i>P. vulgaris</i>	sim	sim	não	não	nsa
	<i>P. acutifolius</i>	sim	sim	não	não	nsa
	<i>V. angularis</i>	não	não	sim	sim	nsa
	<i>V. unguiculata</i>	sim	sim	sim	sim	nsa
PROTEÍNAS DE DEFESA	α AI-1 (feijão comum)	não	não	sim	sim	sim
	α AI-2 (feijão comum)	sim	não	não	não	não
	0.19 (trigo)	sim	sim	sim	não	sim
	0.53 (trigo)	sim	sim	sim	não	baixa
	WRP 25 (trigo)	sim	não	sim	não	não
	WRP 26 (trigo)	não	não	sim	não	não
	BIII (centeio)	sim	sim	não	não	sim

Apesar do desenvolvimento de processos para a transformação de diversas culturas, muitos obstáculos precisam ainda ser vencidos para a aplicabilidade desta tecnologia (Cooley et al., 1995; Damm et al., 1989). Os primeiros esforços para produzir plantas de feijão transgênicas não foram bem sucedidos devido à inexistência de sistemas eficientes de transferência de DNA e de regeneração de plantas de feijão (McClellan et al., 1991). Leguminosas como soja (*Glycine Max*), feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), caupi (*Vigna unguiculata*) e feijão azuki (*Vigna angularis*) são importantes em muitos países, mas transformação genética destas culturas é ainda trabalhosa, demorada e ineficiente (Finer & Nagasawa, 1988; Singh et al., 1998; Hinchee et al., 1988).

Dois sistemas de transformação têm sido principalmente usados para leguminosas: biobalística ou bombardeamento de partículas (Finer et al., 1989) que consiste na transferência de microprojéteis, usualmente de ouro ou tungstênio, cobertos com DNA e propelidos para dentro de células alvo através de aceleração. O sucesso desse método depende da habilidade do tecido alvo de se regenerar e dar origem a uma planta fértil. Este sistema foi utilizado por Russel et al., 1993, para conseguir plantas transgênicas de feijão a partir de informações descritas para organogênese de brotos de meristemas apicais ou axilares de feijão (McClellan & Grafton, 1989; Malik & Saxena, 1992; Mohamed et al., 1992a) e foi posteriormente explorado para gerar plantas transgênicas de feijão expressando a albumina 2S de castanha do Pará (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) (Aragão et al., 1999), RNAs antisense mostrando sintomas retardados e atenuados de um isolado brasileiro de geminivírus do mosaico dourado do feijão (Aragão et al., 1998) e fosfinotricina acetil transferase, codificada pelo gene *bar*, a qual confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio (Aragão et al., 2002), sendo que as duas últimas foram incluídas no programa de melhoramento de feijão da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA.

O segundo sistema de transformação é mediado por *Agrobacterium* e apresenta vantagens, como facilidade do protocolo, baixo custo de equipamentos e inserção de uma única cópia do gene na maioria das plantas transgênicas obtidas por esse método (Hansen & Chilton, 1999). A transformação mediada por *Agrobacterium* também depende da susceptibilidade da cultura alvo ou genótipo alvo a *Agrobacterium*, bem como à disponibilidade de um procedimento de regeneração.

A partir do sistema de transformação mediado por *Agrobacterium*, dois métodos podem ser utilizados para regenerar plantas: embriogênese somática e organogênese. Ambos foram usados para recuperar plantas de *Phaseolus coccineus* a partir de cotilédones imaturos (Angelini & Allavena, 1989) e soja (Trick et al., 1987). Embriogênese somática foi usada para regenerar ervilha (*Pisum sativum*) usando explantes de embriões imaturos (Kysely et al., 1987) e caupi, a partir de folhas primárias jovens (Anand et al., 2000). Plantas de feijão azuki (El-Shemy et al., 2002) e de *P. acutifolius* (Dillen et al., 1997) foram regeneradas a partir de calos. Organogênese direta de parte aérea, induzida pelo cultivo de meristemas apicais ou axilares sob altas taxas de citocininas, tem sido descrita para *P. vulgaris* e *P. acutifolius* (Malik & Saxena, 1992; Mohamed et al., 1992a, 1992b; MCClean & Grafton, 1989; Cruz de Carvalho et al., 2000).

Embora plantas transgênicas de diversas leguminosas da família Phaseolae tenham sido produzidas usando esses dois sistemas de transformação (Hinchee et al., 1988; McCabe et al., 1988; Dillen et al., 1997; El-Shemy et al., 2002), a transformação e regeneração ainda não são reproduzíveis em muitos laboratórios.

Dentre as leguminosas, o feijão azuki tem mostrado boa regeneração e transformação pelo sistema mediado por *Agrobacterium* (Yamada et al., 2001). Feijão azuki não é uma cultura cosmopolita, mas é um membro da tribo Phaseoleae. Assim, o sistema de transformação do azuki pode ser usado como um modelo para a compreensão das funções gênicas em grãos de leguminosas. Este trabalho apresenta os resultados iniciais de regeneração de feijão azuki a partir de transformação de explantes de epicótilos com o inibidor de trigo 0.53, visando, inicialmente, desenvolver uma metodologia para as nossas condições e estudar a expressão desse inibidor nas plantas transformadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Plasmídeos e Bactéria

O vetor binário pFSMV 10.3, contendo o gene neomicina fosfotransferase II (*nptII*) e o gene codificando para o inibidor de trigo 0.53 (Fig 1) foi usado para a transformação de feijão azuki. O gene neomicina fosfotransferase II (*nptII*), usado como marcador de seleção, confere tolerância ao antibiótico canamicina e está sob o controle regulatório do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). O inibidor de trigo 0.53 encontra-se sob o controle regulatório do promotor da fitohemaglutinina. A cepa EHA 105 de *A. tumefaciens* (Hood et al., 1993) foi usada para transformação de feijão azuki.

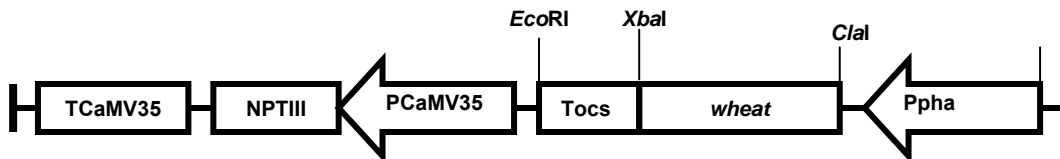


Figura 1. Representação esquemática da região transferida do vetor binário pFSMV 10.3.

Material vegetal e germinação das sementes

Sementes de feijão azuki compradas no mercado foram desinfestadas superficialmente em etanol 70% por 30 segundos seguido por hipoclorito de sódio 2% durante 15 minutos e 5 lavagens em água destilada autoclavada. As sementes foram semeadas sobre meio basal MS (Murashige and Skoog, 1962) modificado para metade da concentração de macronutrientes e solidificado com 8 g L^{-1} de ágar contendo 20 g L^{-1} de sacarose, pH 5,8 e um dos dois reguladores de crescimento: $1 \mu\text{M}$ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou $2,5 \mu\text{M}$ de thidiazuron (TDZ). As sementes foram germinadas a 25°C em regime de 5 dias no escuro seguido por 3 dias na luz, 3 dias no escuro e, novamente na luz por 1 dia.

Transformação e seleção de feijão azuki

Epicótilos de plântulas alongadas por 12 dias, conforme descrito anteriormente, foram cortados em pequenos fragmentos com cerca de 10 mm de comprimento (10 explantes por epicótilo, em média), e entre 25 a 30 explantes por placa foram colocados horizontalmente em meio de co-cultivo. Este meio consistiu de sais de MS solidificado com 5 g L^{-1} de phytigel contendo 20 g L^{-1} de sacarose, a pH 5,8 com $100 \mu\text{M}$ de acetoseringona e reguladores de crescimento como indicado na tabela 2. Uma colônia de *A. tumefaciens* cepa EHA 105 carregando o vetor binário pFSMV 10.3 foi crescida a 28°C durante a noite em LB líquido contendo 100 mg L^{-1} de rifampicina e 100 mg L^{-1} de canamicina. Células bacterianas foram coletadas por centrifugação e ressuspendidas para uma A_{600} entre 0,1 e 0,2 em meio MS líquido contendo 15 g L^{-1} de glicose, tendo sido colocados $2 \mu\text{l}$ da suspensão sobre os lados feridos de cada explante. Após dois dias de co-cultura a 25°C no escuro, os explantes foram lavados duas vezes com água destilada autoclavada e o excesso de líquido foi removido com papel de filtro estéril. Os explantes foram plaqueados horizontalmente sobre meio de regeneração - MR (MS sólido contendo 100 mg L^{-1} de canamicina e 300 mg L^{-1} de cefotaxima e reguladores de crescimento conforme tabela 2 e foram incubados a 25°C sob luz branca e fria fluorescente (regime de luz de 16h a $50 - 60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-2}$). Os explantes foram sub-cultivados a cada duas semanas. As brotações maiores que 1 cm e apresentando mais de duas folhas foram transferidas para meio MS sem reguladores de crescimento, mas contendo 50 mg L^{-1} de canamicina e 300 mg L^{-1} de cefotaxima. Essas brotações estão sendo repetidamente selecionadas no mesmo meio para desenvolvimento das raízes e futura transferência para solo, em casa de vegetação, para posteriores análises.

RESULTADOS

A formação de brotações ocorreu diretamente de tecido globular intumescido e organizado proveniente do câmbio vascular (pró-gemas) de epicótilo. Explantes cortados a partir de epicótilos alongados (Fig. 2a) foram colocados em meio de co-cultura (Fig. 2b), sendo inoculados com a cepa EHA 105 de *A. tumefaciens* carregando o vetor binário pFSMV 10.3. Após a co-cultura, os explantes foram transferidos para meio de regeneração, passando por subcultivos a cada duas semanas.

Na presença de 2,4D (1 μM) os epicótilos alongaram de maneira normal. Por outro lado, a presença de TDZ (2,5 μM) afetou o desenvolvimento das plântulas, as quais alongaram muito pouco e tiveram a raiz principal engrossada, sem emissão de raízes secundárias, o que reduziu significativamente o número de explantes.

A resposta de azuki aos diferentes meios foi bastante variada. Os explantes germinados em TDZ 2,5 μM não desenvolveram parte aérea, formando calos friáveis de coloração verde (MR contendo BAP 3 mg L^{-1}) ou ficaram totalmente oxidados (MR contendo TDZ 2,5 μM ou 10 μM). Em todos os tratamentos se verificou o desenvolvimento de calos brancos, friáveis e hiper-hidratados tipo “flocos de algodão”, que não regeneraram.

O mesmo aconteceu com os explantes originados de epicótilos alongados na presença de 2,4D, quando colocados para regenerar em meio contendo BAP 3 mg L^{-1} , BAP 1 mg L^{-1} ou TDZ 2,5 μM .

Apenas os explantes germinados na presença de 1 μM de 2,4D e colocados em meio de regeneração contendo cinetina desenvolveram pró-gemas e a partir destas, multibrotações. Dos 67 explantes, 20 apresentaram pró-gemas (Fig. 2c) a partir do 31^o dia pós-semeadura (aproximadamente 30%), dos quais 16 desenvolveram multibrotações (Fig 2. d-e). Brotos maiores do que 1 cm foram transferidos para meio de enraizamento (MS sem regulador de crescimento, suplementado com 50 mg L^{-1} de canamicina e 300 mg L^{-1} de cefotaxima), onde estão sendo sub-cultivados para posteriores análises moleculares.

Tabela 2. Efeito de reguladores de crescimento utilizados nos meios de germinação, co-cultura e regeneração sobre explantes de epicótilos de azuki, sobrevivência dos explantes e formação de brotações.

DAS - dias após a semeadura.

GERMINAÇÃO	CO-CULTURA	REGENERAÇÃO	Nº DE EXPLANTES			Nº DE BROTAÇÕES
			14 DAS	27 DAS	31 DAS	46 DAS
2,4D 1 μM	BAP 10 mg L^{-1}	BAP 3 mg L^{-1}	12	12	6	0
		BAP 1 mg L^{-1}	21	11	9	0
	KIN 10 mg L^{-1}	KIN 1 mg L^{-1}	67	41	20	16
	TDZ 2,5 μM	TDZ 2,5 μM	87	43	11	0
TDZ 2,5 μM	BAP 10 mg L^{-1}	BAP 3 mg L^{-1}	14	10	10	0
	TDZ 2,5 μM	TDZ 2,5 μM	12	3	3	0
	TDZ 10 μM	TDZ 10 μM	10	5	5	0

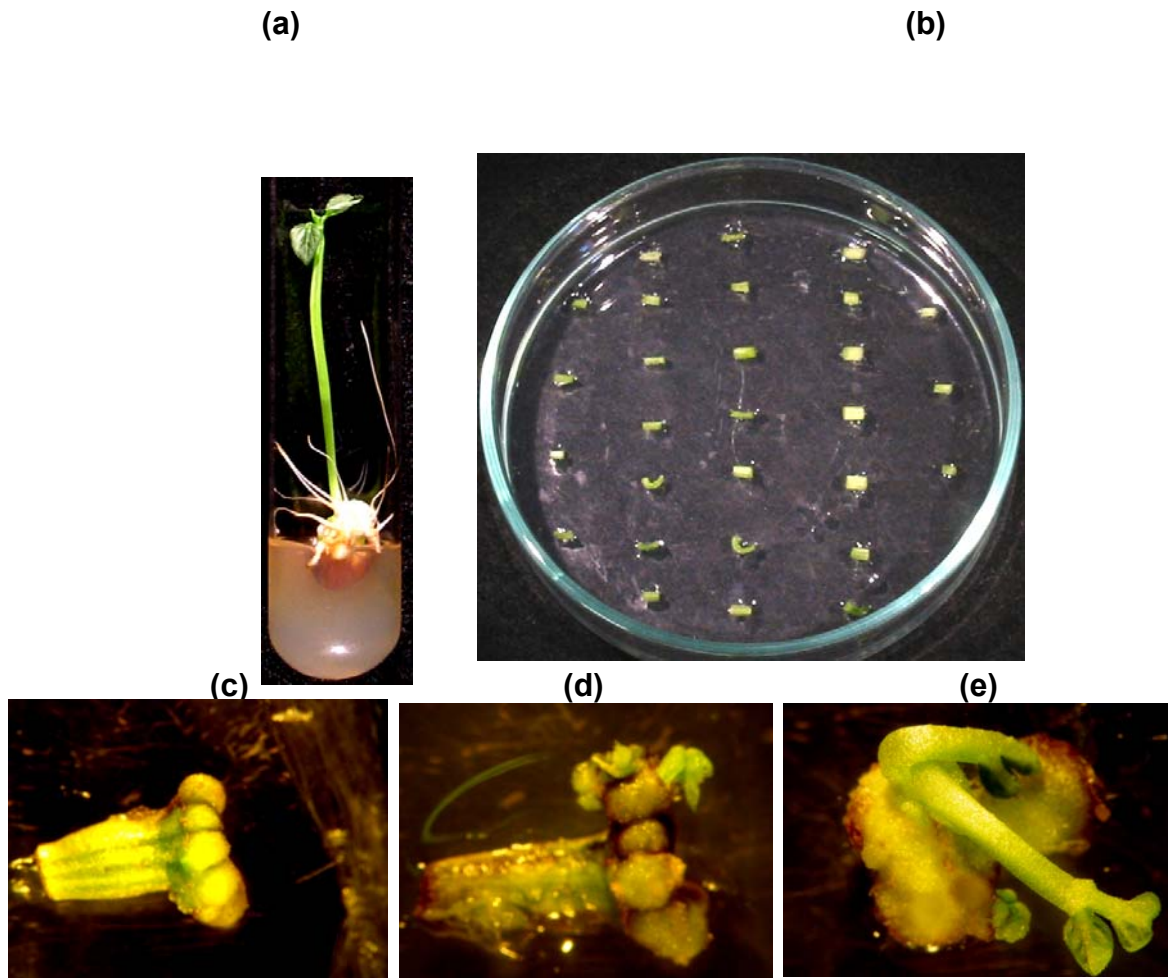


Figura 2: regeneração de feijão azuki: (a) epicótilo alongado; (b) co-cultura; (c) formação de pró-gemas; (d) multibrotação das pró-gemas; (e) desenvolvimento de uma multibrotação.

DISCUSSÃO

Um sistema de transformação e regeneração para feijão azuki foi desenvolvido através do sistema mediado por *A. tumefaciens* (El-Shemy et al., 2002). Entretanto, a eficiência de regeneração e concentração ótima de reguladores vegetais de crescimento é genótipo dependente (Yamada et al., 2001) e, por isso, está sendo desenvolvida em nosso laboratório uma metodologia para uma cultivar comercialmente utilizada no Brasil.

Com base em observações feitas a partir de experimentos realizados com feijão de corda em nosso laboratório, os epicótilos foram expostos à luz antes da co-cultura para estimular um balanço hormonal endógeno favorável a citocininas. Foi observado que no tratamento que deu origem ao surgimento de pró-gemas, essas estruturas se formaram e deram origem a multibrotações de forma precoce (cerca de 31 dias pós-germinação) quando comparado ao tempo necessário para obter brotações a partir de calos descrito por Yamada et al., 2001.

Resultados obtidos com experimentos anteriores indicavam a presença de elevada taxa endógena de auxinas no feijão, o que poderia explicar a formação exagerada do calos friáveis, tipo “flocos de algodão” e, em alguns explantes foi observada apenas a formação de raízes. Este experimento foi, então, montado com o objetivo de se determinar um balanço otimizado de reguladores que favorecesse a rota das citocinina e que eliminasse a formação desse tipo de calos. A combinação que utilizou germinação na presença de 1 μM de 2,4D e o uso de KIN (10 mg L^{-1} na co-cultura e 1 mg L^{-1} no meio de regeneração) se mostrou eficiente para a obtenção de organogênese direta, tendo sido adotada para os experimentos seguintes que estão em curso no nosso laboratório. Repetições desse experimento estão sendo montadas a fim de confirmar os resultados obtidos. Entretanto, algumas observações têm nos sugerido que algumas mudanças podem ser efetuadas a fim de melhorar o procedimento. Por exemplo, uma grande parte dos explantes oxidou completamente ao longo dos sub-cultivos. Nas repetições deste experimento que estão em curso, foram separados os explantes cortados a partir do terço superior do epicótilo dos demais e foi possível observar que enquanto a maioria dos explantes do terço superior permanecem verdes, quase todos os demais se tornam oxidados e morrem. Isso se explica, uma vez que o terço superior está mais próximo da região meristemática apical, sendo mais jovens e tendo maior capacidade de dediferenciação.

A repetição desse experimento permitirá avaliações sobre a eficiência e reprodutibilidade da metodologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anand, R.P.; Ganapathi, A.; Ramesh, V.A.; Vengadesan, G. and Selvaraj, N. 2000. High frequency plant regeneration via somatic embryogenesis in cell suspension cultures of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 36: 475-480.
- Angelini, R. R. and Allavena, A. 1989. Plant regeneration from immature cotyledon explant cultures of bean (*P. coccineus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 19: 167-174.
- Aragão, F.J.L.; Ribeiro, S.G.; Barros, L.M.G.; Brasileiro, A.C.M.; Maxwell, D.P.; Rech, E.L. and Faria, J.C. 1998. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. *Molecular Breeding* 4: 491-499.
- Aragão, F.J.L.; Barros, L.M.G.; Sousa, M.V.; Grossi de Sá, M.F.; Almeida, E.R.P.; Gander, E.F. and Rech, E.L. 1999. Expression of a methionine-rich stored albumin from the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K. lecytidaceae) in transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* (L.) fabaceae). *Genetics and Molecular Biology* 22 (3): 445-449.
- Aragão, F.J.L.; Vianna, G.R.; Albino, M.M.C. and Rech, E.L. 2002. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. *Crop Science* 42: 1298-1302.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da reforma Agrária. Comissão Técnica para Redução das Perdas na Agropecuária. (Brasília, DF), Perdas na agropecuária brasileira: relatório preliminar. Brasília, v.1, 1993.
- Cooley, J.; Ford, T. and Christou, P. 1995. Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric-discharge particle acceleration. *Theor Appl Genet.* 90: 97-104.
- Cruz de Carvalho, M.H.; Van Lê, B.; Zuily-Fodil, Y.; Pham Thi, A.T. and Thanh Van, K.T. 2000. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Science* 159: 223-232.
- Damm, B; Schmidt, R. and Willmitzer, L. 1989. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplasts. *Mol Gen Genet* 217: 6-12.
- Dillen, W; De Clercq, J.; Goosens, A.; Van Montagu, M. and Angenon, G. 1997. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Theor. Appl. Genet.* 94: 151-158
- El-Shemy, H.A.; Khalafalla, M.; Wakasa, K and Ishimoto, M. 2002. Reproducible transformation in two grain legumes - soybean and azuki bean - using different systems. *Cellular & Molecular Biology Letters* 7: 709 - 719.

Franco, O.I.; Rigden, D.J.; Melo, F.R. and Grossi de Sá, M.F. (2002) Plant α -amilase inhibitors and their interaction with insect α -amilases: structure, function and potential for crop protection. Eur. J. Biochem. 269: 397-412.

Finer, J.J. and Nagasawa, A. 1988. Development of an embryogenic suspension culture of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. Plant Cell Tissur Organ Cult. 15:125-136.

Finer, J.J.; Finer, K.R. and Ponappa, T. 1999. Particle bombardment-mediated transformation, in Current Topics in Microbiology and Immunology (Vol.240), Plant Biotechnology: New Products and Applications (Hammond, J.; McGarvey, P. B. and Yusibov, V. Eds), Springer-Verlag 240: 59-80.

Hansen, G. and Chilton, M-D. 1999. Lessons in gene transfer to plants by a gifted microbe, in Current Topics in Microbiology and Immunology (Vol.240), Plant Biotechnology: New Products and Applications (Hammond, J.; McGarvey, P. B. and Yusibov, V. Eds), Springer-Verlag 240: 21-49.

Hinchee, M.A.W.; Conner-Ward, D.V.; Newell, C.A.; McDonnell, R.E.; Sato, S.J.; Gasser, C.S.; Fischhoff, D.A.; Re, D.B.; Fraley, R.T. and Horsch, R.B. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. Bio/Technology 6: 915-922.

Kysely, W.; Myers, J.R.; Lazzeri, P.A.; Collins, G.B. and Jacobsen, H.J. 1987. Plant regeneration via somatic embryogenesis in pea (*Pisum sativum* L.). Plant Cell Rep 6: 305-308.

Malik, K.A. and Saxena, P.K. 1992. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: high-frequency induction of direct shoots formation in intact seedlings by N-benzylaminopurine and thidiazuron. Planta 186: 384-389.

McCabe, D.E.; Swain, W.F.; Martinell, B.J. and Christou, P. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. Bio/Technol. 6: 923-926.

McClellan, P.; Grafton, K.F. 1989. Regeneration of dry bean (*Phaseolus vulgaris*) via organogenesis. Plant Sci. 60:117-122.

McClellan, P.; Chee, P.; Held, B.; Simental, J.; Drong, R.F. and Slightom, J. 1991. Susceptibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Agrobacterium* infection; transformation of cotyledonary and hypocotyls tissues. Plant Cell Tissue Org Cult. 23:131-138.

Mohamed, M.F.; Read, P.E. & Coyne, D.P. 1992a. Dark preconditioning, CPPU, and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117: 668-672.

Mohamed, M.F.; Read, P.E. & Dermot, P.C. 1992b. Plant regeneration from in vitro culture of embryonic axis explants in common and tepary beans. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117: 332-336.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15: 473-497.

Russell, D.R.; Wallace, K.M.; Bathe, J.H.; Martinell, B.J. & McCabe, D.E. 1993. Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Rpt* 12: 165-169.

Singh, R.J.; Klein, T.M.; Mauvais, C.J.; Knowlton, S.; Hymowitz, T and Kostow, C.M. 1998. Cytological characterization of transgenic soybean. *Theor. Appl. Genet.* 96: 319-324.

Trick, H.N.; Dinkins, R.D.; Santarem, E.R.; Di, R.; Samoylov, V.M.; Meurer, C.; Walker, D.; Parrott, W. A.; Finer, J.J. and Collins, G.B. 1997. Recent advances in soybean transformation. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 3: 9-26.

Yamada, T.; Teraishi, M.; Hattori, T. and Nakamura, K. 2001. Transformation of azuki bean by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 64: 47 - 54.

<p>Circular, Técnica 27</p> <p>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</p>	<p>Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Serviço de Atendimento ao Cidadão Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624 http://www.cenargen.embrapa.br e.mail:sac@cenargen.embrapa.br</p> <p>1ª edição 1ª impressão (2003): 150 unidades</p>	<p>Comitê de Publicações</p> <p>Expediente</p>	<p>Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias Secretário-Executivo: Maria José de Oliveira Duarte Membros: Maurício Machaim Franco Regina Maria Dechechi G. Carneiro Luciano Lourenço Nass Sueli Correa Marques de Mello Vera Tavares Campos Carneiro Supervisor editorial: Maria José de Oliveira Duarte Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi Editoração eletrônica: Giscard Matos de Queiroz</p>
--	--	--	--