

MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS

Ana Lúcia Soares da Silva Ribeiro Martins, Pâmela Kalyenna Duarte

RESUMO

A tecnologia de transferência de genes tem criado novas alternativas para a produção de plantas com adaptações ao ambiente de cultivo com maior capacidade de produção. Os métodos utilizados na produção de plantas geneticamente modificadas podem ser classificados como indiretos e diretos. O método indireto requer a utilização de um vetor biológico para a introdução do DNA na planta. Os vetores mais utilizados são a *Agrobacterium tumefaciens* com capacidade de transferir parte de seu DNA para o genoma da planta. A transferência de genes mediada por *Agrobacterium* tem sido bastante empregada. Os métodos diretos são aqueles que provocam modificações nas paredes e membranas celulares para a introdução de DNA exógeno, através de processos físicos ou químicos, os mais eficientes são a eletroporação de protoplastos e biobalística. As plantas transgênicas tem sido produzidas nas principais espécies cultivadas e levadas ao mercado consumidor, expressando o aumento da qualidade nutricional ou resistência a herbicidas, insetos ou fungos.

Palavras chave: *Agrobacterium tumefaciens*, genoma, DNA, biobalística.

INTRODUÇÃO

A biotecnologia vegetal consiste na aplicação de um conjunto de técnicas para manipular o potencial genético das plantas, originou-se no final da década de 1850 com trabalhos dos fisiologistas vegetais alemães Julius Von Sachs e W. Knop (RAVEN, 1999).

Os métodos da biotecnologia permitem não somente reduzir o tempo da obtenção de variedades com novas características, mas também transmitir propriedades de espécies que, normalmente são sexualmente incompatíveis. Em outras palavras, as barreiras naturais entre as espécies podem ser superadas, o que oferece um enriquecimento de variedades realmente novas em forma de plantas transgênicas. Além disso, é possível, com os métodos da biologia molecular moderna, isolar e manipular genes específicos, o que não acontece no melhoramento clássico, onde o melhorista é obrigado a trabalhar com genomas inteiros (BARROS e MOREIRA, 2001).

Segundo Borém (2001) a biotecnologia é o desenvolvimento de processos biológicos, utilizando –se a técnica de DNA recombinante, a cultura de tecidos e outros. Pode-se ser também o uso industrial de processos de fermentação de leveduras para a produção de álcool ou cultura de tecidos para a extração de produtos secundários. E ainda um processo tecnológico que permite a

utilização de material biológico para fins industriais.

Para a melhoria da qualidade dos alimentos, quanto aos níveis nutricionais, para homens e animais domésticos e a criação de variedades tolerantes a deficiência de nutrientes e ao stress do ambiente, representam a grande perspectiva do uso da biotecnologia na agricultura (BARROS e MOREIRA, 2001).

De acordo com Borém (2001) a transferência específica de genes que controlam características, também específicas, de um organismo para o outro é denominada engenharia genética e pode ser utilizada na transferência desses genes, mesmo em organismos filogeneticamente distantes produzindo os organismos geneticamente (OGMs).

Os primeiros experimentos a campo com plantas transgênicas foram conduzidos em 1986, nos Estados Unidos e na França. Na década de 1986 a 1995, 56 culturas diferentes foram testadas em mais de 3,5 mil experimentos realizados em mais de 15 mil locais, em 34 países. As culturas mais freqüentemente testadas foram milho, tomate, soja, canola, batata e algodão e as características genéticas introduzidas foram tolerância a herbicidas, resistência a insetos, qualidade do produto e resistência a vírus (BRASILEIRO e DUSI, 1999).

Os métodos de engenharia genética permitem que genes individualmente sejam inseridos nos organismos de forma precisa e simples (RAVEN, 1999). Portanto ao invés de promover o cruzamento entre organismos relacionados para obter uma característica desejada, cientistas podem identificar e inserir, no genoma de um determinado organismo, um único gene responsável pela característica em particular. O sucesso da produção de plantas transgênicas depende da introdução do DNA no genoma vegetal e da regeneração de plantas que expressam um gene inserido (DROSTE, 1998)

Vários métodos para a transferência de genes em plantas tem sido propostos, possibilitando a produção de plantas transgênicas das espécies de maior importância no mundo (SANTARÉM, 2000).

A transferência de genes para espécies vegetais tem sido possível graças a manipulação genética de células, utilizando métodos diretos ou indiretos de transformação. O método indireto é aquele no qual utiliza um vetor, como *Agrobacterium tumefaciens* (SANTARÉM, 2000) ou *Agrobacterium rhizogenes* (BRASILEIRO e DUSI, 1999), de forma a intermediar a transferência de genes.

Entretanto, algumas dicotiledôneas e a maioria das monocotiledôneas e gimnospermas

não são suscetíveis, ou apresentam pouca suscetibilidade à infecção pela *Agrobacterium* (POTRIKUS, 1990). Os métodos diretos, têm sido adotados, porque não requerem a utilização de vetores biológicos, mas por outro lado utilizam protoplastos, que em alguns casos apresentam dificuldade de regeneração de plantas. Os métodos diretos mais utilizados são a eletroporação e a biobalística (SANTARÉM, 2000). O objetivo deste trabalho é apresentar uma revisão bibliográfica sobre os métodos de transformação de plantas.

MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS

TRANSFERÊNCIA POR *AGROBACTERIUM*

O biólogo molecular mexicano Luis Herrera - Estrela e o geneticista norte-americano Robert B. Horsch foram os primeiros a conseguir, em 1984, plantas de tabaco transformadas geneticamente via *Agrobacterium*, através da união das técnicas de biologia molecular, cultura de tecidos vegetais, transformação e seleção *in vitro*. Portanto, foi demonstrado que essa bactéria poderia servir como um vetor natural para a transformação de plantas, possibilitando que genes com características de interesse agrônômico pudessem ser transferidos para vegetais (SANTARÉN, 2000).

Agrobacterium é uma bactéria de solo, Gram negativa, aeróbica, pertencente à Família *Rhizobiaceae* (LIPP-NISSINEN, 1993). Sua importância para os estudos de transformação de plantas reside na capacidade natural que esses patógenos possuem de introduzir DNA em plantas hospedeiras. Esse DNA é integrado e passa a ser expresso como parte do genoma da planta. Como consequência dessa expressão, o padrão normal de desenvolvimento é alterado (LIPP-NISSINEN, 1993).

Agrobacterium tumefaciens (figura 1) é uma das cinco espécies do gênero *Agrobacterium* que pode penetrar em plantas, principalmente nas dicotiledôneas, causando a galha-da-coroa. Esta bactéria possui um plasmídeo indutor de tumor denominado Ti, parte do qual é incorporado nas células da planta hospedeira, que passa a produzir hormônios vegetais e opinas (compostos sintetizados para a nutrição da bactéria). Outra bactéria do solo, *Agrobacterium rhizogenes* (figura 2), causadora da proliferação de raízes secundárias no ponto de infecção tem sido também considerada excelente vetor para transformação genética (BORÉM, 1998).

Na transformação mediada por *Agrobacterium* (figura 3) é necessário que a bactéria fique em contato com explantes, com potencial regenerativo, como segmentos de folhas jovens, embriões zigóticos, entrenós, cotilédones etc. A técnica consiste em colocar o explante na presença do vetor de transformação (*Agrobacterium*) contendo o gene de interesse onde eles são co-cultivados. As bactérias então infectam o tecido vegetal iniciando o processo de transferência e transformação do genoma da planta. A seguir o tecido é cultivado em meio de regeneração contendo antibiótico para eliminação da *Agrobacterium* e um agente seletivo que é um sistema baseado na utilização de genes que conferem resistência a antibióticos. As plantas transformadas são então, regeneradas *in vitro* e posteriormente aclimatadas (BRASILEIRO, 1998).

Quando a bactéria conecta uma célula da planta, um segmento deste plasmídeo, chamado de T-DNA é transferido do plasmídeo Ti para o núcleo da célula da planta e integrado em uma posição aleatória em um dos cromossomos da planta durante a transformação (TORRES, 2003)

A infecção por *Agrobacterium* requer um ferimento no tecido vegetal. Primeiramente, acreditava-se que o ferimento teria a função de remover a barreira física imposta pela parede celular. Atualmente, sabe-se que as células feridas, mas metabolicamente ativas, excretam compostos fenólicos de baixo peso molecular, especificamente reconhecidos pela bactéria no momento da infecção. Essas moléculas foram identificadas como acetosiringona (AS) ou a-hidroxi-acetosiringona (OH-AS) (STACHEL et al., 1985), chalconas e derivados do ácido cinâmico (STACHEL et al., 1985) e são responsáveis pela iniciação da transferência do T-DNA (BRASILEIRO, 1998).

No início do processo de infecção de uma planta por *Agrobacterium*, ocorre o reconhecimento e a ligação da bactéria à célula vegetal. As bactérias são atraídas em direção ao tecido vegetal por quimiotactismo em relação às moléculas-sinal (compostos fenólicos, açúcares e aminoácidos), que são exsudadas por células lesadas em decorrência de ferimentos superficiais causados por insetos e geadas. Uma vez em contato com as células vegetais, as bactérias sintetizam microfibrilas de celulose para favorecer a formação de agregados de células bacterianas em volta do tecido vegetal ferido. A capacidade de infectar células vegetais está associada à presença, nas agrobactérias, de um plasmídeo de alto peso molecular (150 a 250 kb), conhecido como plasmídeo Ti (Figura 4) (AHMED, 2000)

Após o ferimento e a colonização no local seguida por neoplastia (formação de um calo) e produção de certos derivados de aminoácidos (opinas) os sintomas continuam mesmo na ausência

das bactérias, implicando na presença de algum determinante genético que transformou a planta. Este determinante é o plasmídeo Ti que se integra ao genoma da planta hospedeira, havendo produção de várias opinas (que são polipeptídios e servem de fonte de carbono e nitrogênio à bactéria) e multiplicação acelerada das células transformadas. Diferentes tipos de pTi codificam a produção de diferentes opinas (octopina, nopalina, agropina), que são sintetizadas pela planta. Outros tipos de opinas também são sintetizadas pelas células das galhas da coroa. Por exemplo, células de tumor induzidas pelo tipo que produz nopalina, sintetizam também agropina e manopina (LIPP-NISSINEN, 1993).

Mais de 600 espécies vegetais são conhecidamente susceptíveis à infecção por *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, sendo a maioria delas da classe das Angiospermas dicotiledôneas e Gimnospermas e com raridade das Angiospermas monocotiledôneas (BRASILEIRO, 1998).

As agrobactérias têm-se mostrado um vetor natural para transformação genética, bastante eficiente para dicotiledôneas. Por ser uma metodologia fácil de ser aplicada e de baixo custo a transformação via *Agrobacterium* tem sido a mais amplamente utilizada (BORÉM, 1998).

A insensibilidade de certas espécies vegetais, especialmente Angiospermas monocotiledôneas, à infecção por *Agrobacterium* limita a utilização dessa bactéria como vetor de transformação genética. Assim, sistemas de transformação direta, baseados em métodos químicos ou físicos, foram desenvolvidos paralelamente ao sistema *Agrobacterium* (BORÉM, 1998).

Sua importância para os estudos de transformação de plantas reside na capacidade natural que esses patógenos possuem de introduzir DNA em plantas hospedeiras. Esse DNA é integrado e passa a ser expresso como parte do genoma da planta (HOHN, 1992).



FIGURA 1: ESTRUTURA DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

(FONTE: www.nsf.gov/.../news/press/01/pr01101derek1.htm)

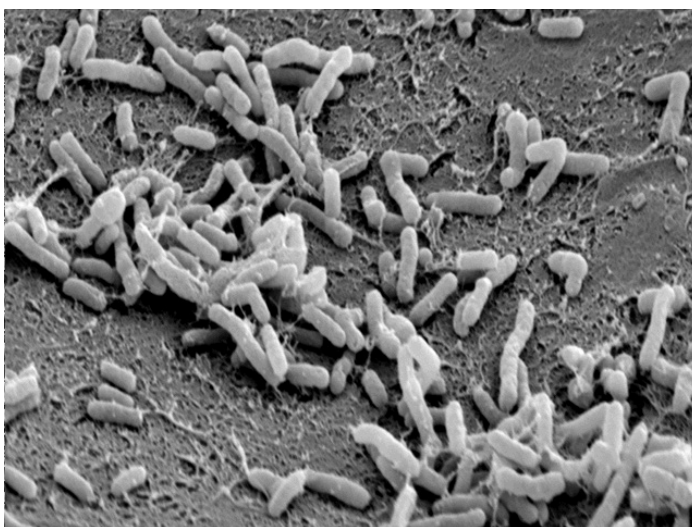


FIGURA 2: *ESTRUTURA DE AGROBACTERIUM RHIZOGENES*.

(FONTE: [HTTP:// www.bio.davidson.edu/metod/dsmeth/ds/htm](http://www.bio.davidson.edu/metod/dsmeth/ds/htm))

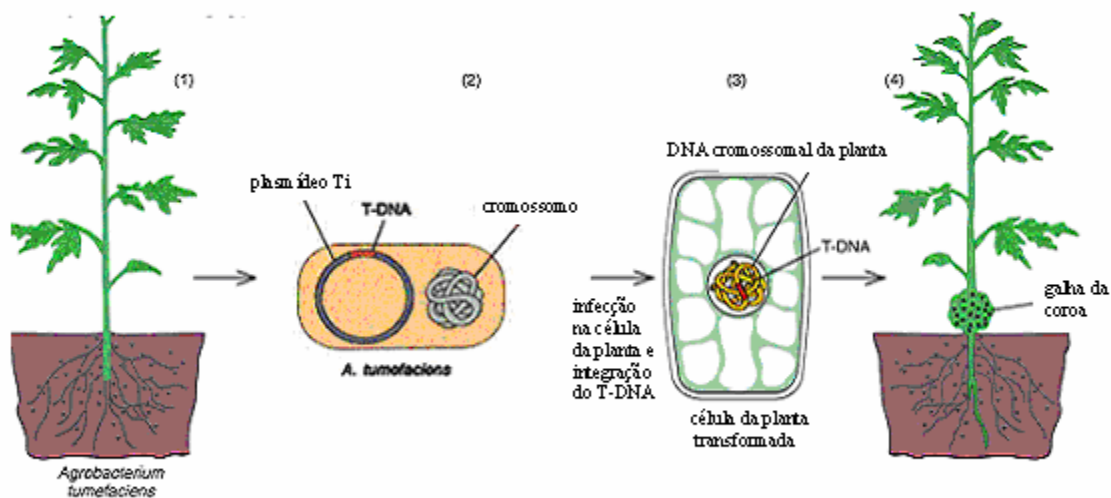


Figura 3: Esquema do processo natural de infecção de uma planta por *Agrobacterium*: 1) As bactérias do solo são atraídas pela planta, após um ferimento, através de moléculas-sinal. 2) T-DNA é transferido da bactéria para o genoma da planta em forma de fita simples (fita-T). 3) Os genes presentes no T-DNA então são expressos, sintetizando opinas e hormônios vegetais (citocininas e auxinas). 4) A síntese desses hormônios nas células transformadas provoca a formação da galha (FONTE: <http://enhs.umn.edu>).



Figura 4: Vetor binário, contendo o gene de interesse entre as extremidades do T-DNA, mantém em uma linhagem desarmada de *Agrobacterium* de forma independente do plasmídeo Ti desarmado, cujos oncogenes foram eliminados e a região *vir* mantida (Fonte: <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/TRANSG/TRG004.htm>)

TRANSFERÊNCIA POR ELETROPORAÇÃO DE PROTOPLASTOS

Protoplastos são definidos como células desprovidas de paredes celulares (EVANS, 1991). Para a introdução de DNA usando a eletroporação, os protoplastos são expostos a pulsos curtos de corrente contínua e alta voltagem, em presença do DNA exógeno. É o método mais indicado para plantas monocotiledôneas como milho e trigo (EVANS, 1991).

Parâmetros como duração dos pulsos elétricos, intensidade do campo elétrico, concentração e forma do DNA, presença ou ausência de DNA carregador, composição do tampão de eletroporação e temperatura de incubação dos protoplastos devem ser determinados (SANTARÉM, 1998)

No procedimento conhecido como fusão de protoplastos, os protoplastos de duas plantas diferentes são unidos, produzindo uma célula somática híbrida. Logo após a remoção das paredes e antes que elas sejam novamente formadas, os protoplastos são fusionados pela adição de um agente apropriado como polietileno glicol ou mediante descargas elétricas (RAVEN, 1999).

Para a transferência dos genes, os protoplastos previamente selecionados e purificados são mantidos em solução juntamente com os plasmídeos que contem os genes a serem introduzidos. Após isso se utiliza uma descarga de capacitores para produzir pulsos de alta voltagem que induz a abertura de poros na membrana celular, o que permite a penetração e a eventual integração dos genes no genoma (BRASILEIRO e DUSI, 1999)

A descarga elétrica é proveniente de um aparelho (eletroporador) que permite ao operador o controle da voltagem e sua duração, bem como ao número de pulsos e o intervalo entre estes. A amostra de suspensão das células intactas ou protoplastos contendo o material a ser inserido (em geral 0,4 a 1 ml é acondicionada em uma câmara cilíndrica de "plexiglass" cujas extremidades

são formadas por dois elétrons de aço inoxidável). O número de pulsos consecutivos a ser administrado, bem como sua intensidade e duração devem inviabilizar 50% das células (DL50), pois assim considera-se que a formação de material exógeno seria maximizada (EVANS, 1991).

Esse tratamento induz uma alteração reversível da permeabilidade da membrana plasmática e poros temporários são formados, permitindo a entrada do DNA nas células (Figura 5). A extensão da formação de poros é determinada pela intensidade e duração do pulso elétrico e pela concentração iônica do tampão de eletroporação. Os poros aumentam em tamanho e número com o aumento da duração e intensidade dos pulsos (BRASILEIRO e DUSI, 1999).

Mais recentemente, foi sugerido que a indução de plasmólise parcial das células, imediatamente antes da eletroporação, substituiria o tratamento enzimático (SABRI et al., 1996).

A associação de plasmólise e eletroporação permitem a difusão do DNA em espaços intercelulares ou a penetração lenta do DNA pelos poros das paredes celulares sendo o choque elétrico necessário apenas para permeabilizar a membrana plasmática (DEKEYSER et al., 1990).

As células híbridas devem ser crescidas em meio de cultura sólido para ocorrer o desenvolvimento de calos. Os calos deverão originar embriões somáticos que, ao se desenvolverem, poderão tornar-se plantas adultas férteis. Plantas híbridas haplóides, obtidas por intermédio do uso de pólen ou de porções (explantes) das anteras, são inviáveis para a reprodução sexuada, sendo necessário propagá-las vegetativamente (RAVEN, 1999).

A eletroporação é uma técnica rápida, simples e realizada sem agentes tóxicos às células, embora os pulsos elétricos possam ter efeito deletério na sobrevivência dos protoplastos e subsequente regeneração de plantas. Algumas plantas transgênicas foram obtidas utilizando essa técnica (SHIMAMOTO et al., 1989)

A grande vantagem deste método é que o tecido é regenerado a partir de uma única célula, evitando, desta forma as quimeras, porém a maior dificuldade é a obtenção de uma nova planta a partir de um protoplasto (EVANS, 1991). Tem sido altamente utilizada na observação da expressão transiente, que é a expressão do gene exógeno sem que ele tenha sido incorporado ao genoma, permitindo assim, testar a funcionalidade de uma construção gênica, sem a necessidade de obter uma planta transgênica (AHMED, 2000).

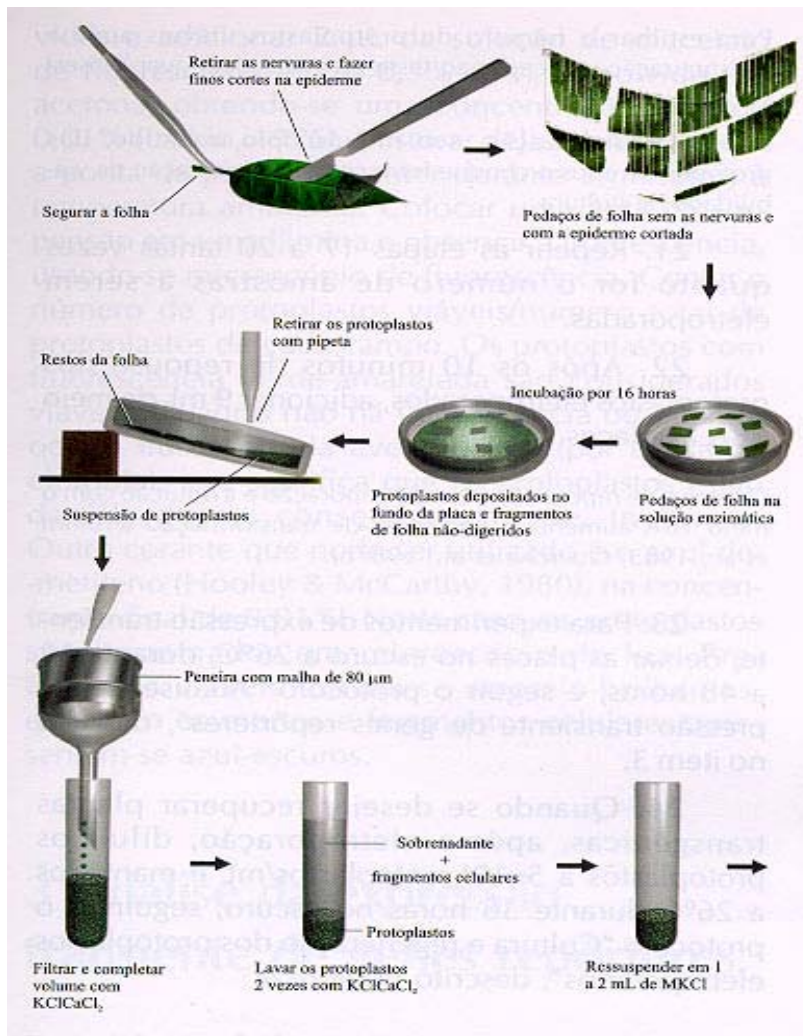


Figura 3: Esquema representativo do isolamento e purificação de protoplastos de *nicotina tabacum* (Fonte: <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/TRANSG/TRG004.htm>).

No caso da inserção de material exógeno o método é aplicável à introdução de moléculas de vários tamanhos tais como a urease, grânulos de cromatina, 14c-sacarose, DNA e k- imunoglobulina em células animais. Em protoplastos isolados de plantas a eletroporação tem estimulado a absorção de 14c-insulina e calceína RNA e DNA. No caso de células intactas há citações da injeção de DNA em leveduras e fumo (AHMED, 2000)

O maior obstáculo do método está na dificuldade de regeneração de plantas a partir de protoplastos transformados. Mesmo quando a regeneração é obtida, as plantas podem apresentar problemas de redução de fertilidade (RHODES et al., 1989), além de várias espécies ainda serem consideradas recalcitrantes para essa tecnologia (BIRCH, 1997).

BIOBALÍSTICA OU BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS

Este método foi desenvolvido por Sanford e colaboradores na Universidade de Cornell, e foi designado biobalística (biológico + balística = biobalística) em razão da alta velocidade imprimida aos microscópicos projéteis revestidos com DNA (SANFORD, 1992 apud BORÉM, 1998).

Como os outros métodos de transferência direta de genes aplicam-se a praticamente toda espécie de planta. Em princípio a biobalística abrangeria as três condições principais que compõem um mecanismo ideal de transferência de genes: Permitiria a transformação de células, tecidos e espécies mais direta, simples e rapidamente; seria aplicável para a transferência de genes às numerosas células, tecidos e espécies para os quais os outros métodos são falhos; praticidade de manuseio, pois através de um aparato relativamente simples pode-se transformar geneticamente eucariotos e procariotos (SANFORD, 1988). Esta é uma técnica que apresenta uma vantagem sobre as demais, uma vez que pode ser utilizada em tecidos intactos, além disso, o procedimento não requer cultura de células ou pré- tratamento dos tecidos a serem bombardeados (RAVEN, 1999).

O método consiste na aceleração de micropartículas que atravessam a parede celular e a membrana plasmática, de forma não letal, carregando substâncias adsorvidas, como DNA, RNA ou proteínas, para o interior da célula (KLEIN et al., 1987 SANFORD, 1988) rompendo a barreira da parede celular e da membrana plasmática, sem o uso de vetores biológicos. Para isso, microprojéteis de ouro ou tungstênio (Figuras 5 e 6), cobertos com moléculas de DNA, são acelerados a alta velocidade pelo acelerador de micropartículas que produz uma força propulsora, usando pólvora, gás ou eletricidade, o que possibilita sua penetração em células intactas (Figura 7). Após o bombardeamento, uma proporção de células atingidas permanece viável; o DNA é integrado no genoma vegetal e incorporado aos processos celulares de transcrição e tradução, resultando na expressão estável do gene introduzido (SANTARÉM e FERREIRA, 1997). Ele apresenta a vantagem de poder ser usado em tecidos intactos, dispensando procedimentos prévios de cultura de tecidos (SILVA, 2000). O termo biobalística pode ser substituído por aceleração de microprojéteis ou bombardeamento de partículas (SANFORD, 1988).

Todo o processo ocorre no interior de uma câmara sob vácuo, para evitar a desaceleração das partículas causadas pelo ar (MOREIRA, et al., 1999). A onda de choque gerada impulsiona o macrocarregador, no qual as micropartículas cobertas com DNA (microprojéteis) foram

previamente depositadas. Ao atingir a tela de retenção, a membrana é retida e as micropartículas contendo o DNA continuam em direção às células alvo, penetrando na parede celular e membrana plasmática (LACORTE et al., 1999; Figura 6).

As moléculas de DNA e RNA são eficientemente ligadas às pequenas partículas de tungstênio e moléculas de diversos tamanhos podem ser arremessadas para dentro das células, tais como RNA de vírus do mosaico do fumo e plasmídeo de DNA (SANTARÉM e FERREIRA, 1997). A desvantagem do tungstênio está na possibilidade das partículas sofrerem degradação catalítica com o passar do tempo, sendo tóxicas para alguns tipos de células (RUSSELL et al., 1992) são também sujeitas à oxidação, o que afeta a adesão do DNA ou degrada o DNA aderido (RUSSELL et al., 1992).

As partículas de ouro são mais uniformes e inertes biologicamente, não causando danos às células. No entanto, elas tendem a se aglomerar irreversivelmente em soluções aquosas, reduzindo a eficiência do processo de introdução de DNA (KIKKERT, 1993).

Sendo assim, a relação entre o tipo de microprojéteis usado para o bombardeamento e a expressão temporária ou estável do gene introduzido deve ser avaliada para cada espécie e tecido estudados (SANTARÉM, 1998)

O processo de biobalística foi inicialmente proposto com o objetivo de introduzir material genético no genoma nuclear de plantas superiores. Desde então, sua universalidade de aplicação tem sido avaliada, demonstrando ser um processo também efetivo e simples para a introdução e expressão de genes bactérias, protozoários, fungos, algas, insetos e tecidos animais (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998).

A biobalística é uma técnica bastante versátil, pois permite além da transformação de um genótipo, pode também ser utilizado para uma organela como a mitocôndria ou o cloroplasto. Uma das principais vantagens é a eficiência na transformação de Gimnospermas e Angiospermas monocotiledôneas, o que não é observado na transformação por meio de *Agrobacterium*. Esse processo possibilitou a obtenção de plantas transgênicas de diversas espécies cultivadas, que até então não haviam sido transformadas por outras metodologias disponíveis (AHMED, 2000)

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

Uma das vantagens do sistema é que este permite a introdução e expressão gênica em

qualquer tipo de célula. Assim, foi permitida a transformação *in situ* de células diferenciadas sem necessidade de regeneração. Outra importante vantagem está na possibilidade de obtenção de plantas transgênicas através da transformação de células-mãe do meristema apical. A técnica de biobalística mostrou-se bastante eficiente, pois as micropartículas conseguem atingir as três camadas do meristema apical (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998) que é formado por células iguais e estas vão se diferenciando em três tipos de meristema primário a protoderme, o procâmbio e o câmbio vascular (RAVEN, 1999)

Diversos parâmetros físicos e biológicos devem ser levados em consideração para se estabelecer um protocolo de transformação utilizando-se esse método, tais como a espécie vegetal e seu estado fisiológico, o tipo de explante, tipo e tamanho da partícula, método de precipitação, velocidade das partículas, tipo de equipamento (SANFORD et al., 1993).

A biobalística tem se mostrado um método promissor para a introdução de novas e desejáveis variedades, vários protocolos de regeneração e transformação vem sendo publicados (KLEIN, 1987).

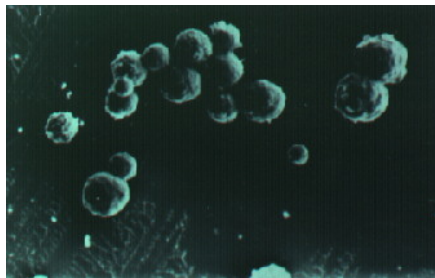


Figura 5.: Micropartículas de ouro com 1 a 3 micrômetros de diâmetro, recobertas com DNA a ser introduzido (Fonte: <http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/transgenicos.htm#MÉTODOS>)

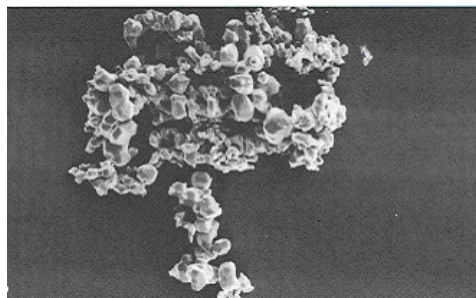


Figura 6. Micropartículas de tungstênio recobertas com DNA a ser introduzido. (Fonte: <http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/transgenicos.htm#MÉTODOS>)

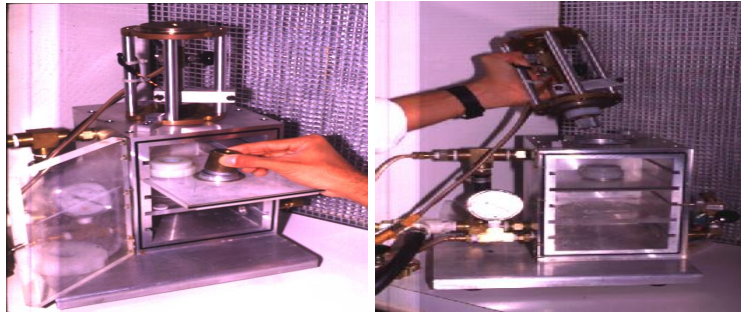


Figura 7. Microprojétil utilizado na biobalística.
(Fonte: <http://inventabrasilnet.t5.com.br/feijaot.htm>)

CONCLUSÃO

As técnicas de transformação genética de plantas é hoje uma prática bastante utilizada, têm permitido acelerar o melhoramento vegetal e está avançando com extrema velocidade. Os métodos de transformação variam tanto em eficiência quanto na forma de aplicação. Estes métodos podem ser indiretos ou diretos. Os métodos indiretos consistem na transformação mediada por algum agente biológico como, por exemplo, o *Agrobacterium* método que consiste em ocasionar um ferimento na planta e inserir, assim fragmentos de DNA, sendo um método muito eficiente em dicotiledôneas. Os métodos diretos não necessitam desses vetores biológicos e sim de processos físicos ou químicos como a eletroporação de protoplastos que introduz o DNA através de protoplastos que são acelerados até atravessar a membrana da célula a ser acrescido o DNA e a biobalística que é um método onde micropartículas de ouro ou tungstênio são aceleradas conseguindo, assim, atravessar a membrana da célula. A obtenção de plantas transformadas não é o fim deste processo, pois são necessárias diversas pesquisas para garantir que estas plantas não apresentem risco à saúde e para serem posteriormente inseridas nos sistemas de produções.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, F. E. Molecular markers for early câncer detection. **Journal of Environmental and Science health**. v.18, p.75-125, 2000.

BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Biotecnologia: um breve histórico. **Informe Agropecuário**. 2000. Belo Horizonte, v. 21, n.204, p.5-13, maio/jun.

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

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV. 1998.

BRASILEIRO, A. C. M. DUSI, D. M. A. **Transformação Genética de Plantas**. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S. ; BUSO, J.A.Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília: Embrapa, 1999.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO V. T. C. eds 1998. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen.

DEKEYSER, R. A. et al. Transient Gene Expression in Intact and Organized Rice Tissues. **The Plant Cell, Rockville** 2: p.591-602, 1990

DROSTE, A. Embriogênese Somática, Transformação e Regeneração de Plantas Férteis de Cultivares Brasileiros de Soja [Glycine max (L.) Merrill]. Porto Alegre, p. 105, 1998. [Tese de pós-graduação em genética e biologia molecular, UFRS].

EVANS, D. A. Use of Protoplast Fusion for Crop Improvement. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R. & MELO, M. **Biotecnologia para a Produção Vegetal**. Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991.

FINER, J. J.; VAIN, P.; JONES, M. W et al. Development of Particle Inflow Gun for DNA Delivery To Plant Cells. **Plant Cell Reports** Berlin, p.11: 323-328, 1992.

HOHN, B. Exploration of Agrobacterium tumefaciens. In: RUSSO, V.E.A. et al. **Development: the molecular genetic approach**. Berlin: Springer - Verlag, 1992.

KIKKERT, J. R. The Biolistics ® PDS - 1000/He device. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, p.33: 221-226, 1993.

KLEIN, T. M.; FITZPATRICK- Mc ELLIGOTT, S. Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues. **Current Opinion Biotechnology**, v. 4, p.583-590, 1993.

LACORTE, C. et al. Biobalística. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília : Embrapa- SPI; Embrapa - CNPH,. v.2, p.761-781, 1999.

LIPP-NISSINEN, K. Molecular and Cellular Mechanisms of Agrobacterium-mediated Plant Transformation. **Ciência e Cultura**, São Paulo, p.45: 104-111, 1993.

MOREIRA, C. S.; PIO, R. M. Melhoramento de Citrus. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. (Eds.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas : Fundação Cargill, v.2, p.116-152, 1991

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., cap.27, 1999

RHODES, C. A.; PIERCE, D. A.; METTLER, I. J. et al. **Genetically Transformed Maize Plants from Protoplasts**. Science, Washington, p.240: 204-207, 1989.

RUSSELL, J. A.; ROY, M. K. ; SANFORD, J. C. Physical Trauma and Tungsten Toxicity Reduce The Efficiency of Biolistic Transformation. **Plant Physiology, Rockville**, p.98: 1.050-1.056, 1992

SABRI, N.; PELISSIER B.; TEISSIE, J. **Transient and Stable Electro transformation of Intact Black Mexican Sweet Maize Cells Are Obtained After Plasmolysis**. Plant Cell Reports, Berlin. v. 15 p. 924-928, 1996.

SANFORD, J. C. The Biolistic Process. Trends in Biotechnology, Cambridge, p.6: 299-302, 1988. Biolistic Plant Transformation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.79: p. 206-209, 1990.

SANTARÉM, E. R. e FERREIRA, A. G. **Transformação de Soja via Bombardeamento de Partículas**. ABCTP Notícias, Brasília, v.9: p.2-9, 1997.

SANTARÉM, E. R. et al. Sonication - **Assisted Agrobacterium-mediated Transformation of Soybean Immature Cotyledons**: optimization of transient expression. Plant Cell Reports, Berlin, v.17: p.752-759. 1998.

SANTARÉM, E. R. **Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais**, Universidade de Cruz Alta, RS 2000.

SHIMAMOTO, K. et al. **Fertile Rice Plants Regenerated from Transformed Protoplasts**. **Nature**, Londres, v.338:p. 274-276, 1989.

STACHEL, S. E., MESSENS, E., VAN MONTAGU, M., et al. Identification of signal molecules produced by wounded plant cells which activate the T-DNA transfer process in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature** London, v. 318, p. 624-629, 1985.

TORRES, A. C. et al. Bioassay for detection of transgenic soybean seeds tolerant to glyphosate. *Pesquisa agropecuária brasileira* v, 38, p.1053-1057, 2003

WILLMITZER, L.; DE BEUCKELEER, M.; LEMMERS, M. DNA from Ti Plasmid Present in Nucleus and Absent from Plastids of Crown Gall Plant Cells. **Nature**, Londres, 1980.