

CULTURA DE TECIDOS DE FEIJOEIRO VISANDO À INTRODUÇÃO DE GENES EXÓGENOS ¹

LEILA MARIA G. BARROS², MARIA I. CONCEIÇÃO S. GAMA³, CHRISTINA H. R. DE P. GONÇALVES⁴,
CRISTINE CHAVES BARRETO², ELIANA F. SANTANA⁵ e VERA TAVARES DE C. CARNEIRO³

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi determinar parâmetros da cultura de tecidos de feijoeiro necessários para a aplicação da técnica de transformação via *Agrobacterium*. Diversos genótipos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) foram cultivados *in vitro*. Alguns parâmetros visando à infecção de ápices caulinares com *Agrobacterium tumefaciens* foram otimizados, como a eliminação da agrobactéria após a co-cultura e a concentração de kanamicina suficiente para a seleção dos ápices infectados. Multibrotações em nós cotiledonares foram obtidas com frequência de até 55,7%, dependendo do genótipo utilizado. Estes nós foram infectados com *A. tumefaciens* contendo em seu plasmídeo Ti o gene da β -glucuronidase (GUS) sob regulação de promotor eucariótico. Entre as multibrotações obtidas, 30% apresentaram região onde foi detectada atividade do gene GUS. Demonstrou-se também a susceptibilidade de feijoeiro a *Agrobacterium rhizogenes*. Raízes transgênicas foram obtidas após infecção de epicótilos.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, cultura *in vitro*, *Agrobacterium*.

BEAN TISSUE CULTURE FOR INTRODUCTION OF FOREIGN GENES

ABSTRACT - The objective of this work was to determine different bean tissue culture parameters necessary to the application of *Agrobacterium*-mediated transformation technique. Several bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes were cultured *in vitro*. The protocols for *Agrobacterium* elimination, after infection of the apical meristems with *Agrobacterium tumefaciens* and the selective kanamycin concentration were determined. Depending on the genotype, multiple buds were obtained from cotyledonary nodes in a frequency up to 55.7%. The cotyledonary nodes were infected with *A. tumefaciens* carrying in the Ti plasmid the gene for β -glucuronidase (GUS) under the control of an eucariotic promoter. Regions with GUS activity were detected in 30% of the shoots. The susceptibility of bean to *Agrobacterium rhizogenes* was also shown. Transgenic roots were obtained after infection of epicotyls with *A. rhizogenes*.

Index terms: *Phaseolus vulgaris*, *in vitro* culture, *Agrobacterium*.

INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa largamente utilizada para alimentação

em países da América Latina, África e oeste da Ásia. As variedades mais cultivadas no Brasil são: Jalo, Carioca, Rosinha, Roxinho e Preto (Schwartz & Pastor-Corrales, 1989). A produção brasileira de feijão no ano de 1994 foi de 3,1 milhões de toneladas (CONAB citado por Reti, 1995).

Atualmente, graças ao progresso da biotecnologia, é possível introduzir no genoma vegetal características encontradas em outras plantas, animais, vírus ou bactérias. No caso do feijoeiro, é grande o interesse na introdução de genes agronomicamente importantes, como os que conferem resistência a doenças ou os que aumentam o valor nutricional (Castro et al., 1987; Aragão et al., 1992). Para introduzir um gene de interesse utilizando téc-

¹ Aceito para publicação em 9 de setembro de 1996.

² Bióloga, M.Sc., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), SAIN Parque Rural, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970 Brasília, DF.

³ Bióloga, Ph.D., Embrapa - Cenargen.

⁴ Farmacêutica Bioquímica, M.Sc., Multiplica Tecnologia Vegetal Ltda, Caixa Postal 30, CEP 18160-000 Salto de Pirapora, SP.

⁵ Geógrafa, Embrapa - Cenargen.

nicas de DNA recombinante é fundamental que um método de regeneração eficiente e alguns processos da cultura de tecidos sejam previamente estabelecidos.

O sucesso na obtenção de plantas transformadas via agrobactéria é dependente da interação patógeno-hospedeiro, da determinação de um sistema de seleção que permita apenas as células portadoras do gene exógeno originarem plantas, e da eliminação eficiente das bactérias utilizadas como vetores, sem causar danos ao tecido vegetal.

O procedimento para seleção de plantas transformadas é realizado, normalmente, com o auxílio de genes que conferem resistência a antibióticos (kanamicina), por exemplo, e genes repórteres, cujo produto da expressão pode ser detectado por técnicas de espectrofotometria ou por ensaios histoquímicos como o gen^e que codifica para enzima GUS. É usual a utilização concomitante destes dois tipos de genes marcadores, o que permite verificar nas plantas sobreviventes ao meio de seleção, a expressão do gene introduzido.

Dada a importância do feijoeiro, vários grupos de pesquisa de diversos países vêm trabalhando com cultura de tecidos nos últimos 30 anos; no entanto, os resultados são pouco satisfatórios. Embora alguns trabalhos relatem regeneração de plantas de feijoeiro (Crocomo et al., 1976; Malik & Saxena, 1992; Mohamed et al., 1993), em alguns deles os resultados não puderam ser reproduzidos, e em outros, os métodos desenvolvidos são restritos a poucos genótipos, com eficiência de regeneração bastante baixa, impossibilitando sua aplicação em um programa de engenharia genética. Alguns grupos de pesquisa contornaram este problema infectando tecido meristemático com *Agrobacterium*. Deste modo, plantas transgênicas de petúnia (Ulian et al., 1988); milho (Gould et al., 1991) e ervilha (Hussey et al., 1989) foram obtidas através da inoculação de *A. tumefaciens* diretamente no meristema. Outra maneira de contornar a ausência de regeneração é a utilização da técnica de aceleração de partículas, como demonstrado por Aragão et al. (1993), em meristemas de feijoeiro. Deste modo, as plantas obtidas, embora quiméricas, poderão conter na sua progênie plantas transgênicas, dependendo das células

atingidas no processo de transformação (Medford, 1992).

O objetivo deste trabalho foi determinar uma série de parâmetros necessários à aplicação da técnica de transformação indireta, onde se utiliza *A. tumefaciens* ou *A. rhizogenes* como vetor de transformação: a origem dos explantes, a influência de agentes geleificantes e as auxinas no enraizamento, a susceptibilidade a diferentes cepas de *Agrobacterium*, a capacidade de expressão do gene repórter GUS e do gene marcador NPTII em tecidos transgênicos, e a sensibilidade aos antibióticos cefotaxima e kanamicina.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Sementes de *Phaseolus vulgaris* cv. Jalo, Carioca, Preto de Cacho, Costa Rica, CNF 172, Rico 23, CNF 10, Rio Negro, Rosinha e Rio Tibagi foram gentilmente cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), da Embrapa, em Goiânia, GO. A cultivar La Victoire foi cedida pela Station d'Amélioration des Plantes, INRA, Versalhes, França.

Bactérias

Todas as cepas de *Agrobacterium* foram doadas pela Station d'Amélioration des Plantes, INRA, Versalhes, França.

A cepa C58C1 de *A. tumefaciens* foi utilizada para infecção de ápices caulinares. Esta cepa é resistente ao antibiótico rifampicina e hospedeira do plasmídeo Ti desarmado PGV 3850::pLGV 1103 (Hain et al., 1985). O gene da neomicina fosfotransferase (NPTII), presente no plasmídeo Ti, sob controle do promotor da enzima octopina sintase, confere à planta hospedeira resistência à kanamicina, e o gene da β -lactamase, confere à bactéria resistência à ampicilina.

A cepa desarmada GV2260 de *A. tumefaciens* foi utilizada para infecção de nós cotiledonares. Esta cepa é resistente ao antibiótico rifampicina (Deblaere et al., 1985), abrigando o vetor binário p35SGUS INT (Vancanney et al., 1990) que contém o gene repórter uid A codificante da enzima β -glucuronidase (GUS) (Jefferson et al., 1987), sob controle do promotor CaMV 35S. Neste plasmídeo, a região codante foi interrompida por um intron de célula vegetal. Em plantas transgênicas que contêm este gene, o intron é removido eficientemente, possibilitando a expressão da enzima. Organismos procariotos não possuem

mecanismos para remover o intron, logo, a expressão da enzima GUS na agrobactéria é bloqueada. O vetor binário possui também o gene da NPTII.

As cepas selvagens de *A. rhizogenes* A4PCRS e A4GUSKANA foram utilizadas para a infecção de epicótilos. Estas cepas carregam o vetor binário contendo o gene repórter GUS e o gene de seleção NPTII, sob regulação de promotor eucariótico, 35S do CaMV (Jouanin et al., 1987).

Todas as agrobactérias foram cultivadas em meio YEB (Vervliet et al., 1975) contendo rifampicina 50 µg/ml, à temperatura de 28°C durante 16 a 18 horas, com agitação até a cultura atingir a fase log de crescimento (densidade ótica a 600 nm entre 0,8 e 1,0). Adicionou-se ampicilina a 100 µg/ml para o cultivo da cepa C58C1 e streptomomicina a 250 µg/ml para a cepa GV2260.

Desinfestação das sementes

As sementes foram lavadas em água corrente, imersas em solução de hipoclorito de sódio 2,5% v/v durante 20 min, com agitação, e lavadas cinco vezes em água destilada autoclavada.

Condições de cultivo dos explantes e plântulas

As culturas dos tecidos vegetais foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura média de 26°C, com fotoperíodo de 16 horas de luz (40-60 mmol. m⁻².s⁻¹) utilizando lâmpada fluorescente. Todos os meios foram autoclavados a 121°C com pressão de 1 kg/cm² durante 15 a 20 minutos. As vidrarias foram autoclavadas na mesma temperatura e pressão durante 30 a 40 minutos.

Infecção de ápices caulinares com *A. tumefaciens*

Após a desinfestação, as sementes (cv. Rio Tibagi) foram colocadas em placas-de-petri contendo água com ágar a 7 g/L e mantidas em câmara de crescimento por 96 horas, as primeiras 48 horas no escuro. Os ápices caulinares, de aproximadamente 0,7-1 mm, foram excisados assepticamente e colocados em meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962) com vitaminas do meio B5 (Gamborg et al., 1968) adicionado de ácido naftalenoacético (ANA) 0,1 mg/L, ágar 0,8% e pH 5,8.

Para determinar a sensibilidade de tecidos de feijoeiro à kanamicina (Km), visando à sua utilização como agente seletivo, ápices caulinares (cv. Rio Tibagi), foram cultivados no meio de cultura acima, adicionado de 10, 30, 50 e 100 mg/L de Km, 30 ápices por tratamento. Foram feitas avaliações aos 30, 50 e 70 dias de cultivo.

Para testar a sensibilidade dos ápices de feijoeiro à cefotaxima (Cx) visando à utilização deste antibiótico na

eliminação da agrobactéria após o co-cultivo, os ápices foram colocados em meio de cultura contendo 250 e 500 mg/L de Cx ou em combinação com 50 mg/L de Km. Foram usados 20 ápices por tratamento, com avaliações aos 30 e 70 dias de cultivo.

A infecção dos ápices caulinares com *Agrobacterium* foi realizada imediatamente após a excisão. Foram colocados 30 ápices caulinares em placas-de-petri, contendo meio básico, e em seguida foram adicionados 10 µl da cultura bacteriana, cepa C58C1, em cima dos ápices. Após 48 horas, a agrobactéria foi eliminada por imersão dos explantes em concentrações variadas de hipoclorito de sódio (0,25; 0,5; 0,75%) e lavados três vezes em água destilada autoclavada. Os ápices foram então cultivados em tubo de ensaio (25x150 mm) contendo 10 ml do meio básico.

Infecção de nós cotiledonares com *A. tumefaciens*

Visando testar a infectividade de *A. tumefaciens* em nós cotiledonares de feijoeiro, buscou-se encontrar genótipos com sistema de multibrotação *in vitro* eficiente. Assim, foi induzida multibrotação em nós cotiledonares de nove genótipos de *Phaseolus vulgaris*. As sementes desinfestadas foram cultivadas em placas-de-petri (três sementes por placa) contendo meio MS acrescido de N⁶-benzilaminopurina (BA) 1 mg/L e ágar 0,7%. Após sete dias, os cotilédones e gemas cotiledonares foram retirados das plântulas, e os nós cotiledonares foram isolados cortando-se o hipocótilo 0,5 cm abaixo da inserção do cotilédone e o epicótilo 0,2 cm acima.

Nós cotiledonares de plantas da cultivar Jalo foram infectados com *A. tumefaciens* cepa GV2260. A inoculação foi realizada após centrifugação da cultura bacteriana e ressuspensão em igual volume de MgSO₄ 10 mM. Esta suspensão foi aplicada nos orifícios das gemas cotiledonares previamente retiradas, utilizando-se seringa e agulha hipodérmica. Após a infecção, os explantes foram mantidos no escuro, em meio MS contendo BA 1 mg/L e ágar 0,7%, a 25°C, durante dois dias, e então foram transferidos para o mesmo meio, acrescido do antibiótico cefotaxima 250 mg/L, para eliminação da agrobactéria. Após 30 a 40 dias, quando as multibrotações atingiam aproximadamente 2 cm de comprimento, foram isoladas e transferidas para meio de enraizamento ou submetidas a ensaio histoquímico, para detecção da expressão do gene GUS. Para favorecer o enraizamento destes brotos, foram testadas diferentes auxinas: ANA, AIB (ácido indolilbutírico) e AIA (ácido 3-indolilacético) nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 10 mg/L adicionadas, antes da autoclavagem, aos meios MS e B5, solidificados com

ágar da marca Cialgas. Os explantes foram mantidos em cultura durante 40 dias.

Diferentes marcas de ágar foram testadas em experimentos de micropropagação. Entrenós de plantas de feijoeiro cv. La Victoire foram retirados de plantas germinadas *in vitro* em meio T0 (Doré, 1975) e colocados no mesmo meio, sem regulador de crescimento, contendo os seguintes ágaros: gelrite, agarose, biomar e sigma.

Visando verificar a sensibilidade à Km, nós cotiledonares da cultivar Jalo foram colocados em placa-de-petri contendo meio MS acrescido de BA 1 mg/L e ágar 0,7%, adicionado de 50 e 100 mg/L de Km. Estes explantes foram mantidos na câmara de crescimento durante 30 dias, e então foram feitas as observações.

Infecção de epicótilos com *A. rhizogenes*

Sementes da cultivar La Victoire foram germinadas *in vitro* em meio T0 (Doré, 1975). Após sete a dez dias, segmentos de epicótilos foram colocados em cultura, com a extremidade apical invertida, em contato com o meio T0, de acordo com o método descrito por Tepfer (1984).

A porção basal foi infectada com as diferentes cepas de *A. rhizogenes*, A4PCRS ou A4GUSKANA, com auxílio de alça de platina. As agrobactérias eram colhidas diretamente de culturas de dois dias em meio YEB sólido.

Um mês após a infecção, as raízes oriundas de epicótilos infectados e raízes de plantas germinadas *in vitro* (controle) foram retiradas e colocadas em cultura, sendo testados os meios T0 e N/5 (meio MS com nitrogênio diluído cinco vezes: NH_4NO_3 330 mg/L e KNO_3 380 mg/L). Foi determinada uma curva de sobrevivência de raízes transformadas com a cepa selvagem A4PCRS em meio N/5, contendo concentrações crescentes de Km (10, 20, 50 e 100 mg/L).

Ensaio histoquímico da enzima β -glucuronidase (GUS)

O ensaio histoquímico foi realizado de acordo com McCabe et al. (1988), (100 mg do substrato, 5-bromo-4-

-cloro-3-indolil glucuronídeo (X-gluc) em 2 ml de dimetil sulfoxido, adicionado em 200 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0, ferrocianeto de potássio 0,5 mM, EDTA 10 mM e triton X-100 0,1%). Os explantes foram incubados a 37°C durante 4 a 24 horas.

Transferência das plântulas para a terra

Em todos os experimentos, plantas com altura aproximada de 5 cm foram transferidas para solo adubado e esterilizado, em casa de vegetação, e aclimatadas por dez dias, utilizando-se um saco de plástico como cobertura, que era gradativamente retirado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Infecção de ápices caulinares com *A. tumefaciens*

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que a adição de 50 mg/L de Km é suficiente para inibir, em 30 dias, o desenvolvimento de plantas. Com 30 mg/L de Km no meio de cultura, os ápices apresentavam parte aérea bem desenvolvida, mas com o decorrer do tempo não enraizavam, tornavam-se cloróticos, e necrosavam. A única planta obtida após 30 dias em 30 mg/L de Km não sobreviveu ao cultivo. O número de plantas obtidas, em meio com adição de 10 mg/L de Km, foi menor que no controle, o que indica que ápices caulinares de feijoeiro são muito sensíveis à Km, e que este é um bom agente seletivo.

Com relação à cefotaxima (Cx), sua adição a 250 mg/L de meio de cultivo, teve um efeito inibidor no desenvolvimento dos ápices (Tabela 2). Nesta concentração foi obtido um menor número de plantas, que se apresentavam cloróticas e menos desenvolvidas, em comparação com as plantas-controles. Este efeito inibitório foi mais acentuado na con-

TABELA 1. Ação da kanamicina no desenvolvimento de ápices caulinares de feijoeiro cv. Rio Tibagi, cultivados *in vitro*.

Kanamicina mg/L	30 dias		50 dias		70 dias	
	N ^o brotos ¹	N ^o plantas	N ^o brotos	N ^o plantas	N ^o brotos	N ^o plantas
0	16	5	15	6	11	13
10	23	1	12	6	11	7
30	19	1	0	0	0	0
50	16	0	0	0	0	0
100	11	0	0	0	0	0

¹ Parte aérea sem raiz.

concentração de 500 mg/L de Cx, obtendo-se plantas de menor porte e 85% dos ápices necrosados. Estes resultados indicam que não seria viável a utilização da Cx durante longo período. Por isto, este antibiótico era utilizado apenas por um período de cinco dias, e então os ápices eram transferidos para meio sem antibióticos.

Como tratamento alternativo à Cx, foi realizada desinfestação em hipoclorito de sódio. Melhores resultados foram obtidos na concentração de 0,25% por dez minutos, após a infecção (Tabela 3). Após este tratamento, os ápices foram colocados sobre 250 mg/L de Cx durante cinco dias, e então transferidos para meio sem antibiótico. Este tratamento permitiu a eliminação da bactéria, reduzindo os efeitos tóxicos observados quando se utilizou a Cx por um período mais prolongado.

TABELA 2. Ação da cefotaxima (Cx) e cefotaxima combinado com kanamicina (Km) no desenvolvimento de ápices caulinares de feijoeiro cv. Rio Tibagi.

Tratamento mg/L	30 dias		70 dias	
	N ^o brotos ¹	N ^o plantas	N ^o brotos	N ^o plantas
0	13	5	9	8
250 Cx	6	0	3	3
500 Cx	4	1	0	3
250 Cx + 50 Km	3	0	0	0
500 Cx + 50 Km	0	0	0	0

¹ Parte aérea sem raiz.

Infecção de nós cotiledonares com *A. tumefaciens*

A porcentagem de multibrotação obtida em nós cotiledonares variou de 0,0 a 50,7% entre os nove genótipos testados (Tabela 4). As cultivares com maior número de brotos (eficiência de multibrotação) foram: Carioca, Preto de Cacho e Jalo. Verificou-se que a cepa desarmada GV 2260 é bastante infectiva nestas cultivares. A cultivar Jalo foi escolhida para dar seqüência ao trabalho, por apresentar explantes maiores que, facilitam as manipulações de infecção com agrobactéria. Embora não se tenham obtido plantas transgênicas, 30% dos brotos apresentaram coloração azul em pequenas regiões do caule (Fig. 1), o que indica transferência do gene para algumas células. A obtenção de plantas com expressão do gene GUS, restrita a regiões específicas, sugere que a infecção ocorreu em células já diferenciadas, dando origem a tecidos quiméricos. De acordo com McClean & Grafton (1989), a região do nó cotiledonar conteria um único meristema, elimina-

TABELA 3. Influência da desinfestação com hipoclorito de sódio no desenvolvimento de ápices caulinares de feijoeiro.

Hipoclorito de sódio (%)	Tempo (min)	Número de plantas desenvolvidas (%)
0,00	0	55
0,25	10	35
0,50	5	25
0,50	10	15
0,75	5	20

TABELA 4. Multibrotação em nós cotiledonares de diversos genótipos de *Phaseolus vulgaris*, cultivados por 40 dias, em meio acrescido de N⁶-benzilaminopurina (1mg/L).

Cultivares	Número de nós cotiledonares em cultura	Número de nós cotiledonares apresentando brotos	Porcentagem de explantes com brotos
Jalo	40	13	32,5
Carioca	71	36	50,7
Preto de cacho	21	8	38,0
Costa Rica	60	5	8,3
CNF 172	34	4	11,7
Rico 23	28	0	0,0
CNF 10	30	8	26,6
Rio Negro	20	2	10,0
Rosinha	33	1	3,0

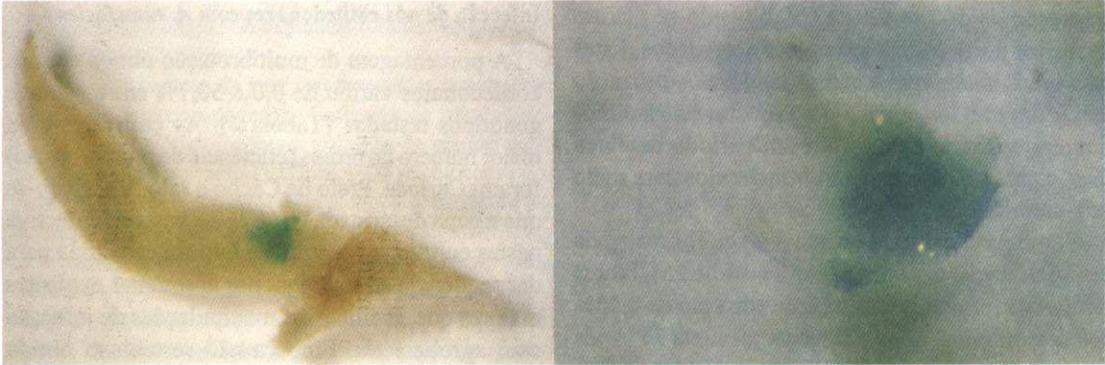


FIG. 1. A) Broto desenvolvido a partir de nó cotiledonar de feijoeiro (cv. Jalo) infectado com *A. tumefaciens* cepa GV2260, carregando o plasmídeo p3SSGUS INT, apresentando reação positiva (flecha) no teste histoquímico para enzima β -glucuronidase. B) Corte transversal do tecido expressando GUS.

do na excisão. No entanto, Martins & Sondahl (1984) demonstraram a existência de gemas dormentes neste tecido, além da gema lateral já desenvolvida.

Verificou-se que em 50 mg/L de Km ainda ocorria desenvolvimento de brotos, enquanto que 100 mg/L eram capazes de inibir totalmente o desenvolvimento desses brotos, sendo, assim, esses 100 mg/ml de Km, adequados à seleção. No entanto, no caso de brotos quiméricos, com uma grande região de tecido não transformado, sensível à Km, poderia inviabilizar-se a seleção. Os tecidos não transformados sofreriam necrose, e, provavelmente, impediriam a sobrevivência do tecido transformado. Optou-se pela não-utilização deste antibiótico em nós cotiledonares.

Dentre as auxinas testadas, nenhuma foi capaz de favorecer o enraizamento de brotos provindos de nó cotiledonar. Foi observado o enraizamento e o desenvolvimento das plantas na presença de diferentes agentes geleificantes, após um mês de cultura (Fig. 2). Plantas completas não se desenvolveram em gelrite e agarose, e a maior parte delas não desenvolveram raízes e apresentaram entre-nós curtos (plantas mal formadas). Com o ágar sigma, o número de plantas completas foi mais elevado do que no biomar. Em brotos oriundos de nó cotiledonar, verificou-se que determinados lotes de ágar cialgas inibiram completamente o enraizamento. O ágar foi, portanto, um fator limitante para o enraizamento de plantas de feijoeiro.

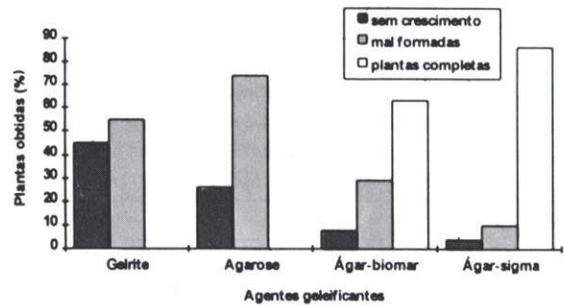


FIG. 2. Porcentagem de plantas obtidas a partir de 200 entrenós de feijoeiro cultivados em meio T0 na presença de diferentes agentes geleificantes, após 1 mês de cultivo. As plantas obtidas foram classificadas de acordo com seu desenvolvimento *in vitro*: sem crescimento, necrose dos entrenós; mal formadas, entrenós desenvolveram plantas sem raízes e com entrenós reduzidos; plantas completas, entrenós desenvolveram plantas normais.

Infeção de epicótilos com *A. rhizogenes*

Verificou-se a infectividade da cepa A4PCRS de *A. rhizogenes* na cultivar La Victoire utilizando segmentos de epicótilos como explante. Raízes em crescimento puderam ser observadas sobre 25 dos 40 epicótilos colocados em meio T0 e infectados com esta cepa. Por outro lado, em 30 epicótilos não-infectados, utilizados como controle, nenhum apre-

sentou desenvolvimento de raízes, o que sugere que as raízes eram resultado da infecção dos explantes pela agrobactéria.

As raízes oriundas de epicótilos infectados cresceram 1,5 vezes mais que as raízes controle. O meio N/5 mostrou ser o mais favorável ao crescimento destas raízes.

Verificou-se que a concentração de 100 mg/L de Km é suficiente para impedir o crescimento de raízes oriundas de infecção com a cepa selvagem (A4PCRS). Kanamicina a 100 mg/L foi utilizada, portanto, para selecionar raízes oriundas da infecção com A4GUSKANA (Fig. 3). A expressão do gene GUS nas raízes transgênicas foi demonstrada através de ensaio histoquímico (Fig. 4). Assim, demonstrou-se a infectividade de *A. rhizogenes* em plantas de feijoeiro (cv. La Victoire). Acredita-se que o estabelecimento de método para regeneração de plantas a partir destas raízes levaria à obtenção de plantas transgênicas. No entanto, até agora, não foi obtido sucesso nos vários ensaios de cultura *in vitro* de raízes visando a regeneração de plantas. Portanto, a limitação deste método restringe-se ao estabelecimento de um processo de regeneração de plantas.

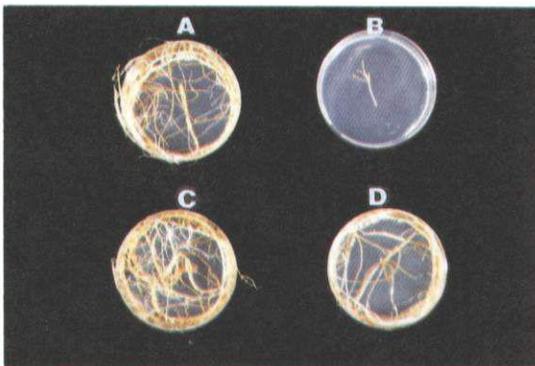


FIG. 3. Ação da kanamicina em raízes obtidas por infecção de epicótilos de feijoeiro com *A. rhizogenes*: cepa A4PCRS (A e B) e cepa A4GUSKANA (C e D), carregando o gene da NPTII, cultivadas em meio N/5 na presença de 100 mg/L de kanamicina (B e D), comparadas às raízes crescidas em ausência deste agente seletivo (A e C).



FIG. 4. Raiz transformada com a cepa A4GUSKANA apresentando expressão do gene GUS em teste histoquímico para a enzima β -glucuronidase (flecha), comparada à raiz obtida por transformação com a cepa selvagem A4PCRS.

CONCLUSÕES

1. A cultura *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* é genótipo dependente.
2. Algumas cultivares desenvolvem-se satisfatoriamente em meio de cultivo a partir de entrenós, ápices caulinares ou nós cotiledonares, enquanto outras necrosam totalmente.
3. O agente geleificante é determinante para o enraizamento de plantas de *P. vulgaris* enquanto nenhuma das auxinas testadas influencia no enraizamento.
4. É possível transferir um caráter gênico para tecidos de feijoeiro, via *Agrobacterium*.
5. A infecção de nós cotiledonares com a cepa GV2260 de *A. tumefaciens* dá origem a brotos quiméricos.
6. As cepas de *A. rhizogenes* A4PCRS e A4GUSKANA são igualmente capazes de infectar plantas de feijão e induzir raízes que crescem indefinidamente em meio de cultura.
7. O gene repórter GUS e o gene marcador NPTII expressam-se nas raízes transgênicas.
8. O antibiótico cefotaxima, utilizado na maioria dos sistemas de transformação, para eliminar a agrobactéria, inibe o desenvolvimento de ápices de feijoeiro, quando utilizado por longo período.
9. A incubação do explante em 0,25% v/v de hipoclorito de sódio por 10 minutos, seguida de cultivo em meio com 250 mg/L de cefotaxima durante

apenas cinco dias é eficiente para eliminação das agrobactérias e não prejudica o desenvolvimento do explante.

10. O antibiótico kanamicina é um agente seletivo adequado para tecidos de feijoeiro; na concentração de 50 mg/L inibe o desenvolvimento de ápices caulinares; e de 100 mg/L inibe o aparecimento de multibrotações em nós cotiledonares e o crescimento de raízes.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão - CNPAF/Embrapa-, pelo envio das sementes de feijoeiro utilizadas neste trabalho; ao Laboratório de Biologia Celular do Institut National de Recherche Agronomique - INRA -, Versailles - França, onde foi realizada parte deste trabalho; à Dra. Diva de Alencar Dusi, pela preciosa colaboração, à Dra. Ana Cristina Miranda Brasileiro, e ao Dr. Francisco Aragão, pela leitura crítica deste artigo.

REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, F.J.L.; SÁ, M.F.G. de; ALMEIDA, E.R.; GANDER, E.S.; RECH, E.L. Particle bombardment-mediated transient expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Molecular Biology*, v.20, p.357-359, 1992.
- ARAGÃO, F.J.L.; SÁ, M.F.G. de; DAVEY, M.R.; BRASILEIRO, A.C.M.; FARIA, J.C.; RECH, E.L. Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an electrical particle acceleration device. *Plant Cell Reports*, v.12, p.483-490, 1993.
- CASTRO, L.A.B. de; LACERDA, Z.; ARAMAYO, R.A.; SAMPAIO, M.J.A.M.; GANDER, E.S. Evidence for a precursor molecule of Brazil nut 2S seed proteins from biosynthesis and cDNA analysis. *Molecular & General Genetics*, v.206, p.338-343, 1987.
- CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; PETERS, J.C. Plantlet morphogenesis and the control of callus growth and root induction of *Phaseolus vulgaris* with the addition of bean seed extract. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, v.78, p.456-460, 1976.
- DEBLAERE, R.; BYTEBIER, B.; DE GRAVE, H.; DEBOECK, F.; SCHELL, J.; MONTAGU, M. van; LEEMANS, J. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene. *Nucleic Acids Research*, v.13, n.13, p.4777-4788, 1985.
- DORÉ, C. La multiplication clonale de l'asperge (*Asparagus officinalis* L.) par culture *in vitro*: son utilisation en sélection. *Annales de l'Amélioration des Plantes*, v.25, p.201-224, 1975.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, v.50, p.148-151, 1968.
- GOULD, J.; DEVEY, M.; HASEGAWA, O.; ULIAN, E.C.; PETERSON, G.; SMITH, R.H. Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiology*, v.95, p.426-436, 1991.
- HAIN, R.; STABEL, P.; CZERNILOFSKY, A.P.; STEINBIB, H.H.; HERRERA-ESTRELA, L.; SCHELL, J. Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene by plant protoplasts. *Molecular & General Genetics*, v.199, p.161-168, 1985.
- HUSSEY, G.; JOHNSON, R.D.; WARREN, S. Transformation of meristematic cells in the shoot apex of cultured pea shoots by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes*. *Protoplasma*, v.148, p.101-105, 1989.
- JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, v.6, p.3901-3907, 1987.
- JOUANIN, L.; GUERCHE, P.; PANBOUKDJIAN, N.; TOURNEUR, C.; CASSE-DELBART, TOURNEUR, J. Structure of T-DNA in plants regenerated from roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. *Molecular & General Genetics*, v.206, p.387-392, 1987.
- 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.
- MARTINS, I.S.; SONDAHL, M.R. Auxillary bud development from nodal cultures of bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). *Turrialba*, v.34, p.157-161, 1984.

- MCCABE, D.E.; SWAIN, W.F.; MARTINELL, B.J.; CHRISTOU, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Biotechnology*, v.6, p.923-926, 1988.
- MCCLEAN, P.; GRAFTON, K.F. Regeneration of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. *Plant Science*, v.60, p.117-122, 1989.
- MEDFORD, F.I. Vegetative apical meristems. *Plant Cell*, v.4, p.1029-1039, 1992.
- MOHAMED, M.F.; COYNE, D.P.; READ, P.E. Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.118, n.1, p.158-162, 1993.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- RETI, J. Colheita e pós-colheita: pesquisas da Embrapa procuram diminuir desperdícios. *Folha da Embrapa*, v.4, n.18, p.6-7, 1995.
- SCHWARTZ, H.; PASTOR-CORRALES, M.A. (Eds.). **Bean production problems in the tropics**. 2.ed. Cali: CIAT, 1989. 726p.
- TEFFER, D. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, v.37, p.959-967, 1984.
- ULIAN, E.C.; SMITH, R.H.; GOULD, J.H.; McKNIGHT, T.D. Transformation of plants via the shoot apex. *In vitro Cellular & Developmental Biology*, v.24, n.9, p.951-954, 1988.
- VANCANNEYT, G.; SCHMIDT, R.; O'CONNOR-SANCHEZ, A.; WILLMITZER, L.; ROCHA-SOSA, M. Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular & General Genetics*, v.220, p.245-250, 1990.
- VERVLIET, G.; HOSTERS, M.; TEUCHY, H.; MONTAGU, M. van; SCHELL, J. Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. *Journal of General Virology*, v.26, p.33-48, 1975.

