

# **EXPRESSÃO TRANSITÓRIA DO GENE *GUS* EM MARACUJAZEIRO (*Passiflora giberti* N.E. BROWN) MEDIADA PELO BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS<sup>1</sup>**

Wagner Campos Otoni<sup>2</sup>  
Vicente Wagner Dias Casali<sup>3</sup>  
John Brian Power<sup>4</sup>  
Michael Raymond Davey<sup>4</sup>

## **1. INTRODUÇÃO**

A transformação genética tem sido obtida para muitas espécies de plantas, utilizando-se o mecanismo natural de transferência de genes com base no vetor *Agrobacterium* (8, 9, 10, 16, 28). A desvantagem deste sistema, no entanto, deve-se ao fato da especificidade em relação às dicotiledôneas (31). A eletroporação, por sua vez, tem sido extensivamente utilizada na mediação da transferência de genes (30, 37), independentemente de a espécie ser mono ou dicotiledônea; no entanto, esse método requer eficiente sistema de regeneração de plantas a partir de protoplastos, fator considerado crítico em se tratando de espécies lenhosas. Na tentativa de suplantar tais dificuldades, o método de aceleração de partículas ou biobalística foi desenvolvido (33), sendo considerado rápido na introdução direta de DNA em células vegetais, quer

---

<sup>1</sup> Apresentado na XXIIª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular de Plantas, Caxambu, 1994. Aceito para publicação em 20.11.1995.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG.

<sup>3</sup> Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa.

<sup>4</sup> Life Science Department, University of Nottingham, University Park, Nottingham NG7, 2RD, UK.

para estudos que envolvam a expressão transitória (1, 3, 19, 25), quer para transformação estável (5, 6, 7, 11, 13, 24,36, 39). A expressão transitória é utilizada na otimização dos parâmetros envolvidos no processo de bombardeamento, para acessar a expressão de determinado produto gênico e para a avaliação de promotores pela análise da expressão de genes *in situ* (1, 2).itória é

Considerando a inexistência de trabalhos envolvendo a utilização da biobalística na transformação do maracujazeiro, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência dos plasmídios pEA18 e pJMD67 na atividade do gene da  $\beta$ -glucuronidase (*gus*) em agregados globulares embriogênicos de *Passiflora giberti* N.E. Brown, bem como a influência das partículas de ouro e tungstênio na expressão do gene *gus* em tecidos bombardeados.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material Vegetal

Agregados globulares embriogênicos de *Passiflora giberti*, com tamanho variável de 1,5 a 3,5 mm, provenientes de culturas líquidas mantidas em meio AA2 (26), contendo 2,0 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D, no escuro e sob agitação orbital de 40 rpm, foram utilizados como explantes no bombardeamento de partículas. As culturas foram subcultivadas semanalmente, os explantes transferidos para o centro de placas de Petri de 5,5 cm, contendo 12 ml de meio MS (27). O meio foi constituído de sacarose, a 3% (p/v), e solidificado pela adição de ágar, a 0,7% (p/v), na ausência de reguladores de crescimento. Em cada tratamento foram utilizados cinco calos embriogênicos por repetição.

### 2.2. Equipamento de Aceleração, Plasmídios, Revestimento das Partículas com DNA e Preparo dos Suportes Carreadores dos Microprojéteis

O equipamento utilizado no bombardeamento de partículas foi desenvolvido por RECH *et alii* (32).*et alii* (32).

A distância do topo da câmara de descarga à malha de retenção foi de, aproximadamente, 4,5 mm. Os tecidos-alvo distavam 12 mm da malha de retenção e a distância entre os eletrodos, na câmara de descarga, 1,7 a 1,8 mm.

Foram utilizados os plasmídios pEA18 e pJMD67, ambos contendo o gene repórter de  $\beta$ -glucuronidase (*gus*). Os plasmídios foram isolados e purificados conforme a metodologia descrita por GOLDS *et alii* (15). Para o revestimento das partículas de ouro (Aldrich, USA) e de tungstênio (Sylvania Chem., GTE Products Corp., USA) foi empregado o método baseado na utilização de cálcio e espermidina (Sigma Chem. Co., USA),

segundo RECH *et alii* (32) e ARAGÃO *et alii* (2). Em um frasco Eppendorf foram misturados, sob agitação em Vortex, 25  $\mu\text{l}$  de uma suspensão de partículas ( $20 \text{ mg ml}^{-1}$ ), 5  $\mu\text{l}$  de DNA à concentração de  $1,0 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  e 25  $\mu\text{l}$  de solução 0,1M de espermidina. Após 10 minutos, a mistura foi centrifugada por duas vezes sucessivas (9.000 rpm; 2s cada), com eliminação do sobrenadante apenas após a primeira centrifugação, e ressuspensão do precipitado em 70 e 34  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto, respectivamente. Sobre a superfície de cada suporte carreador de partículas, constituído de um filme plástico Mylar (DuPont, USA) de 12 x 12 mm, foram dispensados 7,5  $\mu\text{l}$  da suspensão de partículas revestidas com DNA.

### 2.3. Detecção Histoquímica da Atividade da $\beta$ -Glucuronidase (GUS)

Essa etapa foi realizada mediante a análise *in situ* da atividade de  $\beta$ -glucuronidase (17). Após o bombardeamento, os calos foram transferidos para 200  $\mu\text{l}$  da mistura de reação histoquímica e incubados à temperatura de  $38^{\circ}\text{C}$ , na ausência de luz, durante 24 a 48 horas. A mistura de reação foi constituída de 100 mM de tampão-fosfato (pH 7,0); 10 mM de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ; 10 mM de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 10 mM de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; 0,1% (v/v) de Triton X-100; e 0,5 mg do substrato X-GLUC por mililitro de solução preparada. A atividade da  $\beta$ -glucuronidase foi determinada pela contagem de cada unidade de expressão, conforme o critério estabelecido por KLEIN *et alii* (20).

Foram estabelecidos dois experimentos com o objetivo de verificar a influência dos plasmídios pEA18 e pJMD67 na atividade do gene *gus* em calos embriogênicos de *P. giberti*, bem com a influência das partículas de ouro e tungstênio na expressão transitória do gene *gus* em tecidos bombardeados.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos Quadros 1 e 2 pode ser observado o efeito do tipo de plasmídio e da partícula metálica sobre a expressão transitória do gene repórter da  $\beta$ -glucuronidase a partir do bombardeamento de agregados globulares embriogênicos de *P. giberti*. Após o período de incubação de 48 horas, em substrato para GUS histoquímico, não foi verificada diferença significativa em termos de unidades de expressão obtidas ao se utilizarem diferentes plasmídios; no entanto, o tipo de partícula metálica

utilizada apresentou efeito significativo, com superioridade das partículas de ouro.

**QUADRO 1** - Valores médios do número de unidades de expressão do gene da  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) em agregados embriogênicos de *P. giberti* bombardeados com partículas de ouro revestidas com DNA dos plasmídios pJMD67 e pEA18

Plasmídio	Unidades de expressão <sup>1</sup>
pJMD67	35,85 a
pEA18	32,70 a

<sup>1</sup> As médias seguidas pela mesma letra não diferem, estatisticamente, entre si, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

**QUADRO 2** - Valores médios do número de unidades de expressão do gene da  $\beta$ -gucuronidase (*GUS*) em agregados embriogênicos de *P. giberti*, em função das partículas metálicas revestidas com o plasmídio pJMD67

Partícula	Unidades de expressão <sup>1</sup>
Ouro	44,25 a
Tungstênio	29,42 b

<sup>1</sup> As médias seguidas pela mesma letra não diferem, estatisticamente, entre si, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Ambos os plasmídios utilizados no presente experimento possuíam o gene repórter *gus*, estando sob controle do promotor 35S do sítio ligante das clorofilas *a/b* (*Cabbs*), no caso do pJMD67 (32), e do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), no caso do pEA18. Pela análise histoquímica nos tecidos (Figura 1), os plasmídios tiveram desempenho semelhante na obtenção de expressão para o gene *gus*. Ambas as construções não continham genes de resistência a antibióticos, como o gene *nptII*. Em função da referida ausência de marcas de resistência, os plasmídios não poderiam ser utilizados na obtenção de transformação estável, o que dificultaria o processo de seleção de transformantes. Os resultados obtidos no presente experimento poderiam ser explicados pelas

diferenças nas propriedades físicas e químicas das partículas de ouro e tungstênio, bem como pela técnica utilizada de precipitação e de revestimento das partículas com o DNA plasmidial. Ainda, o equipamento de aceleração não permitiu a uniformização das condições de bombardeamento entre os diferentes disparos, com conseqüências sobre a velocidade, uniformidade de dispersão e de penetração das partículas nos tecidos. ARAGÃO *et alii* (2), utilizando o mesmo equipamento de aceleração desenvolvido por RECH *et alii* (32), avaliaram a influência de certos fatores na expressão transitória do gene *gus*, presente no plasmídeo pJMD67, em folhas, cotilédones e eixos embrionários de *Phaseolus vulgaris*. Foi observado que o método de precipitação das partículas, a concentração do DNA, a intensidade de vácuo aplicado e o tipo de tecido utilizado tiveram influência marcante no número de unidades de expressão do gene.

No entanto, as modernas concepções dos equipamentos de aceleração de partículas (12, 18, 23, 34, 38) têm proporcionado controle preciso dos fatores físicos inerentes aos sistemas de aceleração, o que leva à maior consistência nos resultados provenientes de diferentes experimentos, bem como amplia as chances de transformação para espécies recalcitrantes, em que os demais métodos de transformação foram considerados falhos.

As vantagens das partículas de tungstênio são o baixo custo, a disponibilidade em várias classes de diâmetros e a relativa facilidade de serem recobertas com DNA. Todavia, tem sido observado que o tungstênio é potencialmente tóxico a certos tipos celulares, além do fato de as partículas estarem sujeitas a oxidações superficiais que podem alterar as ligações com as moléculas de DNA, bem como causar, com o tempo, a degradação catalítica do DNA adsorvido às mesmas. As partículas de ouro, ao contrário, são de custo elevado e apresentam forma e tamanho uniformes. Ao contrário das partículas de tungstênio, as de ouro são biologicamente inertes, não sendo tóxicas a nenhum tipo de tecido avaliado, nem tão pouco causam o ataque catalítico ao DNA (6, 14, 23, 33, 35).

CHAREST *et alii* (4), na avaliação do efeito de microprojéteis constituídos de partículas de ouro e de tungstênio na transformação de *Picea glauca*, não obtiveram diferenças significativas de unidades de expressão pela determinação da atividade do gene *gus* pelo método histoquímico. Todavia, para três das quatro espécies bombardeadas com partículas de ouro foram obtidos, por fluorimetria, valores de atividade superiores para GUS. LI *et alii* (21), utilizando o sistema propelido por hélio, Biolistic™, avaliaram alguns fatores na otimização da expressão transiente em pólen e tecidos embriogênicos derivados de suspensão

celular embriogênica de *Picea glauca*. Ao contrário do observado por CHAREST *et alii* (4), os autores obtiveram o maior nível de expressão para GUS ao utilizar partículas de ouro de 1,6 µm de diâmetro.

No presente trabalho, a utilização de agregados globulares foi importante, uma vez que, sob condições adequadas de meio e de ambiente, tais tecidos mostraram-se bastante ativos fisiologicamente e originaram plantas via embriogênese somática (29). O exame histológico dos tecidos revelou que os agregados celulares desenvolvidos em meio líquido possuíam pequenos nódulos meristemáticos (proembriões), compactos e localizados na periferia do tecido parenquimático e compostos por células com características tipicamente meristemáticas, isodiamétricas, com núcleos proeminentes, divisão mitótica intensa, com citoplasmas densos e pouco vacuolizados (9). CHRISTOU (6) e McCABE e CHRISTOU (23) destacaram a adequada escolha de tecidos cujas células estejam em atividade intensa e potencialmente regenerativas como atributo importante para o sucesso da técnica de aceleração de partículas. YE *et alii* (39) relataram que o estado fisiológico dos tecidos bombardeados foi considerado fator crítico na obtenção de plantas transgênicas de *Prunus*. Foi obtida elevada expressão transitória para GUS em calos derivados de embriões. Todavia, os autores não obtiveram regenerantes de linhagens de calos iniciados de folhas, comprovadamente transformadas, as quais apresentaram o potencial morfogênico comprometido, em virtude do prolongado tempo de cultivo *in vitro*.

Os únicos relatos envolvendo a transformação genética do maracujazeiro referem-se aos trabalhos de MANDERS *et alii* (22) e OTONI (29). MANDERS *et alii* (22) descreveram a transformação do maracujá-amarelo mediada pelo vetor *A. tumefaciens*, ao passo que OTONI (29) descreveu a transformação da mesma espécie mediada por *A. rhizogenes*. Ambos os trabalhos não envolveram o gene *gus*, apenas o gene *nptII*, o qual confere resistência ao antibiótico canamicina.

Considerando a importância crescente da família *Passifloraceae*, estudos adicionais deveriam ser realizados no sentido de estabelecer parâmetros e condições ideais para obtenção de regenerantes a partir de tecidos bombardeados, uma vez que, a exemplo de outras espécies, a aceleração de partículas poderá apresentar-se como metodologia alternativa a ser empregada nos estudos da expressão transitória de genes e, idealmente, na obtenção de expressão estável, de modo especial em relação a genes que confirmam características agrônômicas desejáveis para o gênero *Passiflora*.

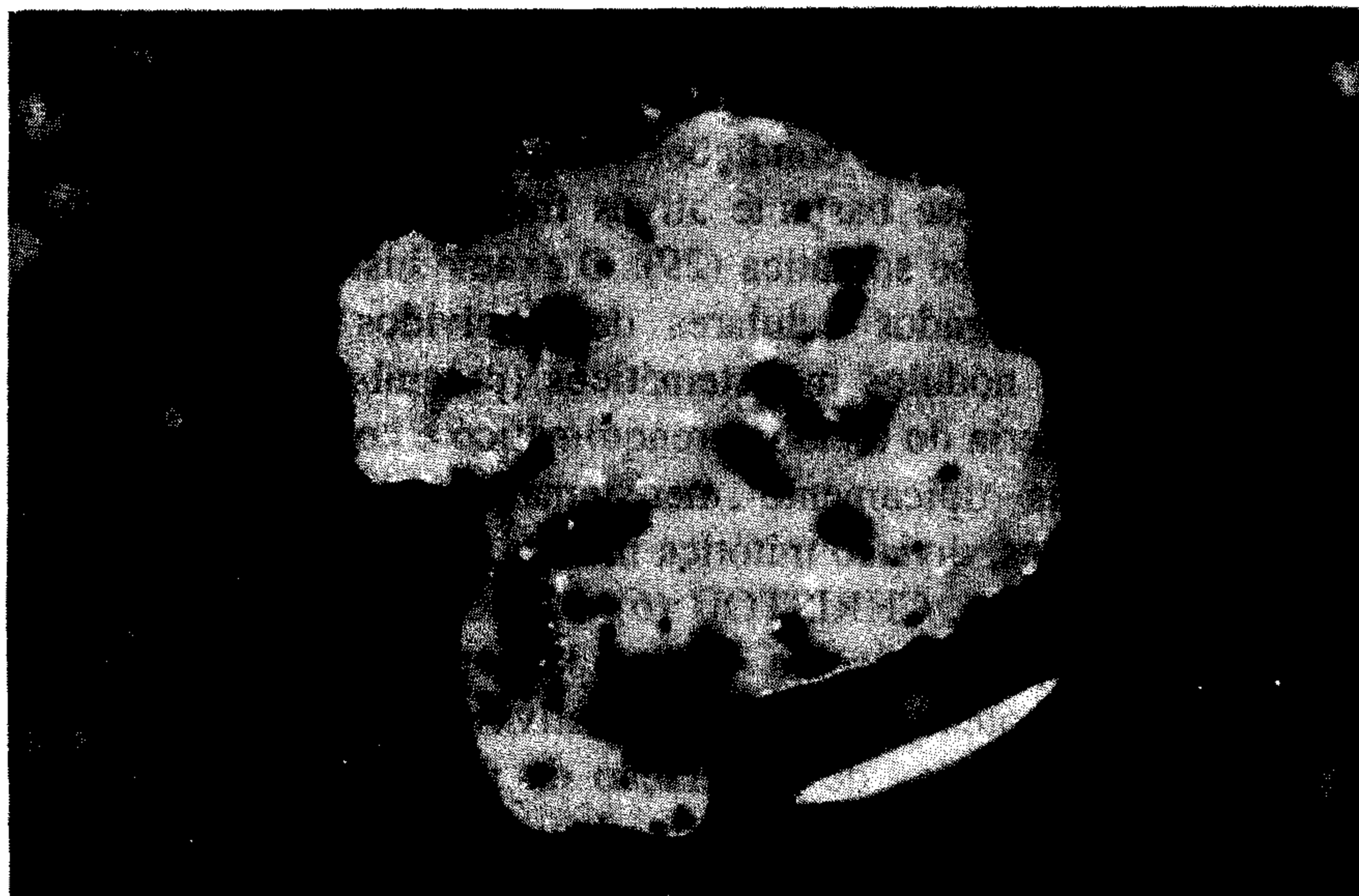


FIGURA 1 - Detecção histoquímica da expressão do gene *gus* em agregados embriogênicos derivados de suspensão celular de *P. giberti* e bombardeados com partículas de ouro revestidas com DNA do plasmídeo pJMD67.

#### 4. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a transformação transitória pela expressão do gene da  $\beta$ -glucuronidase (*gus*), presente em ambos os plasmídios utilizados, a saber: pEA18 e pJMD67. Agregados globulares embriogênicos de *Passiflora giberti* N.E. Brown, provenientes do cultivo em meio líquido rico em aminoácidos (AA2), contendo  $2,0\text{mg l}^{-1}$  de 2,4 D, foram utilizados como fontes de explantes no bombardeamento. Os tecidos foram bombardeados com partículas de ouro e de tungstênio, recobertas com DNA plasmidial. A avaliação da atividade para GUS foi baseada na reação histoquímica *in situ*, sendo quantificado o número de unidades de expressão. Foi observado que a elevada atividade fisiológica das células embriogênicas foi importante na obtenção da expressão do gene da  $\beta$ -glucuronidase. Foram observados níveis de expressão superiores a 45% em relação ao total de explantes submetidos ao bombardeamento. A expressão do gene *gus* foi superior em calos bombardeados por microprojéteis constituídos de partículas de ouro,

comparativamente às partículas de tungstênio; todavia, foram obtidos níveis de expressão semelhantes em calos bombardeados com os plasmídios pEA18 e pJMD67.

## 5. SUMMARY

### (PARTICLE BOMBARDMENT-MEDIATED TRANSIENT EXPRESSION OF *GUS* IN PASSIONFRUIT (*Passiflora giberti* N.E. BROWN))

The aim of this work was to evaluate some critical parameters for the transient *gus* gene expression system in *Passiflora giberti* using a home-made electrical-discharge gun device. Cell suspension-derived globular embryogenic aggregates, cultured on a liquid aminoacid rich medium AA2, containing 2.0 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D, were used as explant sources for particle bombardment. Tissues were bombarded with tungsten M10 and gold particles coated with plasmid DNA. Both plasmids used for these experiments contained the  $\beta$ -glucuronidase (*gus*) structural sequence, under control of the 35S CaMV promoter, for pEA18, and the chlorophyll binding site (*CabbS*) 35S promoter, for pJMD67. Tissues were analysed for in situ localization of GUS activity and the transformation efficiency was expressed as the number of blue spots per embryogenic callus (expression units). GUS activity was detected 6 to 12 hr after bombardment. Over 45% of the explants bombarded expressed transient GUS activity. For the microprojectile type, DNA-coated gold particles with the plasmid pJMD67 showed higher levels of GUS expression as compared to tungsten particles. Using DNA-coated gold particles, there was no significant effect of the plasmids, pEA18 and pJMD67, on the level of the reporter gene expression. This represents the first report on the literature on transformation of the genus using particle acceleration.

## 6. LITERATURA CITADA

1. ARAGÃO, F.J.L.; SÁ, M. F. G.; 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 Mol. Biol.*, 20: 357-359, 1992.
2. ARAGÃO, F.J.L.; SÁ, M.F. G.; DAVEY, M.R.; BRASILEIRO, A.C.M.; FARIA, J.C. & RECH, E.L. Factors affecting gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an electrical particle acceleration device. *Plant Cell Rep.*, 12: 483-490, 1993.
3. BRASILEIRO, A.C.M; ARAGÃO, F.J.L. & BARRUETO CID, L.P. Particle bombardment-mediated transient expression of GUS in *Eucalyptus*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS, XXIII, Caxambu, MG, 1994. Anais...(Resumo E-28), p.47.



4. CHAREST, P.J.; CALÉRO, N.; LACHANCE, D.; DATLA, R.S.S.; DUCHÊSNE, L.C. & TSANG, E.W.T. Microprojectile-DNA delivery in conifer species: factors affecting assessment of transient gene expression using the  $\beta$ -glucuronidase reporter gene. *Plant Cell Rep.*, 12: 189-193, 1993.
5. CHRISTOU, P.; FORD, T.L. & KOFRON, M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology*, 9: 957-962, 1991.
6. CHRISTOU, P. Genetic transformation of crops plants using microprojectile bombardment. *The Plant J.*, 2: 275-281, 1992.
7. CHRISTOU, P.; FORD, T.L. & KOFRON, M. The development of a variety-independent gene-transfer method for rice. *Tibtech.*, 10: 239-246, 1992.
8. DANDEKAR, A.M. Transformation. In: HAMMERSCHLAG, F.A. & LITZ, R.E. (eds.). *Biotechnology of perennial fruit crops*. Cambridge, University Press, 1992. p. 141-168.
9. DANDEKAR, A.M.; McGRANAHAM, G.H. & JAMES, D.J. Transgenic woody plants. In: KUNG, S. & WU, R. (ed.). *Transgenic plants - economic impacts*. New York, Academic Press, 1993. v.2., p.129-151.
10. DAY, A.G. & LICHTENSTEIN, C.P. Plant genetic transformation. In: FOWLER, M.W.; WARREN, G.S. & MOO-YOUNG, M. (eds.). *Plant biotechnology: comprehensive biotechnology*. Oxford, Pergamon Press, 1992. p.151-182.
11. ELLIS, D.D.; McCABE, D.E.; McINNIS, S.; RAMACHANDRAN, R.; RUSSEL, D.R.; WALLACE, K.M.; MARTINELL, B.J; ROBERTS, D.R.; RAFFA, K.F. & McCOWN, B.H. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. *Bio/Technology*, 11:84-89, 1993
12. FINER, J.J.; VAIN, P.; JONES, M. & McMULLEN, M.D. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep.*, 11: 323-328, 1992.
13. FITCH, M.M.M.; MANSHARDT, R.M.; GONSALVES, D.; SLIGHTOM, J.L. & SANFORD, J. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/Technology*, 10: 1466-1472,1992.
14. FRANKS, T. & BIRCH, R.G. Microprojectile techniques for direct gene transfer into intact plant cells. In: MURRAY, D. (ed.). *Advanced methods in plant breeding and biotechnology*. Wallingford, C.A.B. International, 1991. p. 103-127.
15. GOLDS, T.J.; DAVEY, M.R.; RECH, E.L. & POWER, J.B. Methods of gene transfer and analysis in higher plants. In: WALKER, J.M. & POLLAND, J.(eds.). *Methods in molecular biology, v.6: Plant Cell culture*. New Jersey, The Humana Press, 1987. p.1-32.
16. GRANT, J.E.; DOMMISSE, E.M.; CHRISTEY, M.C. & CONNER, A.J. Gene transfer to plants using *Agrobacterium*. In: MURRAY, D. (ed.). *Advanced methods in plant breeding and biotechnology*. Wallingford, C.A.B.International, 1991. p.50-73.
17. JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A. & BEVAN, M.W. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. *EMBO J.*, 6: 3901-3907, 1987.
18. KIKKERT, J.R. The biolistic<sup>R</sup> PDS-1000/He device. *Plant Cell Tis. Org. Cult.*, 33:221-226, 1993.
19. KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R. & SANFORD, J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327 70-73,1987.
20. KLEIN, T.M.; GRADZIEL, T.; FROMM, M.E. & SANFORD, J.C. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Bio/Technology* 6: 559-563, 1988.
21. LI, Y.-H.; TREMBLAY, F.M. & SÉGUIN, A. Transient transformation of pollen and

- embryogenic tissues of white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) resulting from microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.*, 13:661-665, 1994.
22. MANDERS, G.; OTONI, W.C.; d'UTRA VAZ, F.B.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J.B. & DAVEY, M.R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Degener) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.*, 13:697-702, 1994.
  23. McCABE, D.E. & CHRISTOU, P. Direct DNA transfer using electric discharge particle acceleration (ACCEL™ technology). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 33: 227-236, 1993.
  24. McCOWN, B.H.; McCABE, D.E.; RUSSELL, D.R.; ROBINSON, D.J.; BARTON, K.A. & RAFFA, K.F. Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. *Plant Cell Rep.*, 9:590-594, 1991.
  25. MORIKAWA, H.; IIDA, A. & YAMADA, Y. Transient expression of foreign genes in plant cells and tissues by a simple biolistic device (particle-gun). *Appl. Microbiol. Biotech.*, 31: 320-322, 1989.
  26. MÜLLER, A.J. & GRAFE, R. Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.*, 161:67-76,1978.
  27. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-479, 1962.
  28. OOMS, G. Genetic engineering of plants and cultures. In: FOWLER, M.W.; WARREN, G.S. & MOO-YOUNG, M. (eds.). *Plant biotechnology: comprehensive biotechnology*. Oxford, Pergamon Press, 1992. p.223-257.
  29. OTONI, W.C. *Hibridação e embriogênese somáticas e transformação genética em algumas espécies de Passiflora*. Viçosa, UFV, 1995. 198p. (Tese D.S.).
  30. RATHUS, C. & BIRCH, R.G. Electroporation for direct gene transfer into plant protoplasts. In: MURRAY, D. (ed.). *Advanced methods in plant breeding and biotechnology*. Wallingford, C.A.B. International, 1991. p.74-102.
  31. RECH, E.L. *Electric fields and Agrobacteria for gene transfer into plants*. Nottingham, University of Nottingham, 1989. 173p. (Tese Ph.D).
  32. RECH, E.L.; VAINSTEIN, M.H. & DAVEY, M.R. An electrical particle acceleration gun for gene transfer into cells. *Technique*, 3 : 143-149, 1991.
  33. SANFORD, J. Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant.*, 79: 206-209, 1990.
  34. SANFORD, J.C.; DEVIT, M.J.; RUSSEL, J.A.; SMITH, F.D.; HARPENDING, M.K.; ROY, M.K. & JOHNSTON, S.A. An improved helium-driven biolistic device. *Technique*, 3: 3-16, 1991.
  35. SANFORD, J.C.; SMITH, F.D. & RUSSEL, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. (eds.). *Methods in enzymology*. New York, Academic Press, 1993. v. 217. p. 483-509.
  36. SATO, S.; NEWELL, C.; KOLACZ, K.; TREDON, L.; FINER, J. & HINCHEE, M. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Rep.*, 12: 408-413, 1993.
  37. SHILLITO, R.D. & POTRYKUS, I. Direct gene transfer to protoplasts of dicotyledons and monocotyledons plants by a number of methods, including electroporation. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. (eds.). *Methods in enzymology*. New York, Academic Press, 1987. p. 313-336.
  38. TAKEUCHI, Y.; DOTSON, M. & KEEN, N.T. Plant transformation: a simple particle bombardment device based on flowing helium. *Plant Mol. Biol.*, 18: 835-839, 1992.
  39. YE, X.J.; BROWN, S.K.; SCORZA, R.; CORDTS, J. & SANFORD, J.C. Genetic transformation of peach tissues by particle bombardment. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 119:367-373, 1994.