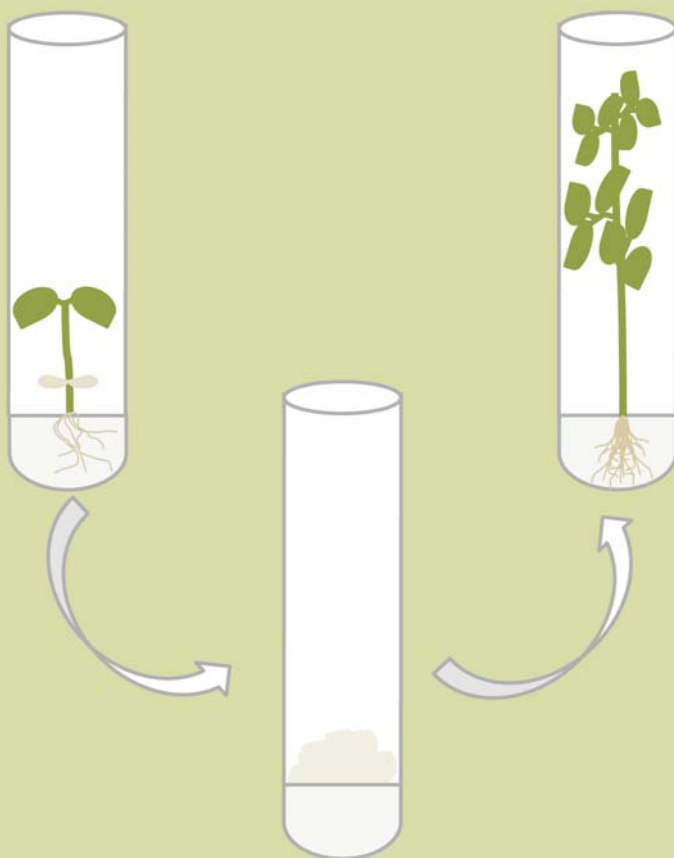


Um panorama sobre regeneração *in vitro* e transformação genética de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 269

Um panorama sobre regeneração *in vitro* e transformação genética de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

*Cleiton de Paula Soares
Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses
Anaíze Borges Henriques
Jean Luiz Simões Araújo
Marcia Soares Vidal*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465, km 7, CEP 23.851-970, Seropédica, RJ

Caixa Postal 74505

Fone: (21) 3441-1500

Fax: (21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Norma Gouvêa Rumjanek

Secretária-Executivo: Carmelita do Espírito Santo

Membros: Bruno José Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Guilherme

Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luis Henrique de Barros Soares

Revisão de texto: uilherme Montandon Chaer, Claudia Pozzi

Jantalia, Orivaldo José Saggin Junior

Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Tratamento de ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

Foto da capa: Marcia Soares Vidal

1ª edição

1ª impressão (2010): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agrobiologia

UM PANORAMA sobre regeneração *in vitro* e transformação genética de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). / Cleiton de Paula Soares et al. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. 28 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 269).

ISSN: 1980-3075

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Melhoramento genético.
I. Soares, Cleiton de Paula. II. Meneses, Carlos H. S. G.
III. Henriques, Anaíze B. IV. Simões-Araújo, Jean Luiz.
V. Vidal, Marcia Soares. VI. Embrapa Agrobiologia VII. Série.
635.652 CDD 23 ed.

Autores

Cleiton de Paula Soares

Mestrando em Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. E-mail: cleitinho_depaula@yahoo.com

Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses

Doutorando em Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. E-mail: chmeneses@gmail.com

Anaíze Borges Henriques

Professora de Botânica, Depto. de Botânica, Instituto de Biologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
E-mail: abh@biologia.ufrj.br

Jean Luiz Simões Araújo

Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Engenheiro Agrônomo, PhD em Genética. BR 465, km 7. Seropédica/RJ. E-mail: jean@cnpab.embrapa.br

Marcia Soares Vidal

Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, Bióloga, DSc. em Genética. BR 465, km 7. Seropédica/RJ.
E-mail: marcia@cnpab.embrapa.br

Apresentação

As atitudes de usar com responsabilidade os recursos naturais (solo, água, ar, flora, fauna, energia), de preservar e conservar a natureza são cada vez mais necessárias para a sociedade moderna acarretando em uma busca constante por sistemas de produção agropecuários apoiados em princípios ecológicos e naturais.

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia construiu o seu atual plano diretor de pesquisa, desenvolvimento e inovação, com a seguinte missão: “gerar conhecimentos e viabilizar tecnologias e inovação apoiados nos processos agrobiológicos, em benefício de uma agricultura sustentável para a sociedade brasileira”.

O documento nº 269/2010 apresenta uma revisão de resultados de pesquisa sobre o uso das técnicas de transformação genética em plantas, com ênfase no cultivo *in vitro* do gênero vegetal *Phaseolus*, que representa os feijões e em particular a espécie *Phaseolus vulgaris* L., conhecida como feijoeiro comum. O feijão, um dos alimentos básicos da alimentação dos brasileiros é produzido em sua maior parte por pequenos agricultores e existe uma continua demanda por novas linhagens e cultivares que incorporem atributos de maior produção, qualidade nutricional e sanidade. A presente publicação é indicada para estudantes e pesquisadores da área de melhoramento genético interessados em obter informações sobre o estado da arte das transformações genéticas e do potencial destas para os programas de melhoramento de feijão.

Eduardo Francia Carneiro Campello
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

Sumário

Introdução	9
Cultura de Tecidos e Regeneração <i>in vitro</i> de Feijão	12
Transformação Genética e Regeneração de Plantas de Feijão	14
Conclusão	20
Referências Bibliográficas	21

Um panorama sobre regeneração *in vitro* e transformação genética de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

Cleiton de Paula Soares

Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses

Anaíze Borges Henriques

Jean Luiz Simões-Araújo

Marcia Soares Vidal

Introdução

Os programas de melhoramento genético vêm buscando, ao longo dos anos, tecnologias que acelerem o desenvolvimento de novas variedades. Entre as ferramentas com potencial para acelerar esse desenvolvimento estão a técnica de cultura *in vitro* e a transformação genética. O estabelecimento de condições apropriadas para o cultivo *in vitro* de espécies pertencentes ao gênero *Phaseolus* pode possibilitar a utilização da transformação genética como ferramenta auxiliar ao melhoramento desta cultura. No entanto, o desenvolvimento de um sistema ideal para o cultivo *in vitro* desse gênero ainda permanece um grande desafio. Neste trabalho serão apresentados alguns resultados alcançados por diversos autores para o cultivo *in vitro*, especificamente de *Phaseolus vulgaris* L., e uma visão geral sobre a transformação genética do feijão comum.

A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) ocupa uma área de 12 milhões de ha e constitui-se na leguminosa mais importante para a alimentação de mais de 500 milhões de pessoas na América Latina e África. O feijoeiro comum é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus*. Considerando todos os gêneros e espécies de feijão englobados nas estatísticas da FAO publicadas em 2005, a produção mundial de feijão

situou-se em torno de 18,7 milhões de toneladas, ocupando uma área de 26,9 milhões de ha (EMBRAPA, 2009).

O feijão é um alimento básico para a população brasileira, constituindo-se em sua principal fonte de proteína vegetal. O teor de proteína das sementes varia de 20 a 33%, sendo também um alimento energético, contendo cerca de 340 cal/100g (FAO, 2007). No Brasil, o feijão é produzido basicamente por pequenos produtores. Aproximadamente 80% da produção e da área cultivada encontram-se em propriedades menores que 100 ha. Os diversos tipos de feijão são cultivados desde o nível do mar até mais de três mil metros de altitude, sendo empregados pouco ou nenhum tipo de fertilizante, pesticida e irrigação (SCHOONHOVEN e VOYSEST, 1991).

O melhoramento genético de feijão tem como finalidade principal desenvolver germoplasmas com variabilidade genética, gerando populações e linhagens com características de interesse agrônomo visando desenvolver cultivares mais produtivas e adaptadas às diferentes regiões produtoras, permitindo assim manter a competitividade e sustentabilidade do feijoeiro no agronegócio brasileiro.

Em face da crescente demanda por novas cultivares, os programas de melhoramento genético têm buscado tecnologias que acelerem o desenvolvimento de novas cultivares ou que possibilitem corrigir alterações genotípicas indesejáveis das que estão em uso. Entre as ferramentas com potencial para acelerar este processo estão as técnicas de cultivo *in vitro* e de transformação genética.

O desenvolvimento de técnicas de cultivo *in vitro* de órgãos, tecidos e células e o desenvolvimento de protocolos de transferência de genes entre espécies incompatíveis sexualmente, tornou possível ao melhorista obter matrizes com qualidade genética e sanitária comprovada, além de acelerar as etapas de melhoramento genético de algumas culturas (CAPLAN et al., 1983); no entanto, para o uso prático da micropropagação se faz necessário o aperfeiçoamento das condições de cultura para cada espécie

e/ou variedade (ROGALSKI, GUERRA, SILVA, 2003). A técnica de micropropagação consiste na produção rápida de milhares de clones de uma planta, a partir de uma única célula vegetal somática ou de um pequeno pedaço de tecido vegetal (HARTMAN e KESTER, 1975).

A capacidade de fazer com que células de plantas formem órgãos, até plantas inteiras, é uma importante ferramenta no melhoramento de qualquer espécie, permitindo o acesso a técnicas como mutagênese *in vitro*, seleção *in vitro*, utilização de variantes somaclonais, rápida micropropagação e em especial a transformação genética (GAMBORG e PHLLIPS, 1995).

Apesar do desenvolvimento de processos para transformação de diversas culturas, muitos obstáculos precisam ainda ser vencidos para aplicabilidade dessa tecnologia (DAMM et al., 1989; COOLEY et al., 1995). Os primeiros esforços para produzir plantas de feijão transgênicas não foram bem sucedidos devido a inexistência de sistemas eficientes de transferência de DNA e de regeneração de plantas de feijão. As dificuldades vão desde a introdução do gene à regeneração das plantas, passando por problemas como a falta de reprodutibilidade e aplicabilidade a todas as variedades e a baixa eficiência de transformação (NAGL et al., 1997).

A transformação genética com a introdução de genes adequados pode auxiliar na solução de problemas relacionados à suscetibilidade da cultura a pragas, doenças, deficiências nutricionais e estresses ambientais (ARAGÃO et al., 1998; GOOSSENS et al., 1999; MANFREDINI et al., 2005).

Devido à importância da cultura do feijão, vários grupos de pesquisa de diversos países vêm trabalhando com a cultura de tecidos nos últimos anos; no entanto, os resultados são pouco satisfatórios (GUIDOLIN, 2003). Alguns trabalhos relatam sucesso na regeneração de plantas de feijão, porém os métodos descritos são restritos a poucos genótipos e apresentam baixa capacidade de promover a regeneração das plantas, dificultando,

dessa forma, a aplicação dos mesmos em um programa de melhoramento que utilize a engenharia genética (NAGL et al., 1997).

Cultura de Tecidos e Regeneração *in vitro* de Feijão

A cultura de tecidos em *Phaseolus vulgaris* L. desenvolveu-se a partir da cultura de meristemas (KARTHA et al., 1981) seguida pelas técnicas de regeneração de brotos axilares de ápices (SAAMM et al., 1987) e nós cotiledonares (MALIKA e SAXENA, 1992), de brotos de pecíolos de folhas (MALIKA e SAXENA, 1991), de explantes cotiledonares e cultura de eixos embrionários (MOHAMED et al., 1992b), organogênese direta a partir de nós de plântulas com ou sem a presença de meristemas axilares (MCCLEAN e GRAFTON, 1989; MOHAMED et al., 1992a) e com o emprego de camadas finas transversais ("transverse thin cell layer" - tTCL) utilizadas na regeneração direta de plantas de *P. vulgaris* variedade carioca (CRUZ DE CARVALHO et al., 2000).

Um dos principais problemas encontrados na regeneração de plantas de feijão é o estabelecimento de um protocolo que permita a utilização da técnica de cultura de tecidos em larga escala. Nos últimos anos, vários trabalhos vêm sendo realizados testando diferentes combinações de hormônios, explantes e meio de cultura na tentativa de se obter suspensões celulares e calos de *P. vulgaris* (BARROS et al., 1997; CARDENAS-AVILA et al., 2000); no entanto, a produção de brotos a partir de calos se restringe a alguns trabalhos (CROCOMO et al., 1976; MOHAMED et al., 1993; ZAMBRE et al., 1998; AHMED et al., 2002; GUIDOLIN, 2003; DELGADO-SÁNCHEZ et al., 2006).

A cultura de meristemas é uma ferramenta útil para a propagação em massa, eliminação de agentes virais e para a conservação do germoplasma (KARTHA, 1982). Um dos primeiros trabalhos abordando esse tema foi o de Crocomo et al. (1976), que regeneraram duas plantas de cultura de calos empregando meio de cultura suplementado com reguladores de crescimento e um extrato aquoso de semente de feijão.

Mohamed et al. (1993) regeneraram plantas a partir de calos primários induzidos a partir de pedicelos dos genótipos Xan159 e Gn Tara de feijão comum. Já Zambre et al. (1998), regeneraram plantas a partir de calos induzidos na região de ligação do cotilédone com o eixo embrionário.

Ahmed et al. (2002), trabalhando com sementes de *P. vulgaris* cv. Fônix e Maxidor observaram a resposta dos explantes, no caso, plântulas intactas e nós cotiledonares, aos tratamentos contendo meio MS (Murashige e Skogg, 1962) + 1 mg.l⁻¹ de benziladenina (BA) e 0,1 mg.l⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA). A partir dessa estratégia, avaliaram o desenvolvimento e o aspecto dos aglomerados de brotos formados a partir dos diferentes explantes e meios de cultura. Malik e Saxena (1991) observaram que explantes, que consistiam em pecíolo e uma porção do limbo, produziam brotos quando cultivados na presença de BAP. Embora a regeneração ocorresse apenas a partir de tecido peciolar, a presença de uma porção do limbo foi considerada essencial para a formação de brotos. Esta constatação levou Ahmed et al. (2002) a investigarem o papel das partes morfológicas da planta doadora na formação dos brotos. Assim, as plântulas intactas foram mantidas em parte deste experimento e os nós cotiledonares foram cultivados sobre os meios de regeneração contendo BA e ANA. A eficiência de formação de brotos de plântulas intactas foi comparada com o de nós cotiledonares. O percentual de regeneração de plântulas intactas e nós cotiledonares foi de 100%. O número de gemas e brotos produzidos por explantes oriundos de plântulas intactas foi significativamente mais elevado do que a partir dos nós cotiledonares. Os resultados são similares aos obtidos por Malik e Saxena (1992).

Delgado-Sánchez et al. (2006), trabalharam no desenvolvimento de um sistema de regeneração organogênica de feijão empregando eixo embrionário de duas cultivares distintas, Flor de Junio Marcela (FJM) e Flor de Mayo Anita (FMA). O eixo embrionário foi excisado de sementes desinfestadas e estabelecidas em meio MS contendo diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) e adenina (A), que corresponderam a 0,0; 0,1; 5,0; 10,0 mg.l⁻¹ e 0,0; 20,0 e 40,0 mg.l⁻¹,

respectivamente, compondo 12 tratamentos. Cada tratamento consistiu de 3 repetições contendo 10 embriões por placa de Petri, tendo sido observado que aos 18 dias após a incubação houve a formação de aglomerados de brotos na cultivar FJM, sendo que estes foram formados na região internodal (60 a 90% dos casos) e no meristema apical (10 a 40% dos casos). Já para a cultivar FMA a formação destes aglomerados de brotos foi observada aos 13 dias após a incubação nas estruturas meristemáticas. Não houve formação de brotos organogênicos nas variedades nos tratamentos contendo 0 e 0,1 mg.l⁻¹ BAP após 30 dias em meio de cultura, independentemente da concentração de adenina empregada. A formação de brotos organogênicos variou com a concentração de BAP empregada de 5 ou 10 mg.l⁻¹. De cada 10 eixos embrionários da cultivar FJM, foi observada a formação de 6,5 a 9,0 brotos; enquanto que apenas um broto foi formado a partir de cada 10 eixos embrionários da cultivar FMA. Delgado-Sánchez et al. (2006) concluíram que a regeneração eficiente foi alcançada quando 5 ou 10 mg.l⁻¹ de BAP foi adicionado ao meio, independentemente da concentração de adenina, induzindo a formação de células diferenciadas como aglomerados de brotos. O protocolo descrito demonstrou ainda uma alta eficiência de regeneração das plantas de feijão, sendo um método consistente e de alta reprodutibilidade.

Transformação Genética e Regeneração de Plantas de Feijão

A transformação genética de vegetais permite a introdução de genes específicos no genoma de cultivares comerciais. Essa ferramenta nos permite compreender a função e regulação dos genes das plantas, ou realizar a transferência dirigida de genes de interesse agrônomico em programas de melhoramento, os quais seriam impossíveis de ocorrer através de cruzamentos sexuais ou fusão de genomas (DRAPER et al., 1988).

Os requisitos essenciais em um sistema de transferência de genes para produção de plantas transgênicas são: (a) a disponibilidade de um tecido-

alvo, incluindo células competentes para a regeneração de plantas, (b) um método para transferir o DNA para essas células regeneráveis, e (c) um procedimento para selecionar e regenerar plantas transformadas com uma frequência satisfatória (POTRIKUS, 1991).

A transformação genética de vegetais superiores tem passado por avanços consideráveis nas últimas duas décadas, tanto com relação à descrição de métodos de regeneração para inúmeras espécies vegetais, quanto à otimização de metodologias de transformação propriamente dita.

Atualmente, os métodos mais empregados são: o processo biobalístico, introdução de genes mediada por *Agrobacterium* e a eletroporação de protoplastos e tecidos (BIRCH, 1997).

Como já mencionado, um dos pontos de estrangulamento para obtenção de uma planta geneticamente modificada reside muitas vezes na inexistência de um processo eficiente para regeneração de plantas a partir das células transformadas. Este fato não é diferente quando se pensa em leguminosas. Diante dessa premissa, vários grupos têm centrado seus esforços neste ponto, tendo sido relatado por vários deles um sucesso quando culturas de células meristemáticas são empregadas como fonte de células totipotentes em uma variedade de métodos de transformação (CHRISTOU, 1997).

Um dos métodos que emergiu como sendo promissor para a obtenção de leguminosas geneticamente modificadas, por ser rápido e relativamente eficiente na transformação de uma série de leguminosas, encontra-se fundamentado na infecção por bactérias do gênero *Agrobacterium*, no caso, *A. tumefaciens* ou *A. rhizogenes*, utilizando como explantes tanto nós cotiledonares, como tecidos meristemáticos (LARKIN et al., 1996; TRIEU e HARRISON, 1996; OGER et al., 1996; SHARMA e ANJIAH, 2000; OLHOFT et al., 2001; OLHOFT e SOMERS, 2001). Contudo, um outro número de espécies de leguminosas também já foram transformadas através de métodos de transferência direta de DNA, incluindo microinjeção, eletroporação, e biobalística (CHRISTOU, 1997; ATKINS e SMITH, 1997; BABAOGU et al., 2000; ARAGÃO et al., 2000b; ARAGÃO et al., 2002; SOMERS et al., 2003; RECH et al., 2008). Como exemplo da última técnica

citada, Aragão et al. (1996) desenvolveram um processo de obtenção de plantas transgênicas de feijão, onde o meristema apical é bombardeado com micropartículas cobertas com o DNA. Em seguida, brotos transgênicos são regenerados a partir das células transformadas, sendo posteriormente transferidos para o solo, onde a nova planta modificada geneticamente gera sementes transgênicas. No entanto, os sistemas já conhecidos de obtenção de plantas transgênicas de leguminosas baseados na transformação de células merismáticas da região apical utilizando o processo de biobalística apresentam como desvantagens a impossibilidade de seleção das células transformadas e a baixa produção de plantas transgênicas (ARAGÃO et al., 2000a).

No processo de biobalística, 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 líquido celular, ocorrendo o processo de integração do gene exógeno no genoma do organismo a ser modificado. Uma das vantagens do sistema de transformação através do processo de biobalística é que este permite a introdução e expressão gênica em qualquer tipo celular. Foi surpreendentemente verificado que um processo de biobalística para a transformação de plantas leguminosas através da introdução de DNA exógeno em sua região merismática apical possibilita a regeneração e produção de plantas transgênicas com uma frequência de produção da ordem de 1% enquanto que, até então, pelos processos conhecidos esse índice era da ordem de 0,03% a 0,07% (ARAGÃO et al., 2000a).

A obtenção de plantas de *Phaseolus vulgaris* transformadas geneticamente via *Agrobacterium* ainda é muito difícil, principalmente pela falta de reprodutibilidade e baixa eficiência das metodologias de regeneração de plantas a partir de calos. Alguns autores sugerem que a falta de reprodutibilidade da metodologia poderia ser solucionada utilizando-se explantes produzidos a partir de sementes maduras germinadas *in vitro*. Estes explantes seriam confiáveis e produziriam calos com maior confiabilidade e eficiência (ZAMBRE et al., 1998; MOHAMED et al.,

1993b). Segundo Zhang et al. (1997) os principais fatores limitantes da transformação genética de feijão englobam: genótipo, idade, tipo e origem do explante primário, pré-condições de cultivo, estirpes de *Agrobacterium*, condições de co-cultivos, sistema de seleção, as condições para a regeneração e os métodos de identificação e análises quantitativas de material transgênico.

A regeneração de plantas a partir de calos pode levar ao surgimento de variação somaclonal propiciando o surgimento de variantes úteis, uma vez que se utiliza da totipotência de algumas células e/ou explantes. Este método pode aumentar a variabilidade genética disponível para o melhorista, além de permitir a seleção *in vitro*, estudos fisiológicos, obtenção de produtos secundários e a transformação genética via *Agrobacterium*, sendo utilizado neste caso como explante, um calo previamente gerado *in vitro* por meio de balanço de fitohormônios (GAMBORG e PHILLIPS, 1995).

A primeira publicação de uma transferência de genes via *Agrobacterium* para *P. vulgaris* bem sucedida foi relatada por Mariotti et al. (1989); contudo, o protocolo quando aplicado por outros grupos de pesquisas não foi aprovado como eficiente. Possivelmente, um genótipo em particular ou estágio fisiológico do explante venha desempenhar um papel crucial neste sistema (VELTCHEVA et al., 2005).

Guidolin (2003), em estudos visando à transformação de *P. vulgaris* via *Agrobacterium* estabeleceu um sistema eficiente e reprodutível de regeneração de plantas a partir de calos induzidos na região de inserção do cotilédone com o eixo embrionário. Este utilizou meio basal composto dos sais MS (1962) e das vitaminas B5. Na indução, desenvolvimento e proliferação do calo utilizou-se a citocinina forchlorfenuron (CPPU) em combinação com o ácido indolacético (AIA). Os explantes utilizados foram os cotilédones de sementes (linhagem Xan 159, CIAT), germinadas *in vitro* (5 µM de BAP). Na fase de indução de calo os explantes permaneceram em meio de cultura (2,5 µM de CPPU e 2,5 µM de AIA) por 21 dias, sendo os primeiros 7 dias no escuro. Após a indução, parte dos cotilédones

(aproximadamente 4 mm, da região de contato com o eixo embrionário) foram transferidas para o meio de desenvolvimento e proliferação do calo (0,25 μM de CPPU e 0,125 μM de AIA), com repicagens a cada 30 dias. A indução de brotos foi obtida com o aumento do tempo de permanência do calo no meio de proliferação para 50 dias, na última etapa de repicagem e transferindo-se para meio de indução de brotos (10 μM de BAP e 10 μM de nitrato de prata) por mais 30 dias. Os calos foram transferidos para meio de desenvolvimento de brotos (10 μM de BAP, 3 μM GA3 (Ácido giberélico) e 10 μM de nitrato de prata) até atingirem aproximadamente 2 cm. No enraizamento dos brotos utilizou-se o ácido naftalenoacético (2 μM) por 30 dias. Os explantes enraizados foram transferidos para vasos e aclimatados em casa de vegetação. As plantas regeneradas produziram sementes férteis, não apresentando diferenças visuais em relação às plantas originais.

No mesmo trabalho, Guidolin (2003) avaliou a virulência de algumas linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* [GV3101 (pBECKS20004), EHA105 (pBECKS20004), LBA4404 (pBECKS20004), GV2260 (pBECKS20004) e LBA4404 (pTOK233)], o efeito dos tempos de duração da sonicação (0, 30, 60, 90, 120 e 180 s), a tolerância a várias concentrações de glufosinato de amônio (GA) (0; 0,01; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 mg.l^{-1}) e o efeito de antibióticos (utilizados para controle da *Agrobacterium*) em calos organogênicos de feijão da linhagem Xan 159 (CIAT). Os resultados demonstraram a suscetibilidade do feijão a *Agrobacterium* e a importância da combinação de linhagens e plasmídeos supervirulentos, como a LBA4404 (pTOK233), na transformação genética do feijão. Essa linhagem foi a que apresentou a maior expressão transitória da β -glucuronidase. O tempo de sonicação de calos de feijão de 60 segundos produziu o melhor resultado, observado pelo aumento significativo da expressão transitória da β -glucuronidase. Os calos de feijão cultivados por 30 dias em presença de GA, mostraram suscetibilidade ao mesmo nas concentrações de 0,1 mg.l^{-1} (20% de calos mortos) e 0,2 mg.l^{-1} (80% dos calos mortos). Com 0,4 mg.l^{-1} de GA todos os calos morreram antes dos 30 dias de cultivo. Dentre os antibióticos utilizados para o controle da *Agrobacterium* após o co-cultivo, a cefotaxima foi o único que não interferiu no crescimento dos calos.

Estrada-Navarrete et al. (2007) descreveram um protocolo de transformação de raiz para diferentes cultivares e variedades de *P. vulgaris* utilizando *Agrobacterium rhizogenes* K599. A partir de cepas de *A. rhizogenes* K599 contendo a construção p35SGFPGUS, caracterizada por possuir um promotor 35S com dois genes repórter - o gene gus, que codifica a enzima β -glucuronidase, fusionado a uma catalase, seguido pelo gene gfp, que codifica a proteína verde fluorescente, mais conhecida por GFP (abreviatura do inglês green fluorescent protein) - foram introduzidas em plântulas de *Phaseolus* spp através da infecção do nó cotiledonar. Para avaliar a capacidade de transferência de genes, a expressão da enzima β -glucuronidase e da proteína GFP foram monitoradas nos pêlos radiculares. A frequência de co-transformação obtida através deste procedimento foi elevada (75-90%), com as raízes transgênicas apresentando crescimento rápido, robusto, e passíveis de serem noduladas pela inoculação com rizóbio.

Colpaert et al. (2008) também adotaram a estratégia de transformação de plântulas de feijão com *A. rhizogenes* K599 utilizando dois marcadores visíveis, GFP e GUS; entretanto, antes da etapa de transformação das plântulas os cotilédones foram removidos e as raízes formadas empregadas no processo de infecção via *Agrobacterium*. Baseado na análise da expressão de GFP e GUS foi estimado que cerca de 75% das raízes foram co-transformadas.

Os protocolos descritos anteriormente tratam de investigações *in vitro*, que tornam possível selecionar e trabalhar com raízes transformadas de *P. vulgaris*, uma vez que esta espécie, assim como outras leguminosas, tem se mostrado recalcitrante. Espécies recalcitrantes eram conhecidas como grupos vegetais em que o processo de transformação genética é extremamente difícil; contudo, este termo vem caindo em desuso, uma vez que à medida que o tempo passa e os estudos relacionados aos processos de transformação avançam, uma espécie após outra pertencente a este grupo se junta à lista de plantas com disponibilidade de sistemas de transformação de confiança.

Conclusão

Apesar do histórico de dificuldades para obtenção de sistemas eficientes de regeneração *in vitro* de feijão, observa-se que houve uma significativa evolução no desenvolvimento de protocolos; no entanto, a eficiência de transformação e regeneração de plantas de feijão ainda é dependente de vários fatores, como a relação entre a concentração de reguladores vegetais de crescimento e o genótipo da planta e, principalmente, a grande quantidade de cultivares de feijão existente em todo mundo.

O método de regeneração de plantas pela organogênese indireta demonstrou ser consistente e com boa reprodutibilidade, bastando apenas alguns testes para possíveis ajustes, podendo ser utilizado em futuros experimentos de transformação genética do feijão via *Agrobacterium tumefaciens*.

A partir dos estudos aqui relatados, pôde-se verificar que diversas espécies do gênero *Phaseolus*, em especial a *P. vulgaris*, foram regeneradas e transformadas geneticamente com limitado sucesso.

Referências Bibliográficas

ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; MORA-AVILÉS, A. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, v. 170, p. 822-827, 2006.

AHMED, E. E.; BISZTRAY, G. Y. D.; VELICH, I. Plant regeneration from seedling explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Acta Biologica Szegediensis**, v. 46, n. 3-4, p. 27-28, 2002.

ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; BRAILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 142-150, 1996.

ARAGÃO, F. J. L.; RIBEIRO, S. G.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; MAXWELL, D. P.; RECH, E. L.; FARIA, J. C. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. **Molecular Breeding**, v. 4, p. 491-499, 1998.

ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants at high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 1-6, 2000.

ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R., ALBINO, M. M. C.; RECH, E. L. Transgenic dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. **Crop Science**, v. 42, p. 1298-1302, 2002.

ATKINS, C.A.; SMITH, P. M. C. Genetic transformation and regeneration of legumes. In: LEGOCKI, A.; BOTHE, H.; PUHLER, A. (Ed.). **Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture**. Berlin: Springer, 1997. 328 p.

BABAĞLU, M.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Genetic engineering of grain legumes: key transformation events. **AgBiotech**, v. 2, June, 2000. Disponível em: <<http://www.biyoteknoloji.gen.tr/yayinlar/Agbiotechgrain/leggenengrevwMBetal2000.pdf>>. Acesso em 12. Ago. 2009.

BARROS, L. M. G.; GAMA, M. I. C. S.; GONCALVES, C. H. R. D.; BARRETO, C. C.; SANTANA, E. F.; CARNEIRO, V. T. D. Cultura de tecidos de feijoeiro visando à introdução de genes exógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 267-275, 1997.

BIRCH, R. G. Plant Transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 297-326, 1997.

CHRISTOU, P. Biotechnology applied to grain legumes. **Field Crops Research**, v. 53, p. 83-97, 1997.

CAPLAN, A.; HERRERA-ESTRELLA, L.; INZE, D.; VAN HAUTE, E.; VAN MONTAGU, M.; SHELL, J.; ZAMBRYSKI, P. Introduction of genetic material into plant cells. **Science**, v. 222, n. 4625, p. 815-821, 1983.

CARDENAS-AVILA, M. L.; VERDE-STAR, M. J.; FROUGHBAKHCH, R.; GAMEZ-GONZALEZ, H.; LOZANO-MARTINEZ, S. J.; NUNEZ-GONZALEZ, M. A.; HERNANDEZ-PINERO, J. L. Variability of *in vitro* callus induction in four bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Phyton**, v. 69, p. 61-64, 2000.

COOLEY, J.; FORD, T.; CHRISTOU, P. Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric discharge particle acceleration. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, p. 97-104, 1995.

COLPAERT, N.; TILLEMANN, S.; MONTAGU, M. C.; GHEYSEN, G.; TERRY, N. Composite *Phaseolus vulgaris* plants with transgenic roots as research tool. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 404-408, 2008.

CROCOMO, O. J.; PETERS, J. E.; SHARP, W. R. Interactions of phytohormones on the control of growth and root morphogenesis in cultured *Phaseolus vulgaris* leaf explants. **Turrialba**, v. 26, p.232-236, 1976.

CRUZ DE CARVALHO, M.; VAN LE, B.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM THI, A. T.; THANH, K. T. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell layer culture and silver nitrate. **Plant Science**, v. 159, p. 223-232, 2000.

DAMM, B.; SCHMIDT, R.; WILLMITZER, L. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplasts. **Molecular and General Genetics**, v. 217, n. 1, p. 6-12, 1989.

DRAPER, J.; SCOT, R.; ARMITAGE, P.; WALDEN, R. (Ed.) **Plant Genetic Transformation and Gene Expression: a laboratory manual**. Oxford: Blackwell, 1988.

DELGADO-SANCHEZ, P.; SAUCEDO-RUIZ, M.; GUZMÁN-MALDONADO, S. H.; VILLORDO-PINEDA, E.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.; FRAIRE-VELÁSQUEZ, S.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; MORA-AVILÉS, A. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, v. 170, p. 822-827, 2006.

COBUCCI, T.; BIAVA, M. (Ed.). **Cultivo do feijão irrigado na Região Noroeste de Minas Gerais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão; Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2005. (Embrapa Arroz e Feijão. Sistema de Produção, 5). Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>, acesso 12. nov. 2009.

ESTRADA-NAVARRETE, G.; ALVARADO-AFFANTRANGER, X.; OLIVARES, J.; GUILLÈN, G.; DÌAZ-CAMINO, C.; CAMPOS, F.; QUINTO, C.; GRESSHOFF, P.; SANCHEZ, F. Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1819-1824, 2007.

FAO. **World Agricultural Information Centre: Statistics**. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso 12 ago. 2008.

GAMBORG, O. L.; PHILLIPS, G. C. **Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods**. Berlin: Springer-Verlang, 1995. 358 p.

GOOSSENS, A.; DILLEN, W.; DE CLERCQ, J.; VAN MONTAGU, M.; ANGENON, G. The arcelin-5 gene of *Phaseolus vulgaris* directs high seed-specific expression in transgenic *Phaseolus acutifolius* and *Arabidopsis* plants. **Plant Physiology**, v. 120, n. 4, p. 1095-104, 1999.

GUIDOLIN, A. F. **Regeneração de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via *Agrobacterium***. Tese (Doutorado em Energia Nuclear) - Universidade de São Paulo, Piracicaba. 133 f. 2003.

HARTMANN, H. T.; KESTER'S, D. E. **Plant Propagation: Principles and Practices**, Ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 662 p. 1975.

KARTHA, K. K. **Gene pool conservation through tissue culture.** In: TISSUE culture of economically important. Singapore: Asian Network for Biological Sciences, 1982 p. 213-218.

LARKIN, P. J.; GIBSON, J. M.; MATHESIUS, U.; WEINMAN, J. J.; GARTNER, E.; HALL, E.; TANNER, G. J.; ROLFE, B. G.; DJORDJEVIC, M. A. Transgenic white clover. Studies with the auxin-responsive promoter, GH3, in root gravitropism and lateral root development. **Transgenic Research**, v. 5, p. 325-335, 1996.

MALIK, K. A.; SAXENA, P. K. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: promotive role of N6-benzylaminopurine in cultures from juvenile leaves. **Planta**, v. 184, n. 1, p. 148-150, 1991.

MALIK, K. A.; SAXENA, P. K. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: high-frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6-benzylaminopurine and thidiazuron. **Planta**, v. 186, p. 384-389, 1992.

MANFREDINI, C.; SICILIA, F.; FERRARI, S.; PONTIGGIA, D.; SALVI, G.; CAPRARI, C.; LORITO, M.; DE LORENZO, G. Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus vulgaris* inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 67, n. 2, p. 108-115, 2005.

MARIOTTI, D.; FONTANA, G. S.; SANTINI, L. Genetic transformation of grain legumes: *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus coccineus* L. **Journal of Genetics and Breeding**, v. 43, p. 77-82, 1989.

MOHAMED, F. M.; READ, P. E.; COYNE, D. P. Dark Preconditioning, CPPU, and Thidiazuron Promote Shoot Organogenesis on Seedling Node Explants of Common and Faba Beans. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 117, p. 668-672, 1992a.

MOHAMED, F. M.; READ, P. E.; COYNE, D. P. Plant-regeneration from *in vitro* culture of embryonic axis explants in common and tepary beans. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 117, p. 332-336, 1992b.

MOHAMED, F. M.; COYNE, D. P.; READ, P. E. Enhanced differentiation of somatic embryoids in callus cultures of common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 36, p. 16-17, 1993.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAGL, W.; IGNACIMUTHU, S.; BECKER, J. Genetic engineering and regeneration of *Phaseolus* and *Vigna*. State of the art and new attempts. **Journal of Plant Physiology**, v. 150, p. 625-644, 1997.

OLHOFT, P. M.; SOMERS, D. A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 706-711, 2001.

OLHOFT, P. M.; LIN, K.; GALBRAITH, J.; NIELSEN, N. C.; SOMERS, D. A. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 731-737, 2001.

OGER, P.; PETIT, A.; DESSAUX, Y. A simple technique for direct transformation and regeneration of the diploid legume species *Lotus japonicus*. **Plant Science**, v. 116, p. 159-168, 1996.

POTRIKUS, I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 205-225, 1991.

RECH, E. L.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature Protocols**, v. 3, p. 410- 418, 2008.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira 'Santa Rosa': efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p.365-367, 2003.

SCHOONHOVEN, A. V.; VOYSEST, O. **Common beans: research for crop improvement**. Cali: CIAT; CAB International, 1991. 980 p.

SHARMA, K. K.; ANJALIAH, V. An efficient method for the production of transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation. **Plant Science**, v. 159, p. 7-19, 2000.

SOMERS, D. A.; SAMAC, D. A.; OLHOFT, P. M. Recent advances in legume transformation. **Plant Physiology**, v. 131, n. 3, p. 892-899, 2003.

TRIEU, A. T.; HARRISON, M. J. Rapid transformation of *Medicago truncatula*: regeneration via shoot organogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 6-11, 1996.

VELTCHEVA, M.; SVETLEVA D.; PETKOVA, S. P.; PERL, A. *In vitro* regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): problems and progress. **Plant Science**, v. 107, p. 2-10, 2005.

ZAMBRE, M. A.; CLERCQ, J. D.; VRANOVA, E.; VAN MONTAGU, M.; ANGENON, G.; DILLEN, W. Plant regeneration from embryo-derived callus in *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) and *P. acutifolius* A. Gray (teparty bean). **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 626-630, 1998.

ZHANG, Z.; COYNE, D. P.; MITRA, A. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 122, p. 300-305, 1997.



Agrobiologia

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**