

## SAAT: TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS MEDIADA POR ULTRA-SOM E *AGROBACTERIUM*

### SAAT: PLANT TRANSFORMATION MEDIATED BY ULTRASOUND AND *AGROBACTERIUM*

#### - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

Eliane Romanato Santarém<sup>1</sup>

#### RESUMO

Vários métodos para transferência de genes em plantas têm sido propostos, possibilitando a produção de plantas transgênicas das espécies cultivadas de maior importância no mundo. Apesar da transformação de plantas utilizando *Agrobacterium* ter vantagens sobre os sistemas que não utilizam vetores biológicos, sua eficiência para a transferência de DNA ainda é baixa. Recentemente, foi proposta uma tecnologia, denominada SAAT (Transformação mediada por *Agrobacterium* e Ultra-som), que consiste no tratamento de tecidos vegetais com ultra-som em presença de *Agrobacterium*. Estudos com microscópio eletrônica de varredura e microscópio óptica mostraram que o tratamento com SAAT produz um grande número de ferimentos pequenos e uniformes na superfície do tecido, permitindo o acesso da *Agrobacterium* a tecidos subepidérmicos. SAAT aumentou a eficiência de transformação em diferentes tecidos, incluindo cotilédones imaturos, tecido foliar, culturas em suspensão, embriões somáticos e zigóticos. De várias espécies, entre elas, soja, caupi, *Picea glauca*, trigo e milho. Essa nova tecnologia permite aumentar a eficiência de transformação para várias espécies, principalmente aquelas recalcitrantes para *Agrobacterium*.

**Palavras-chave:** *Agrobacterium*, SAAT, transformação, ultra-som

#### SUMMARY

Several methods for gene transfer into plants have been developed and it has allowed many of the world's important crop plants to be transformed. Transformation using *Agrobacterium* has several advantages over vectorless systems, although its efficiency on transferring DNA is still low for many species. Recently, a technology called SAAT (Sonication Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation) has been described, which involves subjecting the plant tissue to brief periods of ultrasound in the presence of *Agrobacterium*. Scanning and light microscopy revealed that SAAT treatment produces a large number of small and uniform wounding through the tissue allowing the *Agrobacterium* easy access to internal plant tissues. SAAT improved the transformation efficiency in several different

plant tissues including immature cotyledons, leaf tissue, suspension cultures, somatic and zygotic embryos from different species such as soybean, cowpea, white spruce, wheat and maize. This new method allows the increase of transformation rates in several species, especially those more recalcitrant to *Agrobacterium*-mediated transformation.

**Key words:** *Agrobacterium*, plant transformation, SAAT, sonication.

#### INTRODUÇÃO

A biotecnologia, nas suas mais diferentes abordagens, tem criado novas perspectivas para o melhoramento vegetal. Entre elas, as técnicas de transferência de genes em plantas podem contribuir significativamente para a sustentabilidade da agricultura, originando cultivos melhorados e mais adaptados ao meio ambiente. Genes, antes inacessíveis ao melhorista, provenientes de vegetais, de animais ou de microrganismos podem ser introduzidos em plantas através de técnicas biotecnológicas, ampliando os limites da variabilidade genética disponível (DE BLOCK, 1993). Uma vez identificado o gene responsável por determinada característica agrônoma de interesse, ele pode ser isolado, clonado e utilizado na transformação genética (BRASILEIRO & DUSI, 1999). As características que podem ser introduzidas em plantas pela engenharia genética incluem o aumento da qualidade e produtividade, resistência a doenças e pragas e tolerância a condições ambientais adversas.

O sucesso da produção de plantas transgênicas depende da introdução do DNA no

<sup>1</sup>Biólogo, Doutor, Professor Titular do Curso de Agronomia, Coordenador do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais *in vitro*, Universidade de Cruz Alta, Cruz Alta – RS, 98025-810. E-mail: santarem@azcomnet.com.br.

genoma vegetal e da regeneração de plantas que expressem o gene inserido (WALDEN & WINGENDER, 1995). Nas últimas duas décadas, vários métodos para a transferência de genes em plantas foram propostos, possibilitando a transformação das espécies cultivadas de maior importância econômica, como soja, amendoim, milho, trigo, algodão, girassol, entre outras (FISK & DANDEKAR, 1993; BRASILEIRO & DUSI, 1999). Entre estas técnicas, a aceleração de partículas, a eletroporação e a transformação mediada por *Agrobacterium* têm se mostrado as mais promissoras na produção de plantas transgênicas (SIEMENS & SCHIEDER, 1996). Porém, vários aspectos devem ainda ser elucidados em cada um desses sistemas.

A aceleração de partículas é uma técnica altamente versátil e, geralmente, de alta reprodutibilidade, podendo ser aplicada à grande variedade de células e tecidos vegetais (FISK & DANDEKAR, 1993; FINER *et al.*, 1996). Contudo, a frequente fragmentação e recombinação do DNA introduzido, bem como a complexidade do padrão de integração e a inserção de múltiplas cópias do gene e/ou vetores, consistem nas desvantagens dessa técnica (SÉMENS & SCHIEDER, 1996). A eletroporação tem permitido a produção de plantas transgênicas, principalmente cereais (DONN *et al.*, 1990). Nesse sistema, que geralmente utiliza protoplastos como alvo para a transformação, a permeabilidade da membrana plasmática é aumentada por aplicação de pulsos elétricos, permitindo que o DNA exógeno penetre nas células. Porém, ainda existem sérios problemas quanto à eficiência de regeneração de plantas a partir de protoplastos, podendo ocorrer a redução da fertilidade nas plantas regeneradas (RHODES *et al.*, 1989), além de existirem várias espécies ainda recalcitrantes (FISK & DANDEKAR, 1993). Por sua vez, a transferência de genes mediada por *Agrobacterium* tem sido bastante utilizada, ressurgindo o interesse nessa técnica nos últimos anos, devido à conveniência e à alta probabilidade de integração de uma ou poucas cópias do gene introduzido (WALDEN & WINGENDER, 1995). O sistema é simples, de baixo custo e, em muitos casos, eficiente. Várias espécies têm sido transformadas por esse sistema (FISK & DANDEKAR, 1993), embora, para algumas espécies, o número de eventos de transformação ainda seja reduzido.

A maioria das monocotiledôneas e algumas dicotiledôneas são susceptíveis à transformação por *Agrobacterium*, sendo necessário aumentar a frequência de eventos de transformação nessas plantas através da manipulação da bactéria e do tecido alvo. O uso rotineiro da acetoseringona, indutor da transferência do T-DNA (STACHEL *et*

*al.*, 1985) adicionada ao meio de co-cultivo, bem como modificações nos vetores binários têm promovido o aumento da eficiência de transformação em arroz (HIEI *et al.*, 1994) e milho (ISHIDA *et al.*, 1996).

O ferimento parece ser um componente importante na transformação mediada por *Agrobacterium*. A injúria do tecido facilita a infecção pela bactéria, além de produzir indutores do processo de transferência de T-DNA (STACHEL *et al.*, 1985). O tipo do ferimento varia desde a simples manipulação do tecido (HORSCH *et al.*, 1985) ao ferimento obtido através do bombardeamento do tecido alvo com partículas de tungstênio (BIDNEY *et al.*, 1992; ROSTE, 1998). Embora a frequência de transformação tenha sido aumentada a partir dessas modificações, ainda é necessário otimizar a eficiência do processo.

Recentemente, foi proposto o uso de pulsos de ultra-som para ferir e modificar o tecido alvo, visando o aumento da infecção por *Agrobacterium*. Essa técnica foi denominada de SAAT (Transformação mediada por *Agrobacterium* e Ultra-som; TRICK & FINER, 1997) e tem gerado expectativas quanto a maior eficiência na transferência de genes usando *Agrobacterium*. Este trabalho tem por objetivo apresentar uma técnica alternativa para transferência de DNA em plantas, utilizando ultra-som e *Agrobacterium*.

## ULTRA-SOM E CÉLULAS VEGETAIS

O efeito mais expressivo do ultra-som é a cavitação acústica. Dois fenômenos de cavitação acústica foram descritos. O primeiro descreve a cavitação transiente ou de colapso, onde "microbolhas" são formadas e crescem até implodir, gerando pressão e temperatura altas durante os estágios finais do colapso. A onda de choque de alta pressão que emana do lugar antes ocupado pela bolha é capaz de causar danos às células ou macromoléculas circundantes (JOERSBO & BRUNSTEDT, 1992).

O outro fenômeno, a cavitação estável, consiste em amplas e rápidas oscilações no tamanho da bolha. Isso ausa um forte fluxo de líquidos no meio que a circunda. Esse processo é conhecido como "micro-corrente". Baixas velocidades dessa micro-corrente resultam na mistura do meio circundante, enquanto altas velocidades podem ocasionar danos às células (FRIZZELL, 1988).

Um dos resultados imediatos da aplicação do ultra-som de alta intensidade é o rompimento celular. Entretanto, a exposição das células a baixas intensidades ou doses subletais tem revelado outros efeitos no metabolismo e estrutura celular (JOERSBO & BRUNSTEDT, 1990). A aplicação de

ultra-som apresenta efeitos químicos, bioquímicos e fisiológicos. Nos sistemas biológicos, os efeitos químicos do ultra-som envolvem a formação de radicais livres, que são formados nos estágios finais de cavitação transiente (MAKINO *et al.*, 1982). Aparentemente, em estudos com células de mamíferos, os radicais livres liberados não são os responsáveis pelo rompimento celular, já que o tratamento das células, com um sequestrador desses radicais, não aumentou a eficiência de plaqueamento das mesmas. No entanto, os radicais livres podem ter efeito na capacidade de divisão das células intactas remanescentes, por afetar a integridade das membranas (FU *et al.*, 1979).

A exposição das células ao ultra-som pode causar a degradação de macromoléculas, tais como, polissacarídeos, proteínas, DNA e, provavelmente, RNA. MILLER *et al.* (1976) observaram a inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas em meristemas radiculares de *Pisum sativum*, logo após a exposição a 1 minuto de ultra-som (1MHz; 30 Watts/cm<sup>2</sup>). A síntese de RNA e de proteínas foi diminuída em 60 a 70% 1 hora após a exposição, mas foi recuperada 4 horas mais tarde. De maneira similar, o índice mitótico foi reduzido depois do tratamento de ultra-som e recuperado após 6 a 7 horas.

Os efeitos fisiológicos do ultra-som estão relacionados à parede celular, à membrana plasmática e ao crescimento. MILLER *et al.* (1974) relataram a ocorrência de ruptura nas paredes celulares na zona de alongamento da raiz primária de *Vicia faba* em resposta ao ultra-som. As observações histológicas demonstraram um grau mais alto de dano na face das células que estava orientada em direção ao transdutor.

BLEANEY & OLIVER (1972) trataram plântulas de *Vicia faba* com ultra-som de 1,5 MHz em intensidade, variando de 1 a 4 Watts/cm<sup>2</sup> durante períodos de 2 a 60 minutos. Foi observado um decréscimo de crescimento com o aumento do tempo e intensidade da exposição. O decréscimo foi máximo no primeiro dia após o tratamento, porém o crescimento foi recuperado ao longo de oito dias. Esses resultados sugeriram a possibilidade de estar havendo alterações temporárias nas células em divisão no meristema e nas regiões de alongamento celular.

A transferência de genes para células vegetais tem sido mediada por tratamentos de ultra-som. Resultados positivos foram obtidos, utilizando protoplastos, suspensões celulares e pedaços intactos de tecidos. O método emprega os mesmos princípios básicos, independente da natureza do material vegetal a ser transformado. Nessa técnica, os tecidos vegetais em suspensão podem ser submetidos ao

tratamento de ultra-som em um tubo de microcentrífuga com baixo volume de solução (tampão ou meio de cultura), contendo o DNA a ser introduzido nas células.

JOERSBO & BRUNSTEDT (1990) obtiveram a introdução de DNA exógeno em protoplastos de *Nicotiana tabacum* e *Beta vulgaris* através da aplicação de pulsos de ultra-som 20KHz a 0,5-1,5 Watts/cm<sup>2</sup> de potência acústica. Para *Beta vulgaris*, a frequência de expressão transiente do gene introduzido foi maior utilizando ultra-som do que a obtida com eletroporação.

Até o presente momento, o mecanismo da permeabilização acústica não está completamente esclarecido. Parece estar relacionado ao violento colapso das bolhas, gerando pressão e temperatura altas. Isso poderia causar ruptura localizada do plasmalema e levar à absorção das substâncias dissolvidas na solução onde as células se encontram, com a posterior restauração da integridade da membrana (JOERSBO & BRUNSTEDT, 1992).

ZHANG *et al.* (1991) obtiveram a integração estável do gene da p-glucuronidase (GUS) em tecidos foliares de *Nicotiana tabacum* através do ultra-som. Neste trabalho, foi indispensável a adição de DNA carregador e os resultados indicaram que a presença de dimetilsulfóxido (DMSO) na solução tampão para o tratamento de ultra-som aumentou a expressão transiente do gene repórter.

## SAAT

A técnica de transformação genética mediada por ultra-som e *Agrobacterium* (SAAT) foi primeiramente proposta por TRICK & FINER (1997), consistindo no tratamento de tecidos vegetais com ultra-som antes ou durante a inoculação desses tecidos com *Agrobacterium*. Várias espécies, que apresentavam baixas frequências de transformação com os outros métodos de introdução de DNA exógeno, tiveram a eficiência do processo aumentada quando foram tratadas com SAAT (TRICK & FINER, 1997). Foi obtido sucesso com essa técnica em monocotiledôneas (*Triticum aestivum* e *Zea mays*), em dicotiledôneas (*Glycine max* e *Vigna unguiculata*) e na gimnosperma *Picea glauca*.

No trabalho pioneiro, utilizando SAAT, os autores relataram o uso de tecido foliar de caupi, embriões imaturos de *Zea mays*, sementes de *Triticum aestivum* e *Picea glauca* como explantes iniciais para a aplicação de pulsos de ultra-som (55KHz). Os pulsos de ultra-som variaram de 2 a 100 segundos, dependendo da espécie testada. Neste trabalho, foi utilizada uma suspensão de *Agrobacterium tumefaciens*, cepa EHA105 (HOOD

*et al.*, 1993), contendo os plasmídeos pIG121Hm (HIEI *et al.*, 1994) ou Vec035 (BECKER, 1990; VANCANNEYT *et al.*, 1990). Em todos os tecidos testados, o tratamento com SAAT aumentou os níveis de expressão transitória do gene GUS. Na maioria dos tecidos inoculados com *Agrobacterium* e sem SAAT, a expressão transitória do gene GUS foi muito baixa ou nula. Aplicando-se pulsos de ultra-som, a expressão aumentou de 100 a 1400 vezes, dependendo da espécie.

Os tecidos submetidos à SAAT foram analisados por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, revelando a formação de grande quantidade de microferimentos na superfície dos tecidos e microcanaís que permitiram o acesso da bactéria a tecidos subepidérmicos. De maneira geral, a extensão dos ferimentos tornou-se maior à medida que a duração do pulso de ultra-som aumentou, variando de 1µm a 1mm. Acredita-se que o aumento significativo na expressão do gene repórter obtido em tecidos tratados com SAAT, é consequência dos ferimentos resultantes da cavitação promovida pelo ultra-som (TRICK & FINER, 1997).

Utilizando cotilédones imaturos de soja, SANTARÉM *et al.* (1998) demonstraram a eficiência da técnica SAAT quanto à expressão transiente do gene GUS. Variações na densidade óptica da suspensão bacteriana, duração do tratamento de ultra-som e tempo de co-cultivo foram alguns dos parâmetros testados para maximizar a expressão transitória do gene repórter. As melhores condições de tratamento e cultivo foram pulsos de 2 segundos de ultra-som,  $DO_{600nm}$  0,1 e 3 dias de cultivo em presença de acetoseringona, resultando em 22% da superfície do explante com expressão do gene GUS. A duração dos pulsos de ultra-som parece ter sido o parâmetro que mais afetou a expressão transitória. Quanto mais longo o pulso, maior a área do cotilédone com setores azuis. Porém, quando tratamentos mais longos que 5 segundos foram aplicados, a competência para a formação de embriões somáticos, a partir dos cotilédones, foi diminuída ou eliminada.

Para obtenção de clones, estavelmente transformados, foi necessário realizar um estudo para otimizar a expressão transiente, reduzindo o dano causado ao tecido pelo ultra-som. Sendo assim, testou-se a incubação do tecido com manitol (0,4M), para promover uma desidratação parcial do tecido alvo. Os níveis de injúria causados pelo ultra-som foram estimados medindo a densidade óptica da solução bacteriana em 400nm, após os tratamentos dos tecidos cotiledonares com ultra-som. Os tratamentos de longa duração (acima de 5 segundos)

resultaram em densidades ópticas mais altas, sugerindo maior extravasamento dos conteúdos celulares. Quando os tecidos foram submetidos a ultra-som, imersos em meio contendo manitol, o ferimento observado nos cotilédones foi menor, indicado pelo decréscimo da densidade óptica da suspensão bactéria/exsudado (SANTARÉM *et al.*, 1998). As observações realizadas, utilizando microscopia eletrônica de varredura, indicaram que o tratamento de ultra-som na presença de manitol resultou em menor dano ao tecido cotiledonar, quando comparado àquele tratamento sem condicionamento osmótico. Entretanto, a expressão transiente de GUS também foi reduzida com essas condições (SANTARÉM *et al.*, 1998). O meio com manitol poderia estar causando a plasmólise celular. Sendo assim, a perda da turgidez das células poderia estar diminuindo a cavitação e, conseqüentemente, o nível de ferimento causado pelo ultra-som, reduzindo assim a expressão transiente (SANTARÉM *et al.*, 1998).

Uma maneira de reverter este problema consistiu em utilizar tecidos mais resistentes ao tratamento com ultra-som, como tecido embriogênico. A transformação de tecidos embriogênicos de soja, cultivados em sistema líquido, foi descrita por TRICK & FINER (1998). Os tratamentos com pulsos de 30 segundos de ultra-som resultaram na expressão transiente de GUS de, aproximadamente, 100 focos azuis por agregado de embriões somáticos. Esse nível de expressão é semelhante àquele obtido quando a técnica de bombardeamento de partículas foi utilizada (VAIN *et al.*, 1993). O crescimento do tecido embriogênico foi inicialmente reduzido cerca de 30%, como resultado do uso de ultra-som. Porém, após duas semanas, a taxa de crescimento foi recuperada assemelhando-se a tecidos não tratados (TRICK & FINER, 1998). As análises moleculares confirmaram a transformação estável do tecido embriogênico de soja e plantas transgênicas foram regeneradas. Contudo, plantas transformadas e plantas controle apresentaram redução de fertilidade, fenômeno já relatado anteriormente, quando culturas em suspensão foram usadas como tecido alvo para a transformação (HADI *et al.*, 1996). Esse sistema de cultura em meio líquido apresenta a desvantagem de requerer um período prolongado de cultura para estabelecer células competentes para a transformação, podendo acarretar uma redução da fertilidade ou completa esterilidade. Dessa maneira, estudos futuros serão necessários para otimizar a aplicação dessa técnica em tecidos de rápida proliferação *in vitro* e pouco susceptíveis à injúria causada pelo ultra-som, de modo a garantir a regeneração de plantas férteis transformadas.

## CONCLUSÃO

SAAT consiste em uma técnica alternativa para a transformação de plantas. Através dos microferimentos gerados pela aplicação de pulsos curtos de ultra-som, a *Agrobacterium* pode, eficientemente, atingir tecidos epidérmicos e subepidérmicos, aumentando a frequência de eventos de transformação. Sendo assim, a aplicação de ultra-som concomitante com *Agrobacterium* poderá viabilizar a transformação de uma maior variedade de tecidos e espécies.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKER, D. Binary vectors which allow the exchange of plantselectable markers and repórtter genes. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 18, p.203,1990.
- BIDNEY, D., SCELONGE, C.; MARTICH, J., *et al.* Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.18, p.301-313, 1992.
- BLEANEY, B.I., OLIVER, R. The effect of in-adiation of *Vicia faba* roots with 1.5 MHz ultrasound. **British Journal Radiology**, London, v.45, p.358-361, 1972.
- 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. v.2. p.679-736.
- DE BLOCK, M. The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implications for plant breeding. *Euphytica*, Wageningen, v.71,p.1-14, 1993.
- DONN, G., NILGES, M., MOROCZ, S. Stable transformation of maize with a chimaeric, modified phosphotricin-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes*. m: NUKAMP, H.J.J. **Progress in plant ceUular and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer, 1990. p.53.
- DROSTE, A. **Embriogênese somática, transformação e regeneração de plantas férteis de cultivares brasileiras de soja [Glycine max (L.) Merril]**. Porto Alegre, RS, 1998. 105p. Tese (Doutorado em genética e biologia molecular) - Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.
- FINER, J.J., FINER, K.R., SANTARÉM, E.R. Physical methods for plant cell transformation. m: MEYERS, R.A. **Encyclopedia of molecular miology and molecular medicine**. Weinheim : VCH, 1996. p.458-465.
- FISK, H.J., DANDEKAR, A.M. The introduction and expression of transgenes in plants in plants. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v.55, p.5-36, 1993.
- FRIZZEL, L.A. Biological effects of acousdc cavitation. In: SUSLICK, K. **Ultrasound, its chemical, physical and biological effects**. Weinheim: VCH, 1988. p.287-303.
- FU, Y-K., KAUFMAN, G.E., MILLER, M.W., *et al.* Modificadon of cysteamine of ultrasound lethality to Chinese hamster V-79 cells. **Radiation Research**, New York, v.80, p.575-580,1979.
- HADI, M.Z., MCMULLEN, M.D., FINER, J.J. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, p.500-505, 1996.
- HIEI, Y., OHTA, S., KOMARI, T. *et al.* Efficient transformation of rice (*Oriw sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **Plant Journal**, Oxford, v.6, p.271-282,1994.
- HOOD, E.E., GELVIN, S.B., MELCHERS, L.S. *et al.* New *Agrobacterium* helper strains for gene transfer to plants. **Transgenic Research**, Dordrecht, v.2, p.208-218,1993.
- HORSCH, R.B., FRY, J.E., HOFFMAN, N.L., *et al.* A simple and general method for transfemng genes into plants. **Science**, Washington, v.221,p.1229-1231,1985.
- ISHIDA, Y., SAITO, H., OHTA, S., *et al.* High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v.14, p.745-750,1996.
- JOERSBO, M. BRUNSTEDT, J. Direct gene transfer to plant protoplast by mild sonication. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.9, p.207-210,1990.
- JOERSBO, M., BRUNSTEDT, J. Sonication: a new method for gene transfer to plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.85,p.230-234,1992.
- MAKINO, K., MASSOBA, M.M., RIESZ, P. Chemical effects of ultrasound on aqueous solution. **Journal of American Chemistry Sodyety**, Easton, v.104, p.3537-3539,1982.
- MILLER, M.W., CIARAVINO, V., ALLEN, D., *et al.* Effect of 2MHz ultrasound on DNA, RNA and protein synthesis in *Pisum sativum* root meristem cells. **International Journal Radiation Biology**, London, v.30, p.217-222,1976.
- MILLER, M.W., VOORHEES, S.M., CARTENSEN, E.L., *et al.* An histological study of the effect of ultrasound on growth of *Vicia faba* roots. **Radiation Botany**, London, v.14, p.201-206,1974.
- RHODES, C.A., PIERCE, D.A., METTLER, I.J., *et al.* Genetically transfonned maize plants from protoplasts. **Science**, Washington, v.240, p.204-207,1989.
- SANTARÉM, E.R., TRICK, H.N., ESSIG, J.S., *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.
- SIEMENS, J., SCHIEDER, O. Transgenic Plants: genetic transformation-recent developments and the state of art. **Plant Tissue Culture & Biotechnology**, Rehovot, v.2, p.66-75, 1996.
- 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.

- TRICK, H.N., FINER, J.J. SAAT: Sonication assisted *Agrobacterium-mediated* transfection. **Transgenic Research**, Dordrecht, v.6, p.329-337, 1997.
- TRICK, H.N., FINER, J.J. Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transfection of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.17, p.482-488, 1998.
- VAIN, P., MCMULLEN, M.D., FINER, J.J. Osmotic treatment enhances particle bombardment mediated transient and stable transfection of maize. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.2, p.84-88, 1993.
- VANCANNEYT, G., SCHMIDT, R., O'CONNOR-SANCHEZ, A., *et al.* 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 transfection. **Molecular General Genetics**, Berlin, v.220, p.245-250, 1990.
- WALDEN, R., WINGENDER, R. Gene-transfer and plant-regeneration techniques. **Tibtech**, Cambridge, v.13, p.324-331, 1995.
- ZHANG, L-J., CHENG, L-M., XU, N., *et al.* Efficient transformation of tobacco by ultrasonication. **Biotechnology**, New York, v.9, p.996-997, 1991.

**Ciência Rural, v. 30, n. 4, 2000.**