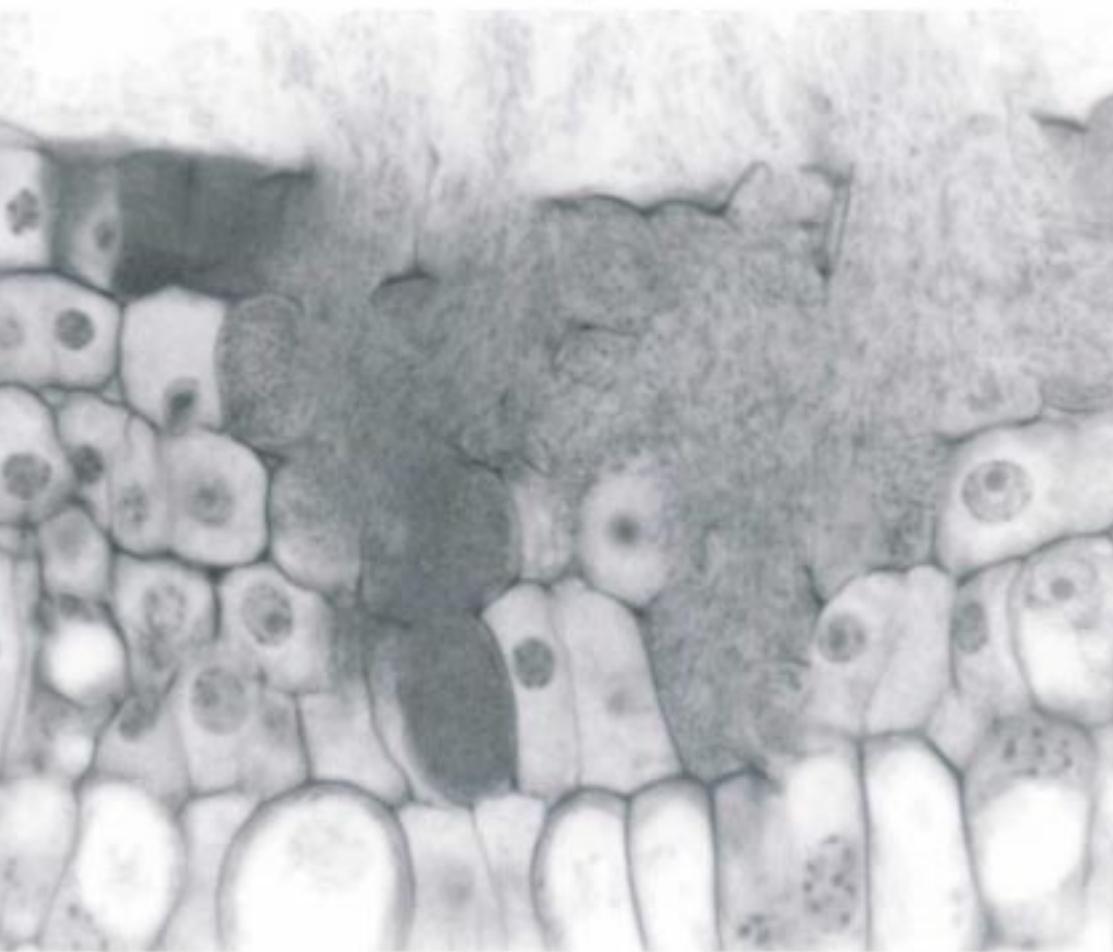


**Avaliações da Infecção de Explantes de Feijoeiro por *Agrobacterium tumefaciens* por meio de Microscopia**



# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 4***

## **Avaliações da Infecção de Explantos de Feijoeiro por *Agrobacterium tumefaciens* por meio de Microscopia**

Solange Rocha M. Andrade  
Beatriz A. Glória  
Mônica T. V. Labate  
Danielle G. Gomes  
Carlos A. Labate

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Cerrados**

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73301-970 Planaltina - DF

Fone: (61) 388-9898

Fax: (61) 388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

[sac@cpac.embrapa.br](mailto:sac@cpac.embrapa.br)

**Comitê de Publicações**

Presidente: *Ronaldo Pereira de Andrade*

Secretária-Executiva: *Nilda Maria da Cunha Sette*

Membros: *Maria Alice Bianchi, Leide Rovênia Miranda de Andrade, Carlos Roberto Spehar, José Luiz Fernandes Zoby*

Supervisão editorial: *Nilda Maria da Cunha Sette*

Revisão de texto: *Maria Helena Gonçalves Teixeira /  
Jaime Arbués Carneiro*

Normalização bibliográfica: *Maria Alice Bianchi*

Capa: *Chaile Cherne Soares Evangelista*

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*

**1ª edição**

1ª impressão (2001): tiragem 300 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).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.  
Embrapa Cerrados.

---

A94S Avaliações da Infecção de explantes de feijoeiro por *Agrobacterium tumefaciens* por meio de microscopia / Solange Rocha M. de Andrade ... [et al.]. – Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2001. 15 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X ; n.4)

1. Genética vegetal - Feijão. 2. *Phaseolus vulgaris*. 3. Infecção - Feijão - *Agrobacterium tumefaciens*. I Andrade, Solange Rocha M. II. Série.

632.8 - CDD 21

# Sumário

Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução .....	7
Material e Métodos .....	8
Resultados .....	9
Agradecimentos .....	14
Referências Bibliográficas .....	14

# Avaliações da Infecção de Explantes de Feijoeiro por *Agrobacterium tumefaciens* por meio de Microscopia

---

Solange Rocha M. Andrade; Beatriz A. Glória<sup>2</sup>;  
Mônica T. V. Labate<sup>3</sup>; Danielle G. Gomes<sup>4</sup>;  
Carlos A. Labate<sup>5</sup>

**Resumo** - *Phaseolus vulgaris* L. é considerado recalcitrante à transformação por *Agrobacterium tumefaciens*. Contudo, alterações no meio de co-cultivo, utilização de linhagens hipervirulentas de *Agrobacterium* e de vetores binários contendo genes *vir* demonstraram que o feijoeiro é susceptível a essa bactéria. O objetivo do presentetrabalho foi estudar o efeito da sonicação nos tecidos vegetais de feijoeiro, bem como a penetração da *Agrobacterium* nas camadas subepidérmicas do tecido vegetal, usando a metodologia SAAT ("Sonication-Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation"). A variedade de feijoeiro utilizada foi a Olathe Pinto, a linhagem de *A. tumefaciens* foi LBA4404:pTOK. Os embriões de feijão foram pré-tratados por 14 dias em meio de multibrotação e, então submetidos à sonicação (de 0 ou 60 segundos) na presença de *Agrobacterium*. Após a inoculação foram co-cultivados por 24 horas em meio líquido seguido de 48 horas em meio sólido, ambos, contendo 20 m.L<sup>-1</sup> de acetoceringona. Os explantes inoculados foram fixados em solução de Karnovsky para as avaliações em microscopia óptica e eletrônica de varredura. As análises da microscopia demonstraram a presença de rupturas na epiderme, quebras da parede celular e invasão da *Agrobacterium* nos tecidos subepidérmicos. Os resultados demonstram que o método SAAT é uma técnica viável para a inoculação de *Agrobacterium* em explantes de *P. vulgaris*.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, feijão, transformação genética.

---

<sup>1</sup> Biól. Ph.D., Embrapa Cerrados, solange@cpac.embrapa.br

<sup>2</sup> Eng. Agrôn., Ph.D., ESALQ/USP, bagloria@carpa.ciagri.usp.br

<sup>3</sup> Eng. Agrôn., Ph.D., ESALQ/USP, mtvlabate@carpa.ciagri.usp.br

<sup>4</sup> Eng. Agrôn., bolsista do convênio FAPESP, dggomes@carpa.ciagri.usp.br

<sup>5</sup> Eng. Agrôn., Ph.D., ESALQ/USP, calabate@carpa.ciagri.usp.br

# Evaluation of Common Bean Explant Infection by *Agrobacterium tumefaciens* Through Microscopy

---

**Abstract** - *Phaseolus vulgaris* L. is considered recalcitrant to *Agrobacterium*-mediated transformation. However, co-culture medium modifications, the use of *Agrobacterium* hipervirulent strains and binary vectors with *vir* genes have demonstrated that the common bean is susceptible to *Agrobacterium*. However, there are no reports of transgenic beans having been produced by this method. The objective of this work was to study the effect of sonication on common bean tissues, as well as the sub-epidermic invasion of *Agrobacterium* in the vegetal tissue using SAAT (Sonication-Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation) method. The bean variety used was the Olathe Pinto, and the *Agrobacterium tumefaciens* strain was LBA4404:pTOK. The mature bean embryos were pre-treated for 14 days in a cytokinin-induced shoot organogenesis medium and then submitted to SAAT for 0 or 60 seconds. Inoculated explants were co-cultivated in a liquid medium for 24 hours followed by 48 hours in a solid medium, both supplemented with 20 m.L<sup>-1</sup> of acetosyringone. After inoculation, explants were fixed in Karnovsky solution for the optic and electronic microscopy evaluation. The microscopy analyses demonstrated the presence of ruptures in the epiderm and the cellular walls and the invasion of *Agrobacterium* in the sub-epidermics tissues. The results demonstrated that the SAAT method is a viable technique for *Agrobacterium* inoculation of *P. vulgaris* explants.

*Index terms:* transformation, SAAT, common bean, genetic

## Introdução

*Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes* são bactérias fitopatogênicas capazes de induzir, respectivamente, a formação de galha-da-coroa "crown gall" e a síndrome da raiz em cabeleira ("hairy root") em algumas espécies de dicotiledôneas. A formação da galha-da-coroa, bem como a síndrome da cabeleira-da-raiz, é resultado de um processo natural de transferência de um fragmento de DNA (T-DNA) da bactéria para a célula vegetal. Esse T-DNA integra-se no genoma nuclear da planta e é expresso de maneira estável. A infecção inicia-se pela penetração da bactéria no tecido vegetal por meio de um ferimento causado por insetos, danos mecânicos, tratos culturais, etc. As células lesadas produzem fenóis, açúcares e aminoácidos que funcionam como moléculas-sinal para a *Agrobacterium*, induzindo os genes *vir*, que é uma etapa primordial para a transferência do T-DNA.

A descoberta desse método natural de transferência de DNA foi o passo inicial para os estudos de transformação de plantas. Cientistas, utilizando técnicas de engenharia genética, desenvolveram plasmídios desarmados para transferência de genes de interesse. Esses plasmídios continham os genes *vir*, responsáveis pela transferência do T-DNA, no entanto, foram deletados os genes oncogênicos, responsáveis pelo tumor.

Embora, aparentemente simples, a técnica de transformação via *Agrobacterium* apresenta algumas limitações e, a principal, refere-se ao hospedeiro. No entanto, estudos recentes relatam a susceptibilidade de espécies consideradas recalcitrantes a *Agrobacterium*, como o milho, arroz e o feijão ([Brasileiro & LAcorte, 1998](#)). Segundo [Trick & Finer \(1997\)](#), tanto a bactéria quanto o tecido-alvo podem ser manipulados para se obter a transformação dessas espécies. Por exemplo, modificações no vetor binário da *Agrobacterium* possibilitou a transformação eficiente do arroz e do milho. A adição de antioxidantes no meio do co-cultivo aumentou as taxas de transformação pela redução da hipersensibilidade. Além disso, diferentes métodos de ferimento do tecido-alvo também têm sido empregados para aumentar a infecção por *Agrobacterium*, pois o ferimento é um ponto primordial para a transferência do T-DNA, uma vez que a bactéria reconhece sinais específicos produzidos pelas células feridas ([Baron & Zambryski, 1995](#); [Godwin et al., 1992](#)).

A técnica SAAT consiste em produzir microferimentos no explante por meio da sonicação por curtos períodos de tempo. Segundo [Trick & Finer \(1997\)](#), o aumento da expressão transitória da  $\beta$ -glucoronidase, em resposta ao tratamento

SAAT, é causado pelos microferimentos induzidos pela cavitação, os quais facilitam a penetração da *Agrobacterium* nos tecidos internos do explante. A cavitação pode ser transitória ou estável e, provavelmente, ambos os mecanismos ocorrem durante a sonicação dos tecidos. O objetivo deste trabalho foi estudar, por meio de microscopia, o efeito dos ferimentos causados pela sonicação de explantes de feijoeiro, com o intuito de utilizar a técnica SAAT para transformação de feijoeiro.

## Material e Métodos

### Material vegetal e explantes vegetais

Sementes de *Phaseolus vulgaris* cv. Olathe Pinto foram multiplicadas em uma mistura de substrato e vermiculita (1:1), em casa de vegetação. Após a colheita, foram lavadas em álcool 70% por 5 minutos e imersas por 15 minutos em hipoclorito de sódio a 1%. A seguir, foram enxaguadas abundantemente em água deionizada estéril e incubadas por 18 a 20 horas em água estéril, à temperatura ambiente.

Após esse período, as sementes foram abertas, os embriões excisados, desinfetados por 5 minutos em hipoclorito de sódio a 0,1% e enxaguados abundantemente em água deionizada estéril. Parte da radícula foi cortada e o meristema apical exposto, cortando-se as folhas primárias (Aragão et al., 1996). Os explantes foram inoculados com *Agrobacterium* após o pré-tratamento por 14 dias em meio de multibrotação (MS3% contendo 44,3 µm de BAP).

### Linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* e aparelho de sonicação

Utilizou-se a linhagem LBA4404 a qual contém o plasmídeo pTiAch5 (Hoekema et al., 1993) e o vetor binário pTOK 233 (Ishida et al., 1996), incluindo o gene *uidA*, interrompido por uma seqüência INTRON (GUS-INTRON) e os genes *nptII* e *hpt*. O gene *uidA* expressa para a proteína β-glucuronidase e o gene *nptII* induz a resistência ao antibiótico canamicina e geneticina e o *hpt*, resistência à higromicina.

A *Agrobacterium* foi cultivada em meio AB, acrescido de 50 mg.L<sup>-1</sup> de canamicina e 100 mg.L<sup>-1</sup> de higromicina a 28 °C até a obtenção de uma densidade óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) entre 0,7-0,8. Em seguida, foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos e ressuspensa em meio de multibrotação líquido, sempre em volume igual ao de cultivo.

Utilizou-se o sonicador ULTRA-SON, Modelo T14, 40 kHz (Thornton INPEC Eletrônica, Piracicaba - SP).

## Microscopia eletrônica de varredura

Os explantes, submetidos à sonicação por 0 a 60 segundos em 25 mL de suspensão de *Agrobacterium*, foram co-cultivados por 24 horas em meio de inoculação (meio de multibrotação contendo *Agrobacterium*) líquido, contendo acetoceringona (20 mg.L<sup>-1</sup>), seguido de 48 horas de co-cultivo em meio de multibrotação sólido, acrescido de acetoceringona (20 mg.L<sup>-1</sup>). Após esse período, foram fixados em solução Karnovsky ([Karnovsky, 1965](#)), seguido de 20 horas de pós-fixação em vapor de tetróxido de ósmio. Desidratados em câmara contendo sílica gel por uma hora e metalizados por 200 segundos (MED 010, Balzers) e imediatamente analisados em microscópio de varredura (Zeiss DSM 940A).

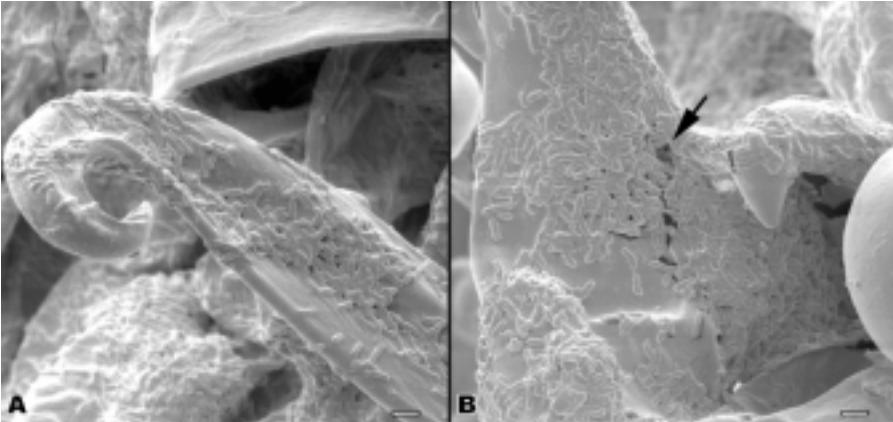
## Microscopia óptica

Explantes inoculados, conforme descrito, foram fixados em solução de Karnovsky ([Karnovsky, 1965](#)), desidratados em série etílica (10% a 100%) e infiltrados com resina glicol metacrilato (Reichert-Jung). As amostras foram seccionadas com 5 µm de espessura em micrótomo (RM2045, Leica), coradas em solução de azul de toluidina a 0,1% por 15 minutos e montadas em entelan (Merck).

## Resultados

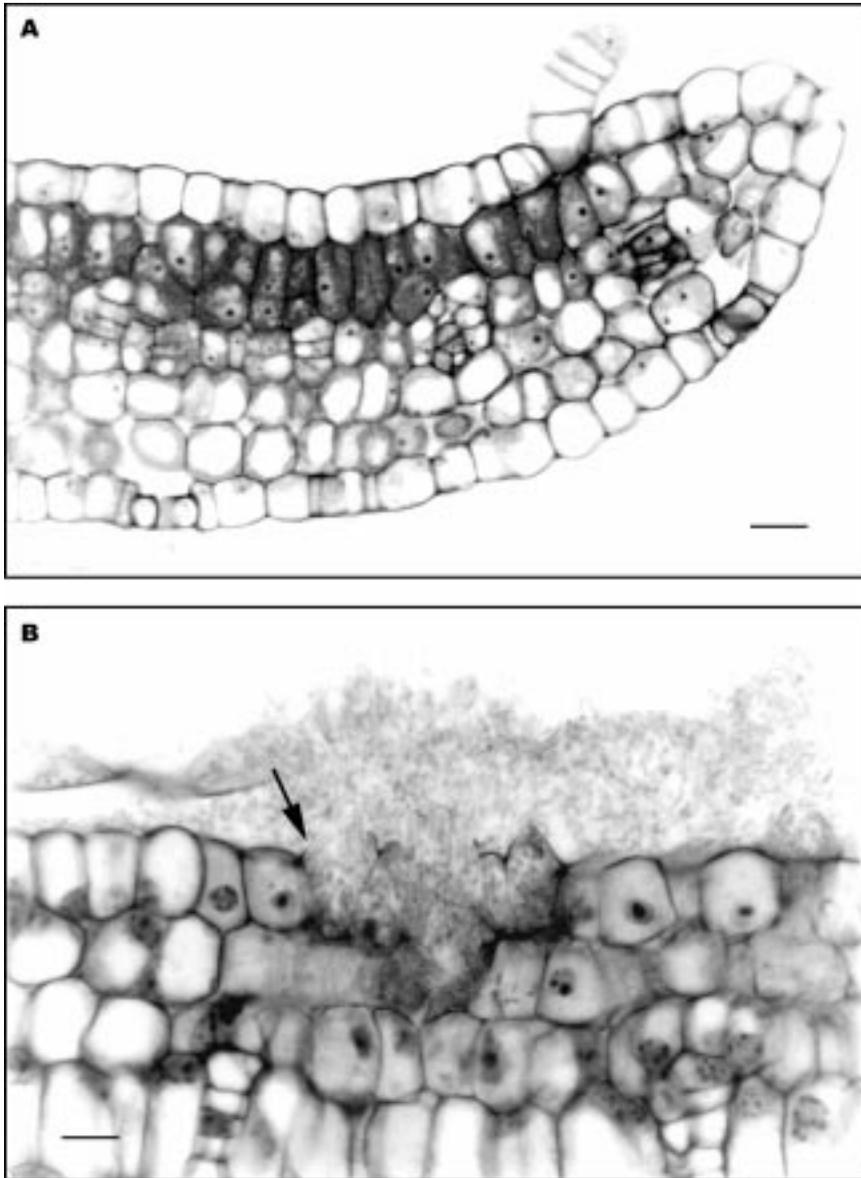
As análises de microscopia óptica e de varredura demonstraram que o tratamento de sonicação causa microferimentos na superfície do tecido vegetal ([Figuras 1 e 2](#)). No explante não-sonicado, a epiderme funciona como uma barreira à *Agrobacterium* ([Figuras 1A e 2A](#)), no material tratado apresenta microfissuras que permitem a invasão da *Agrobacterium* ([Figuras 1B e 2B](#)), conforme descrito por [Trick & Finer \(1997\)](#). Segundo esses autores os microferimentos podem variar de 1 µm até 1 mm, dependendo da intensidade do tratamento. Essa amplitude é suficiente para permitir a invasão da *Agrobacterium* no interior das células ou nos espaços intercelulares do tecido vegetal ([Figuras 1B e 2B](#)).

[Trick & Finer \(1997, 1998\)](#) também observaram, através da microscopia de varredura, que a superfície do tecido tratado apresentava microfissuras que permitiam o acesso da *Agrobacterium* ao mesófilo, ao contrário do que acontecia com os primórdios foliares não-tratados.

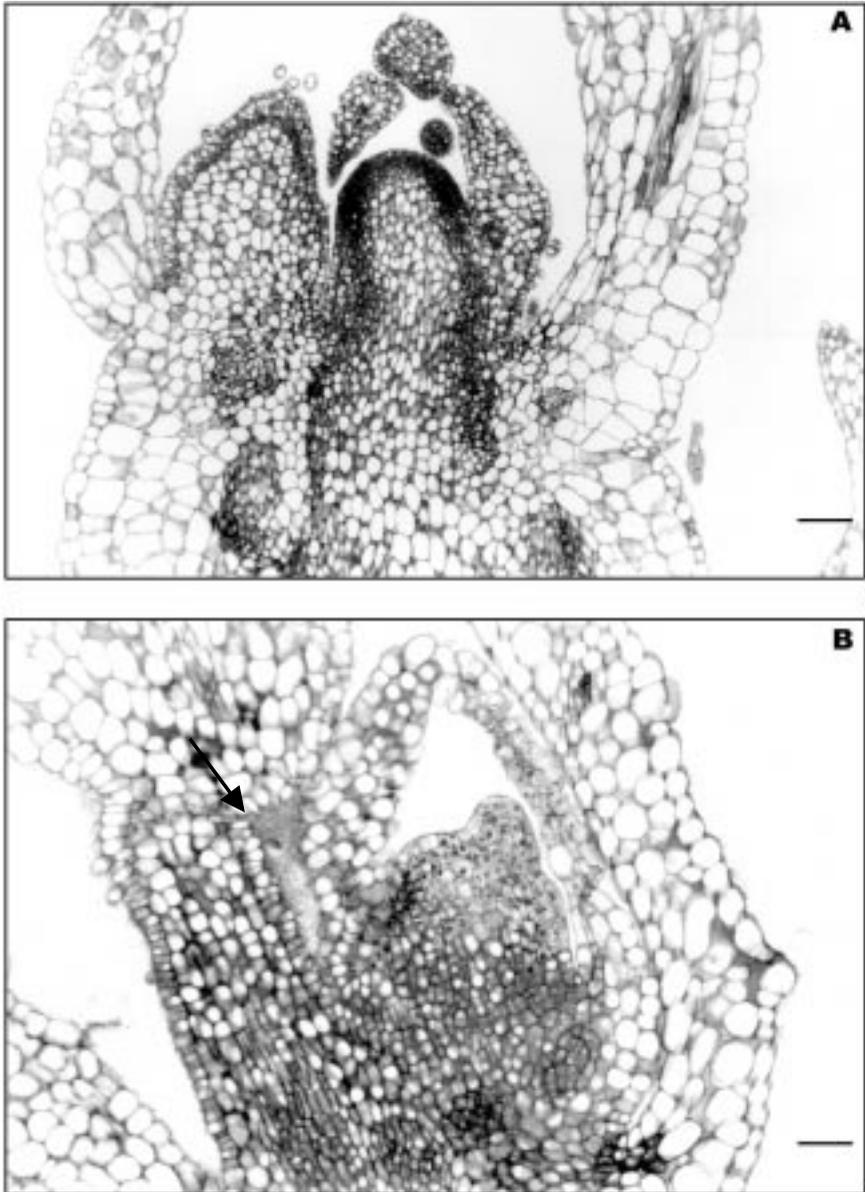


**Figura 1.** Análise da superfície dos primórdios foliares de explante de feijoeiro ao microscópio de varredura, 14 dias após pré-tratamento em meio de multibrotação. **A** = não-sonicado, inoculado (barra = 5  $\mu\text{m}$ ); **B** = sonicado 60 segundos, inoculado (barra = 5  $\mu\text{m}$ ), a seta indica a microfissura e a invasão da *Agrobacterium*.

A sonicação altera o quimiotactismo da *Agrobacterium* pelo explante ([Figuras 1 e 3](#)), inclusive, sendo possível observar a proximidade da bactéria nas regiões meristemáticas ([Figura 4](#)). A sonicação causa rompimento na parede celular, o que permite a invasão da *Agrobacterium* ([Figura 2B](#)). É possível observar células intactas próximas às regiões colonizadas ([Figuras 2 e 4](#)); como essas células são os possíveis alvos para a transferência do T-DNA, aumenta-se a extensão do tecido atingido, conseqüentemente, a eficiência da transformação. Resultado semelhante foi observado por [Trick & Finer \(1998\)](#) em soja. As paredes celulares do tecido embrionário não-tratado estavam intactas, não havendo invasão do mesófilo. Entretanto, o tecido tratado apresentava rupturas nas células epidérmicas e subepidérmicas, podendo ser observada a colonização da bactéria em ambos os tecidos, bem como células intactas na camada subepidérmica.

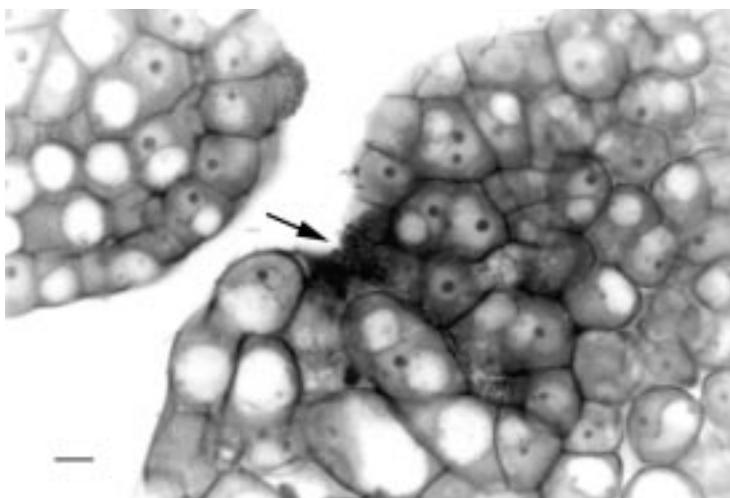


**Figura 2.** Cortes transversais de primórdios foliares do explante. A = controle, não-sonicada, inoculada (barra = 19  $\mu\text{m}$ ); B = sonicada por 60 segundos e inoculada, nos quais se observam células epidérmicas e subepidérmicas rompidas, apresentando *Agrobacterium* no seu interior (barra = 7,5  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 3.** Cortes longitudinais do ápice caulinar de feijoeiro (*P. vulgaris* L.) pré-tratado por 14 dias em meio de multibrotação. A = controle, não-sonicado, inoculado; B = sonicado 60 segundos, inoculado (barra = 74  $\mu$ m). A seta indica a presença da *Agrobacterium*.

A grande vantagem dessa técnica é que permite a colonização dos tecidos internos, possibilitando atingir tecidos-alvo como nós cotiledonares ou meristemas apicais que, em geral, costumam estar protegidos por diversas camadas celulares (Trick & Finer, 1997, 1998). Santarém et al. (1998) demonstraram que o tratamento SAAT não é genótipo específico, pois observaram o aumento da expressão transiente da  $\beta$ -glucuronidase em diferentes genótipos de soja tratados. Entretanto, existem diversos trabalhos que relatam diferentes respostas à transformação via *Agrobacterium* conforme a cultivar utilizada (Birch, 1997; Grant et al., 1993; Wordragen & Dons, 1992; Zupam & Zambryski, 1995). A resposta diferenciada à *Agrobacterium*, apresentada pelas cultivares, pode ser causada por reações diferentes ao estresse do ferimento (Wordragen & Dons, 1992), assim Santarém et al. (1998) consideram que a sonicação pode minimizar essas diferenças. Segundo Aragão & Rech (1993), alguns dos fatores que afetam a transformação de certas variedades de feijão é a impossibilidade de se atingir o meristema apical, pois este está protegido pelos primórdios foliares. A utilização do SAAT poderia resolver esse problema, pois usando o processo de sonicação a *Agrobacterium* pode atingir a região meristemática (Figura 4). Isso indica que a técnica SAAT tem potencial para a transformação das variedades comerciais brasileiras. No entanto, essa técnica precisa ser otimizada para essas variedades.



**Figura 4.** Detalhe do meristema apical caulinar do explante sonicado por 60 segundos em conjunto com *Agrobacterium*. A seta indica a presença da *Agrobacterium* na região do domo meristemático (barra = 7,5  $\mu$ m).

## Agradecimentos

Ao Dr. Francisco Aragão, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela cessão das sementes da variedade Olathe Pinto. Ao Dr. Antônio Figueira, CENA/USP, pela cessão da linhagem de *Agrobacterium*. Ao NAP/NEMA, ESALQ/USP, por permitir o desenvolvimento do trabalho de microscopia eletrônica de varredura e ao Departamento de Botânica que permitiu o desenvolvimento dos trabalhos de microscopia óptica.

## Referências Bibliográficas

ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, V.; 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 Applied Genetics**, New York, v. 93, p. 142-150, 1996.

ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E. L. Morphological factors influencing recovery of transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of carioca cultivar. **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 15, p. 157-163, 1993.

BARON, C.; ZAMBRYSKI, P. C. Notes from the underground: highlights from plant-microbe interactions. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 13, p. 356-362, 1995.

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

BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 75-92.

GODWIN, I. D.; FORDLLOYD., B. V.; NEWBURY, H. J. In vitro approaches to extending the host-range of *Agrobacterium* for plant transformation. **Australian Journal of Botany**, Victoria, v. 40, p. 751-763, 1992.

GRANT, J. E.; DOMMISSE, E. M.; CRHISTEY, M. C.; CONNER, A. J. Gene transfer to plants using *Agrobacterium*. In: MURRAY, D. R. (Ed.). **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Exon: CAB. International, 1993. v. 4, p. 50-73.

HOEKEMA, A.; HIRSCH, P. R.; HOOYKAAS, P. J. J.; SCHILPEROORT, R. A. A binary plant vector strategy based on separation of vir-region and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. **Nature**, London, v. 303, 1993. p. 179-180.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, p. 745-750, 1996.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137, 1965.

SANTARÉM, E. R.; TRICK, H. N.; E SSIG, J. S.; FINER, J. J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, p. 752-759, 1998.

TRICK, H. N.; FINER, J. J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. **Transgenic Research**, Philadelphia, v. 6, p. 329-336, 1997.

TRICK, H. N.; FINER, J. J. Sonication-assited *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, p. 482-488, 1998.

WORDRAGEN, M. F.; DONS, H. J. M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of recalcitrant crops. **Plant Molecular Biology Report**, v. 10, p. 12-36, 1992.

ZUPAN, J. R.; ZAMBRYSKI, P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. **Plant Physiology**, Bethesda, v.107, p.1041-1047, 1995.