

Regeneração e Transformação Genética de Plantas.

64

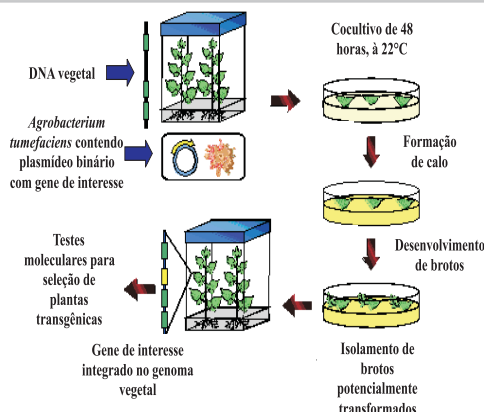
Circular Técnica

Campina Grande, PB
Dezembro, 2002

Autores

Márcia Soares Vidal,
Bióloga, Dr^a. Pesquisadora da
Embrapa Algodão. Rua Osvaldo
Cruz, 1143, Centenário. CP. 174,
CEP 58107-720, Campina
Grande, PB.
e-mail mvidal@cnpa.embrapa.br

Julita M^a Frota Chagas Carvalho,
Dr^a. Pesquisadora da Embrapa
Algodão.
e-mail julita@cnpa.embrapa.br



O melhoramento das espécies cultivadas, dentre elas o algodão, tem sido uma preocupação constante, uma vez que nenhuma cultura preenche todos os parâmetros agrônômicos qualitativos desejáveis, como resistência a patógenos, produtividade e tolerância a diferentes estresses fisiológicos (MOREIRA *et*

al., 1999). Durante as últimas décadas a cultura do algodão vem sendo melhorada por meio de métodos convencionais, utilizando a própria variabilidade natural dentro de diferentes recursos genéticos (GYVES, 1994a). No entanto algumas características não puderam ser melhoradas utilizando o melhoramento clássico, seja pela sua ausência no "pool" genético do algodão, seja pela dificuldade de cruzamento, uma vez que, para que isso ocorra, alguns requisitos são necessários como a compatibilidade entre espécies, o tempo necessário para a transferência dos caracteres desejáveis, etc. O melhoramento de várias espécies de plantas sofreu grande avanço graças à engenharia genética, como combinação das técnicas de biologia molecular, cultura de tecidos e transferência de genes (GYVES, 1994b; LINDSEY, 1992; DALE *et al.*, 1993; AYUB *et al.*, 1996). Esta última só foi possível com a descoberta que o material genético de qualquer organismo compõem-se das mesmas unidades, os genes.

A regeneração de plantas utilizando cultura de tecidos é um importante passo para o sucesso no estabelecimento de programas de melhoramento que empregam a transformação de plantas. Esta regeneração pode ser obtida por meio da organogênese ou embriogênese, sendo a última subdividida em embriogênese zigótica, também conhecida como cultura de embriões, e embriogênese somática. A embriogênese somática apresenta certa preferência de utilização, uma vez que as plantas obtidas por este processo são desenvolvidas a partir de células individuais, não produzindo as quimeras, como pode ser observado durante a organogênese (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O estabelecimento de um protocolo de regeneração de plantas reprodutível e de alta eficiência é um pré-requisito para a viabilizar a transferência de genes, uma vez que a transformação genética vegetal requer que as células ou tecidos transformados sejam regenerados *in vitro*.

Regeneração de Plantas

A regeneração de plantas pode ser obtida por dois processos: a organogênese e a embriogênese.

A organogênese, também chamada de neoformação de gemas, é um processo de regeneração “de novo” de gemas vegetativas ou gemas florais. A formação de gemas vegetativas pode anteceder ou não à formação de gemas florais. Basicamente, a organogênese pode se dar de duas formas: diretamente de tecidos com potencial morfogênico e indiretamente, através da formação de calos - aglomerado de células desorganizadas, formado por células diferenciadas e não diferenciadas, que se dividem de forma ativa, e que geralmente são originadas em zonas com injúrias químicas ou físicas (HANDRO e FLOH, 1990).

A embriogênese pode ser dividida em zigótica e somática. A embriogênese zigótica, também chamada de cultura de embrião tem sido empregada para descrever os processos de crescimento e desenvolvimento de embrião originado a partir da fecundação (zigoto), já a somática designa o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se em plantas por meio de estágios embriogênicos, sem que haja a fusão de gametas.

A regeneração de plantas de algodão empregando a organogênese encontra-se muito incipiente, uma vez que poucos trabalhos vem sendo apresentados empregando esta metodologia, onde pôde-se observar o estabelecimento dos explantes ideais para este processo, bem como reguladores de crescimento e suas concentrações. Hemphill *et al* (1998) trabalharam com inúmeros tipos de explante de algodão das seguintes cultivares: Stovepipe, CA-3050, CA-3066, CA-3076, Stoneville 7A e Paymaster HS 26. Os que responderam preferencialmente ao superbrotamento foram as gemas com potencial morfogênico (apical, nó cotiledonar, nó das folhas primárias, nó das folhas secundárias e meristema apical) das cultivares Stoneville 7A e Paymaster HS 26, indicando potencial responsivo de acordo com o “background” genético. Carvalho *et al* (2000), utilizando nó cotiledonar de *Gossypium hirsutum* cv CNPA 7H como explante, obtiveram organogênese empregando sais e vitaminas do meio MS suplementado com 2,5 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP) e 2,5 mg/L de Kinetina (Kin).

A regeneração de plantas de algodão empregando a embriogênese somática foi conseguida em poucas cultivares de *G. hirsutum*, sendo a freqüência de regeneração muito baixa para a maioria das cultivares testadas

(DAVIDONIS e HAMILTON, 1983; TROLINDER e GOODIN, 1987; TROLINDER e XHIXIAN, 1989; GAWEL e ROBACKER, 1990) e da espécie silvestre *G. klotzchianum* (PRICE e SMITH, 1979). Entre as cultivares comerciais de algodão, a obtenção de plantas através da embriogênese somática está limitada às linhagens da cultivar Coker, que apresentam altas taxas de regeneração (JOHN e STEWART, 1992).

Transformação Genética de Plantas

A transformação genética é definida como sendo a introdução controlada de ácidos nucléicos em um genoma receptor, excluindo-se a introdução por fecundação (TACCHINI e WALBOT, 1986). Diferentes técnicas de transformação genética de plantas foram estabelecidas com o desenvolvimento da cultura de tecidos e da engenharia genética (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998). As metodologias de transformação genética de plantas podem ser divididas em duas categorias: transferência indireta e direta de genes.

✓ Transformação Indireta

A transferência indireta é aquela em que, para intermediar a transformação, utiliza-se um vetor, como as bactérias *Agrobacterium tumefaciens* (CHILTON *et al.*, 1977) e *Agrobacterium rhizogenes* (CHILTON *et al.*, 1982). Já a transferência direta de DNA se baseia em métodos físicos ou químicos, geralmente adaptados de sistemas de transformação de células animais já estabelecidos.

A obtenção de plantas transgênicas, empregando as técnicas de transferência de genes mencionadas anteriormente, envolvem técnicas complexas de cultura de células ou tecido, adaptação dos protocolos de transformação, seleção das linhagens transformantes e regeneração propriamente dita das plantas transformadas (CHRISTOU, 1996; SIEMENS e SCHIEDER, 1996; HOOYKAAS e SCHILPEROORT, 1992).

A transformação genética indireta emprega bactérias do gênero *Agrobacterium*, conhecidas como vetores de transformação de plantas. Tais bactérias pertencem a família *Rhizobiaceae*, juntamente com os gêneros *Rhizobium*,

Bradyrhizobium e *Phyllobacterium*, bactérias fixadoras de nitrogênio. As agrobactérias são divididas de acordo com suas características fitopatogênicas em *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *A. vitis* e *A. radiobacter*. *A. Agrobacterium tumefaciens* é o agente etiológico causal da doença galha-de-coroa, *A. rhizogenes* causa a raiz em cabeleira, *A. rubi* induz galhas especificamente em *Rubus* spp., *A. vitis* induz galhas especificamente em videiras e *A. radiobacter* é saprófita (não-patogênica). A galha de coroa é uma doença relativamente importante em regiões de clima temperado, principalmente em pomares e vinhedos da Europa, da Austrália e da América do Norte. No Brasil, entretanto, não é uma doença de importância relevante. Sobre certas espécies vegetais, principalmente aquelas propagadas vegetativamente (como videiras, roseiras, algumas espécies florestais e frutíferas), a galha de coroa pode tomar proporções devastadoras, conduzindo à perda quase que total da produção.

A capacidade das agrobactérias de infectar células vegetais está associada à presença do plasmídeo, molécula circular de ácido desoxirribonucléico (DNA) com capacidade de duplicação autônoma, de alto peso molecular (150-250 kilobase), conhecido como Ti (do inglês "tumor-inducing") em cepas de *Agrobacterium tumefaciens* e Ri (do inglês "root-inducing") em cepas de *A. rhizogenes* (HOOYKAAS e MOZO, 1994; WALKERPEACH e VELTEN, 1994). Este plasmídeo apresenta uma região, o T-DNA (do inglês "transferred DNA") capaz de ser transferido e integrado no genoma da célula vegetal hospedeira pela agrobactéria de modo estável. O T-DNA é delimitado por duas seqüências repetitivas de 25 pares de base (pb), conhecidas como bordas direita e esquerda.

A interação entre as espécies de *Agrobacterium* e as plantas envolve uma complexa série de sinalizadores químicos que propiciam a comunicação entre o patógeno e a planta hospedeira. Estes sinais incluem açúcares, neutros ou ácidos, compostos fenólicos, opinas, proteínas Vir e o T-DNA, que em última instância será transferido da bactéria para a célula vegetal (WINANS, 1992; HOOYKAAS e BEIJERSBERGEN, 1994; Baker *et al.*, 1997). O processo de transferência do T-DNA é iniciado quando a agrobactéria percebe certos compostos (açúcares ou fenólicos) liberados por células vegetais que sofreram algum tipo de injúria física causada durante os tratamentos culturais, geadas,

insetos etc. Este fenômeno de atração das bactérias pelas moléculas-sinal liberadas pelas células lesionadas é conhecido como quimiotatismo positivo. Uma vez em contato com a célula vegetal, as agrobactérias sintetizam microfibrilas de celulose, capazes de melhorar a fixação das bactérias às células vegetais.

O processo de indução da transferência do T-DNA da bactéria para o genoma vegetal ocorre graças as moléculas-sinal que ativaram os genes de virulência, localizados na região de virulência, ou região *vir*. A região *vir* é um "regulon" composto por seis a oito operons, contendo, aproximadamente, 25 genes cujas proteínas codificadas promoverão a transferência do T-DNA. Os tumores obtidos após a inoculação com *A. tumefaciens* são o resultado da expressão de outro grupo de genes, os oncogenes, localizados no T-DNA que foi transferido para a célula vegetal. Os oncogenes codificam enzimas envolvidas na via de biossíntese dos reguladores de crescimento vegetal, auxina e citocinina. Esses hormônios sintetizados pelas células vegetais transformadas irão gerar um desbalanço hormonal, que tem como conseqüência uma multiplicação descontrolada destas células, assim como das células vizinhas. Essa proliferação desordenada de células transformadas é que vai originar o tumor ou galha (BRASILEIRO, 1993; Gelvin, 2000). No caso da síndrome da raiz em cabeleira, os oncogenes induzirão a produção de raízes no local da inoculação (TEPFER, 1990).

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 servirão como fonte de energia exclusivamente para a agrobactéria parasita. O tipo de opina produzido e secretado pelas células do tumor é determinado pela bactéria indutora do tumor. Deste modo, as cepas de *Agrobacterium* sp. são classificadas de acordo com o tipo de opina presente no tumor, como por exemplo, cepas do tipo octopina, nopalina, agropina (WINNANS, 1992).

O conhecimento das bases moleculares do mecanismo de infecção por *Agrobacterium* abriu novas perspectivas para as pesquisas sobre transferência de genes para plantas, utilizando esta bactéria como vetor natural de transformação. Tal fato só foi possível graças a uma característica intrínseca do mecanismo de transferência genética natural: nenhum dos

genes contidos no T-DNA, exceto as bordas, são necessários ao seu processo de transferência e integração no genoma vegetal (HOOYAAS e SCHILPEROORT, 1992). Assim pôde-se excluir totalmente o T-DNA da agrobactéria, incluindo os genes de síntese de fitohormônios, sem que isso afete o seu processo de transferência. Uma cepa de *Agrobacterium* spp. cujo o T-DNA foi excluído do seu plasmídeo Ti ou Ri é conhecida como uma cepa desarmada, pois ela não é capaz de induzir tumores ou raízes em plantas. O desenvolvimento de vetores baseados no sistema *Agrobacterium* requer então que as bordas direita e esquerda sejam conservadas e que os agentes de síntese de fitohormônios sejam removidos do T-DNA. Desse modo, qualquer seqüência de DNA inserida entre as bordas do T-DNA pode ser transferida e integrada no genoma vegetal, sem afetar a regeneração da célula em uma planta normal. A partir destas observações, dois sistemas de transformação foram desenvolvidos utilizando o plasmídeo Ti desarmado como vetor: o sistema binário e o sistema de cointegrado (JOUANIN *et al.*, 1993).

O sistema binário, desenvolvido por Hoekema e colaboradores em 1983, demonstra que os genes de virulência localizados no plasmídeo Ti ou Ri podem estar em outro plasmídeo ou no cromossoma vegetal, sem que isto influencie o processo de transferência do T-DNA, concluiu-se com isso que estes genes podem agir "in trans". A partir desta informação foram construídos vetores pequenos, chamados binários, que possuem entre as bordas direita e esquerda, não mais os oncogenes e sim genes de interesse a serem transferidos para o genoma vegetal. Tais vetores são capazes de se replicar tanto em *Agrobacterium*, quanto em *Escherichia coli*. Portanto o sistema binário consiste em uma agrobactéria contendo o plasmídeo Ti ou Ri desarmado, e de um vetor binário, contendo somente o gene de interesse entre as bordas do T-DNA. No sistema cointegrado, o gene de interesse é clonado em um vetor de expressão, chamado de vetor intermediário. Este vetor não é capaz de se replicar em *Agrobacterium* sp e é introduzido, por recombinação homóloga obrigatória no T-DNA, tornando-se parte integrante do plasmídeo Ti ou Ri desarmado. A região de virulência funciona então "in cis", ao contrário do que ocorre no sistema binário (BRASILEIRO, 1993).

Existem dois métodos básicos que empregam *Agrobacterium* na transformação vegetal. O primeiro deles e mais antigo, porém ainda muito

empregado, é o cocultivo, no qual as células do explante ferido (folha, caule, raiz, embriões, etc) são infectados pela agrobactéria, resultando na transferência do T-DNA para o genoma vegetal. Os explantes são transferidos para meio de regeneração, que contém além dos fatores necessários para a regeneração de brotos, um antibiótico para eliminar as agrobactérias residuais e um agente de células ou tecidos transformados (Figura 1). Diversos protocolos já foram descritos empregando esta metodologia, porém basicamente são modificações do método descrito por Horsch e colaboradores em 1985 (BRASILEIRO e LACORTE, 2000). O segundo método, restrito por enquanto a plantas de *Arabidopsis thaliana* e *Medicago truncatula*, se baseia na infiltração de bactérias em plantas sem a necessidade de nenhuma etapa em cultura de tecidos. Esta metodologia de transformação de plantas foi descrita, em que células de *A. tumefaciens* são introduzidas a vácuo em plantas de *Arabidopsis thaliana* (BECHTOLD *et al.*, 1993). Tal metodologia se baseia no crescimento de plantas de *A. thaliana* até a etapa de florescimento, em seguida as mesmas são retiradas do solo, levadas ao laboratório onde é aplicada a vácuo a bactéria *A. tumefaciens* em meio crescimento contendo sacarose, posteriormente tais plantas são replantadas. A seleção de sementes supostamente transformadas se dá algumas semanas após semanas da infiltração. Clough e Bent (1998), descreveram um protocolo de transformação adaptado do método de infiltração à vácuo de *Agrobacterium*, onde não mais as plantas eram retiradas do solo e sim as flores/inflorescência eram imersas em uma suspensão de agrobactéria num meio rico em sacarose e detergente e posteriormente mantidas em Fitotron até que produzissem sementes. As sementes eram então selecionadas quanto ao evento de transformação em laboratório de cultura de tecidos.

Transformação Direta

Na transferência direta, destacam-se as seguintes metodologias: transformação de protoplastos com polications, eletroporação de protoplastos ou tecidos intactos e bombardeamento de micropartículas.

✓ Transformação de Protoplastos

A transformação de protoplastos com agentes químicos do tipo polications, como o polietilenoglicol (PEG), polivinil álcool (PVA) ou DEAE-dextran se dá pela passagem passiva do

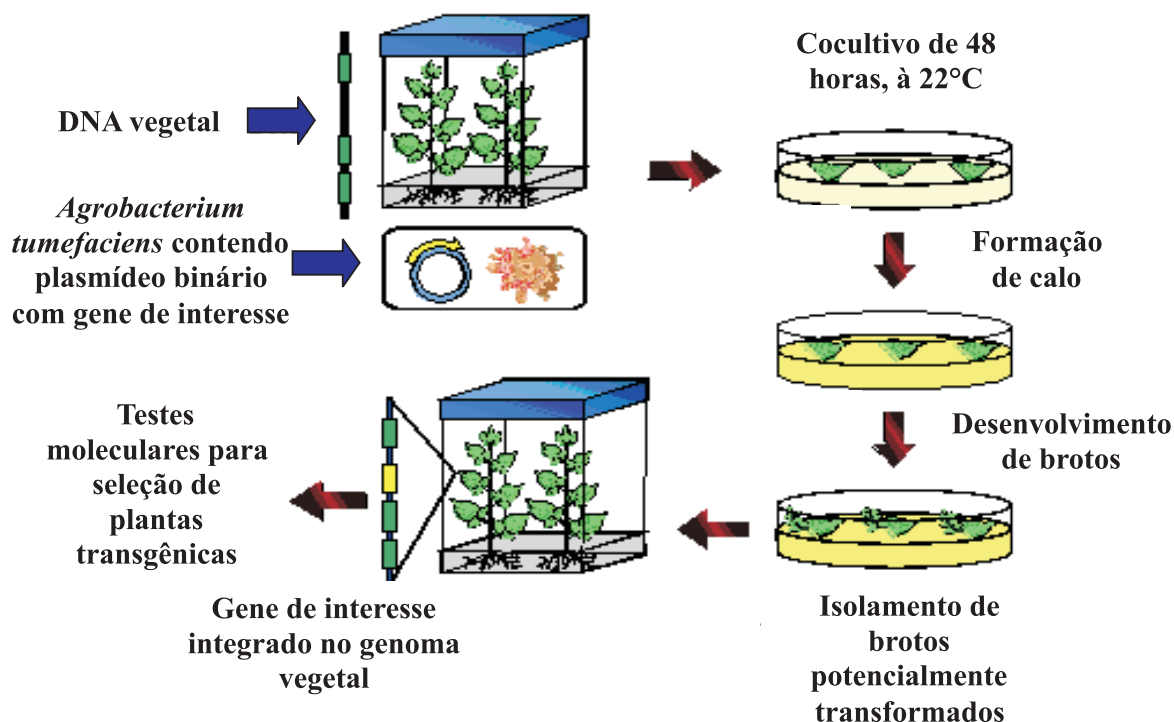


Fig. 1. Esquema do método de transformação por cocultivação com cepa desarmada de *Agrobacterium*.
Fonte: <http://www.cipotato.org/market/belgtech/breakthr.htm>

DNA através da membrana celular para dentro da célula vegetal. Este processo ocorre graças ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática quando em contato com os polícatões, uma vez que as cargas positivas desses agentes químicos interagem tanto com as cargas negativas do DNA quanto da própria membrana, facilitando assim a sua entrada. Várias espécies vegetais já foram transformadas com esta metodologia, porém a eficiência de transformação é muito baixa além de estar limitada ao uso de protoplastos (BRASILEIRO e DUSI, 1999).

✓ Transformação por Eletroporação

A transformação por meio da eletroporação consiste em submeter, uma mistura de DNA e protoplastos ou tecidos vegetais, a um campo elétrico de intensidade controlada, durante um curto período de tempo. O choque elétrico vai provocar a abertura parcial de poros na membrana plasmática, facilitando a entrada dos ácidos nucleicos exógenos para o interior da célula vegetal. A utilização de tecidos intactos

para a eletroporação envolve etapas de pré-tratamento dos tecidos com celulases e/ou pectinases ocasionando digestão parcial da parede celular vegetal, uma barreira física para a entrada do DNA exógeno na célula vegetal (BRASILEIRO e DUSI, 1999).

✓ Transformação por Biobalística

O bombardeamento de micropartículas, também conhecido como biobalística, utiliza microprojéteis de ouro ou tungstênio acelerados a altas velocidades (superiores a 1.500 km/h) para carrear e introduzir ácidos nucleicos e outras moléculas em células e tecidos *in vitro*. As micropartículas aceleradas penetram na parede e membrana celular de maneira não-letal, localizando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Em seguida, o DNA é dissociado das micropartículas pela ação do meio intracelular, ocorrendo o processo de integração do gene exógeno no genoma do organismo a ser modificado (ARAGÃO *et al.*, 1998; LACORTE *et al.*, 1999).



Fig. 2. Equipamento de biobalística utilizado no processo de introdução de genes em células ou tecidos vegetais (ARAGÃO *et al.*, 1998).

Transformação Genética em Algodão

Os transgênicos de algodão são resgatados do cultivo de tecidos de planta de algodão através de duas metodologias: bombardeamento de micropartículas (MCCABE e MARTINELL, 1993) e cocultivo com *Agrobacterium tumefaciens* (FIRROZABADY *et al.*, 1987; UMBECK *et al.*, 1987). Ambas as técnicas produzem plantas transgênicas, com diferentes graus de eficiência. A primeira consiste em introduzir genes provenientes de outros organismos em cultivares elites de algodoeiro, embora a eficiência da transformação seja baixa, como constatou McCabe & Martinell (1993) (uma planta transgênica para 1000 explantes bombardeados). A segunda requer regeneração via embriogênese somática, restrita a poucas cultivares como, por exemplo, a linhagem Coker (TROLINDER e XHIXIAN, 1989; FIRROZADADY e DE BOER, 1993; KOONCE *et al.*, 1996). Portanto, esta metodologia implica na transformação de células ou tecidos de calos regeneráveis da linhagem Coker. As supostas plântulas transgênicas regeneradas, através da embriogênese somática serão retrocruzadas através das técnicas do melhoramento de plantas com outras cultivares para a obtenção das características agronômicas desejadas. A obtenção de plantas transgênicas adultas da linhagem Coker requer 10-14 meses e é necessária uma adição de 6-10 anos de retrocruzamentos para se transferir as características desejáveis dentro das melhores cultivares agronômicas. Além do mais, plantas regeneradas pelo método de calos embriogênicos são, às vezes, estéreis e/ou mostram sinais de variação somaclonal, a qual afetam os fenótipo e genótipo da planta (STELLY *et al.*, 1989; FIRROZABADY e DEBOER, 1993). Atualmente

na China, pesquisadores vêm transformando plantas de algodão fazendo a polinização de tais plantas com pólen transformado por *A. tumefaciens* (DENG *et al.*, 1999). Outros trabalhos relatam ainda a transformação de pólen por biobalística (U.S. Pat. No. 5.100.792; U.S. Pat. No. 5.120.657), microinjeção (U.S. Pat. No. 4.743.548) e eletroporação (U.S. Pat. No. 5.629.183), e posteriormente o seu emprego em ensaios de polinização de plantas.

O conhecimento e o estabelecimento dos protocolos de cultivo de tecidos e de transformação de plantas são necessários e fundamentais para incrementar os programas de melhoramento do algodoeiro.

Referências Bibliográficas

- ARAGÃO, F.J.L.; GIOVANNI, R.V.; RECH, E.L. Feijão transgênico. **Biotecnologia**, v. 5, p. 46-49, 1998.
- AYUB, R.; GUI, M. AMOR, M.B.; GILLOT, L.; ROUSTAN, J.P.; LATCHE, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J.C. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cataloupe melon fruits. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 862-866, 1996.
- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S.P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, v.276, p. 726-733, 1997.
- BECHTOLD, N.; ELLIS, J.; PELLETIER, G. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. **C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences**. v. 316, p. 1194-1199, 1993.
- BRASILEIRO, A.C.M. Biologia de *Agrobacterium* sp. **ABCTP Notícias**, v.20, p. 2-6, 1993.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. Introdução à transformação genética de plantas. In. BRASILERO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C., ed. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. p.13-33.
- BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In. TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., ed. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, 1999. p 679-735.

- BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE, C. *Agrobacterium*: um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biocologia**, v. 15, p. 12-15, 2000.
- CARVALHO, J.M.F.C.; SOUZA, D.M.; SANTOS, J.W. Indução de superbrotamento e regeneração de planta *in vitro* na cultivar de algodão CNPA 7H. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 4, p. 62-65, 2000.
- CHILTON, M.D.; DRUMMOND, M.H.; MERLO, D.J.; SCIAKY, D.; MONTOYA, A.L.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. **Cell**, v. 11, p. 263-271, 1977.
- CHILTON, M.D.; TEPFER, D.A.; PETIT, A.; DAVID, C.; CASSE-DELBART, F.; TEMPÉ, J. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of host plant root cells. **Nature**, v. 295, p. 432-434, 1982.
- CHRISTOU, P. Transformation technology. **Trends Plant Science**, v. 1, p. 423-431, 1996.
- CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 16, p. 735-743, 1998.
- DALE, P.J.; IRWIN, J.A.; SCHEFFLER, J.A. The experimental and commercial release of transgenic crop plants. **Plant Breeding**, v. 111, p. 1-22, 1993.
- DAVIDONIS, G.H.; HAMILTON, R.H. Plant regeneration from callus tissue of (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Science Letters**, v.32, p.89-93, 1983.
- DENG-D.W.; GUO-S.D.; YANG-Z.M. Study on the molecular cytological mechanism of cotton transformation by pollen tube pathway. **Scientia-Agricultura-Sinica**, v. 32(6), p. 113-114, 1999.
- FIROOZABADY, E.; DeBOER, D.L. Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **In Vitro Cell Developmental Biology**, v.29, p.166-173, 1993.
- FIROOZABADY, E.; DeBOER, D.L.; MERLO, D.J.; HALK, E.L.; AMERSON, L.N.; RASHKA, K.E.; MURRAY, E.E. Transformation of cotton (*G. hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v.10, p.105-116, 1987.
- GAWEL, N.J.; ROBACKER, C.D. Somatic embryogenesis in two *Gossypium hirsutum* genotypes on semi-solid versus liquid proliferation media. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.23, p. 201-204, 1990.
- GELVIN, A.B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annual Review of Plant Physiology and Plant molecular Biology**, v. 51, p. 223-256, 2000.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In. TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., ed. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 183-260.
- GYVES, E.M. Técnicas de mejoramiento genético convencionales. In. GYVES, E.M., ed. **Agrobiotecnología**. México: Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V., 1994a. p. 10-17.
- GYVES, E.M. Técnicas de mejoramiento genético no convencionales. In. GYVES, E.M., ed. **Agrobiotecnología**. México: Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V., 1994b. p. 20-45.
- HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese "in vitro". In. TORRES, A.C. & CALDAS, L.S., ed. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCPT/ EMBRAPA-CNPQ, 1990. p. 203-212.
- HEMPHILL, J.K.; MAIER, C.G.A.; CHAPMAN, K.D. Rapid in-vitro plant regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 273-278, 1998.
- HOEKEMA, A.; HIRSCH, P.R.; HOOYKAAS, P.J.J.; SCHILPEROOT, R.A.A. A binary vector strategy based on separation of *vir* and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, v. 303, p. 179-180, 1983.
- HOOYKAAS, P.J.J.; BEIJERBERGEN, A.G. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 157-179, 1994.
- HOOYKAAS, P.J.J.; MOZO, T. *Agrobacterium* molecular genetics. **Plant Molecular Biology Manual**, v. B3, p. 1-9, 1994.
- HOOYKAAS, P.J.J.; SCHILPEROORT, R.A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. **Plant Molecular Biology**, v. 19, p. 15-38, 1992.

HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMANN, N.L.; EICHHOLTZ, D.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, v. 227, p. 1229-1231, 1985.

JOHN, M.E.; STEWART, J. Mc. Genes for jeans: biotechnological advance in cotton. **Tibtech**, v.10, p. 165-170, 1992.

JOUANIN, L.; BRASILEIRO, A.C.M.; LEPLÉ, J.C.; PILATE, G.; CORNU, D. Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. **Annual Science Forest**, v. 50, p. 325-336, 1993.

KOONCE, L.; DEVER, J.; BURNS, T.; TROLINDER, N.L. Progress towards genotype independent transformation. In: DUGGER, P.; RICHTER, D. eds. **National Cotton Council of America**: Nashville: Tenn, 1996. 1173p.

LACORTE, C.; ARAGÃO, F.J.L.; VAINSTEIN, M.H.; RECH, E.L. Biobalística. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., ed. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, 1999. p 761-781.

LINDSEY, K. Genetic manipulation of crop plants. **Journal of Biotechnology**, v.79, p. 1-28, 1992.

McCABE, D.E.; MARTINELL, B.J. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. **Biotechnology**, v.11, p.596-598, 1993.

MOREIRA, J.A.N.; NÓBREGA, M.B.M.; VIEIRA, R.M.. Engenharia genética no algodoeiro. In: BELTRÃO, N.E.M., ed. **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: EMBRAPA Comunicação para transferência de tecnologia, 1999. p. 391-404.
PRICE, H.J.; SMITH, R.H. Somatic embryogenesis in suspension cultures of

Gossypium klotzchianum Andress. **Planta**, v. 145, p. 305-307, 1979.

SIEMENS, J.; SCHIEDER, O. transgenic plants: genetic transformation – recent developments and state of state of the art. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 2, p. 66-75, 1996.

STELLY, D.M.; ALTMAN, D.W.; KOHEL, R. J.; RANGAN, T.S.; COMMISKEY, E. Cytogenetic abnormalities of cotton somaclones from callus cultures. **Genome**, v.32, p. 762-770, 1989.

TACCHINI, P.; WALBOT, V. Transformation of plants. **Nestlé Research News**, p. 19-29, 1986.

TEPFER, D. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. **Physiology Plant**, v. 79, p. 140-146, 1990.

TROLINDER, N.L.; GOODIN, J.R. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Reports**, v.6, p. 231-234, 1987.

TROLINDER, N.L.; XHIXIAN, C. Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton. **Plant Cell Reports**, v.8, p. 133-136, 1989.

UMBECK, P.; JOHNSON, G.; BARTON, K.; SWAIN, W. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. **Biotechnology**, v.5, p.263-266, 1987.

WALKERPEACH, C.R.; VELTEN, J. *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. **Plant Molecular Biology Manual**, v. B1, p. 1-19, 1994.

WINNANS, S.C. Two-way chemical signalling in *Agrobacterium*-plant interactions. **Microbiology Review**, v. 56, p. 12-31, 1992.

**Circular
Técnica, 64**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58107-720 Campina Grande, PB
Fone: (83) 3315 4300 Fax: (83) 3315 4367
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br

1ª Edição

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

Comitê de

Presidente: Alderi Emídio de Araújo
Secretária Executiva: Nivia M.S. Gomes
Membros: Demóstenes M.P. de Azevedo
José Wellington dos Santos
Lúcia Helena Avelino Araújo
Márcia Barreto de Medeiros
Maria Auxiliadora Lemos Barros
Maria José da Silva e Luz

Expedientes: Supervisor Editorial: Nivia M.S. Gomes
Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão
Tratamento das ilustrações: Maria do Socorro A. de Sousa
Editoração Eletrônica: Maria do Socorro A. de Sousa