

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**REGENERAÇÃO *in vitro* E CONDIÇÕES DE CO-CULTIVO
NA TRANSFORMAÇÃO DE EMBRIÕES IMATUROS DE
MILHO VIA *Agrobacterium tumefaciens***

DIELLI APARECIDA DIDONÉ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, março de 2015

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**REGENERAÇÃO *in vitro* E CONDIÇÕES DE CO-CULTIVO
NA TRANSFORMAÇÃO DE EMBRIÕES IMATUROS DE
MILHO VIA *Agrobacterium tumefaciens***

DIELLI APARECIDA DIDONÉ

Orientador: Prof. Magali Ferrari Grando, Ph.D

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal

Passo Fundo, março de 2015

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

“REGENERAÇÃO *in vitro* E CONDIÇÕES DE CO-CULTIVO NA TRANSFORMAÇÃO DE
EMBRIÕES IMATUROS DE MILHO VIA *Agrobacterium tumefaciens*”

Elaborada por

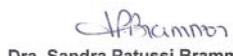
Dielli Aparecida Didoné

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em
Agronomia – Produção Vegetal

Aprovada em: 31/03/2015
Pela Comissão Examinadora


Dra. Magali Ferrari Grando
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora


Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Coordenadora do PPGAgro


Dra. Sandra Patussi Brammer
Embrapa Trigo


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV


Dr. Hugo Permingeat
Universidad Nacional de Rosario - Argentina

CIP – Catalogação na Publicação

- D557r Didoné, Dielli Aparecida
Regeneração *in vitro* e condições de co-cultivo na
transformação de embriões imaturos de milho via
Agrobacterium tumefaciens / Dielli Aparecida Didoné . –
2015.
119 f. : il.; 25 cm.
- Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade
de Passo Fundo, 2015.
Orientadora: Profª. Magali Ferrari Grando, Ph.D.
1. Milho. 2. Genética. 3. Temperatura. I. Grando,
Magali Ferrari, orientadora. II. Título.

CDU: 633.15

BIOGRAFIA DO AUTOR

DIELLI APARECIDA DIDONÉ nasceu em Cacique Doble, no ano de 1990. Em 2012 concluiu o curso de Ciências Biológicas Bacharelado pela Universidade de Passo Fundo – UPF. No mesmo ano ingressou no Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo – RS, realizando estudos de regeneração *in vitro* e condições de co-cultivo na transformação de embriões imaturos de genótipos de milho via *Agrobacterium tumefaciens* para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Osmar João Didoné e Ivânia Zanella Didoné, e meu irmão Tiago Didoné, meu infinito agradecimento, pelo apoio, companheirismo, carinho e atenção durante a minha vida, na qual sem vocês não estaria concluindo mais esta etapa. A vocês, meu amor incondicional!

À minha amiga e orientadora, professora Ph.D Magali Ferrari Grandó pelos ensinamentos, dedicação, amizade, palavras de conforto e sábios conselhos. És uma referência profissional e pessoal para meu crescimento. Obrigada por estar ao meu lado e acreditar em mim!

Ao programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (FAMV-UPF), pela oportunidade e apoio durante o período de realização do trabalho.

Aos professores do curso, pelos ensinamentos, competência e disposição em compartilhar experiências.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À família e grandes amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV-UPF, pela amizade, cafés, momento de descontração, apoio e colaboração nesta jornada.

Aos meus amigos, especialmente, à Marília Rodrigues de Silva, Michele Antunes, Nageli Almeida, Cássia Ceccon e Lidiane König, verdadeiras amigas, que tornaram mais leve meu trabalho. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias. É bom poder contar com vocês!

E, por fim, a todos aqueles que por um lapso não mencionei, mas que colaboraram para esta pesquisa: abraços fraternos!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 Importância do milho.....	9
2.2 Transformação genética.....	10
2.2.1 Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
2.2.2 Método de infecção bacteriana.....	14
2.2.3 Etapas de transformação genética de milho via <i>A. tumefaciens</i>	18
2.2.3.1 Co-cultivo do tecido com <i>A. tumefaciens</i>	19
2.2.3.2 Etapa de descanso.....	21
2.2.3.3 Seleção dos tecidos transformados.....	21
2.2.3.4 Regeneração de plantas.....	22
2.2.4 Influência do genótipo na cultura de tecidos e transformação genética de milho.....	25
2.2.5 Aspectos envolvidos na transformação genética via <i>A. tumefaciens</i> em milho.....	27
CAPITULO I - CONCENTRAÇÃO DE FITORREGULADORES NA ETAPA DE PRÉ-REGENERAÇÃO <i>in vitro</i> DE DOIS HÍBRIDOS DE MILHO PARA MANIPULAÇÃO GENÉTICA	31
RESUMO	31
ABSTRACT	32
1 INTRODUÇÃO	34
2 MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1 Local.....	38
2.2 Material vegetal.....	38
2.3 Indução de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos imaturos.....	39
2.4 Etapa de Pré-Regeneração.....	39
2.5 Delineamento experimental.....	40
2.6 Etapas de maturação e germinação de embriões	

somáticos.....	41
2.7 Aclimatização.....	42
2.8 Avaliação dos sistemas e análise estatística.....	43
3 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	44
3.1 Etapa de Pré-Regeneração.....	44
3.2 Etapa de maturação dos embriões somáticos.....	46
3.3 Etapa de germinação dos embriões somáticos.....	50
3.3.1 Emergência das plantas do genótipo Hi-II.....	54
3.3.2 Emergência das plantas do genótipo H3MT-2.....	57
3.4 Etapa de aclimatização de plantas.....	62
4 CONCLUSÃO.....	65
CAPITULO II - EXPRESSÃO TRANSIENTE DO GENE REPÓRTER <i>uidA</i> EM EMBRIÕES IMATUROS DE MILHO SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE CO-CULTIVO COM <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	66
RESUMO.....	66
ABSTRACT.....	68
1 INTRODUÇÃO.....	69
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1 Estirpe, plasmídeo e crescimento bacteriano.....	75
2.2 Etapa de infecção e co-cultivo.....	76
2.2.1 Ensaio I.....	77
2.2.2 Ensaio II.....	77
2.3 Etapa de descanso.....	78
2.4 Etapa de seleção.....	78
2.5 Avaliações realizadas.....	79
2.6 Delineamento experimental e análise estatística.....	81
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
3.1 Ensaio I.....	81
3.1.1 Expressão transiente de GUS.....	81
3.2 Ensaio II.....	85
3.2.1 Transformação transiente do genótipo Hi-II.....	85
3.2.1.1 Análise conjunta dos experimentos.....	88
3.2.2 Transformação transiente do genótipo BR 451.....	90
3.2.3 Calos resistentes ao herbicida Bialaphos.....	95
3.2.4 Análise de PCR gene bar em calos resistentes.....	98
4 CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS.....	103

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela		Página
1	Genótipos de milho utilizados para estudo da regeneração de plantas <i>in vitro</i> e seus programas de origem.....	38
2	Concentrações dos fitoreguladores utilizados nos diferentes meios de pré-regeneração. Passo Fundo, 2014.....	40
3	Meios utilizados para regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos de milho (FRAME et al, 2002, 2011).....	41
4	Desdobramento da interação dupla (Meios-Genótipos) para a variável manutenção dos calos embriogênicos na etapa de Pré-Regeneração provenientes de 500 mg de calos embriogênicos de dois genótipos de milho. Passo Fundo, 2015.....	45
5	Número de embriões maduros observado 15 dias após transferidos para o meio de MS+6% de sacarose (etapa de Regeneração I) provenientes de 500 mg de calos embriogênicos pré-regenerados em diferentes meios de cultura. Passo Fundo, 2015.	48
6	Desdobramento da interação dupla (Meios-Genótipos) para número de embriões maduros e números de embriões germinados depois de 15 dias na etapa de Regeneração II provenientes de 500 mg de calos embriogênicos. Passo Fundo, 2015.....	51
7	Desempenho dos diferentes meios de pré-regeneração na percentagem de plantas aclimatadas e plantas aclimatizadas adultas férteis de dois genótipos de milho. Passo Fundo, 2015.....	63

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

Figura		Página
1	Meios utilizados para o crescimento das bactérias, cultura de tecidos, regeneração e transformação das plantas.....	74
2	Expressão gene <i>uidA</i> 3 dias e 5 dias após a infecção com com <i>A. tumefaciens</i> Estirpe EHA101:pTF102 em embriões zigóticos imaturos do genótipo Hi-II	82
3	Expressão transiente de GUS em embriões imaturos do genótipo Hi-II de milho submetidos a diferentes treatments de co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> estirpe <i>EHA101:pTF102</i> . Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015.....	87
4	Frequência de calos resistentes ao herbicida Bialaphos obtida a partir de embriões do genótipo Hi-II submetidos a diferentes condições de de co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> Estirpe <i>EHA101:pTF102</i> . Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015	96

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Figura		Página
1	Representação esquemática da organização de um plasmídeo Ti. As regiões ilustradas correspondem: (<i>vir</i>) região de virulência; (<i>trae trb</i>) região de transferência conjugativa; (<i>rep</i>) região de replicação; (<i>opc</i>) região de catabolismo de opinas e (região-T) região transferida para a célula vegetal. O tamanho e a posição relativa de cada região varia segundo a linhagem de <i>Agrobacterium</i> sp. (Zhu et al., 2000).....	16
2	Ilustração esquemática da transformação genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . O processo de transformação é constituído por nove grandes passos e começa com o reconhecimento e fixação das <i>A. tumefaciens</i> , para as células do hospedeiro (1), sendo a detecção de sinais específicos da planta é reconhecido pelos componentes de transdução de sinal VirA VirG da agrobactéria (2). Após a ativação dos genes da região vir (3), uma cópia móvel do T-DNA é gerada pelo complexo de proteínas VirD1 eVirD2 (4) e entregue pelo VirD2 no citoplasma da célula hospedeira o complexo de DNA (complexo fita - T), (6, 7, 8, 9) sendo importado, integrado no genoma do hospedeiro (SUNDERECHA et al., 2009).....	17
3	Etapas da transformação genética via <i>A. tumefaciens</i> . Laboratório de Biotecnologia Vegetal, UPF. Passo Fundo, 2015.....	19

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura		Página
1	Aspectos dos calos embriogênicos do híbrido de milho Hi-II utilizados no experimento: A) Placa contendo 500 mg de calo embriogênico; B) Calo embriogênico apresentando embriões somáticos; C) Calo embriogênico apresentando embriões alongados na etapa de Pré-regeneração no meio suplementado com 0,25 mg.L ⁻¹ de 2,4-D. Passo Fundo, 2015.....	46
2	Processo de maturação e germinação dos embriões somáticos do híbrido de milho Hi-II: A) Calo contendo embriões maduros na sua superfície apresentando coleóptilo (Co); B) Embrião somático maduro isolado; C) Embrião somático isolado germinando na etapa de Regeneração I com passagem no meio de pré-regeneração suplementado com 0,25 mg.L ⁻¹ de 2,4-D, apresentando raiz inicial (RI) e coleóptilo (Co). Passo Fundo, 2015.....	46
3	Aumento da massa fresca dos calos expostos ao regulador de crescimento ABA durante o processo de pré-regeneração, conforme observado na etapa de maturação (Regeneração I): A) Massa celular aumentada em oito vezes em relação a massa de calo inicial resultante da passagem dos mesmos pelo meio suplementado com 0,10 mg/L ⁻¹ 2,4-D + 0,26 ABA; B) Massa celular aumentada em sete vezes em relação a massa de calo inicial resultante da passagem dos mesmos meio suplementado com 0,25 mg/L ⁻¹ 2,4-D + 0,26 ABA; C) Calos pré-regenerados em meio suplementado com 0,25 mg/L ⁻¹ 2,4-D na etapa de maturação de embriões somáticos. Passo Fundo, 2015.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
4	Desempenho dos diferentes tratamentos de pré-regeneração na emergência de plantas após adicionados na presença de luz na regeneração do genótipo Hi-II de milho. Passo Fundo, 2015.....	55
5	Germinação dos embriões do genótipo Hi-II que passaram pela pré-regeneração com 0,25 mg/L-1 de 2,4-D aos oito dias na presença da luz. As plantas formadas nesta placa foram obtidas de 500 mg de calos embriogênicos cultivados inicialmente. Passo Fundo, 2015.....	56
6	Germinação de embriões somáticos do híbrido de milho Hi-II, cuja pré-germinação foi realizada em meio contendo 0,25 mg/L ⁻¹ de 2,4-D: A) Aspecto do embrião maduro germinando na presença da luz; B) Aspecto planta 1,5 cm passada para recipiente de vidro na etapa de Regeneração II após 15 dias expostas a luz. Passo Fundo, 2015.....	57
7	Desempenho dos diferentes tratamentos de pré-regeneração na emergência de plantas após adicionados na presença de luz na regeneração do genótipo H3MT-2 de milho. Passo Fundo, 2015....	58
8	Aspectos histológicos de cortes transversais de embriões somáticos de milho: A) Genótipo de milho Hi-II apresentando os dois eixos embrionários: meristema apical (MA) e meristema radicular (MR); B) Genótipo H3MT-2 apresentando apenas um eixo o meristema radicular (MR). Passo Fundo, 2015.....	60
9	Aspecto do calo/estruturas embriogênicas do genótipo H3MT-2 em meio de germinação resultando numa organogênese aparente por não apresentar meristema apical. Passo Fundo, 2015....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
10	Desempenho na produção de plantas de dois genótipos de milho pré-regenerados em diferentes meios de cultura. Passo Fundo, 2015.....	61
11	Etapas de aclimatização de plantas do genótipo Hi-II de milho: A) Plantas em recipientes de vidros prontas para aclimatização; B) Plantas em vasos de 500 mL em câmara umida; C) Plantas adultas em casa de vegetação; D) Espiga produzida por planta regenerada <i>in vitro</i> . Passo Fundo, 2015.....	63

CAPITULO II

1	Esquema geral do plasmídeo binário padrão pTF102 desenvolvido pela “Towa State University”, contendo o gene <i>bar</i> que codifica a fosfotricina acetiltransferase e confere resistência ao antibiótico fosfotricina; e o gene <i>uidA</i> com intron que codifica a β -glucoronidase utilizado para análise histoquímica de GUS. Fonte: Frame et al., 2002.....	76
---	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
2	<p>Teste histológico de GUS em embriões zigóticos imaturos do híbrido de milho Hi-II infectados com <i>A. tumefaciens</i> EHA101:pTF102 e mantidos em diferentes tratamentos de co-cultivo: A) 3 dias a 20 °C-GUS avaliado no 3º dia após infecção; B) 3 dias a 20 °C- GUS avaliado no 5º dia após infecção; C) 5 dias 20 °C-GUS avaliado no 3º dia; D) 5 dias 20 °C-GUS avaliado no 5º dia da infecção; E) Embrião não transformado como controle negativo, F) 3 dias 20°C seguidos por 2 dias 28 °C-GUS avaliado no 5º dia após infecção. Barra de 1 mm. Passo Fundo, 2015.....</p>	85
3	<p>Expressão transiente de GUS (A) Frequência de embriões com pontos azuis; e (B) Média de pontos azuis por embrião utilizando diferentes condições de co-cultivo de embriões imaturos do genótipo Hi-II de milho com <i>A. tumefaciens</i> estirpe EHA101:pTF102. Dados se referem a 75 embriões avaliados por tratamento. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015.....</p>	90
4	<p>Expressão transiente de GUS (A) Frequência de embriões com pontos azuis; e (B) Média de pontos azuis por embrião utilizando diferentes condições de co-cultivo na transformação genética de embriões do genótipo BR 451 de milho com <i>A. tumefaciens</i> estirpe EHA101:pTF102. Dados se referem a 52 embriões avaliados por tratamento. S = Superior no desvio padrão + média. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015.....</p>	

Figura	LISTA DE FIGURAS	Página
6	Expressão do gene <i>uidA</i> em embriões do híbrido de milho BR 451 infectados com <i>A. tumefaciens</i> EHA101:pTF102: A) T1= embriões co-cultivados 3 dias a 20°C; B) T2= 3 dias a 28°C; C) T3= 5 dias a 20°C; D) T4= 5 dias a 28°C; E) Controle negativo não infectado. Barra de 1 mm. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015.....	94
7	Frequência de calos resistentes ao herbicida Bialaphos obtida a partir de 1563 embriões imaturos do genótipo Hi-II submetidos a diferentes condições de de co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> Estirpe EHA101:pTF102. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015.....	97
8	A e B) Calo do genótipo Hi-II expressando resistência ao herbicida Bialaphos, apresentando embriões somáticos em sua superfície; C) Calo não resistente, sensível a presença do herbicida. Barra de 1 mm. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015.	97
9	Frequência de calos resistentes ao herbicida Bialaphos obtida a partir de 201 embriões imaturos do genótipo BR 451 submetidos a diferentes condições de co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> estirpe EHA101:pTF102. S = Superior no desvio padrão + média Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015.....	98
10	Análise de PCR em calos resistentes ao herbicida Bialaphos: M: Marcador 1000pb; C+: DNA isolado plasmídeo da bactéria <i>A. tumefaciens</i> EHA101 pTF 102 como controle positivo de 407 pb; C-: Calo não transformado como controle negativo; 11: Fragmento de 407 pb amplificados por PCR a partir de calos embriogênicos contendo o gene bar. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015.....	99

**REGENERAÇÃO *in vitro* E CONDIÇÕES DE CO-CULTIVO
NA TRANSFORMAÇÃO DE EMBRIÕES IMATUROS DE
GENÓTIPOS DE MILHO VIA *Agrobacterium tumefaciens***

DIELLI APARECIDA DIDONÉ¹

RESUMO – Inúmeros estudos de manipulação e melhoramento genético vêm sendo realizados no milho, sendo a técnica de *Agrobacterium tumefaciens* preferida para a transferência de genes. No entanto, esta técnica necessita de um sistema de transformação e de regeneração de plantas bem ajustados, pois o gene geralmente é introduzido ao nível de células totipotentes que devem dar origem a plantas completas e férteis. Os experimentos relatados neste trabalho se dedicaram a examinar a capacidade de regeneração *in vitro* e a transformação genética de embriões zigóticos imaturos de milho *via A. tumefaciens*. Na primeira parte são relatados experimentos investigando a capacidade de regeneração do híbrido de milho H3MT-2 e otimização da regeneração de plantas do híbrido Hi-II utilizando meio de pré-regeneração. A segunda parte relata a transformação transiente de embriões zigóticos imaturos do híbrido Hi-II e da variedade BR 451 transformados com *A. tumefaciens* em diferentes períodos e temperaturas de co-cultivo. Foi verificado o período ideal para realização do teste histoquímico de GUS para obtenção da frequência de transformação transiente. Como resultado, foi

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração “Produção Vegetal”.

observado que a etapa de pré-regeneração é fundamental na regeneração de plantas do genótipo Hi-II. Para este genótipo, o meio de pré-regeneração contendo 0,25 mg.L⁻¹ de 2,4-D foi o mais eficaz na conversão de embriões somáticos em plantas (410 plantas a partir de 2,5 gramas de calos embriogênicos iniciais) acelerando também o processo de regeneração em duas semanas. O genótipo H3MT-2 não respondeu positivamente aos tratamentos e sistema de regeneração utilizados. A realização do teste histoquímico de GUS após cinco dias da infecção permite melhor acesso aos indicativos da transformação transiente do que após três dias. A frequência de transformação transiente para o genótipo Hi-II foi, em média, 71,8%, não sendo influenciada pelos tratamentos de co-cultivo. No entanto, para o genótipo BR 451 a condição de co-cultivo cinco dias a 20 °C proporcionou uma frequência superior de transformação transiente (73,3%). A transferência do T-DNA pela bactéria foi favorecida pelo co-cultivo dos embriões imaturos por cinco dias a 20 °C, em ambos os genótipos, pois resultou num maior número de pontos azuis por embriões somáticos. A transformação estável avaliada através do número de calos resistentes ao herbicida e portadores do gene *bar*, foi de 0,39% para o genótipo Hi-II. Os eventos de transformação estável foram observados somente a partir de co-cultivo realizado com 20 °C. Foi possível otimizar a transformação transiente para os dois genótipos estudados.

Palavras chave: *Zea mays*, embriogênese somática indireta, 2,4-D, ABA, GUS, temperatura, transformação genética.

**REGENERATION *in vitro* AND CONDITIONS OF CO-
CULTIVATION FOR TRANSFORMATION OF MAIZE
GENOTYPES IN IMMATURE EMBRYOS VIA *Agrobacterium
tumefaciens***

ABSTRACT – Numerous studies of genetic engineering and genetic improvement have been carried out with this cereal and the *Agrobacterium tumefaciens* preferred technique for gene transfer. However, this technique requires a transformation and regeneration plant system adjusted since the gene is generally introduced to the level of totipotent cells which gives rise to whole, fertile plants. The experiment reported in this paper is devoted to examine the *in vitro* regeneration capacity and the genetic transformation of immature zygotic embryos of maize via *A. tumefaciens*. In the first part are reported experiments evaluating the regenerative capacity of the H3MT-2 hybrid of maize and the adaptation and optimization of plant regeneration from Hi-II genotype in the LBV-UPF. The second part reports the transient expression of immature zygotic embryos of the variety BR 451 and the hybrid Hi-II transformed with *A. tumefaciens* at different periods and temperatures of co-cultivation. To verify the ideal time to perform the GUS histochemical assay after infection to access the frequency of transient transformation. As results, it was observed that the pre-regeneration step proved to be crucial in plant regeneration of Hi-II genotype. For this genotype, the pre-regeneration medium containing 0.25 mg.L⁻¹ 2,4-D was shown to be more effective in the conversion of somatic embryos into plants (410 plants from the initial 2.5 g of embryogenic callus) and also accelerated the

regeneration process in two weeks. The addition of ABA fito-reguladores with 2,4-D resulted in an increase in cell division, delaying the onset of development of plants 15 days. The H3MT-2 genotype did not respond positively to treatment and regeneration system used in this experiment. It has been shown in this work the optimization of *in vitro* regeneration of maize Hi-II genotype that can result in acceleration and efficiency of the production of genetically modified plants. The completion of the histochemical GUS assay after five days of infection allows for better access the transient transformation than after three days. For both genotypes of maize Hi-II and BR 451, the transfer of the T-DNA by the bacterium was enhanced by co-culture of immature embryos for five days at 20 °C, since it resulted in a higher number of blue spots per somatic embryos, 21.4 and 23.1, respectively. It was possible to transfer the *bar* marker gene in 0.39% of the embryos from Hi-II genotype infected with *A. tumefaciens* and the calli that carried the *bar* gene were obtained from co-culture temperature of 20°C. It was possible to optimize transient transformation for the two genotype studied.

Key words: *Zea mays*, indirect somatic embryogenesis, 2,4-D, ABA, GUS, temperature, genetic transformation.

1 INTRODUÇÃO

Cultivado no mundo inteiro, o milho (*Zea mays* L.) movimenta um mercado anual de aproximadamente 40 bilhões de dólares (JAMES, 2014). É um dos principais cereais cultivados e consumidos no mundo, servindo de alimento tanto para o homem como para os animais. Essa cultura tem sido alvo de inúmeros estudos de manipulação genética e transformação de plantas. O melhoramento genético, ou seja, a introdução de genes via engenharia genética tem contribuído para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, pois plantas tolerante a herbicidas e resistente a insetos, as quais estão sendo cultivadas no Brasil, tem causado uma redução na aplicação de defensivos agrícola, bem como na emissão de CO₂ na atmosfera (JAMES, 2010).

Em 2014, o Brasil cultivou 12,5 milhões de hectares (ha) de milho transgênicos (JAMES, 2014). Conforme James (2013), o Brasil é o país que mais cresce em área para produção de transgênicos, apresentando uma evolução de 10% em 2013. Entre 2012 e 2013, o crescimento acumulado foi de 3,7 milhões de hectares no Brasil, o que representa mais que o triplo da média mundial, que foi de 3%. Embora plantas transgênicas sejam cultivadas no Brasil, estas são produzidas por multinacionais sendo importante a produção das mesmas no país.

Inicialmente plantas de milho transformadas geneticamente foram produzidas pelo emprego da técnica de biobalística (GORDON-KAMM et al., 1990), entretanto, hoje, a técnica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tem sido preferida para esse fim (FRAME et al., 2002; 2006; 2011; ISHIDA et al., 2007;

OMER et al., 2013; OMBORI et al., 2014; QUE et al 2014, HIEI et al., 2014), por ser uma alternativa mais eficiente, visto que este método permite a integração do gene exógeno em regiões transcricionalmente ativas do genoma, assim como a introdução de baixo número de cópias que serão integradas no genoma da planta com raros rearranjos (ISHIDA et al., 2007).

A. tumefaciens é uma bactéria gram negativa do solo, capaz de transferir e integrar parte do seu DNA o T-DNA no genoma nuclear das células. Entretanto, é um microorganismo que infecta naturalmente plantas dicotiledôneas, havendo dificuldades no estabelecimento de técnicas para a infecção de plantas monocotiledôneas, como é o caso do milho. Carvalho et al. (2004) relataram que as dificuldades do método de transformação por *A. tumefaciens* em monocotiledôneas pode ser devido à multiplicidade de fatores que influenciam a transformação.

Para uma transformação eficiente do milho, via *A. tumefaciens*, entre os fatores mais importantes a serem considerados está a utilização de: (1) explantes com alta capacidade morfogênética, (2) estirpes de *A. tumefaciens* competentes para transformação de cereais, (3) condições de co-cultivo *in vitro* que favoreçam a transferência do T-DNA da bactéria para o genoma vegetal, e (4) genótipos de milho responsivos *in vitro*.

Além disso, para obtenção de plantas transgênicas o cultivo *in vitro* é geralmente um pré-requisito, pois o gene deve ser introduzido a nível de células ou tecidos competentes para regenerar uma planta completa via cultura de tecidos. Para isso é comumente utilizado tecidos pouco diferenciados para a recepção de genes, sendo

que a transformação genética de milho via *A. tumefaciens* tem sido realizada em células do embrião imaturo (ISHIDA et al 1996; 2007; FRAME et al 2002; 2006; 2011; HUANG & WEI 2005; VEGA et al 2008; ISHIDA et al., 2013).

A maioria dos experimentos de transformação genética em milho tem sido realizada com embriões imaturos do genótipo modelo Hi-II pela sua alta capacidade de produção de calos embriogênicos e regeneração de plantas *in vitro* (FRAME et al., 2000; 2002; 2011; ZHAO et al., 2000; 2001; VEGA et al., 2008). A transformação de outros genótipos de milho por esse método tem sido um desafio (HUANG & WEI 2005, FRAME et al 2006; ISHIDA et al 2007; OMBORI et al., 2013; OMER et al., 2014). O Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF desenvolveu um híbrido de milho, H3MT-2, a partir do cruzamento de linhagens apresentando alta capacidade de produzir calos embriogênicos (SILVA, 2009; GRANDO et al., 2009). A expressão transiente do gene repórter *uidA* em pendões e embriões imaturos deste híbrido co-cultivados com a *A. tumefaciens* já foi detectada (SILVA, 2009), mas necessita estudos sobre a sua capacidade de regeneração de plantas. Outro genótipo alternativo para a transformação genética, seria é a variedade de milho BR 451 da Embrapa Milho e Sorgo (GUIMARÃES et al., 2004) que apresenta capacidade de produção de calos embriogênicos e regeneração de plantas *in vitro* (PETRILLO et al., 2008; SILVA et al., 2009).

Um sistema de regeneração ajustado é essencial para a obtenção de plantas geneticamente modificadas, para que um gene de interesse possa ser introduzido ao nível de células totipotentes e que

plantas possam ser regeneradas a partir destas células transformadas.

Outra etapa crucial no desenvolvimento de um sistema de transformação genética é a etapa de co-cultivo, a qual se refere ao cultivo concomitante do explante e da agrobactéria para a transferência do T-DNA, o qual pode ser realizado de várias maneiras, sendo mais comumente realizado em meio sólido, durante três dias a 20 °C (FRAME et al., 2002; 2006; 2011; ISHIDA et al., 2007).

Desta forma, visando o emprego da tecnologia de transformação genética em milho, há necessidade de avaliar a capacidade de regeneração do novo híbrido de milho H3MT-2 e também adaptar e otimizar a regeneração de plantas a partir do genótipo modelo Hi-II no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF, e adaptar o protocolo de co-cultivo na transformação dos genótipos BR 451 e HI-II. Nesse contexto, os objetivos foram os seguintes:

a) Avaliar a capacidade de conversão de embriões somáticos em plantas de dois híbridos de milho o Hi-II e o H3MT-2 visando sua utilização em experimentos de transformação genética;

b) Avaliar o uso do meio de pré-regeneração contendo ABA e 2,4-D na regeneração de plantas de diferentes genótipos de milho.

c) Avaliar o efeito do período e da temperatura na etapa de co-cultivo na transformação genética de embriões zigóticos imaturos do genótipo de milho Hi-II e da variedade BR 451 com a *A. tumefaciens*.

d) Verificar qual o período ideal para realização do teste histoquímico de GUS após a infecção, visando acessar a frequência de transformação transiente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância do milho

O milho é considerada uma das principais espécies utilizadas no mundo, visto que anualmente são cultivados cerca de 170 milhões de hectares, os quais contribuem para a produção de aproximadamente 900 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2014; USDA, 2014).

Em termos de produção mundial, o Brasil ocupa o terceiro lugar (13%) na produção de milho, atrás somente dos Estados Unidos (40%) e China (20%). Na safra de 2014 os brasileiros cultivaram 15,084 milhões de hectares, com uma produção de 77,187 milhões de toneladas (CONAB, 2014). No Rio Grande do Sul foi observado um recuo da área plantada, chegando a 9,9% inferior ao ano 2013, estabelecendo pouco mais de 932 mil hectares plantados com milho. Essa é menor área plantada na história do estado, que já chegou a plantar mais de dois milhões de ha na década de 90. Se a área apresentou recuo, a produtividade aumentou, passando a mesma para atuais 5.695 kg/ha, contra 5.307 kg/ha do ano anterior (CONAB, 2014). Entre os anos de 1976 e 2014 a produtividade do milho no Brasil aumentou mais de 200%, sendo que a área utilizada para o plantio cresceu apenas 18% (IBGE, 2014).

No México o milho é a base da alimentação da população, chegando a um consumo per capita anual de 63 kg, enquanto no Brasil não chega aos 19 kg (EMBRAPA, 2006). Mesmo não sendo a base da alimentação brasileira, compartilha-se da afirmação de Júnior et al. (2006), que relataram que o milho representa umas das culturas mais importantes devido sua produtividade, composição química e valor nutritivo. E mesmo não tendo conhecimento em termos técnicos de composição os brasileiros nativos, por volta do século XVIII, começaram a colocar o milho em lugar decisivo na alimentação nacional (URU, 2007).

O milho, comparativamente a outras espécies cultivadas, tem experimentado avanços significativos nas mais diversas áreas do conhecimento agrônomo e biológico, bem como naquelas concernentes à ecologia, biotecnologia e biologia molecular, propiciando melhor compreensão de suas relações com o meio e o homem (FANCELLI, 2003). Tais interações mostram-se fundamentais para o exercício da previsão de desenvolvimento da planta, quando submetida a estímulos e ações negativas advindas da atuação de agentes bióticos e abióticos no sistema produtivo, e no melhoramento de sua espécie tornando-a mais produtiva e assim garantir a demanda do produto mundialmente.

2.2 Transformação genética

Há muito tempo novas variedades de milho vêm sendo produzidas a partir de técnicas tradicionais de melhoramento, visando melhoria das plantas (HUANG & WEI, 2004). Entretanto, os métodos

tradicionais de melhoramento são lentos e incertos, sendo que a introdução de um gene ou de um conjunto de genes, pelos métodos convencionais, requer repetidos cruzamentos. Além disso, durante o processo de manipulação genética por cruzamentos controlados, outros genes são transferidos além daquele desejado (FARAH, 2000).

Visando superar tais dificuldades encontradas nos métodos clássicos de melhoramento, diferentes técnicas de transformação genética de plantas foram estabelecidas, com o desenvolvimento da cultura de tecidos e da engenharia genética. Além disso, elas ampliam consideravelmente os limites de disponibilidade de genes imposto pela incompatibilidade sexual. Isto ocorre devido ao fato de poder transferir, para plantas, genes isolados de outras plantas, ou mesmo de microorganismo e animais (BRASILEIRO, 1998). Um gene responsável por uma determinada característica uma vez identificado, pode ser isolado, clonado, sequenciado e utilizado em programas de melhoramento genético de plantas, por meio da transformação genética. Isto permite que características agronômicas importantes como resistência a doenças, pragas, herbicidas e tolerância a estresse possam ser introduzidas em plantas cultivadas (ZANETTINI & PASQUALI, 2004).

Existem diversas técnicas de transformação genética, agrupadas em duas categorias: transferência direta e indireta de genes. A transferência direta de DNA é baseada em métodos físicos ou químicos e a transferência indireta, para intermediar a transformação, usa-se como vetor uma bactéria, como *A. tumefaciens* e a *A. rhizogenes* (BRASILEIRO, 1998).

Comparados os métodos diretos de transformação conhecidos como bombardeamento e eletroporação, a *A. tumefaciens* possui numerosas vantagens, sendo que um dos recursos é gerar um único ou baixo número de cópias de transgenes integrados com um final definido. Isto é positivo, pois a inserção de múltiplas cópias dos genes pode levar a uma instabilidade da expressão dos transgenes ou ainda ao silenciamento gênico (KLAEPER et al., 2001; VEGA et al., 2008).

Outras vantagens são o padrão de inserção simples, integração mais precisa, rearranjos raros e maiores níveis de expressão do transgene (ZHAO et al., 1998; SHOU et al., 2004; ZHANG et al., 2005; VEGA et al., 2008); segmentos relativamente grandes podem ser integrados no genoma da planta (> que 10KB) (HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 1998; ISHIDA et al., 2007).

2.2.1 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

Esse método é intermediado por bactérias do gênero *Agrobacterium*, que são microorganismos que vivem no solo e tem capacidade de penetrar em algumas espécies vegetais, principalmente dicotiledôneas, causando doenças, que na maioria das vezes não gera danos econômicos para a agricultura brasileira (ZANETTINI; PASQUALI, 2004).

A. tumefaciens, atualmente denominada de *Rhizobium radiobacter* (BULL et al. 2010), é uma das cinco espécies do gênero *Agrobacterium* que pode transferir genes para plantas, principalmente para dicotiledôneas. Essa bactéria possui um plasmídeo indutor de

tumor denominado Ti, parte do qual (T-DNA) é incorporado nas células da planta hospedeira.

O T-DNA é delimitado por sequências repetidas de 25 pb, conhecidas como extremidades direita e esquerda, ou borda direita e esquerda, e, este é transferido e integrado no genoma da célula vegetal. Os genes presentes no T-DNA passam, então, a expressar-se, codificando enzimas envolvidas na via de biossíntese de reguladores de crescimento (auxinas e citocininas) (PACURAR et al., 2011). A expressão desses genes interfere no balanço hormonal das células transformadas, resultando na sua multiplicação descontrolada, levando, assim, à formação da galha, ou tumor, nos sítios infetados da planta (TZFIRA & CITOVSKY, 2000; ZUPAN et al., 2000).

O T-DNA também possui genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese de opinas, que são aminoácidos ou carboidratos modificados, os quais são utilizados como fonte de energia, carbono e nitrogênio para a bactéria. Desta forma, as células transformadas pelo T-DNA continuam dividindo-se incontrolavelmente devido à produção de citocininas e auxinas e, quanto mais elas se dividem, mais produzem opinas que vão sendo utilizadas pela bactéria (ANDRADE et al., 2003; PACURAR et al., 2011).

Uma vez estabelecido que os genes contidos no T-DNA não interferiam em sua transferência da célula bactéria para a célula vegetal, cientistas construíram vetores desarmados das funções oncogênicas, pela retirada dos genes envolvidos na síntese de auxina e citocinina, produzindo assim um sistema útil na transferência de genes

e obtenção de plantas geneticamente modificadas (LACROIX et al., 2006; PUCARAR et al., 2011).

A construção de vetores derivados do plasmídeo Ti para introduzir genes exógenos em plantas só foi possível graças a uma particularidade do mecanismo de transferência do T-DNA: nenhum gene presente no T-DNA, exceto os 25 pb de suas bordas, é necessário ao processo de transferência e integração do T-DNA. Assim sendo, pode-se eliminar partes ou todo o T-DNA, incluindo os oncogenes, sem que isso afete o processo de transferência (BRASILEIRO; LACORTE, 1998).

Por ser muito grande, o plasmídeo Ti é difícil de ser manipulado. Portanto, foram criados os vetores binários (BEVAN, 1984), que são menores, e capazes de multiplicar tanto em *A. tumefaciens* como em *Escherichia coli* e fáceis de manipular em laboratório. Esses vetores possuem um T-DNA artificial, no qual diferentes transgenes podem ser inseridos e uma origem de replicação compatível com o Ti na *A. tumefaciens*. Os vetores binários são introduzidos em *A. tumefaciens* desarmadas, ou seja, em bactérias que carregam plasmídeos Ti que tiveram a região do T-DNA removida. O Ti de *A. tumefaciens* desarmadas possui, ainda, a região de virulência (*vir*), sendo seus genes capazes de transferir o T-DNA recombinante do vetor binário para o tecido vegetal (GELVIN, 2003; LEE & GELVIN, 2008)

2.2.2 Método de infecção bacteriana

O mecanismo de transferência de T-DNA é um

mecanismo elaborado que engloba uma série de genes de virulência (*vir*) do plasmídeo Ti. Esses genes *vir* são induzidos por sinais químicos liberados por células injuriadas da planta (CHILTON, 2001), sendo responsáveis pela síntese de enzimas e proteínas que cortam e transportam o T-DNA para o genoma vegetal.

Além da região-T e da região *vir*, três outras regiões funcionais, não envolvidas diretamente no processo de indução tumoral, foram também identificadas no plasmídeo Ti, são elas (i) região de replicação (região *rep*), que contém a origem de replicação e funções ligadas à manutenção do plasmídeo Ti dentro da bactéria (estabilidade), controle do número de cópias e incompatibilidade entre bactérias; (ii) região de absorção e catabolismo de opinas (região *opc*), envolvida na síntese de enzimas específicas responsáveis pela absorção das opinas para dentro da célula e posterior catabolismo das mesmas pela bactéria, e (iii) região de transferência conjugativa (regiões *tra* e *trb*), responsável pela transferência conjugativa do plasmídeo Ti entre linhagens de *Agrobacterium* sp. ou para outras bactérias Gram-negativas (Figura 1). A maioria dessas regiões é altamente conservada entre os diferentes tipos de plasmídeo Ti, principalmente aqueles pertencentes à mesma classe de opinas (ANDRADE et al., 2003).

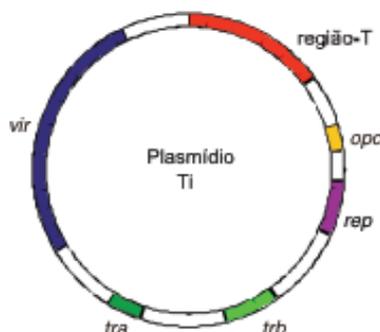


Figura 1 - Representação esquemática da organização de um plasmídeo Ti. As regiões ilustradas correspondem: (*vir*) região de virulência; (*trae trb*) região de transferência conjugativa; (*rep*) região de replicação; (*opc*) região de catabolismo de opinas e (*região-T*) região transferida para a célula vegetal (Zhu et al., 2000)

O processo de infecção e transferência da região-T para a célula vegetal ocorre em diferentes etapas (Figura 2). A primeira delas inicia-se pelo reconhecimento e fixação da bactéria no tecido vegetal lesado por tratos culturais, geadas ou insetos. As Agrobactérias são atraídas em direção à célula vegetal por quimiotactismo positivo em relação a moléculas-sinal (essencialmente compostos fenólicos, aminoácidos e monossacarídeos) que são exsudadas pelas células da planta ferida (TZFIRA & CITOVSKY, 2000). Uma vez em contato com a célula vegetal, as bactérias sintetizam filamentos de celulose que estabilizam a ligação inicial, propiciando uma melhor fixação entre a bactéria e a célula hospedeira (MATTHYSSE et al., 2000).

Com a ligação inicial estabilizada, as moléculas-sinal exsudadas em resposta ao ferimento da planta vão também motivar a expressão dos genes de virulência que estão localizados na região *vir* do plasmídeo Ti. A região *vir* é formada por aproximadamente 34

genes agrupados em pelo menos oito operons (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*, *virF* e *virH*) (PACURAR et al., 2011). Os operons da região *vir* são co-regulados por duas proteínas da própria região *vir*, *VirA* e *VirG* (SUNDERECHA et al., 2009).

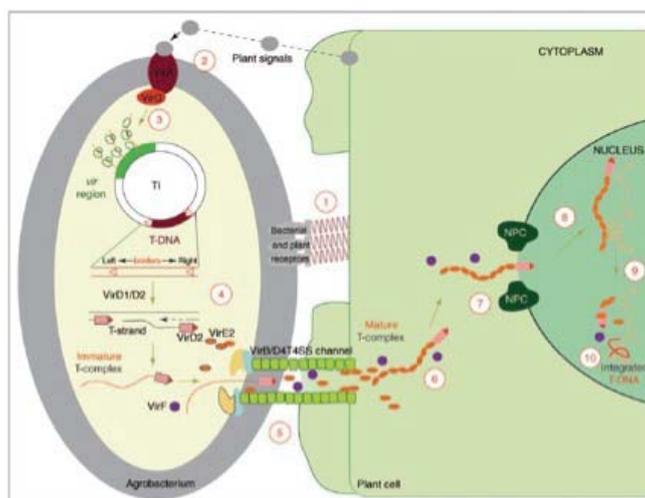


Figura 2 - Ilustração esquemática da transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. O processo de transformação é constituído por nove grandes passos e começa com o reconhecimento e fixação das *A. tumefaciens*, para as células do hospedeiro (1), a detecção de sinais específicos da planta é reconhecido pelos componentes de transdução de sinal *VirA* *VirG* da agrobactéria (2). Após a ativação dos genes da região *vir* (3), uma cópia móvel do T-DNA é gerada pelo complexo de proteínas *VirD1* e *VirD2* (4) e entregue pelo *VirD2* no citoplasma da célula hospedeira o complexo de DNA (complexo fita-T), (6, 7, 8, 9) sendo importado e integrado no genoma do hospedeiro (SUNDERECHA et al., 2009)

O mecanismo pelo qual a fita-T deixa a célula bacteriana, penetra na célula vegetal e integra-se no seu genoma nuclear, é pouco conhecido (ZUPAN et al., 2002). Sabe-se que, para a fita-T chegar até

o núcleo da planta, ela precisa atravessar membranas, paredes celulares e espaços inter e intracelulares. Acredita-se que a fita-T é transportada da bactéria para a célula vegetal, como um complexo nucleoprotéico, conhecido como complexo-T e formado pela fita-T protegida na extremidade 5' por VirD e envolvida por vários monômeros de VirE (SUNDERECHA et al., 2009).

Uma vez inseridos no genoma da planta, os genes presentes no T-DNA, passam a ser transcritos e traduzidos, dando início ao desenvolvimento do tumor. Todos os genes do T-DNA, apesar de sua origem procariota, possuem sinais de regulação que são reconhecidos pela maquinaria de transcrição eucariota vegetal, incluindo TATA e CAAT “boxes” e cauda poli(A). Assim, os genes do T-DNA são expressos ao mesmo tempo e da mesma maneira que os genes da planta (SUNDERECHA et al., 2009).

2.2.3 Etapas da transformação genética de milho via *A. tumefaciens*

Na transformação genética via *A. tumefaciens* as etapas incluem: Infecção do explante com a bactéria, seguido de um curto prazo de tempo de co-cultivo entre os mesmos, eliminação da *A. tumefaciens* por antibióticos, seleção dos tecidos transformados com agente seletivo em meio e regeneração de plantas (Figura 3).

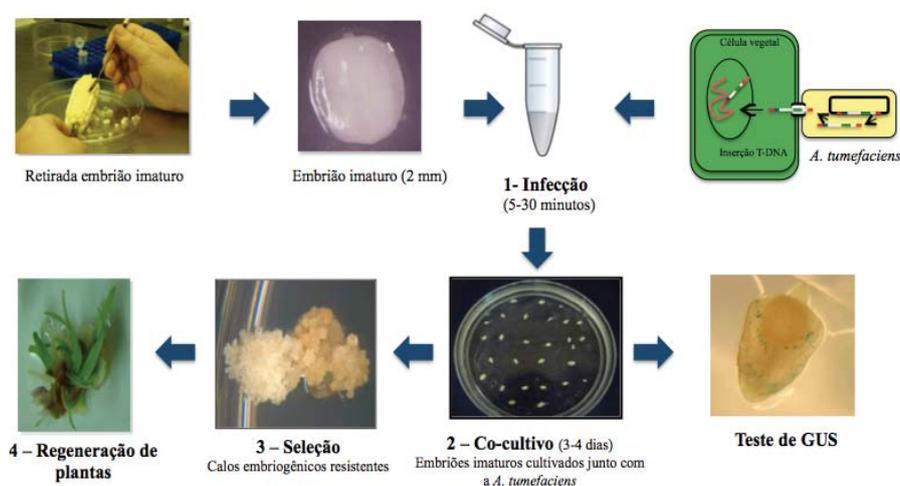


Figura 3 - Etapas da transformação genética via *A. tumefaciens*. Laboratório de Biotecnologia Vegetal, UPF. Passo Fundo, 2015.

2.2.3.1 Co-cultivo do tecido com *A. tumefaciens*

Após a etapa de infecção, que é onde ocorre o contato da bactéria com o tecido a ser transformado, podendo variar de cinco a trinta minutos em meio líquido contendo de 100 a 200 μM de acetossiringona (FRAME et al., 2002; 2006; 2011; HUANG & WEI, 2005; LEE et al., 2007; VEGA et al., 2008; OMBORI et al., 2013), essa substância é necessária para ativar a região vir e induzir ao máximo essa região (ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 2000; SAIRAM et al., 2003; WANG et al., 2007), é realizado o co-cultivo.

No co-cultivo os tecidos são transferidos para meio sólido sem a presença de agentes seletivos e antibióticos, para que ocorra a transferência do T-DNA da bactéria para a célula vegetal. Essa etapa, assim como a infecção, é uma das mais sensíveis e necessita ter condições ótimas para que a integração do T-DNA no genoma do

tecido vegetal ocorra com sucesso. Geralmente ocorre de 3 a 4 dias na temperatura de 20 °C (FRAME et al., 2002; 2006; 2011; HUANG & WEI, 2005). De acordo com Ishida et al., (2007) o co-cultivo, juntamente com o estágio de desenvolvimento correto dos embriões imaturos, é um dos fatores mais importantes no processo de transformação genética de plantas.

Quando se realiza a transferência de genes entre espécies, um teste essencial é verificar se a espécie receptora transformada está expressando o gene de interesse, esse teste é geralmente feito após o período de co-cultivo (FRAME et al., 2002; 2006; 2011; HUANG & WEI, 2005).

Para tal identificação, vem sendo utilizado genes repórteres, que são genes introduzidos juntamente com o gene de interesse que permitem a visualização do evento de transformação genética por expressarem uma enzima ou proteína detectável por testes específicos (CARNEIRO et al., 2004). O mais amplamente utilizado é o gene *uidA* que foi isolado de *E. coli* (JEFFERSON et al., 1987), pois além de não necessitar de radioatividade e equipamentos específicos ele apresenta outras vantagens como simplicidade, rapidez e versatilidade de métodos de detecção da atividade enzimática. Ainda há o fato de que a maioria das plantas não apresenta atividade endógena significativa. Além disso, a β -glucuronidase não requer cofator e é bastante estável, resistente a diversos solventes e detergentes e é ativo em ampla faixa de pH (5,0 a 9,0) (LACORTE, 1998).

A enzima β -glucuronidase, na presença de seu substrato X- Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide), produz um precipitado de

cor azul índico, facilitando a visualização das células que receberam o gene. A expressão do gene *uidA* pode ser detectada horas após o episódio de transformação sendo útil, desta forma, na determinação da frequência de transformação transitória (SILVA, 2009).

2.2.3.2 Etapa de descanso

Após o co-cultivo, os explantes são transferidos para meio de descanso contendo antibióticos, geralmente carbenicilina ou cefotaxima e vancomicina para a eliminação da *A. tumefaciens* (ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; 2006; 2011; OMBORI et al., 2013). Nesta etapa também ocorre a recuperação das células vegetais que sofreram com a integração do T-DNA. O período de descanso varia de 4 a 8 dias (ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; 2006; 2011; VEGA et al., 2008).

2.2.3.3 Seleção dos tecidos transformados

Para seleção de tecidos e plantas transformadas os genes marcadores são de extrema importância. Genes marcadores são genes que determinam resistência a antibióticos e herbicidas, sendo que a seleção é realizada na presença dos agentes seletivos correspondentes. O ideal é que o gene marcador de seleção seja capaz de se expressar em todos os tecidos, em um grande número de espécies vegetais hospedeiras. O gene marcador de seleção deve ser introduzido no genoma da planta juntamente com o gene de interesse. Dessa forma, uma vez ocorrido o processo de transformação, as células

transformadas que contenham e expressem o gene marcador em contato com o agente seletivo poderão crescer normalmente, enquanto aquelas que não foram transformadas morrerão (BRASILEIRO & DUSI, 1999).

O gene marcador *bar* clonado de *Streptomyces hygroscopicus*, codifica para a fosfinotricina acetiltransferase (PAT) que confere resistência ao herbicida PPT (fosfinotricina) (DEBLOCK et al., 1987), tem auxiliado na seleção de calos de milho já transformados com o gene desejável, pois somente os mesmos sobrevivem quando cultivados em meio de cultura contendo o herbicida glufosinato de amônio ou Bialaphos (agente ativo fosfinotricina) (FRAME et al., 2002; 2006; 2011; VEGA et al., 2008; SILVA, 2009).

Plantas completas são regeneradas a partir dos calos resistentes ao herbicida e ainda, a aplicação do herbicida nas folhas de plantas adultas pode ser utilizada para realização do “screening” para seleção de plantas transgênicas (GRANDO, 2001). A frequência de calos resistentes ao herbicida pode ser utilizado para calcular a frequência de transformação estável (FRAME et a., 2002).

2.2.3.4 Regeneração de plantas

Devido à organogênese e à embriogênese, dois processos morfogênicos, é possível a regeneração de plantas através da cultura de tecidos. Existem dois padrões básicos de expressão desses dois processos: direto e indireto. Na embriogênese somática direta, os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação

de estádios intermediários de calos. Na embriogênese indireta os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação (GUERRA et al, 1999).

A organogênese geralmente se dá pela otimização da relação citocinina/auxina no meio de cultura e ocorre pela diferenciação de órgãos e brotos diretamente do explante (organogênese direta) ou do calo (organogênese indireta) podendo originar-se de uma única célula ou de um conjunto de células (ANDRADE, 2005). Normalmente, envolve a regeneração de gemas a partir de grupos de células meristemáticas, existindo casos em que é difícil determinar se o processo de regeneração envolve organogênese ou embriogênese. Porém, há critérios para a determinação do tipo de regeneração, como os apresentados a seguir: embriões somáticos possuem sistema vascular fechado sem conexão com o sistema vascular do explante inicial, como ocorre na organogênese. Na organogênese são formadas gemas caulinares que, mais tarde, darão origem a raízes adventícias (PERES, 2002).

A regeneração de plantas pela embriogênese é a partir de embriões somáticos formados no tecido cultivado. Estudos citológicos mostraram que a embriogênese é a rota mais comum para regeneração de plantas (VASIL et al., 1985; GRATTAPAGLIA & MACHADO 1998).

As auxinas são relatadas como fortes iniciadoras da embriogênese somática (KOMAMINE et al., 1992; RAGHAVAN, 1997; EZHOVA, 2003; CHE et al., 2006). Conforme Theologis (1986), é evidente que as auxinas induzem o crescimento e o

desenvolvimento a partir de alterações na expressão gênica. A exposição a uma grande quantidade de auxina serve como um gatilho, induzindo a divisão celular nas células da epiderme e promovendo uma maior diferenciação em embriões somáticos (BONACIN et al., 2000). Mashayekhi et al., (2008) relatam também que baixas concentrações de auxina induzem a embriogênese somática. Assim, mesmo uma pequena concentração de auxina é suficiente para indução de células competentes para desencadear a embriogênese somática (DE KLERK et al., 1997). A auxina sintética mais amplamente utilizado para a indução de calo embriogênico em gramíneas é o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (GRANDO et al., 2002; 2013).

Outro hormônio utilizado na embriogênese somática é o ABA (ácido abscísico), sendo adicionado no meio de cultura durante as fases finais de desenvolvimento dos embriões somáticos, de certo modo, assemelha-se ao aumento natural de hormônios endógenos observados em vários embriões zigóticos. Portanto, este regulador de crescimento vegetal é utilizado para estimular a maturação e, ao mesmo tempo, para evitar germinação precoce (GARCIA- MARTÍN et al., 2005; GONÇALVES et al., 2010). Segundo Torres et al. (1999), a inclusão de ABA, também aumenta a frequência de embriões somáticos produzidos e sua conversão em plantas.

Diversos fatores podem influenciar o potencial regenerativo de uma espécie como genótipo, os tipos de dosagem de reguladores de crescimento, os tipos e tamanho de explantes utilizados para iniciar a cultura, os meios de culturas e as condições de cultivo (BHASKARAN & SMITH, 1990; GRANDO et al., 1993).

A regeneração de plantas de milho via embriogênese somática foi primeiramente relatada por Green & Phillips (1975). Desde então, a regeneração de milho tem sido relatada a partir de vários explantes como embriões zigóticos imaturos (DUNCAN et al., 1985; BINOTT et al., 2008; FRAME et al., 2002; 2006), embriões maduros (HUANG & WEI 2004; ZHAO et al., 2008), tecidos foliares jovens (AHMADABADI et al., 2007), meristemas apicais (SAIRAM et al., 2003; CHEN et al., 2006) e pendão imaturo (SONGSTAD et al., 1992, GRANDO et al., 2013), geralmente passando pelo processo de embriogênese somática indireta, ou seja mediante a produção de calos embriogênicos. Atualmente, embriões zigóticos imaturos tem sido o explante mais amplamente utilizado para a produção de calos embriogênicos (ALAN & BRIAN, 2009) e transformação genética (FRAME et al., 2002; 2006; 2011; HUANG; WEI, 2005; VEGA et al., 2008; ISHIDA et al., 2007; 2013), visto que o mesmo apresenta grande número de células jovens e competentes para a embriogênese, além de alto potencial regenerativo (HUANG & WEI, 2004).

2.2.4 Influência do genótipo na cultura de tecidos e transformação genética de milho

O sucesso na recuperação de eventos transgênicos é atribuído, em grande parte, à elevada frequência de indução e manutenção de calos embriogênicos, estas são características bastante dependentes do genótipo utilizado (Songstad et al., Brettschneider et al., Lowe et al., apud FRAME et al., 2006). Infelizmente a maioria dos genótipos de milho, especialmente as variedades elite, apresentam

pobre resposta *in vitro*, aspecto que limita o número de genótipos que foram eficientemente transformados (ISHIDA et al., 2007).

Diferenças genotípicas na iniciação de culturas embriogênicas de milho já foram relatadas extensamente na literatura (GREEN & PHILLIPS, 1975; DUNCAN et al., 1985; TOMES & SMITH, 1985; HODGES et al., 1986; BHASKARAN & SMITH, 1990; CARVALHO et al., 1997; VARNIER, 2004; FERNANDES et al. 2008). No Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF foram testados 39 genótipos de milho de diferentes programas de melhoramento, sendo que somente 21 genótipos (54%) produziram calos embriogênicos, e destes 11 (28%) mantiveram sua embriogenicidade ao longo dos subcultivos, sendo possível regenerar plantas de somente 10 genótipos (25,6%) (SILVA et al., 2003; VARNIER, 2004; GRANDO et al., 2004; 2005; 2006).

Diversas linhagens e híbridos de milho têm sido utilizados para indução de culturas de calos, porém, a regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos tem sido obtida eficientemente a partir de poucos genótipos, destacando-se a linhagem americana A188, que apresenta baixo valor agrônômico, mas apresenta alta capacidade de indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas (GREEN & PHILLIPS, 1975; ARMSTRONG et al., 1992; ISHIDA et al., 1996).

Um grande avanço no cultivo *in vitro* ocorreu pelo desenvolvimento do híbrido Hi-II, a partir do cruzamento entre as linhagens A188 x B73 (ARMSTRONG et al., 1991). Esse híbrido apresenta excelente resposta *in vitro* na produção de calos embriogênicos com alto potencial de regeneração de plantas (VEGA et al., 2008) e tem sido amplamente utilizado nos experimentos de

transformação genética de milho, tanto pelo método de biobalística (SONGSTAD et al., 1992; WALTERS et al., 1992; GRANDO, 2001; GRANDO et al., 2005) como *A. tumefaciens* (LUPOTTO et al., 1998; ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002, 2011; VEGA et al., 2008).

Outros genótipos responsivos *in vitro* têm sido identificados por vários grupos e já utilizados na transformação de plantas (ISHIDA et al., 1996; 2007; SAIRAM et al., 2003; FRAME et al., 2006; 2011; LEE et al., 2007; OMBORI et al., 2008; 2013; AKOYI et al., 2013; OMER et al., 2013; MUOMA., 2014). Há poucos relatos na literatura de transformação de genótipos brasileiros de milho (CARNEIRO, 2009; SILVA, 2013), sendo assim, o desenvolvimento deste sistema de transformação possibilitará o uso da engenharia genética para o melhoramento do milho e o desenvolvimento agrícola do país.

2.2.5 Aspectos envolvidos na transformação genética via *A. tumefaciens* em milho

O milho foi a segunda cultura a ser transformada via *A. tumefaciens* após o arroz. Sendo relatada primeiramente em 1996, por um grupo Japonês (ISHIDA et al., 1996). Depois disso, outros grupos tiveram sucesso nessa técnica (FRAME et al., 2002; 2006; HUANG & WANG et al., 2003; 2004; 2009; WEI, 2005; ZHAO et al., 2001, VEGA et al., 2008; OMER et al., 2013; OMBORI et al., 2014).

Ishida et al. (1996) transformaram a linhagem A188 de milho através do co-cultivo de embriões imaturos com *A. tumefaciens* linhagem LBA4404 carregando vetores super binários, obtendo uma

frequência de transformação entre 5 a 30%. Em 2001, Zhao e colaboradores utilizando embriões imaturos do híbrido Hi-II de milho, obtiveram 40% de transformação. Frame et al. (2002) utilizaram o mesmo genótipo para a introdução de genes usando um vetor binário tradicional (não superbinário), obtendo uma eficiência de transformação de 5.5%.

O genótipo do milho utilizado tem um papel extremamente importante na determinação da frequência de transformação. A maioria dos genótipos utilizados tem sido a Linhagem A188 e seus híbridos, pois os mesmos apresentam ótima capacidade embriogênica *in vitro* (ISHIDA et al., 1996; 2007; ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002).

Huang e Wei (2005) desenvolveram uma metodologia eficiente para transformação de quatro linhagens elites de milho avaliando inúmeros fatores que influenciam a transformação desta espécie com *A. tumefaciens*, tais como concentração bacteriana, pH e presença de tween 20 no meio de infecção, tempo de inoculação, linhagens de *A. tumefaciens* (LBA4404, EHA105 e GV3101), tempo, temperatura e pH do co-cultivo, obtendo uma eficiência de transformação de até 5,3%. Este valor é considerado satisfatório, desde que não foram utilizados genótipos modelos, nem vetores super binários.

Mesmo obtendo várias espécies de monocotiledôneas transformadas via *A. tumefaciens*, existem muitos aspectos a serem melhorados e estudados que influenciam na transformação principalmente na otimização da mesma.

Carvalho et al. (2004) relataram que as dificuldades do

método de transformação por *A. tumefaciens* em monocotiledôneas pode ser devido a multiplicidade de fatores que influenciam a transformação. Uma limitação importante do sistema da *A. tumefaciens* para a transferência de genes para monocotiledôneas é a existência de estrita interação entre o genótipo da planta e estirpe da agrobactéria, bem como a necessidade de identificar e completar sinais moleculares específicos para a indução de genes *vir* durante o período de co-cultivo.

Por isso, torna-se importante o estudo do co-cultivo na infecção de explantes com *A. tumefaciens*. Huang & Wei (2005) testaram diferentes tempos de co-cultivo. Quando os explantes não foram co-cultivados e foram transferidos diretamente para meio seletivo após a inoculação com *A. tumefaciens* não houve transformação. Com um dia de co-cultivo a frequência de transformação foi muito baixa, com dois dias a frequência aumentou e no terceiro dia e até o sexto dia houve um aumento na frequência de transformação. Um período de três dias de co-cultivo tem sido utilizado para milho (ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; SAIRAM et al., 2003; HUNG & WEI, 2005; FRAME et al., 2006; ISHIDA et al., 2007 e VEGA et al., 2008).

Além do período de co-cultivo, a temperatura utilizada nesta fase tem influência na eficiência da transformação. Huang e Wei (2005) testaram diferentes temperaturas (19 a 28 °C) durante esse período sendo que a temperatura mais adequada foi 22 °C e níveis inferiores de expressão de *gus* foram observados em 19 e 28 °C, mas outros autores utilizaram 25° C durante esta etapa (ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 2001, ISHIDA et al., 2007, VEGA et al., 2008).

Essas informações podem ajudar a desenvolver métodos para aumentar a frequência de transformação em importantes espécies de plantas, inclusive milho.

O detalhamento das etapas envolvidas na transformação genética de milho via *A. tumefaciens* demonstra a complexidade dos fatores envolvidos nesse processo, assim as condições relacionadas a estirpes, crescimento da bactéria e meios de cultura, condições na transformação, como na etapa de co-cultivo, devem estar bem ajustadas.

O milho apresenta um forte efeito genotípico para a resposta *in vitro* e somente explantes jovens contendo células meristemáticas ou embriogênicas são responsivos a cultura de tecidos. Apesar do esforço e dedicação de diversos grupos de pesquisa, o milho, tem sido difícil de ser transformado geneticamente. A extensão de genótipos capazes de serem transformados aliado a uma melhor compreensão das interações patógeno-hospedeiro, pode proporcionar maiores possibilidades para a aplicabilidade e eficiência da engenharia genética no melhoramento do milho.

CAPITULO I

CONCENTRAÇÃO DE FITORREGULADORES NA ETAPA DE PRÉ-REGENERAÇÃO *in vitro* DE DOIS HÍBRIDOS DE MILHO PARA MANIPULAÇÃO GENÉTICA

DIELLI APARECIDA DIDONÉ¹

RESUMO – A primeira etapa de um programa de transformação genética de plantas é o estabelecimento de um protocolo eficiente de regeneração a partir da cultura de tecidos. Para obtenção de uma planta geneticamente modificada o gene de interesse deve ser incorporado estavelmente no genoma de uma célula saudável e totipotente, de forma que a planta regenerada contenha o novo gene inserido em todas as suas células, inclusive nos gametas para transmissão do gene para a próxima geração. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de conversão de embriões somáticos em plantas em dois híbridos de milho mediante o uso de uma etapa de pré-regeneração. Calos embriogênicos provenientes de embriões zigóticos imaturos dos genótipos Hi-II e H3MT-2 foram cultivados em cinco diferentes meios de pré-regeneração contendo diferentes concentrações de fitoreguladores 2,4-D e ABA (esquema bifatorial 5x2 resultando em 10 tratamentos). A etapa de pré-regeneração se mostrou fundamental na regeneração de plantas do genótipo Hi-II. Para este genótipo, o meio de pré-regeneração contendo 0,25 mg.L⁻¹ de

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração “Produção Vegetal”.

2,4-D demonstrou ser o mais eficaz na conversão de embriões somáticos em plantas (410 plantas a partir de 2,5 gramas de calos embriogênicos iniciais) e também acelerou o processo de regeneração em duas semanas. Este tratamento produziu 17X mais plantas comparado com o sistema de regeneração sem a etapa de pré-regeneração. Já a adição dos fitoreguladores ABA juntamente com 2,4-D proporcionou um aumento na divisão celular retardando o início do desenvolvimento de plantas em 15 dias. O genótipo H3MT-2 não respondeu positivamente aos tratamentos e sistema de regeneração utilizados neste experimento. O mesmo provavelmente necessita de outras condições de cultivo, como adição de fitoreguladores de enraizamento e/ou parte aérea para seu melhor desempenho. Foi demonstrado, neste trabalho, a otimização da regeneração *in vitro* do genótipo Hi-II de milho, podendo resultar na aceleração e eficiência da obtenção de plantas geneticamente modificadas.

Palavras-chave: Embriogênese somática indireta, *Zea mays*, 2,4-D, ABA, cultivo *in vitro*.

FITOREGULATORS CONCENTRATION ON *in vitro* PRE-REGENERATION STAGE OF TWO CORN HYBRID FOR GENETIC MANIPULATION

ABSTRACT – The first stage of plant genetic transformation program is the establishment of an efficient regeneration protocol from tissue culture. To obtain a genetically modified plant the gene of interest need to be stably integrated into the genome of a healthy

totipotent cell such that the regenerated plant contains the new gene inserted in all their cells, including the gametes gene for transmission to next generation. The objective of this study was to evaluate the conversion capacity of somatic embryos in to plants from two maize hybrids by using a pre-regeneration step in the presence of 2,4-D and ABA. Embryogenic callus from immature zygotic embryos of Hi-II and H3MT-2 genotypes were grown in five pre-regeneration media containing different concentrations of 2,4-D and fitoregulores ABA (5x2 factorial scheme resulting in 10 treatments). The pre-regeneration step proved crucial for regeneration of plants from Hi-II genotype. For this genotype, the pre-regeneration medium containing 0.25 mg.L^{-1} 2,4-D was shown to be more effective in the conversion of somatic embryos into plants (410 plants from the initial 2.5 g of embryogenic callus) and also accelerated the regeneration process in two weeks. Since the addition of ABA fitoregulators with 2,4-D resulted in an increase in cell division, it caused a delay the onset of development of plants 15 days. The H3MT-2 genotype did not respond positively to treatment and regeneration system used in this experiment. It has been shown in this work, the optimization of *in vitro* regeneration of maize Hi-II genotype and it may result in acceleration and efficiency of the production of genetically modified plants.

Key words: Indirect somatic embryogenesis, *Zea mays*, 2,4-D, ABA *in vitro* cultivation.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) tem sido uma importante fonte alimentícia para o mundo e tem contribuído no aumento das produções agrícolas mundiais. Atualmente, é o terceiro cereal mais produzido no mundo, havendo previsões de que até o ano de 2020, o milho vai superar o arroz e o trigo na demanda global (PINGALI, 2001). No Brasil, o milho é uma das culturas mais importantes, sendo cultivado em quase todo o território nacional.

Devido sua importância sócio econômica, grandes investimentos têm sido aplicados no seu melhoramento genético convencional e, nas últimas duas décadas, no melhoramento através da engenharia genética. No entanto, um pré-requisito fundamental para aplicação das técnicas biotecnológicas no melhoramento de plantas é a possibilidade de obtenção de plantas *in vitro*. A regeneração de plantas de milho via embriogênese somática foi primeiramente relatada por Green & Phillips (1975), dando início a história do milho na biotecnologia (FRANK & CHRISTIAN, 2010). O embrião zigótico imaturo tem sido o explante mais amplamente utilizado para a produção de calos embriogênicos (VASIL & VASIL, 1982; DUNCAN et al., 1985; BINOTT et al., 2008) e transformação genética de milho (FRAME et al., 2002; 2006; 2011; HUANG & WEI, 2005; VEGA et al., 2008; ISHIDA et al., 2007; 2014; OMER et al., 2013), visto que o mesmo apresenta grande número de células jovens e competentes para a embriogênese, além de alto potencial regenerativo (HUANG & WEI, 2004).

A auxina sintética 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) tem sido amplamente utilizada para indução de calos embriogênicos em milho (FRAME et al., 2002; 2006; 2011; ZHAO et al., 2008 GRANDO et al., 2013) e o ABA (ácido abscísico) tem sido utilizado por alguns grupos (ARMSTRONG et al., 1994) para promover o desenvolvimento da germinação de embriões somáticos.

Grande parte dos protocolos de regeneração de plantas a partir de embriões somáticos de milho induzidos *in vitro* requer duas etapas: (a) maturação dos embriões somáticos e (b) germinação dos mesmos de forma a favorecer o desenvolvimento da parte aérea e raiz. A maturação é induzida pela retirada do 2,4-D e aumento do nível de sacarose de 3 para 6% no meio denominado Regeneração I. Por outro lado a germinação dos embriões maturados se dá numa próxima fase onde a concentração de sacarose é reduzida novamente a 3% sem a adição de reguladores de crescimento e na presença da luz (FRAME et al., 2000; 2002; 2011).

Uma estratégia publicada recentemente por Frame et al. (2011) para aumentar a eficiência na regeneração de plantas transgênicas do híbrido de milho Hi-II foi a utilização da etapa de pré-regeneração, a qual constitui-se na transferência dos embriões somáticos a um meio contendo reduzida concentração de 2,4-D, em relação ao meio de manutenção de calos, antes de proceder o processo de regeneração propriamente dita. A manutenção dos embriões por duas semanas numa concentração reduzida de auxina estimula o desenvolvimento e diferenciação dos embriões antes do subcultivo para o meio de maturação apresentando alta concentração de sacarose (Frame et al., 2000).

No entanto, a regeneração do milho é altamente dependente do genótipo visto que a maioria dos genótipos não conseguem produzir calos embriogênicos a partir de explantes ou regenerar plantas. A recalcitrância do milho *in vitro* tem sido amplamente relatada na literatura (HUANG & WEI, 2005; FRAME et al., 2006; ISHIDA et al., 2007; LEE et al., 2007; WANG et al., 2007; OMBORI et al., 2008; WANG et al., 2009; CARNEIRO et al., 2009; AKOYI et al., 2013; GRANDO et al., 2013).

O híbrido Hi-II, bem como suas linhagens de origem (A188 e B73), tem sido largamente utilizados na obtenção de transgênicos devido seu alto potencial de indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas (FRAME et al., 2000; 2002; 2011; ZHAO et al., 2000; 2001; VEGA et al., 2008). No entanto, esse híbrido americano é um genótipo de clima temperado e portador de pobres características agronômicas. Portanto, é desejável adaptar o sistema de cultura de tecidos a genótipos brasileiros adaptados ao clima e com boas características agronômicas (CARNEIRO, 2009; GRANDO et al., 2013; SILVA, 2013).

O potencial embriogênico de genótipos brasileiros de milho foi relatado por Santos-Serejo & Aguiar-Perecin (2000), Carneiro et al. (2000), Petrillo et al. (2008), Fernandes et al. (2008) e Carneiro (2009). No entanto, não existem relatos sobre plantas transgênicas obtidas a partir de genótipos sul-brasileiros de milho (GRANDO et al., 2013).

O Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF (LBV-UPF) desenvolveu um híbrido de milho denominado H3MT-2, a partir de linhagens responsivas *in vitro*. Esse híbrido possui espiga bem

desenvolvida, além de ter sido selecionado em trabalhos anteriores por apresentar alta capacidade de produção de calos embriogênicos (SILVA, 2009; 2013), podendo ser útil nos experimentos de transformação genética. No entanto, sua capacidade de regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos ainda deve ser avaliada.

Desta forma, visando o emprego da tecnologia de transformação genética em milho, há necessidade de avaliar a capacidade de regeneração do novo híbrido de milho, bem como, adaptar e otimizar a regeneração de plantas a partir do genótipo modelo Hi-II.

A otimização da regeneração do híbrido Hi-II e o conhecimento do potencial regenerativo do novo híbrido H3MT-2 busca fornecer uma base útil para expandir o sucesso da transformação genética de milho no LBV-UPF.

Os objetivos deste trabalho foram:

a) Avaliar a capacidade de conversão de embriões somáticos em plantas de dois híbridos de milho, Hi-II e o H3MT-2, visando sua utilização em experimentos de transformação genética.

b) Avaliar o uso do meio de pré-regeneração suplementado com ABA e 2,4-D na regeneração de plantas de diferentes híbridos de milho.

2 MATERIAL E MEÉTODOS

2.1 Local

O experimento foi desenvolvido no telado, casa de vegetação e Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo – RS, no período de março de 2012 a março de 2013.

2.2 Material vegetal

Foram utilizados dois genótipos de milho: Hi-II e H3MT-2 (Tabela 1). Sementes destes genótipos foram semeadas em telado, contendo solo previamente analisado e corrigido. Após 12 dias da autopolinização, os embriões zigóticos imaturos, medindo cerca de 1,5 a 1,8 mm de comprimento, foram excisados assepticamente para indução dos calos embriogênicos.

Tabela 1 - Genótipos de milho utilizados para estudo da regeneração de plantas *in vitro* e seus programas de origem

Genótipos	Origem
Hi-II (Híbrido B73XA188)	Universidade de Minnessota-EUA
H3MT-2 (Híbrido L20XL2)	LBV/UPF*

*Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Universidade de Passo Fundo.

2.3 Indução de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos imaturos

Os embriões imaturos dos dois genótipos de milho foram cultivados no meio de indução de calos composto pelo meio básico N6 (CHU et al., 1975) contendo vitaminas Ericson (0,5 mg.L⁻¹ de tiamina HCl, 2 mg.L⁻¹ de glicina, 0,5 mg.L⁻¹ de piridoxina HCL, 0,5 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico), 100 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 2,88 g.L⁻¹ de L-prolina, 10 µM de nitrato de prata (AgNO₃), 20 g.L⁻¹ de sacarose, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D (SONGSTAD et al., 1992), até a formação de calos embriogênicos. Para tal, os explantes foram subcultivados a cada 21 dias, em meio de manutenção para multiplicação dos calos o qual diferencia do meio de indução apenas no aumento de 2,4-D para 2 mg.L⁻¹ e na ausência de AgNO₃. Calos com cinco meses de idade foram selecionados e pesados para o início dos experimentos de regeneração de plantas.

2.4 Etapa de pré-regeneração

A etapa de pré-regeneração visa preparar os embriões somáticos para a sua regeneração. Para essa fase foi utilizado o meio básico MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido das vitaminas MS (0,5 mg.L⁻¹ de tiamina HCl, 2 mg.L⁻¹ de glicina, 0,5 mg.L⁻¹ de piridoxina HCL, 0,5 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico), 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ sacarose, 3 g.L⁻¹ Phytigel, pH 5,8. A este meio foram adicionados diferentes tipos e concentrações de fitoreguladores,

conforme consta na tabela 2.

Calos embriogênicos dos genótipos Hi-II e H3MT-2 foram cultivado nestes cinco diferentes meios de pré-regeneração, sendo que 500 mg de calo embriogênico fresco foi distribuído homogêneamente na superfície da placa de petri (100 mm X 15 mm) contendo 25 ml de cada meio de pré-regeneração. As culturas foram mantidas por 14 dias no escuro a 25 ± 2 °C.

Tabela 2 - Concentrações dos fitoreguladores utilizados nos diferentes meios de pré-regeneração. Passo Fundo, 2014

Meios	Concentração		
	2,4-D mg.L ⁻¹	ABA mg.L ⁻¹	Sacarose g.L ⁻¹
M1	-	-	30,0
M2*	0,25	-	30,0
M3	0,25	0,26	30,0
M4**	0,10	0,26	30,0
M5***	-	-	60,0

* Frame et al. (2011), ** Arsmstrong et al. (1994), ***Sem pré-regeneração, passagem direta para Regeneração I com alta concentração de sacarose, segundo Frame et al. (2002).

2.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o completamente casualizado, com cinco repetições, no esquema bifatorial 5x2 (5 concentrações de fitoreguladores x 2 genótipos) resultando, em dez tratamentos. A unidade experimental foi constituída por uma placa de petri com 500 mg de calos embriogênicos selecionados, totalizando em torno de, 13 calos de, aproximadamente, 0,5 cm de diâmetro.

2.6 Etapas de maturação e germinação de embriões somáticos

Os tecidos encubados nos meio de pré-regeneração foram transferidos para placa de Petri (100 mm X 25 mm) contendo 30 ml do meio de Regeneração I (RI, Tabela 3) onde permaneceram duas semanas no escuro a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ para maturação dos embriões somáticos. Após os calos foram transferidos para o meio de Regeneração II (RII) em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h com lâmpadas de luz fluorescentes sob intensidade de luz de $40\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ para germinação.

As estruturas embriogênicas foram mantidas no meio R II em placa de petri até as plantas germinadas atingirem 1 a 1,5 cm de comprimento, quando foram transferidas para recipientes de vidro transparente (200 mL), contendo 20 mL da mesma formulação do meio. As estruturas embriogênicas remanescentes foram repicadas para meio fresco de mesma composição a cada três semanas até a obtenção de plantas.

Tabela 3 - Meios utilizados para regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos de milho (FRAME et al., 2002, 2011)

Meios	Maturação dos embriões somáticos
Regeneração I	Sais MS, acrescidos de vitaminas MS, 100 mg.L^{-1} de mio-inositol, 60 g.L^{-1} sacarose, 3 g.L^{-1} Phytigel, pH 5.8.
	Germinação dos embriões somáticos
Regeneração II	Mesma composição do meio de Regeneração I com redução concentração de sacarose para 30 g.L^{-1} ; pH 5,8.

Na etapa de maturação foi retirada uma amostragem de calo para estudo histológico. Os calos embriogênicos, foram fixados em FAA (formaldeído: ácido acético: etanol 70% na proporção de 5:5:90 e coloridos com azul de toluidina, preparado em solução aquosa 2% (p/v). Subsequentemente, os tecidos foram desidratados em solução de etanol e etanol xilol em séries e embebidos em parafina. Seções de tiras de 10 mm de espessura foram fixadas em lâminas com xilol e montadas, conforme Carvalho et al. (2001). As observações das preparações foram realizadas em microscópio binocular (10x), equipado com câmara fotográfica.

2.7 Aclimatização

Apos atingirem 10 a 15 cm de comprimento nos vidros, as plantas foram aclimatizadas sendo cuidadosamente removidas do meio. Suas raízes foram lavadas em água corrente e transferidas para potes plásticos de 500 ml contendo 50% substrato esterilizado Eucatex tipo floreira e 50% vermiculita. As plantas foram mantidas por quatro dias em câmara com alta umidade, a qual foi gradualmente reduzida. Depois de sete a dez dias, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, sendo inicialmente protegidas da luz direta do sol por 2-3 dias, e gradativamente expostas ao sol. Plantas desenvolvidas foram transferidas para vasos com capacidade de 10 L, contendo o mesmo substrato acima citado até atingirem a maturidade.

2.8 Avaliação dos sistemas de regeneração e análise estatística

As seguintes variáveis foram analisadas após 15 dias de cultivo nas diferentes etapas de regeneração:

Etapa de pré-regeneração: Frequência de manutenção dos calos embriogênicos, a qual se refere à frequência de calos que se mantiveram embriogênicos nos diferentes meios avaliados após 15 dias de cultivo.

Etapa de maturação: Número de embriões somáticos maduros obtido de 500 mg de calo embriogênico após 15 dias de cultivo. Os embriões maduros foram identificados por apresentarem escutelo esbranquiçados e desenvolvido.

Etapa de germinação: número de embriões germinados e número de embriões somáticos maduros tardiamente obtido de 500 mg de calo embriogênico após 15 dias em meio de regeneração II. No final da etapa de germinação, a qual durou em torno de 60 dias, foi avaliado o número total de plantas obtidas de cada tratamento que foram transferidas para recipientes de vidro.

Etapa de aclimatização: Nesta etapa apenas um número restrito de plantas foram transferidas para a etapa de aclimatização, sendo contabilizado a frequência de plantas aclimatizadas e a frequência de plantas adultas obtidas.

Os dados obtidos das avaliações acima foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey a 5%. Na etapa de aclimatização. Os dados foram avaliados pela média \pm 1 desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Etapa de pré-regeneração

Houve diferença significativa entre os diferentes meios de pré-regeneração na manutenção dos calos embriogênicos e entre os diferentes genótipos havendo interação entre os dois fatores (Tabela 4). Os meios de pré-regeneração suplementados com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D (M2) e $0,10 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D + $0,26 \text{ mg.L}^{-1}$ de ABA (M4) promoveram uma maior frequência de manutenção dos calos embriogênicos do genótipo Hi-II, apresentando 100 e 89 %. Ambos os meios foram melhores para o genótipo Hi-II quando comparado com o H3MT-2. O genótipo H3MT-2 obteve uma média na manutenção dos calos embriogênicos de 55,9%, sendo que o meio de pré-regeneração não influenciou nesta variável.

Esta diferença na manutenção dos embriões somáticos entre os genótipos pode ser explicada pelo tipo de calo envolvido. O genótipo Hi-II produz calo embriogênico do tipo II, que se caracteriza por ser altamente friável, macio, crescimento rápido e mantém uma alta taxa de atividade embriogênica por um tempo prolongado (MCCAIN et al., 1988; ARMSTRONG et al., 1991). Por outro lado, o H3MT-2 apresenta um calo embriogênico do tipo I, compacto, nodular e caracteriza-se pelo crescimento lento e pela inability de ser cultivado por longo período (GREEN & PHILLIPS, 1975; OZIAS-AKINS & VASIL, 1982; ARMSTRONG & GREEN 1985).

Tabela 4 – Frequencia de obtenção de calos embriogênicos na etapa de Pré-Regeneração provenientes de 500 mg de calos embriogênicos de dois genótipos de milho em diferentes concentrações de fitoreguladores. Passo Fundo, 2015

Calos embriogênicos (%)		
Meios de pré-regeneração	Genótipos	
	Hi-II	H3MT-2
M1 Sem reguladores de crescimento	A 13,8 c	A 23,0 a
M2 0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D	A 100,0 a	B 51,0 a
M3 0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D+0,26mg.L ⁻¹ ABA	A 44,2 b	A 47,5 a
M4 0,1 mg.L ⁻¹ 2,4-D+0,26mg.L ⁻¹ ABA	A 89,2 a	B 43,0 a
M5 Sem reguladores + 6% sacarose	A 32,7 b	A 32,3 a
C.V (%)	32,9	

Médias antecedidas pela mesma letra maiúscula, na linha, mesma letra, minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A manutenção dos calos embriogênicos em todas as etapas de regeneração é imprescindível, pois é a partir dos embriões somáticos presentes na superfície dos calos que as plantas serão formadas. Os embriões somáticos são estruturas avasculares e bipolares, ou seja, tem a capacidade de formar uma planta completa por apresentar o meristema caulinar e radicular.

Nesse estudo foi observado que os calos embriogênicos do genótipo Hi-II que passaram pelos meios de pré-regeneração suplementados com 0,25 mg.L⁻¹ de 2,4-D (M2) e 0,1 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,26 mg.L⁻¹ ABA (M4) mantiveram sua embriogênicidade em todas as subsequentes etapas da regeneração.

A etapa de pré-regeneração utilizando 0,25 mg.L⁻¹ de 2,4-D foi recentemente utilizada na regeneração de plantas transgênicas de milho por Frame et al. (2011) e anteriormente sugerida por Armstrong (1994). Segundo estes autores esta etapa é importante para a diferenciação dos embriões somáticos e sua preparação para a

maturação. Devido à redução de 2,4-D, os calos embriogênicos cessam sua divisão e produção de embriões somáticos de forma que os embriões somáticos remanescente na superfície do calo sofrem um alongamento, aumentando seu tamanho e se diferenciando para a regeneração. Esse comportamento também foi observado no presente experimento no meio utilizando $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D (Figura 1C), os demais meios não apresentaram esse comportamento nos embriões somáticos.



Figura 1 – Aspectos do calos embriogênicos do híbrido de milho Hi-II: A) Placa contendo 500 mg de calo embriogênico; B) Calo embriogênico apresentando embriões somáticos; C) Calo embriogênico apresentando embriões alongados na etapa de pré-regeneração no meio suplementado com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. Passo Fundo, 2015.

3.2 Etapa de maturação dos embriões somáticos

A etapa de maturação consiste em interromper os ciclos repetitivos de divisão celular e fornecer os estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais para a diferenciação celular, para que os ciclos de desenvolvimento e de maturação originem um grande

número de embriões somáticos maduros de alta qualidade e aptos a converterem-se em plantas.

Os embriões somáticos em contato com o meio de Regeneração I que contem alta concentração de sacarose (60 g.L^{-1}) recebem um estresse osmótico causando sua maturação, ou seja, a capacitação para germinar. Com essa maturação foi possível identificar os embriões somáticos maduros por se apresentarem esbranquiçados e com o escutelo desenvolvido, o que torna possível o seu isolamento dos calos matrizes (Figura 2B). Esses embriões maduros isolados tem potencial de formar uma planta completa e uma regeneração organizada por apresentarem eixo apical e radicial (Figura 2C).

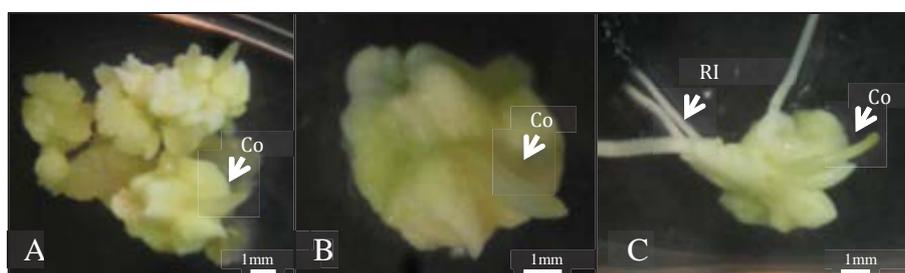


Figura 2 - Processo de maturação e germinação dos embriões somáticos do híbrido de milho Hi-II: A) Calo contendo embriões maduros na sua superfície apresentando coleóptilo (Co); B) Embrião somático maduro isolado; C) Embrião somático isolado germinando na etapa de Regeneração I com passagem no meio de pré-regeneração suplementado com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, apresentando raiz inicial (RI) e coleóptilo (Co). Passo Fundo, 2015.

O aumento da osmolaridade parece estar relacionado com a transcrição do ciclo divisão/diferenciação, portanto a desidratação

dos embriões somáticos é a maneira mais adequada de simular as condições reais de um embrião contido dentro de uma semente verdadeira (TORRES et al., 1999).

Neste experimento foi investigado se a maturação dos embriões somáticos de milho é influenciada pelo meio utilizado na etapa da pré-regeneração. Como resultado foi observado que os calos de ambos os genótipos de milho estudados que passaram pelo meio de pré-regeneração suplementados com 0,25 mg.L⁻¹ 2,4-D (M2) e 0,25 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,26 mg.L⁻¹ de ABA (M3) apresentaram maior número de embriões maduros comparado aos demais meios (Tabela 5). Isso indica que a passagem dos calos embriogênicos pelo meio com 0,25 mg.L⁻¹ de 2,4-D fornece o estímulo necessário para a maturação adequada dos embriões somáticos (FRAME et al., 2000). Em contraste, o uso de pré-regeneração sem este fitorregulador, ou mesmo sem a passagem pela etapa de pré-regeneração (M5) resultaram na metade, ou menos, do número de embriões maduros observados em meio de maturação (Tabela 5).

Tabela 5 - Número de embriões maduros dos genótipos Hi-II e H3MT-2 observados 15 dias após transferidos para etapa de Regeneração I, pré-regenerados em diferentes meios de cultura. Passo Fundo, 2015

Meios de pré-regeneração	Embriões maduros
M1 Sem reguladores de crescimento	2,9 b
M2 0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D	15,8 a
M3 0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,26mg.L ⁻¹ ABA	14,8 a
M4 0,1 mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,26mg.L ⁻¹ ABA	7,0 b
M5 Sem reguladores + 6% sacarose	7,4 b
C.V (%)	48,0

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

O 2,4-D é conhecido por desempenhar um papel importante na indução da embriogênese somática e auxiliar na expressão da totipotência das células competentes (KOMAMINE et al., 1992; RAGHAVAN, 1997; TORRES et al., 1999; EZHOVA, 2003; CHE et al., 2006).

A exposição do tecido a auxina serve como um gatilho, induzindo a divisão celular nas células da epiderme e promovendo uma maior diferenciação em embriões somáticos (BONACIN et al., 2000), pois tem a capacidade de induzir alterações na expressão gênica (THEOLOGIS, 1986), e, segundo Leljaklevanic et al. (2004), possivelmente à alteração dos níveis de metilação em células embriogênicas. Segundo estes autores, um nível ótimo de metilação é necessário para um desenvolvimento normal do embrião somático (Uma hipometilação ou hipermetilação pode causar um imediato e irreversível bloqueio da embriogênese somática (VYSKOT et al., 1993).

Por outro lado, embora o ABA seja utilizado para estimular a maturação e, ao mesmo tempo, para evitar germinação precoce dos embriões somáticos (GARCIA-MARTÍN et al., 2005; GONÇALVES et al., 2010), sua presença no meio de pré-regeneração parece não ter favorecido a maturação dos embriões somáticos no presente experimento (Tabela 5). Este regulador de crescimento foi utilizado por Armstrong et al. (1994) e Grandó (2001) para maturação dos embriões somáticos do híbrido Hi-II de milho antes da regeneração de plantas. Segundo CHUGH & KHURANA (2002), o ABA apresenta um complexo mecanismo de regulação da expressão

gênica, envolvendo eventos transcricionais bem como pós-transcricionais, como o processamento do transcrito, estabilidade do mRNA, controle da tradução e da atividade proteica.

3.3 Etapa de germinação dos embriões somáticos

Nessa etapa as estruturas embriogênicas foram cultivadas em meio MS sem reguladores de crescimento suplementado com 3% de sacarose na presença da luz para indução da germinação dos embriões somáticos. Depois de 15 dias nessas condições foi avaliado o número de embriões germinados para avaliar influência do meio de pré-regeneração nesta etapa. Como muito embriões maturaram nesse período, também foi contabilizado o número de embriões somáticos maduros tardiamente após 15 dias de cultivo em meio de Regeneração II (germinação).

Foi constatado que as estruturas embriogênicas do genótipo Hi-II, previamente pré-cultivadas em meio contendo reguladores de crescimento, continuaram maturando na etapa de germinação (Tabela 6), o que propiciou uma maior produção de plantas a serem regeneradas, visto que estas estruturas serão repicadas neste mesmo meio até a sua germinação. Já, o genótipo H3MT-2 não mostrou tal comportamento se mostrado inferior ao genótipo Hi-II quanto a maturação nos meios acima citados.

Tabela 6 - Número de embriões maduros e números de embriões germinados depois de 15 dias na etapa de Regeneração II pré-regenerados em diferentes meios. Passo Fundo, 2015

Meios pré-regeneração	Embriões maduros tardiamente	
	Genótipos	
	Hi-II	H3MT-2
M1 Sem reguladores de crescimento	A 10,2 b	A 11,4 a
M2 0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D	A 28,2 a	B 14,4 a
M3 0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D+0,26mg.L ⁻¹ ABA	A 35,8 a	B 9,6 ab
M4 0,1 mg.L ⁻¹ 2,4-D+0,26mg.L ⁻¹ ABA	A 39,6 a	B 10,0 ab
M5 Sem reguladores + 6% sacarose	A 5,8 b	A 0,0 b
C.V (%)	46,8	
Meios pré-regeneração	Número embriões germinados	
	Genótipos	
	Hi-II	H3MT-2
M1 Sem reguladores de crescimento	A 11,8 cd	A 9,2 a
M2 0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D	A 26,4 b	B 11,8 a
M3 0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D+0,26mg.L ⁻¹ ABA	A 21,0 bc	B 6,0 a
M4 0,1 mg.L ⁻¹ 2,4-D+0,26mg.L ⁻¹ ABA	A 46,6 a	B 3,6 a
M5 Sem reguladores + 6% sacarose	A 4,2 d	A 2,2 a
C.V (%)	44,8	

Médias antecedidas pela mesma letra maiúscula, na linha, mesma letra, minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Para o genótipo Hi-II, a passagem pelo meio de pré-regeneração M4 (0,1 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,26mg.L⁻¹ ABA) promoveu maior número de embriões germinados, 46,6 embriões germinados por 500 mg de calos embriogênicos iniciais (Tabela 6). Esse meio foi utilizado com sucesso na regeneração deste genótipo de milho por Armstrong et al. (1994), e obtenção de plantas transgênicas de milho por Grando et al., (2004). Os outros dois meios que continham reguladores de crescimento produziram em torno de 23 embriões germinados, e sem reguladores a germinação se mostrou ainda menos eficiente. Para o genótipo H3MT-2 não houve efeito do meio de pré-regeneração na germinação dos embriões, sendo que em média

somente 6,6 embriões apresentaram esse comportamento. Este genótipo se mostrou inferior ao Hi-II principalmente em relação aos três meios suplementados com fitoreguladores (M2, M3 e M4) (Tabela 6), evidenciando o efeito genotípico na regeneração de plantas.

A diferente resposta entre os genótipos pode ser explicada pela presença de genes envolvidos na receptibilidade dos reguladores de crescimentos (CLOSE & GALLAGHER-LUDEMAN, 1989), bem como com as variações nos níveis de hormônios endógenos do explante (NORSTOG, 1970 apud BHASKARAN & SMITH, 1990). Trabalhos avaliando níveis de hormônios endógenos dos explantes em diferentes genótipos verificaram que o hormônio ABA teve maiores níveis nos calos embriogênicos (JIMENEZ & BANGERTH, 2001).

Para Milach et al (1991) a variabilidade entre os genótipos na regeneração esta sob controle genético. Diversos fatores podem influenciar o potencial regenerativo de uma espécie como genótipo, os tipos de dosagem de reguladores de crescimentos, os meios de culturas e as condições de cultivo (BHASKARAN E SMITH, 1990; GRANDO et al., 1993; 2013). O genótipo é um fator que tem um papel fundamental durante a indução da embriogênese em milho pelo tipo de calo e seu potencial de regeneração (HUANG & WEI, 2005; ISHIDA et al, 2007; LEE et al, 2007, WANG et al., 2007). Por isso é imprescindível escolher um genótipo que tenha um bom potencial regenerativo para os futuros trabalhos de transformação genética, pois é necessário que os calos contendo os genes de interesse formem plantas.

O melhor meio para a germinação de embriões pertencentes ao genótipo Hi-II foi o M4 ($0,1 \text{ mg/L}^{-1}$ 2,4-D + $0,26 \text{ ABA}$). Uma das explicações para este grande número de embriões germinados nesse meio pode ter sido a adição de ABA no meio de pré-regeneração. Ambos os meios contendo esse regulador apresentaram um aumento da massa fresca dos calos de 7 e 8 vezes em relação a sua massa inicial quando passaram pelo meio de maturação de embriões (meio de regeneração I). A figura 3 ilustra esse crescimento e compara o mesmo com estruturas embriogênicas que passaram pelo meio de pré-regeneração somente com o 2,4-D (sem ABA). Esse comportamento reflete a intensa divisão celular proporcionada pelo ABA e explica o comportamento destes embriões nas repicagens subsequentes, como discutido a seguir.



Figura 3 - Aumento da massa fresca dos calos expostos ao regulador de crescimento ABA durante o processo de pré-regeneração: A) Massa celular aumentada em oito vezes em relação a massa de calo inicial resultante da passagem pelo meio suplementado com $0,10 \text{ mg/L}^{-1}$ 2,4-D + $0,26 \text{ ABA}$; B) Massa celular aumentada em sete vezes em relação a massa de calo inicial resultante da passagem pelo suplementado com $0,25 \text{ mg/L}^{-1}$ 2,4-D + $0,26 \text{ ABA}$; C) Calos pré-regenerados em meio suplementado com $0,25 \text{ mg/L}^{-1}$ 2,4-D na etapa de maturação de embriões somáticos. Passo Fundo, 2015.

3.3.1 Emergência das plantas do genótipo Hi-II

As estruturas embriogênicas foram mantidas no meio de germinação (Regeneração II) em placa de petri e repicadas para meio fresco a cada 3 semanas até as plantas germinadas atingirem 1 a 1,5 cm de comprimento, quando foram transferidas para recipientes de vidro para possibilitar o desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular. A Figura 4 mostra a dinâmica da emergência das plantas regeneradas do genótipo Hi-II ao longo de 63 dias, sendo contabilizado o total número de plantas passadas para recipientes de vidro ao longo deste processo, incluindo as cinco repetições.

Embora o meio M4 (0,1 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,26mg.L⁻¹ ABA) tenha proporcionado um maior número de embriões germinados observados aos 15 dias da Etapa de germinação (Tabela 6), as plantas demoraram para se desenvolver, atingindo o pico da produção de plantas transferidas para vidros aos 37 dias da sua transferência para a luz, ou seja, houve um retardamento na emergência das plantas. Os embriões que passaram pelo M3, suplementado com ABA, tiveram um comportamento semelhante (Figura 4). Portanto, a passagem dos calos embriogênicos pelo meio de pré-regeneração contendo ABA resultou no retardo do início de formação de plantas em torno de 15 dias, comparado com o meio M2 contendo 0,24 mg.L⁻¹ de 2,4-D (discutido a seguir). No entanto, os meios M4 e M3 (ambos com ABA) promoveram um desempenho superior na produção de plantas quando comparados com os meios de pré-regeneração sem reguladores de crescimento (M1 e M5). Os resultados obtidos concordam com Armstrong et al. (1994) que

obteve um aumento na eficiência de regeneração de plantas de milho quando adicionado 0.1 mg/L^{-1} de 2,4-D + $2,6 \text{ mg/L}^{-1}$ de ABA ao meio de regeneração. Segundo Torres et al. (1999) a inclusão de ABA, aumenta a frequência de embriões somáticos produzidos e sua conversão em plantas.

No meio M1, sem reguladores e 3% de sacarose, ocorreu uma germinação mais precoce produzindo menor numero de plantas ao longo do processo de regeneração. O meio M5 apresentou a performance mais baixa de todos os meios (Figura 4). Este meio tem sido utilizado por muitos grupos para obtenção de plantas transgênicas do genótipo em questão (ZHAO et al., 2001; FRAME et al. 2002; 2006; FERNANDES et al., 2008; VEGA et al., 2008; OMBORI et al., 2008).

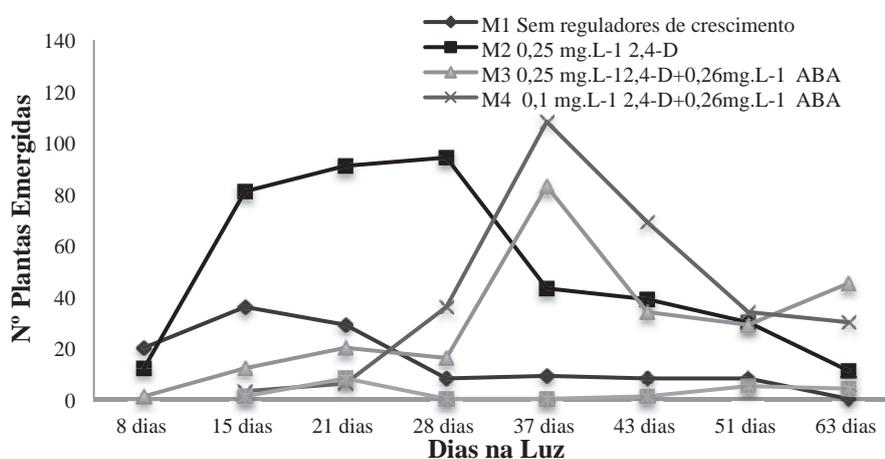


Figura 4 - Desempenho dos diferentes tratamentos de pré-regeneração na emergência de plantas, do genótipo Hi-II, dias após estarem na presença de luz. Passo Fundo, 2015

Comparando o desempenho dos diferentes tratamentos de pré-regeneração na velocidade da emergência de plantas após

transferidos para a etapa de germinação na luz o meio com $0,25 \text{ mg/L}^{-1}$ de 2,4-D (M2) apresentou uma resposta mais eficiente e também mais rápida, promovendo a formação das primeiras plantas em apenas 8 dias (germinação precoce) e atingindo um pico de produção de plantas entre os 15 a 28 dias da transferência para a luz (Figura 4). Portanto, este seria o meio mais eficiente para a regeneração de plantas de milho para o genótipo Hi-II.

A Figura 5 mostra o aspecto da vigorosa germinação dos embriões do genótipo Hi-II, que passaram pela pré-regeneração com $0,25 \text{ mg/L}^{-1}$ de 2,4-D, oito dias expostos a luz em meio de germinação. O rápido desempenho destes embriões na formação de plantas após a transferência para a luz, se deve a perfeita maturação dos embriões maduros os quais apresentam estruturas bipolares e esbranquiçadas, que possuem eixo embrionário e radicular capaz de formar uma planta completa. Quando essas estruturas são expostas a luz, recebem estímulo para a germinação (Figura 6).



Figura 5 - Germinação dos embriões do genótipo Hi-II que passaram pela pré-regeneração com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D aos oito dias na presença da luz. As plantas formadas nesta placa foram obtidas de 500 mg de calos embriogênicos cultivados inicialmente. Passo Fundo, 2015

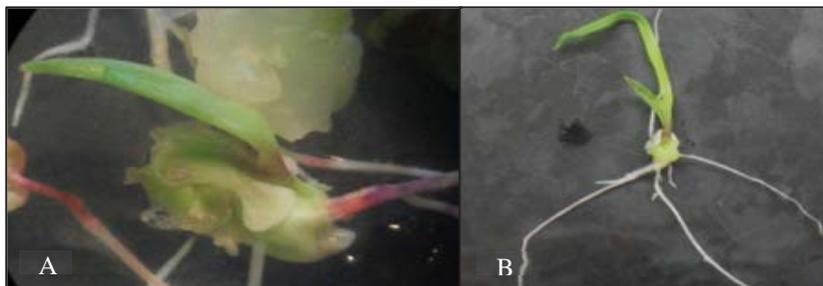


Figura 6 - Germinação de embriões somáticos do híbrido de milho Hi-II, cuja pré-germinação foi realizada em meio contendo $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D: A) Aspecto do embrião maduro germinando na presença da luz; B) Aspecto planta 1,5 cm passada para recipiente de vidro na etapa de Regeneração II após 15 dias expostas a luz. Passo Fundo, 2015.

3.3.2 Emergência das plantas do genótipo H3MT-2

O genótipo H3MT-2 iniciou a emergência das plantas após 13 dias da presença da luz e obteve uma baixa performance na produção de plantas (Figura 7), de forma que foram obtidas somente 13 plantas no total do experimento, enquanto o genótipo Hi-II produziu 1.081 plantas. As plantas obtidas do genótipo H3MT-2 apresentavam baixo vigor, sendo que muitas não se desenvolveram eficientemente, se mostrando frágeis e deficientes. A maioria dos embriões maduros desse genótipo não germinaram, formaram apenas parte aérea ou raízes, mostrando que o desenvolvimento dos seus embriões somático não é perfeito como do genótipo Hi-II, ou seja, não é bipolar. Com isso, o isolamento dos embriões acaba afetando a sua germinação. Para esse genótipo, que produz calo tipo I, talvez o processo de regeneração utilizado não seja o mais adequado, sendo necessário para esse genótipo um fitoregulador de enraizamento ou indução de parte aérea para um melhor desempenho.

Uma alternativa seria o uso de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de IBA (ácido indol butírico) para o enraizamento (HUANG & WEI., 2004). Alguns autores sugerem também o uso de $0,5$ e $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ da citocinina BAP (6-bencilaminopurina) na regeneração de plantas de calos do tipo I (SELLMER et al.,1994; HUANG & WEI., 2004; 2005; SILVA; 2009; VARNIER, 2004)

Frame et al, (2011) desenvolveram um protocolo de regeneração de plantas diferenciado para o genótipo B104 que produz calo tipo I em comparação com o Hi-II que produz calo tipo II. Este protocolo não utiliza pré-tratamento de regeneração, o que também não se mostrou eficaz para o genótipo H3MT-2.

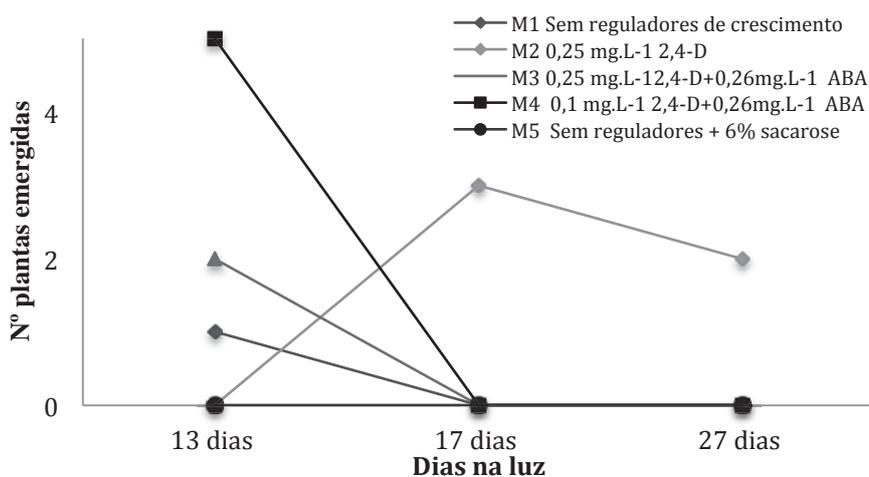


Figura 7 - Desempenho dos diferentes tratamentos de pré-regeneração na emergência de plantas, do genótipo H3MT-2, dias após estarem na presença de luz. Passo Fundo, 2015

Para verificar o motivo da germinação ineficiente dos embriões somáticos do H3MT-2, e para compreender as razões deste genótipo não apresentar boa performance na regeneração de plantas, foi realizado estudo histológico na etapa de maturação dos embriões

somáticos. Mediante a análise dos cortes histológicos, visualizado com microscopia ótica com aumento de 10x, verificou-se que a maioria dos calos, deste genótipo, não apresentavam desenvolvimento de estruturas isoladas semelhantes a embriões somáticos, ou seja, alguns embriões não apresentavam o meristema apical e sim apenas meristema radicial (Figura 8B), comprovando o que foi observado durante o processo de regeneração de plantas estudado, onde muitos calos desenvolveram somente raiz no meio de germinação (Figura 9). Ao contrário, o genótipo Hi-II apresentou meristemas radicular e apical semelhantes a embriões zigóticos, capaz de formar uma planta completa (Figura 8A). Desta forma, uma vez que essas estruturas assemelham-se a embriões zigóticos pelas suas similaridades morfológicas e histológicas, e considerando que elas não estabelecem conexão vascular com o calo de origem, segundo Haccius (1978), elas podem ser chamadas de embriões somáticos.

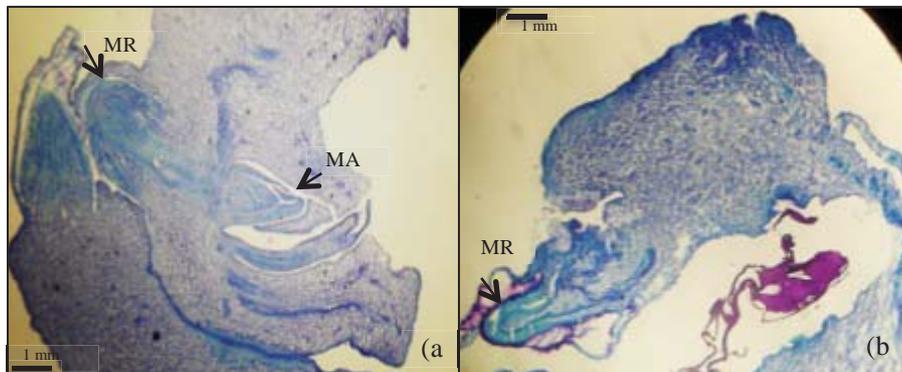


Figura 8 - Aspectos histológicos de cortes transversais de embriões somáticos de milho: a) Genótipo de milho Hi-II apresentando os dois eixos embrionários: meristema apical (MA) e meristema radicial (MR); b) Genótipo H3MT-2 apresentando apenas um eixo o meristema radicial (MR). Passo Fundo, 2015.

No entanto, Vasil (1987) relatou que o desenvolvimento anormal de embriões somáticos pode resultar numa organogênese aparente, o qual foi observado no genótipo H3MT-2 (Figura 9) que produziu raízes em meio de germinação. Da mesma forma a otimização do processo de embriogênese somática viabiliza a obtenção de maior número de plantas. Recentemente Akoyi et al., (2013) sugeriram o uso de 3 mg.L^{-1} de Dicamba em vez do 2,4-D para indução de calos de milho, a frequência de indução de calos embriogênicos variou de 35% para 79% conseguindo regenerar plantas. O protocolo de Frame et al (2011) estabelece 3 mg.L^{-1} de Dicamba na indução dos calos do genótipo B104, o qual possui calo do tipo I igual o H3MT-2.



Figura 9 - Aspecto do calo/estruturas embriogênicas do genótipo H3MT-2 em meio de germinação resultando numa organogênese aparente por não apresentar meristema apical. Passo Fundo, 2015

A perfeita maturação e germinação dos embriões somáticos do genótipo Hi-II resultou no seu melhor desempenho na regeneração de plantas comparado ao genótipo H3MT-2. Ainda a passagem pela etapa de pré-regeneração foi fundamental para a

regeneração de plantas para o genótipo Hi-II. O meio sem pré-tratamento (M5) foi muito inferior aos que utilizaram pré-regeneração, sendo possível regenerar somente 24 plantas em todo o experimento, ou seja a partir de 2,5 gramas de calos embriogênicos iniciais, contabilizando as 5 repetições de 500 mg (figura 10). Já a produção total de plantas regeneradas quando foi empregado o meio de pré-regeneração suplementado com 0,25 mg.L⁻¹ de 2,4-D (M2) foi de 410 plantas, as quais foram obtidas de 2,5 gramas de calos embriogênicos (Figura 10), ou seja produziu 17X mais plantas comparado com o protocolo padrão para o genótipo Hi-II (M5). A utilização deste meio de pré-regeneração (M2) já foi sugerido por Frame et al. (2011), no entanto nenhum dado na literatura havia mostrado o contraste na produção de plantas utilizando este meio de pré-regeneração.

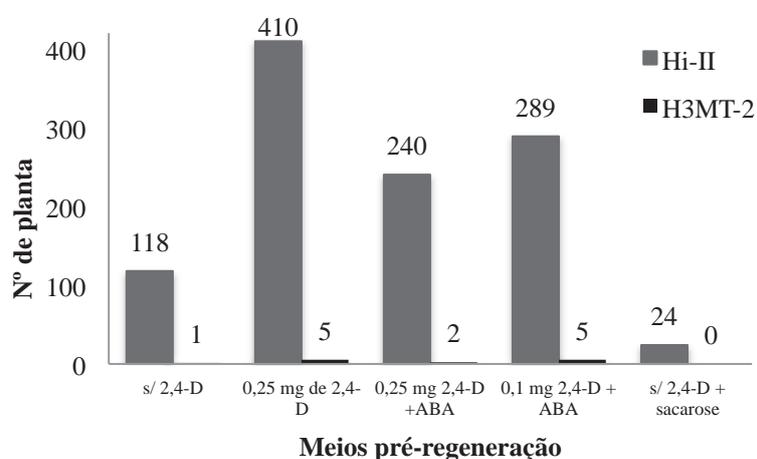


Figura 10 – Produção de plantas dos dois genótipos de milho pré-regenerados em diferentes meios de cultura. Passo Fundo, 2015.

3.4 Etapa de aclimatização de plantas

A fase de aclimatização das plantas oriundas do cultivo *in vitro* é bastante delicada, sendo apontada como uma das mais críticas do processo de regeneração, pela ocorrência da maioria das perdas (DÍAS-PEREZ et al., 1995). Os mesmos autores relatam que durante esse estágio, as plantas são expostas a mudanças súbitas nas condições ambientais, pois são transferidas de um ambiente *in vitro* para o meio externo, onde as plantas irão desenvolver mecanismos de controle de transpiração e condutância estomática, ativar os mecanismos de controle de perda de água pelas células e aumentar a taxa fotossintética em condições de atmosfera mais rica em CO₂ (ROCHA et al., 2008).

Devido ao grande número de plantas emergidas pelo genótipo Hi-II em todos os tratamentos, foram aclimatizadas 30 plantas para cada tratamento (24 plantas do tratamento M5). O tratamento com 0,25 mg 2,4-D (M2) mostrou melhor resultado tanto quanto a frequência de plantas aclimatizadas (93,3%), como na frequência de plantas adultas obtidas (76,7%) (Tabela 7). Todas as plantas se apresentaram férteis (Figura 11).

Por outro lado o genótipo H3MT-2 produziu um número limitado de plantas e todas foram aclimatizadas. Foi obtida uma aclimatização de 100% quando os calos foram pré-regenerados nos meios sem reguladores (M1) e na presença de 0,25 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 0,26 mg.L⁻¹ de ABA (M3). No entanto, somente os tecidos pré-regenerados no meio M1 produziram 100% de plantas adultas férteis.

Tabela 7 - Desempenho dos diferentes meios de pré-regeneração na percentagem de plantas aclimatadas e plantas aclimatizadas adultas férteis de dois genótipos de milho. Passo Fundo, 2015

Meios na pré-regeneração	PTA*	Planta aclimatada		Planta adulta		
		Genótipo Hi-II				
		N	%	N	%	
M1 Sem reguladores de crescimento	30	16	53,3	11	36,7	
M2 0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D	30	28	93,3S	23	76,7S	
M3 0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D+0,26mg.L ⁻¹ ABA	30	20	66,6	15	50,0	
M4 0,1 mg.L ⁻¹ 2,4-D+0,26mg.L ⁻¹ ABA	30	19	63,3	14	46,7	
M5 Sem reguladores + 6% sacarose	24	2	1,2I	0	0,0	
Desvio padrão			33,7		37,8	
			Genótipo H3MT-2			
			N	%	N	%
M1 Sem reguladores de crescimento	1	1	100,0	1	100,0S	
M2 0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D	5	2	50,0	1	25,0	
M3 0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D+0,26mg.L ⁻¹ ABA	2	2	100,0	1	50,0	
M4 0,1 mg.L ⁻¹ 2,4-D+0,26mg.L ⁻¹ ABA	5	4	80,0	2	40,0	
M5 Sem reguladores + 6% sacarose	0	0	0I	0	0	
Desvio padrão			42,2		40,4	

*PTA = Número de plantas transferidas para aclimatização. S= Superior M+1dp= média mais um desvio padrão. I= Inferior M-1dp= média menos um desvio padrão.



Figura 11 - Etapas de aclimatização de plantas do genótipo Hi-II de milho: A) Plantas em recipientes de vidros prontas para aclimatização; B) Plantas em vasos de 500 mL em câmara umida; C) Plantas adultas em casa de vegetação; D) Espiga produzida por planta regenerada *in vitro*. Passo Fundo, 2015.

Os dois genótipos avaliados apresentaram diferença na capacidade de regeneração *in vitro* pelo sistema adotado e tratamentos

avaliados. O genótipo Hi-II apresentou maior capacidade de regeneração de planta e o tratamento de pré-regeneração influenciou fortemente a sua resposta *in vitro*. Cada genótipo pode requerer diferentes condições para poder expressar o seu potencial de regeneração de plantas, necessitando de condição de cultivo diferente para regeneração de plantas. Definitivamente o sistema adotado não possibilitou bom desempenho do novo híbrido de milho H3MT-2 para a regeneração.

Investimentos para otimização das condições de cultivo para cada genótipo é de fundamental importância para seu uso na produção de plantas transgênicas. O genótipo Hi-II submetido a etapa de pré-regeneração em meio suplementado com $0,25 \text{ mg/L}^{-1}$ 2,4-D (M2) produziu 410 plantas a partir de 2.5 gramas de calos embriogênicos submetidos ao processo de regeneração. Essas plantas foram produzidas de forma rápida, atingindo um pico de transferência para recipientes de vidro em torno de 15 a 23 dias, provavelmente pela forma organizada e eficiente com que os embriões foram diferenciados, maturados e germinados. Essas condições ainda permitiram que 93,3% das plantas produzidas fossem aclimatizadas, e 76,7% chegassem a fase adulta com fertilidade. Por essas razões este tratamento e genótipo é o escolhido para utilização em programas envolvendo transformação genética no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF.

Foi demonstrado, neste trabalho, a otimização da regeneração *in vitro* do genótipo Hi-II de milho, podendo resultar na aceleração e eficiência da obtenção de plantas geneticamente modificadas

4 CONCLUSÕES

Há diferença no potencial de regeneração de plantas *in vitro* entre os híbridos Hi-II e H3MT-2, sendo que o híbrido Hi-II apresenta maior capacidade de conversão de embriões somáticos em plantas nas condições avaliadas.

O genótipo H3MT-2 não responde positivamente aos tratamentos e sistema de regeneração utilizados neste experimento.

Para o genótipo Hi-II, o meio de pré-regeneração contendo 0,25mg/L¹ de 2,4-D é a combinação mais eficaz para a regeneração de plantas de milho.

CAPITULO II

EXPRESSÃO TRANSIENTE DO GENE REPÓRTER *uidA* EM EMBRIÕES IMATUROS DE MILHO SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE CO-CULTIVO COM *Agrobacterium tumefaciens*

DIELLI APARECIDA DIDONÉ¹

RESUMO – O uso da engenharia genética no melhoramento do milho tem contribuído para o aumento da sua produtividade e sanidade. A técnica de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* tem sido a tecnologia mais utilizada na produção de plantas geneticamente modificadas de milho pois permite a introdução de genes herdados estavelmente para as próximas gerações. Porém, existem vários fatores que influenciam a eficiência desse processo como é o caso da temperatura e do período de co-cultivo da *A. tumefaciens* com o tecido alvo do milho a ser transformado. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do período e da temperatura na etapa de co-cultivo na transformação genética de embriões zigóticos imaturos do híbrido de milho Hi-II e da variedade BR 451 com a *A. tumefaciens*. Também, buscou verificar o período ideal para realização do teste histoquímico de GUS após a infecção, para acessar a frequência de transformação transiente. Após a

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração “Produção Vegetal”.

infecção, os embriões imaturos foram transferidos para 2 ensaios diferentes de co-cultivo com a *A. tumefaciens* constituído primeiramente de: T1: três dias à 20°C; T2: cinco dias à 20°C e T3: três dias à 20°C + dois dias à 28°C. Neste ensaio foram realizados dois testes histoquímicos de GUS: aos três e cinco dias após a infecção. O segundo experimento foi constituído por: T1: co-cultivo dos embriões três dias à 20°C; T2: três dias à 28°C; T3: cinco dias à 20°C por e; T4: cinco dias à 28°C por. A realização do teste histoquímico de GUS após cinco dias da infecção permite acessar melhor a transformação transiente do que após três dias. A frequência de transformação transiente para o genótipo Hi-II foi em média de 71,8%, não sendo influenciada pelos tratamentos de co-cultivo. No entanto, para o genótipo BR 451 a condição de co-cultivo cinco dias a 20 °C proporcionou uma frequência superior de transformação transiente (73,3%). Para os dois genótipos de milho, Hi-II e BR 451, a transferência do T-DNA pela bactéria foi favorecida pelo co-cultivo dos embriões imaturos por cinco dias a 20 °C, pois resultou num maior número de pontos azuis por embriões somáticos 21,4 e 23,1 respectivamente. A transformação estável foi de 0,39% para o genótipo Hi-II. Os eventos de transformação estável foram observados somente a partir de co-cultivo realizado com 20 °C. Foi possível otimizar a transformação transiente para dois genótipo estudados.

Palavras-chave: Temperatura, teste histoquímico de GUS, *Zea mays*, transformação genética

**TRANSIENT EXPRESSION OF THE REPORTER GENE *uidA*
IN MAIZE IMMATURE ZIGOTIC EMBRYOS SUBMITTED TO
DIFFERENT CONDITION OF CO-CULTIVATION WITH
*Agrobacterium tumefaciens***

ABSTRACT – The use of genetic engineering in the improvement of maize has contributed to the increase in its productivity and sanity. The genetic transformation technique via *Agrobacterium tumefaciens* has been the most used technology for production of genetically modified maize plants since it allows the introduction of genes inherited stably for future generations. However, there are several factors that influence the efficiency of that process such as period and temperature and co-cultivation period *A. tumefaciens* with the target tissue to be transformed maize. This study aimed to evaluate the effect of period and temperature on the co-cultivation step in genetic transformation of maize immature zygotic embryos of the Hi-II genotype and the variety BR 451 with *A. tumefaciens* and to identify what the ideal period for performing the GUS histochemical assay after infection to access the frequency of transient transformation. After infection, the immature embryos were transferred to two different test treatments co-cultivation with *A. tumefaciens* primarily composed: T1: three days at 20 °C; T2: five days at 20 °C; T3: three days at 20 °C ± two days at 28 °C. Two GUS histochemical assays were carried out: at three and five days after infection. The second test consisted of: T1: co-cultivation of embryos three days at 20 °C; T2: three days at 28 °C; T3: five days at 20 °C by; T4: five days at 28 °C. The completion of the histochemical GUS assay after five days of

infection allowed better access the transient transformation than after three days. This procedure will be adopted by the Plant Biotechnology Laboratory UPF to monitor T-DNA transfer from the bacterial plasmid into the plant cell. For both genotypes of maize Hi-II and BR 451, the transfer of the T-DNA by the bacterium was enhanced by co-culture of immature embryos for five days at 20 °C, since it resulted in a higher number of blue spots per somatic embryos 21.4 and 23.1, respectively, so for genetic transformation of these genotypes co-cultivation with *A. tumefaciens* embryos at 20 °C for five shows to be the most effective period. It was possible to transfer the *bar* gene in 0.39% of the Hi-II embryos infected with *A. tumefaciens* the calli carrying the *bar* gene were obtained in co-culture temperature of 20 °C. It was possible to optimize transient transformation for two genotype studied.

Key words: Temperature, GUS histochemical assay, *Zea mays*, genetic transformation.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de grande importância mundial na produção de alimentos para humanos e animais, sendo que 13% da área agriculturável no mundo é cultivada com esta espécie (USDA, 2014). Desde a primeira liberação comercial de plantas transgênicas de milho portadoras do gene Bt, que confere resistência a insetos, na metade dos anos 90, o milho tem se tornado a espécie alvo mais importante da inovação biotecnológica, sendo a

cultura que apresenta maior número de novas características introduzidas pela engenharia genética liberada comercialmente (Que et al., 2014). Estas características compreendem desde resistência a insetos, tolerância a diferentes herbicidas, tolerância ao frio, produção de etanol e indução da macho esterilidade (ISAAA, 2014). No Brasil 83% do milho cultivado é transgênico e tem sido produzido por grandes empresas multinacionais, ou seja o Brasil ainda não liberou comercialmente nenhum produto de milho transgênico no mercado. A Embrapa Milho e Sorgo lidera as pesquisas com transformação genética de milho no país, já tendo relatado a produção de plantas transgênicas pelos métodos de biobalística e *Agrobacterium tumefaciens* (CARNEIRO et al., 2000; 2009).

A obtenção de plantas transgênicas pelo uso de *A. tumefaciens* baseia-se na capacidade única dessas bactérias de transferir sequências específicas de DNA para o genoma vegetal. O processo de infecção de células vegetais pela *A. tumefaciens* tem sido intensamente estudado, podendo ser considerado um dos sistemas de interação planta-patógeno melhor caracterizado em nível molecular (BRASILEIRO, 1993).

Essa metodologia de transferência de genes tem a grande vantagem de poder transferir segmentos de DNA relativamente grandes com pequenos rearranjos e integração de baixo número de cópias do gene dentro do genoma vegetal favorecendo a transmissão e expressão do gene para a progênie (MEYER & SAEDLER, 1996; ZHAO et al., 1998). A aplicação de transformação genética mediada por *A. tumefaciens* até pouco tempo estava limitada a plantas dicotiledôneas, devido ao fato de a maioria das monocotiledôneas e

gimnospermas não serem hospedeiros naturais ou apresentarem pouca suscetibilidade a *A. tumefaciens* (BINNS & TOMASHOW, 1988, HIEI et al., 2014). Porém, vários laboratórios já transformam, de maneira eficiente, diversas espécies monocotiledôneas com *A. tumefaciens* devido ao uso de linhagens bacterianas mais adequadas, uso de genótipos responsivos e tecidos alvos apropriados (HIEI et al., 2014). Os primeiros relatos da obtenção de monocotiledôneas transgênicas obtidas pela transformação com *A. tumefaciens* se referem ao arroz (HIEI et al. 1994), milho (ISHIDA et al. 1996), trigo (CHENG et al., 1997), cevada (TINGAY et al., 1997), sorgo (ZHAO et al., 2000) e milheto (JHA et al., 2011). No entanto, até hoje, o milho é o único cereal transgênico liberado no mercado, e portanto considerado uma cultura líder na biotecnologia agrícola (HIEI, et al., 2014).

O sucesso na transformação do milho foi devido ao uso de tecido com alta taxa de divisão celular, o embrião zigótico imaturo, aliado ao uso de um genótipo altamente responsivo *in vitro*, a linhagem A188, e uso de linhagens de *A. tumefaciens* contendo vetores superbinários, ou seja com extras cópias dos genes *vir*, responsáveis pela transferência do T-DNA (ISHIDA, et al., 1996, 2007). Posteriormente, a utilização do genótipo de milho Hi-II (híbrido resultante do cruzamento das linhagens A188 e B73, criado especificamente para uso na cultura de tecidos) favoreceu a obtenção de plantas transgênicas e férteis de milho *via A. tumefaciens* (ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002, 2011), mesmo utilizando um plasmídeo binário padrão. O milho tem sido transformado rotineiramente por muitos laboratórios ao redor do mundo, mas

poucos genótipos tem tido transformados efetivamente (JI et al., 2014), sendo o genótipo Hi-II o mais amplamente utilizado para transformação de milho.

Alguns genótipos alternativos têm sido utilizados por alguns grupos (FRAME et al., 2006; 2011; CARNEIRO et al., 2009). A variedade de milho BR 451 da Embrapa Milho e Sorgo (GUIMARÃES et al., 2004) apresenta capacidade de produção de calos embriogênicos e regeneração de plantas *in vitro* (PETRILLO et al., 2008; SILVA et al., 2009) podendo ser uma alternativa brasileira ao híbrido americano Hi-II. No entanto, para a utilização de genótipos alternativos são necessários ajustes nos protocolos de transformação.

O Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo desenvolve trabalhos no sentido de adaptar metodologias de transformação genética de milho utilizando a linhagem EHA 101 de *A. tumefaciens* que tem a capacidade de infectar gramíneas. O vetor binário pTF 102 possui o gene para *bar* que confere resistência ao herbicida Bialapohos e o gene repórter *uidA*, que codifica para a enzima β -glucuronidase, contendo um intron (GUS-Intron), permitindo sua expressão somente em eucariotos.

O gene *uidA* (comumente denominado gene *gus*) desempenha um papel importante nos estudos iniciais de transformação genética em cereais (HIEI et al., 2014), visto que através do ensaio histoquímico de GUS (JEFFERSON et al., 1987) é possível visualizar a cor azul após o co-cultivo do tecido vegetal com a *A. tumefaciens*. Isso torna possível otimizar os parâmetros que determinam a eficiência de infecção e monitorar a transferência do T-DNA do plasmídeo da bactéria para a célula vegetal. A expressão

transiente diz respeito à expressão temporária de um gene mediante sua presença não permanente no genoma, portanto é uma medida de uma transformação também transiente. A transformação pode somente ser considerada estável após a inserção do gene no genoma da planta. Porém, a eficiência da transformação, utilizando *A. tumefaciens*, é dependente de diversos parâmetros, incluindo estirpe da bactéria, a resposta ao cultivo *in vitro* do genótipo de milho e composição do meio de cultura.

Segundo Ishida et al. (2007), o co-cultivo é um dos fatores mais importantes dentro do protocolo de transformação genética. Para o milho o período de co-cultivo de três dias tem sido utilizado por vários autores (FRAME et al., 2002; 2006; 2011; ISHIDA et al., 2007). Além do período de co-cultivo, a temperatura utilizada nesta fase também influencia na eficiência da transformação (HUANG & WEY, 2005). Neste contexto este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do período e da temperatura na etapa de co-cultivo na transformação genética de embriões zigóticos imaturos do híbrido de milho Hi-II e da variedade BR 451 com a *A. tumefaciens*, e verificar qual o período ideal para realizar o teste histoquímico de GUS após a infecção, visando acessar a frequência de transformação transiente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Visando utilizar a tecnologia de transformação do milho com *A. tumefaciens* na transferência de genes de interesse, foi utilizado o protocolo de acordo com Frame et al. (2002; 2011), de forma que o processo de transformação foi constituído de quatro

etapas sequenciais: infecção, co-cultivo, descanso e seleção. Os meios de cultura utilizados nestas etapas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Meios utilizados para o crescimento das bactérias, cultura de tecidos, regeneração e transformação das plantas

Meios de cultura	Cultura de bactérias
YEP	10 g.L ⁻¹ de peptona, 5 g. L ⁻¹ de NaCl, 10 g. L ⁻¹ de extrato de levedura, 1.5% de ágar, pH 7,0.
Infecção	
Inf	Sais N6 (Chu et al., 1975); vitaminas Erickson (0,5 mg.L ⁻¹ de tiamina HCl, 2,0 g.L ⁻¹ de glicina, 0,5 mg.L ⁻¹ de piridoxina HCL, 0,5 mg.L ⁻¹ de ácido nicotínico); 100 mg.L ⁻¹ de caseína hidrolisada; 0,7 g.L ⁻¹ de L-prolina; 2,0 mg.L ⁻¹ de 2,4D; 68,5 L ⁻¹ de sacarose, 36 L ⁻¹ de glicose, pH 5,2.
InfAS	Meio Inf suplementado com 100 µM acetossiringona. Obs. acetossiringona adicionada imediatamente antes do uso.
Co-cultivo	
CM	InfAS sem glicose; sacarose reduzida para 30 g.L ⁻¹ e adicionado de 0,5 g.L ⁻¹ de MES; 10 µM nitrato de prata; 8,0 g.L ⁻¹ de Agar, 100 µM acetossiringona.; pH 5,8. Obs. A acetossiringona e nitrato de prata foram adicionados após a autoclavagem.
Descanso	
DS	CM sem acetossiringona adicionado de 100 mg.L ⁻¹ cefatoxima e 100 mg.L ⁻¹ de vancomicina, pH 5,8.
Seleção	
SM	CM sem acetossiringona suplementado com 100 mg.L ⁻¹ de cefatoxima; 100 mg.L ⁻¹ vancomicina e 1,5 mg.L ⁻¹ de fosfotricina (Bialaphos) e aumento da L-Prolina para 2,88 mg.L ⁻¹ .
SM2	Mesmo do SM, suplementado com 3 mg.L ⁻¹ de fosfotricina (Bialaphos).

2.1 Estirpe da agrobactéria, plasmídeo e condições de crescimento bacteriano

Foi utilizada a estirpe desarmada de *A. tumefaciens* EHA 101 contendo o plasmídeo binário padrão pTF102 (Figura 1), gentilmente cedido pela Dra. Kan Wang do “Plant Transformation Facility, Iowa State University”. Este vetor contém o gene marcador *bar* e o gene repórter *uidA*, ambos sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S. O gene *uidA* (gene repórter contendo intron) é utilizado para acessar a eficiência de transformação transiente pelo teste histoquímico de GUS para detecção da cor azul, mediante reação enzimática. O gene *bar* (contendo intensificador de tradução do vírus Etch do Tabaco) confere resistência ao herbicida Bialaphos (fosfinotricina) é utilizado para a seleção dos tecidos transformados.

Bactérias obtidas de estoque de glicerol foram cultivadas em meio YEP sólido (Tabela 1) suplementado com 100 mg.L⁻¹ de espectinomicina e 50 g.L⁻¹ de canamicina por três dias a 19°C.

Dois “loops” desta cultura foram suspensos em 5ml de meio de infecção (meio InfAS, tabela 1) suplementado com 100uM de acetossiringona) até atingir a densidade celular de OD550 = 0.3 - 0.4. As bactérias foram incubadas em um shaker horizontal em uma plataforma a 100 rpm em temperatura ambiente (23 °C) por 2 horas, sendo que esta fase corresponde ao pré-tratamento para ativação do T-DNA (FRAME et al., 2002).

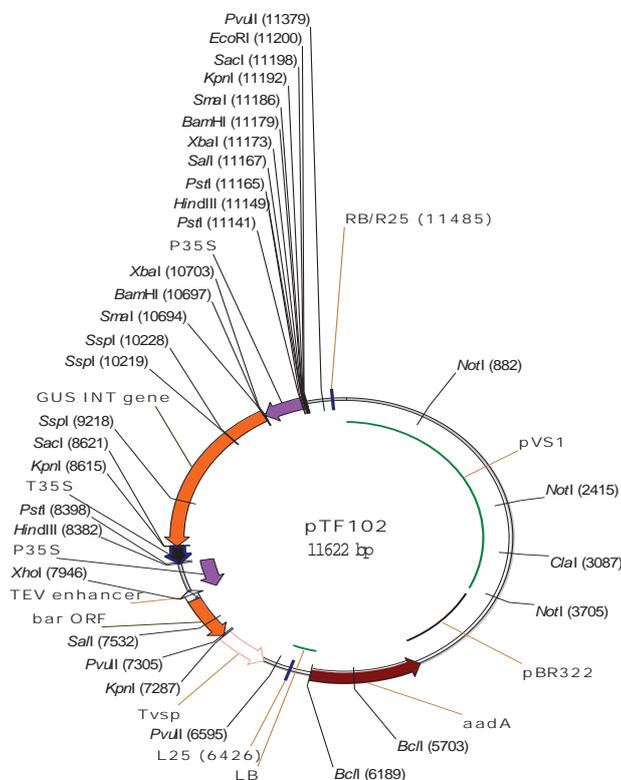


Figura 1. Esquema geral do plasmídeo binário padrão pTF102 desenvolvido pela “Iowa State University”, contendo o gene *bar* que codifica a fosfotricina acetiltransferase e confere resistência ao antibiótico fosfotricina; e o gene *uidA* com intron que codifica a β -glucuronidase utilizado para análise histoquímica de GUS. Fonte: Frame et al., 2002

2.2 Etapa de infecção e co-cultivo

Os embriões zigóticos imaturos dos genótipos Hi-II e BR 451 de 1,2 a 1,8 mm de comprimento, coletados aproximadamente 11 dias após a polinização, foram imersos em 1 mL da suspensão de *A. tumefaciens* (InfAS) durante cinco minutos no escuro.

Após a infecção os explantes foram transferidos para o meio de co-cultivo (CM - tabela 1). As placas de petri foram vedadas com fita porosa e co-cultivados no escuro. Esta etapa dois ensaios foram realizados, conforme descrito abaixo:

2.2.1 Ensaio I: Diferentes períodos e temperaturas de co-cultivo dos embriões imaturos do Híbrido Hi-II com *A. tumefaciens*

T1: três dias à 20°C;

T2: cinco dias à 20°C;

T3: três dias à 20°C seguido por dois dias à 28°C.

O teste histoquímico de GUS foi realizado três e cinco dias após a infecção.

2.2.2 Ensaio II: Diferentes dias e temperaturas de co-cultivo dos embriões imaturos do Híbrido Hi-II e BR 451 com *A. tumefaciens*

T1: três dias à 20°C;

T2: três dias à 28°C ;

T3: cinco dias à 20°C;

T4: cinco dias à 28°C.

O teste histoquímico de GUS foi realizado cinco dias após a infecção em todos os tratamentos.

2.3 Etapa de descanso

Os explantes co-cultivados com *A. tumefaciens* foram transferidos do meio CM para meio de descanso (meio DM, tabela 1) contendo 100 mg.L^{-1} de cefotaxima e 100 mg.L^{-1} de vancomicina para eliminação da bactéria. As placas de petri foram vedadas com fita porosa e mantidas no escuro a 28°C durante sete dias.

2.4 Etapa de seleção

Após o período de descanso, os explantes foram transferidos para o meio de seleção (SM, Tabela 1) contendo $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Bialaphos para seleção de calos resistentes ao herbicida. As placas de petri foram vedadas com fita porosa mantidas a 28°C no escuro durante duas semanas. Após, os embriões foram transferidos para meio SM2 (contendo 3 mg.L^{-1} de Bialaphos), sendo subcultivados para este mesmo meio a cada três semanas. Estas culturas foram mantidas no escuro a 28°C por aproximadamente cinco meses até a proliferação de calos resistentes ao herbicida. No último subcultivo, os calos embriogênicos resistentes foram segmentados em fragmentos de 3 a 5 mm de diâmetro e transferidos para meio de regeneração de plantas.

2.5 Avaliações realizadas

a) Frequência de transformação transiente

A frequência de transformação transiente de cada tratamento foi avaliada mediante a expressão do gene repórter *uidA* nos embriões imaturos submetidos a infecção e co-cultivo com a agrobactéria após três e/ou cinco dias. Para tal foi empregado o teste histoquímico para β -glucuronidase (GUS) conforme (Jefferson et al., 1987). O gene *uidA* codifica a enzima GUS que, na presença do substrato X-glucuronidase produz um dímero de cor azul índico que possibilita a visualização e a contagem dos eventos de transformação. Os embriões foram incubados em solução X-gluc por 16 horas a 37 °C. Após a incubação a reação foi removida e os embriões foram armazenados em etanol 70% para as análises posteriores. Contagem de pontos azuis por embrião e frequência de embriões com pontos azuis.

b) Frequência de calos resistentes ao herbicida

A frequência de calos resistente ao herbicida foi acessada pelo número de calos resistentes ao Bialaphos obtidos no final do período de seleção (cinco meses após a transformação) em relação ao número total de explantes inoculados (% de calos resistentes).

A amplificação do gene *bar* foi utilizado para confirmar a transformação dos calos resistentes ao herbicida. Para tal, foi extraído o DNA genômico dos calos supostamente resistente conforme

Dellaporta et al. (1983) e submetido à análise molecular por PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) para detecção do gene *bar*. A quantificação do DNA foi realizada por eletroforese em gel agarose (1%) seguindo quatro etapas: (1) preparação do gel 1% (200 ml de TBE 0,5 M, 2 g de agarose e 50 µL de brometo de etídio); (2) preparação das amostras (3 µl de Green Go taq (5x) + 2 µl de DNA); (3) corrida do gel (80 volts por 1 hora) e (4) coloração em brometo de etídio visualização em UV, na qual as amostras foram comparadas um DNA Marcador a uma concentração conhecida de 100 ng. Após a quantificação as amostras foram diluídas em água miliQ estéril até obter-se a concentração de 25 ng de DNA.

As reações de amplificação por PCR foram feitas com volume final de 20 µL contendo: água 10,9 µL, buffer 10x 2 µL (5X), MgCl 0,6 µL (25 mM), dNTPs 4 µL (2,5 mM), primer *forward* 1,0 µL (0,5 µM), primer *reverse* 1,0 µL (0,5 µM), Taq polimerase 0,5 µL (U/µL) e 5 µL de DNA (25 ng). As amplificações foram realizadas em termociclador com a seguinte programação: 94 °C por 2 min, 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 54 °C por 45 s, 72 °C por 45 s seguido por 72 °C por 5 min. Os primers utilizados foram: *Forward* 5'-TGC ACC ATC GTC AAC CAC-3' e *Reverse* 5'-AGA AAC CCA CGT CAT GCC-3'. Como controle positivo foi utilizado o plasmídeo pTF 102 e como controle negativo DNA de calos não transformados. O produto de amplificação foi analisado em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, visualizados e fotografados no transluminador sob luz ultra violeta. O tamanho dos fragmentos observados foi de 407 pb para os calos com a presença do gene *bar*.

2.6 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o completamente casualizado com cinco repetições para cada tratamento (período e temperatura de co-cultivo) nos dois ensaios. A unidade experimental foi uma placa de petri contendo 30 explantes. Para análise da transformação transiente foi retirada uma amostragem de cinco explantes por repetição, totalizando 25 embriões por tratamento avaliados pelo teste histoquímico de GUS.

Foram obtidas as médias e realizado desvio padrão ± 1 dos experimentos. O ensaio II foi repetido três vezes sequenciais, nas datas 18/01, 28/01 e 01/02 de 2013.

3 RESULTADO E DISCUSSÕES

3.1 Ensaio I

3.1.1 Expressão transiente de GUS

O gene repórter *uidA* controlado pelo promotor constitutivo viral 35S foi utilizado para investigar a transformação transiente, ou seja a transferência do T-DNA da *A. tumefaciens* EHA101 para as células dos embriões imaturos de milho, independente da sua integração ou não no seu genoma, quando diferentes períodos e temperaturas foram utilizados no co-cultivo. Este ensaio também foi útil para verificar quantos dias depois da infecção a

expressão do gene *uidA* se torna mais visível para análise da transformação transiente.

Quando os embriões foram co-cultivados com a bactéria por três dias a 20 °C (T1), a frequência de embriões expressando GUS após cinco dias da infecção foi de 90%, ou seja 70% a mais do que a frequência de embriões GUS positivo observados aos três dias da infecção (20%) (Tabela 2). Esta diferença no aumento da frequência de embriões expressando GUS foi observada quando o co-cultivo foi realizado por cinco dias a 20 °C (95%) em relação ao teste histoquímico realizado ao três dias (25%) (Tabela 2). Esses dados indicam que após cinco dias da infecção a visualização do GUS foi aumentada, possibilitando um melhor acesso a medida de transformação transiente.

Tabela 2 - Expressão gene *uidA* 3 dias e 5 dias após a infecção com com *A. tumefaciens* EHA101:pTF102 em embriões zigóticos imaturos do genótipo Hi-II

Tratamento	Condições co-cultivo	Expressão gene <i>uidA</i>			
		Embriões com pontos azuis* (%)		Nº de pontos azuis/embrião	
		3 DAI	5 DAI	3 DAI	5 DAI
T1	3 dias 20°C	20	90	1,9	10,6
T2	5 dias 20°C	25	95	6,7	24,8
T3	3 dias 20°C+ 2 dias 28°C	-	80	-	12,4

*Amostra de cinco embriões por repetição, total 25 embriões/tratamento.

**DAI = Dias após infecção.

Da mesma forma, o número de pontos azuis observados por embrião aumentou em torno de 5,6 vezes quando a análise de GUS foi realizada no 5º dia depois da infecção comparado a análise de Gus no 3º dia após a infecção. Esse aumento foi observado nos tratamentos T1 e T2 (Tabela 2 e Figura 2).

Provavelmente a maior visualização do GUS foi ocasionada pelo maior tempo de exposição de cultivo *in vitro* na presença da auxina sintética 2,4-D, que induz divisões celulares, oportunizando as células transformadas com o T-DNA bacteriano expressarem o gene *uidA* de forma mais visível.

A maioria dos protocolos de transformação genética de milho realizam o teste histoquímico de GUS após três dias da infecção (FRAME et al., 2002; 2006; 2011; ISHIDA et al., 2007). Ombori et al. (2013) encontraram maior frequência de embriões expressando GUS no terceiro dia de co-cultivo comparado ao quarto dia. No entanto nossos resultados mostraram que a realização do teste após cinco dias permite acessar melhor a transformação transiente do que após três dias da infecção. Este procedimento será adotado pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF (LBV-UPF) para monitorar a transferência do T-DNA do plasmídeo da bactéria para a célula vegetal.

Quando comparados as frequências de transformação transiente entre os diferentes tratamentos de co-cultivo (T1 e T2), foi observado que embora as frequências de embriões com pontos azuis se mantem constante entre os tratamentos, o co-cultivo de cinco dias a 20 °C (T3) proporcionou o dobro do número de pontos azuis (24,8)

comparado ao co-cultivo de três dias a 20 °C (T1) (10,6) contabilizados no 5º dia da infecção (Tabela 2 e Figura 2). Isso indica que cinco dias de co-cultivo proporcionou maior número de células transformadas com o T-DNA do que três dias de co-cultivo a 20 °C.

A questão a ser respondida é se o aumento da transformação foi devido a maior exposição de tempo a temperatura de 20 °C que favorece a transferência do T-DNA (FRAME et al., 2002; 2011; HUANG & WEI, 2005; LEE et al., 2007), ou a maior permanência dos embriões no meio de co-cultivo, o qual é suplementado com acetossiringona, substância conhecida por estimular a transferência do T-DNA da *A. tumefaciens* para a célula vegetal (WU et al., 2003; DING et al., 2009). Por sua vez, o meio de descanso, onde os embriões do tratamento T1 permaneceram pelos últimos dois dias antes do ensaio histológico de GUS, não apresenta acetossiringona e é suplementado com antibióticos cefotaxima e vancomicina para eliminação da bactéria e submetidos a uma temperatura de 28 °C.

Esta questão pode ser esclarecida pelo desempenho do tratamento T3, onde os embriões foram co-cultivados no regime de três dias a 20 °C seguido por dois dias a 28 °C, ou seja os embriões foram mantidos por cinco dias em meio de co-cultivo, sendo alterado somente a temperatura sem a troca de meio. Como este tratamento se comportou muito semelhante ao tratamento de co-cultivo três dias a 20 °C (em média 12,4 pontos azuis/embrião) (Tabela 2 e Figura 2), é possível concluir que a maior causa do aumento de transformação transiente do tratamento T3 foi devido a maior exposição de tempo a

temperatura de 20 °C e não a outros fatores relacionados ao meio de cultura.

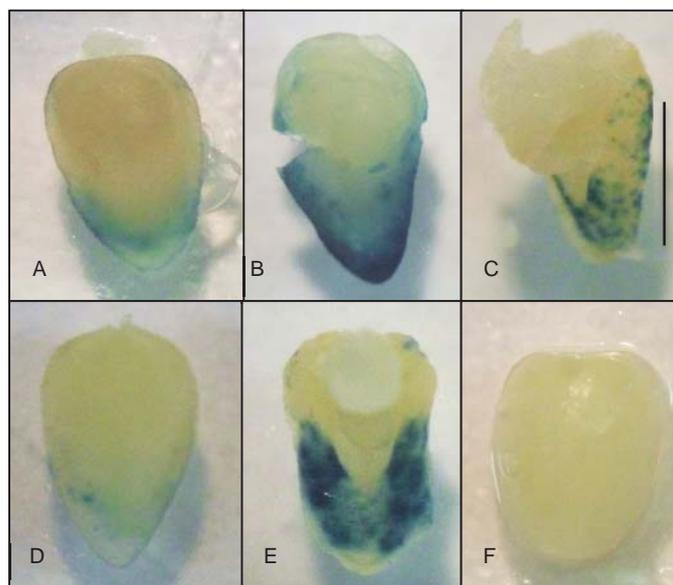


Figura 2 - Teste histológico de GUS em embriões zigóticos imaturos do híbrido de milho Hi-II infectados com *A. tumefaciens* EHA101:pTF102 e mantidos em diferentes tratamentos de co-cultivo: A) três dias a 20 °C-GUS avaliado no 3° dia após infecção; B) três dias a 20 °C- GUS avaliado no 5° dia após infecção; C) cinco dias 20 °C-GUS avaliado no 3° dia; D) cinco dias 20 °C-GUS avaliado no 5° dia da infecção; E) Embrião não transformado como controle negativo, F) três dias 20°C seguidos por dois dias 28 °C - GUS avaliado no 5° dia após infecção. Barra de 1 mm. Passo Fundo, 2015.

3.2 Ensaio II

3.2.1 Transformação transiente do genótipo Hi-II

Esse ensaio foi realizado três vezes sequenciais (3 experimentos independentes) com o genótipo Hi-II, e para o genótipo BR 451 foi realizado apenas uma vez devido a reduzida disponibilidade de material vegetal. O mesmo teve como objetivo verificar o efeito do período e da temperatura de co-cultivo na transferência do T-DNA da bactéria para embriões imaturos de milho verificada mediante a expressão transiente do gene repórter *uidA* e obtenção de calos resistentes ao herbicida.

A tabela 3 apresenta os resultados dos três experimentos realizados com o genótipo Hi-II e evidencia a variação na resposta aos tratamentos e a variação entre os experimentos.

No experimento I os tratamentos T3 (cinco dias a 20 °C) e T4 (cinco dias a 28 °C) resultaram numa maior frequência de embriões com pontos azuis (embriões GUS positivos), 92 e 100%, respectivamente. No entanto o tratamento T3 se mostrou superior aos demais em relação a média de pontos azuis por embrião (27,9). O tratamento T1 (três dias a 20 °C) que representa as condições de co-cultivo mais utilizada em protocolos de transformação genética de milho do genótipo Hi-II (FRAME et al., 2002; 2011), apresentou apenas 9,9 pontos azuis por embrião (Tabela 3).

Tabela 3 - Expressão transiente de GUS em embriões imaturos do genótipo Hi-II de milho submetidos a diferentes períodos e temperaturas de co-cultivo com *A. tumefaciens* estirpe *EHA101:pTF102*. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015

Experimento	Tratamentos de Co-cultivo		Expressão gene <i>uidA</i>	
	Período	T°	Embriões com pontos azuis* (%)	Média de pontos azuis por embrião
I	3 dias	20	80	9,9
		28	60	4,7
	5 dias	20	92	27,9 S
		28	100 S	26,3
Desvio Padrão			15,6	10,0
II	3 dias	20	48	9,9
		28	8	0,9
	5 dias	20	48	13,3
		28	76 S	14,6
Desvio Padrão			24,2	5,3
III	3 dias	20	100	23,8
		28	93,2	16,2
	5 dias	20	93,2	23,1
		28	63,2	4,5
Desvio Padrão			14,2	7,7

*Amostra de vinte e cinco embriões por tratamento.

S = Superior no desvio padrão ± 1 .

No experimento II, as medias de embriões GUS positivos foram mais baixas que os outros experimentos, sendo que o tratamento T4 (cinco dias a 28°C) foi superior para esta variável (76%) comparado aos demais tratamentos. Para número de pontos azuis por embrião, os tratamentos T3 (cinco dias a 20 °C) e T4 mostraram valores mais elevados.

O terceiro experimento indicou que o tratamento T1 e T3 apresentaram os maiores valores para número de pontos azuis por embrião (23,8 e 23,1, respectivamente).

Essa variação entre os experimentos é habitual quando se trabalha com transformação genética e reflete a influência de fatores difíceis de serem controlados, mesmo num sistema de rotina na transformação de plantas de milho e mostra a necessidade de se levar em consideração média de vários experimentos ao se testar diferentes tratamentos para melhorar os protocolos já existentes e estabelecidos para esta espécie (GRANDO et al., 2011).

3.2.1.1 Análise conjunta dos experimentos

O co-cultivo por cinco dias a temperatura de 20 °C (tratamento T3) promoveu elevado número de pontos azuis por embrião em todos os experimentos, consistindo na condição que se manteve mais favorável ao longo do ensaio (Tabela 3). A análise conjunta dos três experimentos permitiu verificar que o co-cultivo por três dias a 28 °C foi a condição mais desfavorável para frequência de embriões GUS positivo (53%) (Figura 3), contrastando com frequências maiores que 75% nos outros tratamentos e com a média de todos os tratamento 71,8% (Figura 3A).

Quanto ao co-cultivo dos embriões por três dias a 20°C (T1) resultou em uma média de 14,5 pontos azuis por embriões (Figura 3B). O bom desempenho desse tratamento na transformação genética para o genótipo Hi-II foi relatado por Frame et al., (2002; 2006) esta condição de co-cultivo é a mais utilizada para embriões zigóticos imaturos de milho (FRAME et al., 2002; 2006; 2011; OMER et al., 2013; SILVA, 2013; OMBORI et al., 2014). Entretanto, o tratamento de cinco dias a 20 °C obteve, em média, maior número de

pontos azuis por embrião (21,4) (Figura 3B) indicando sua superioridade sobre os demais tratamentos e sobre a média dos tratamentos que foi 14,6 pontos por embrião.

É possível concluir que as condições de co-cultivo influenciam na frequência de transformação genéticas em embriões imaturos, principalmente o número de células transformadas por explante. Huang & Wey (2005) relataram diferenças no período (0-6 dias) e na temperatura (19-28 °C) do co-cultivo na transferência do T-DNA da bactéria em explantes de milho, verificando que a temperatura mais adequada seria 22 °C e que o período não variou de três a seis dias de co-cultivo. Porém, quando os explantes permaneceram por três dias obtiveram maior números de transformação estável.

Quando se compara a expressão do gene *uidA* em embriões zigóticos imaturos do genótipo Hi-II transformados com a mesma bactéria e co-cultivados durante três dias a 20 °C em trabalhos anteriores realizados no LBV-UPF (SILVA, 2013), observa-se um aumento na frequência de embrião GUS positivos de 45% (31 para 76%) e de 7,5 pontos azuis por embrião (7 para 14,5). Isso indica a melhoria e a otimização na transformação transiente em laboratório para este genótipo.

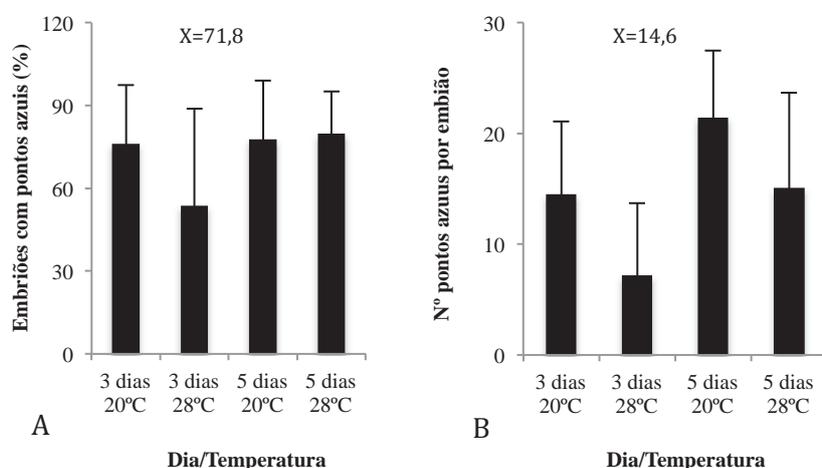


Figura 3 - Expressão transiente de GUS (A) Frequência de embriões com pontos azuis; e (B) Média de pontos azuis por embrião utilizando diferentes condições de co-cultivo de embriões imaturos do genótipo Hi-II de milho com *A. tumefaciens* estirpe *EHA101:pTF102*. N = 75 embriões. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015.

3.2.2 Transformação transiente do genótipo BR 451

A capacidade dos embriões imaturos de serem transformados via *A. tumefaciens* também foi avaliada para a variedade BR 451 de milho, utilizando as mesmas condições de co-cultivo avaliadas para o híbrido Hi-II. Os resultados são demonstrados na figura 4. A frequência de transformação transiente dos embriões do genótipo BR 451 (43,3) foi menor quando comparado ao observado para o Hi-II (71,8). O número de pontos de transformação também foi menor para o BR 451 (11,7) quando comparado ao Hi-II (14,6).

A capacidade de transformação de diferentes genótipos de milho com a *A. tumefaciens* tem sido amplamente discutida na

literatura (FRAME et al., 2006, 2011; HUANG & WEI, 2005; OMER et al., 2013), sendo a dependência do genótipo a principal limitação na transformação genética de milho via *A. tumefaciens* (HIEI et al., 2013). A diferença genotípica pode ser explicada pela compatibilidade entre o genótipo e a linhagem da bactéria empregada na transformação (OMBORI et al., 2013). Segundo Nam et al. (1997 citado por Ombori et al., 2013) a sensibilidade de células de *Arabidopsis thaliana* a linhagens bacterianas é atribuída a diferenças na sua conexão com a célula vegetal ou ainda na maquinaria de transferência do T-DNA codificado pela bactéria ou célula vegetal.

Avaliando o efeito das condições de co-cultivo na transformação transiente de embriões do genótipo BR 451, o tratamento T3 (cinco dias a 20 °C) foi superior para frequência de embriões GUS positivo (73,3%) (Figura 4A) e para número de pontos azuis observados por embrião (23,1) (Figura 4B), concordando com o que foi observado para o genótipo Hi-II.

Comparando com trabalhos de transformação genética anteriores realizados com este genótipo no LBV-UPF (SILVA, 2013), observamos um aumento acentuado na frequência de embriões GUS positivos quando co-cultivado três dias a 20 °C, no qual passou de 13,6% para 26,6%. O mesmo ocorreu com o número de pontos azuis de 1,6 para 4 pontos por embrião, mostrando a otimização da transformação transiente também para o genótipo BR 451 neste laboratório.

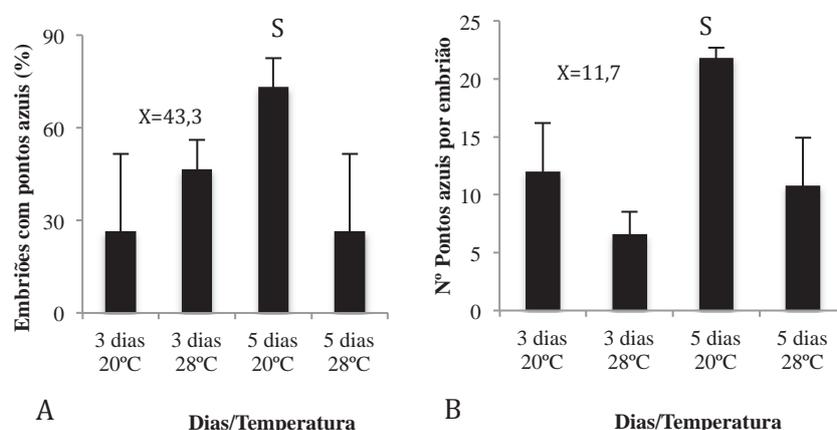


Figura 4 - Expressão transiente de GUS (A) Frequência de embriões com pontos azuis; e (B) Média de pontos azuis por embrião utilizando diferentes condições de co-cultivo na transformação genética de embriões do genótipo BR 451 de milho com *A. tumefaciens* estirpe *EHA101:pTF102*. N = 52 embriões. S = Superior no desvio padrão + média. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015

Segundo Alimohammadi & Bagherieh-Najjar (2009), a temperatura de co-cultivo é um fator importante a ser estudado, pois há diferentes respostas entre plantas monocotiledôneas, genótipos, explantes e estirpes de *A. tumefaciens* utilizados. O efeito da temperatura na transferência de genes mediada por *A. tumefaciens* foi relatado anteriormente por Fullner et al. (1996), quando demonstraram que a formação de pili ou T-pili da agrobactéria é maior em baixas temperaturas (19 °C) e menor sob temperaturas mais elevadas (28 °C). O T-pilus é um apêndice ou canal filamentosos preso à superfície da *A. tumefaciens*, composto por proteínas codificadas do plasmídeo Ti (MCCULLEN & BINNS, 2006). Acredita-se que este sistema de

secreção é o principal meio de transporte do T-DNA da célula bacteriana para a célula vegetal (LAI et al., 2000).

Recentemente, Ziemienowicz (2013) relatou que as temperaturas ideais para transformação de plantas dicotiledôneas estão em 19-20 °C, enquanto que para monocotiledôneas as melhores temperaturas estão em 24-25 °C. Ainda assim a temperatura ideal durante o período de co-cultivo é variável entre e dentro das espécies.

Plantas de milho transgênicas foram obtidas a partir do co-cultivo dos embriões imaturos de 19 a 28 °C por Gordon-Kamm et al. (2002) em que a temperatura adequada foi 22 °C, e níveis inferiores de expressão de *gus* foram observados em 19 e 28 °C.

Segundo Hiei et al. (2014) usar baixa temperatura durante o co-cultivo é uma estratégia para aumentar a transferência do T-DNA da bactéria para o tecido alvo e evitar o supercrescimento da *A. tumefaciens* no meio de co-cultivo. Ainda a maquinaria da transferência do T-DNA dentro da bactéria pode ser mais efetiva a baixas temperaturas (FULLNER & NESTER, 1996). Os experimentos relatados nesse trabalho demonstraram que a transformação transiente do gene *uidA* oscila entre as temperaturas 20-28 °C empregadas no co-cultivo, sendo que a melhor temperatura foi a de 20 °C. No entanto, quando os embriões foram co-cultivados a temperatura de 28 °C não foi observado supercrescimento de bactéria.

As Figura 5 e Figura 6 mostram a expressão do gene *uidA* em embriões imaturos dos genótipo Hi-II e BR 451 transformados geneticamente pela *A. tumefaciens* e a influência do período e temperatura no co-cultivo observadas nesses experimentos, e, ainda, torna visível o efeito do genótipo neste processo.

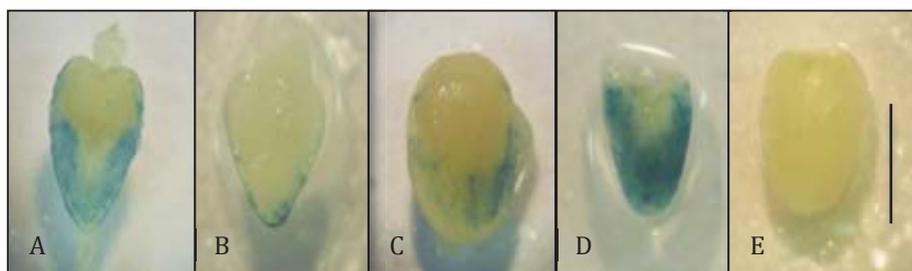


Figura 5 - Expressão do gene *uidA* em embriões do híbrido de milho Hi-II infectados com *A. tumefaciens* EHA101;pTF102: A) T1= embriões co-cultivados 3 dias a 20°C; B) T2= 3 dias a 28 °C; C) T3= 5 dias a 20°C; D) T4= 5 dias a 28°C; E) Controle negativo não infectado. Barra de 1mm. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015.

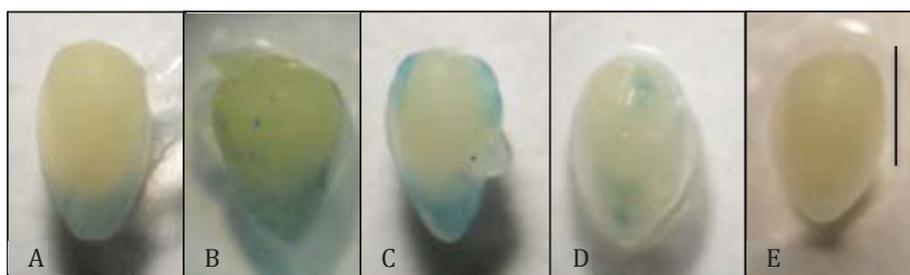


Figura 6 - Expressão do gene *uidA* em embriões do híbrido de milho BR 451 infectados com *A. tumefaciens* EHA101;pTF102: A) T1= embriões co-cultivados 3 dias a 20°C; B) T2= 3 dias a 28°C; C) T3= 5 dias a 20°C; D) T4= 5 dias a 28°C; E) Controle negativo não infectado. Barra de 1 mm. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015.

Um passo crítico no desenvolvimento de um sistema eficiente de transformação mediada por *A. tumefaciens* em cereais é o estabelecimento de condições ótimas na transferência do T-DNA da bactéria para o tecido alvo, a partir dos quais as plantas podem ser regeneradas. Embora, a transformação mediada por *A. tumefaciens* em cereais é um método importante que tem sido utilizado em laboratórios de todo o mundo, protocolos de rotina foram

estabelecidas apenas em cultivares específicas dentro de uma espécie e com tecidos específicos de elevado potencial de regeneração (SHRAWAT & GOOD, 2011). Por isso, se torna imprescindível o estabelecimento de estratégia de transformação no LBV-UPF com novos genótipo como o BR 451 e buscar a otimização na transformação do genótipo Hi-II em nossas condições.

2.2.3 Calos resistente aos herbicida Bialaphos

Buscando avaliar o efeito das diferentes condições de co-cultivo nas etapas subsequentes do processo de obtenção de plantas transgênicas, foi avaliado a produção de calos embriogênicos resistentes ao herbicida Bialaphos utilizado como agente seletivo no processo de seleção de tecidos transformados. Segundo Hiei et al., (2014) usar baixa temperatura durante o co-cultivo aumenta a transferência do T-DNA da bactéria para o tecido alvo e também evita o supercrescimento da *A. tumefaciens* no meio de co-cultivo. No entanto a baixa temperatura pode resultar no crescimento menos vigoroso da célula do milho refletindo na capacidade de produção de calos embriogênicos resistentes ao herbicida.

A Tabela 4 apresenta as frequências de calos obtidos em todos os experimentos e tratamentos utilizando o genótipo Hi-II, a partir de um total de 1.563 embriões imaturos submetidos a infecção com *A. tumefaciens*. No experimento I o tratamento T4 (cinco dias 28°C) produziu uma frequência de calos resistentes ao Bialaphos superior aos demais tratamentos (20,9%) . No experimento II o cultivo dos embriões por três dias a 28 °C produziu a menor frequência de

calos resistentes, o que foi observado também nos outros experimentos, mostrando ser uma condição desfavorável para a produção destas estruturas. No entanto, no experimento III o Tratamento T1 (três dias 20 °C) promoveu uma maior frequência de calo resistente ao herbicida (32,6%), não sendo superior aos demais tratamentos.

Tabela 4 - Frequência de calos resistentes ao herbicida Bialaphos obtida a partir de embriões do genótipo Hi-II submetidos a diferentes condições de co-cultivo com *A. tumefaciens* Estirpe *EHA101:pTF102*. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015

Exp.	Tratamentos de Co-cultivo	Nº de embriões infectados	% calos resistentes	Expressão gene <i>bar</i>	
				Nº Calo PCR positivo	Escapes (%)
I	3 dias 20°C (T1)	146	10,9	-	-
	3 dias 28°C (T2)	134	4,5	-	-
	5 dias 20°C (T3)	142	7,7	-	-
	5 dias 28°C (T4)	139	20,9 S	-	-
TOTAL/media		561	11		
Desvio Padrão			6,1		
II	3 dias 20°C (T1)	112	21,4	-	-
	3 dias 28°C (T2)	110	9,1	-	-
	5 dias 20°C (T3)	136	24,3	-	-
	5 dias 28°C (T4)	132	28	-	-
TOTAL/media		490	21,2		
Desvio Padrão			7,1		
III	3 dias 20°C (T1)	184	32,6	1 (0,54%)	98,9
	3 dias 28°C (T2)	66	16,7	0	100
	5 dias 20°C (T3)	191	27,2	1 (0,52 %)	99
	5 dias 28°C (T4)	71	18,3	0	100
TOTAL/media		512	26,6	2 (0,39%)	99,5
Desvio Padrão			6,5		
TOTAL/media GERAL		1563	19,6		

S = Superior no desvio padrão ± 1 .

Com resultado da análise conjunta dos experimentos em relação a produção de calos resistentes, fica evidente o efeito negativo

do co-cultivo realizado nas condições de três dias a 28 °C na produção de calos resistentes ao herbicida Bialaphos (Figura 7).

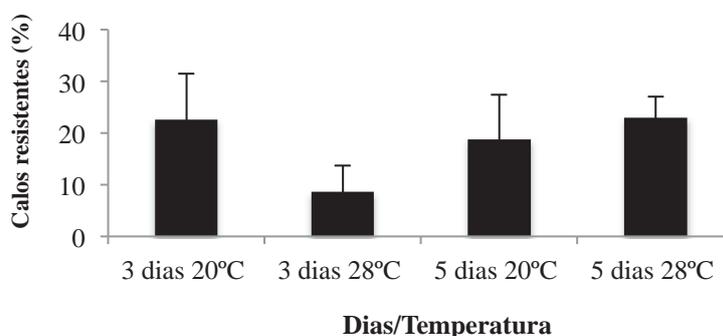


Figura 7 - Frequência de calos resistentes ao herbicida Bialaphos obtida a partir de 1563 embriões imaturos do genótipo Hi-II submetidos a diferentes condições de co-cultivo com *A. tumefaciens* Estirpe *EHA101:pTF102*. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015

Os calos do genótipo Hi-II transformados geneticamente pela *A. tumefaciens* expressam resistência ao herbicida Bialaphos, os quais crescem em meio seletivo e apresentam embriões somáticos em sua superfície (Figura 8).

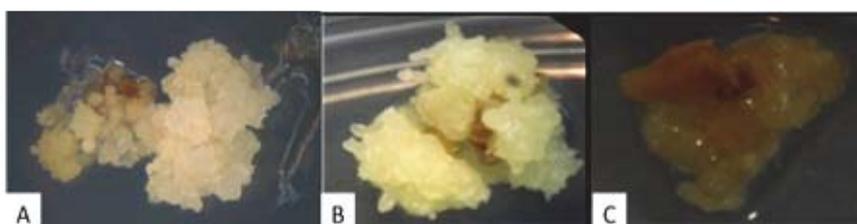


Figura 8 – Expressão gene *bar*: A e B) Calo do genótipo Hi-II expressando resistência ao herbicida Bialaphos, apresentando embriões somáticos em sua superfície; C) Calo não resistente, sensível a presença do herbicida. Barra de 1 mm. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015

Para o genótipo BR 451 o cultivo conduzido por cinco dias a 20 °C favoreceu a produção de calos resistentes sendo que 36,9% dos 74 embriões co-cultivados produziram calos na presença do herbicida utilizado na seleção (Figura 9). Isso indica que o co-cultivo prolongado em baixa temperatura não prejudica a produção de calos resistentes ao herbicida para ambos os genótipos.

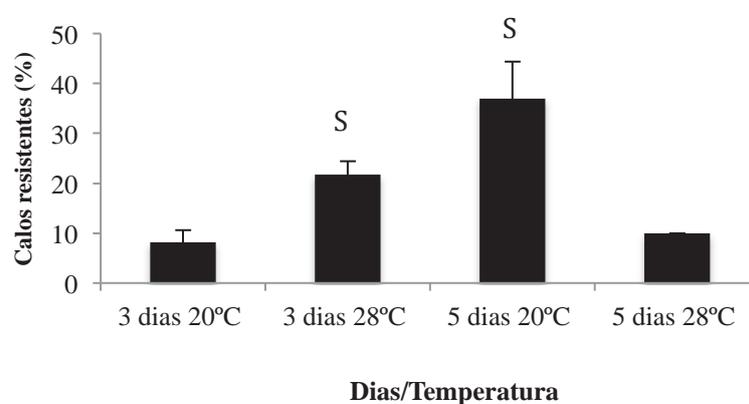


Figura 9 - Frequência de calos resistentes ao herbicida Bialaphos obtida a partir de 201 embriões imaturos do genótipo BR 451 submetidos a diferentes condições de co-cultivo com *A. tumefaciens* estirpe *EHA101:pTF102*. S = Superior no desvio padrão + média Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015.

3.2.4 Análise de PCR para amplificação do gene *bar* em calos resistentes

Foi realizada a amplificação por PCR do gene *bar* apenas nos calos resistentes do genótipo Hi-II obtidos no experimento III, devido ao grande número de calos possivelmente resistentes obtidos em todos os experimentos (307 calos) e também nos calos resistentes obtidos do genótipo BR451. Foi confirmada a presença do

gene *bar* em dois dos calos resistentes para o genótipo Hi-II (Tabela 3 e Figura 10) e nenhum para o genótipo BR 451. Assim a eficiência de transformação estável foi de 0,54% para o T1 e 0,52% para o T3 (tabela 4). Ressalta-se que somente foram obtidos calos transgênicos (transformação estável) a partir de embriões co-cultivados em temperatura de 20 °C (três ou cinco dias).

No presente experimento, a frequência de transformação estável se refere ao número de calos resistentes produzidos a partir do número total de embriões submetidos à infecção com *A. tumefaciens*. Portanto, os resultados obtidos neste experimento (0,54 e 0,53%) (Figura 10) é muito inferior ao relatado na literatura para este mesmo genótipo 5 a 8% (FRAME et al., 2002; 2006; GRANDO et al., 2011).

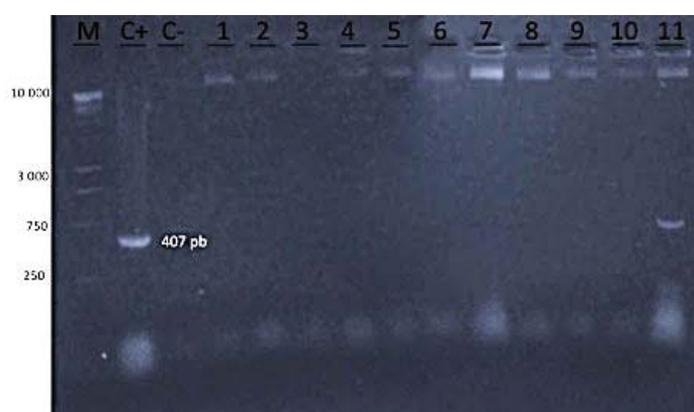


Figura 10 - Análise de PCR em calos resistentes ao herbicida Bialaphos: M: Marcador 1000pb; C+: DNA isolado plasmídeo da bactéria *A. tumefaciens* EHA101 pTF 102 como controle positivo de 407 pb; C-: Calo não transformado como controle negativo; 11: Fragmento de 407 pb amplificados por PCR a partir de calos embriogênicos contendo o gene *bar*. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015.

Dos 138 calos resistentes obtidos no experimento III, 136 (98%) são considerados escapes, ou seja, sobreviveram ao cultivo na presença 3 mg.L^{-1} de Bialaphos, porém não eram geneticamente modificados. No caso do genótipo BR 451, a frequência de escape foi de 100%, pois nenhum dos 38 calos resistentes obtidos do sistema de seleção portavam o gene *bar*. Alguns dos calos considerados escapes podem também ser quimeras, ou seja apresentam células geneticamente modificadas e não modificadas gerando resultado falso-negativo por PCR.

A ocorrência de escapes é comum em protocolos de transformação. Escapes também foram encontrados nos trabalhos descritos por Binka et al. (2012) e Wang et al. (2009). No entanto a frequência de escapes nestes experimentos com os dois genótipos foi muito alta. A dose de 3 mg.L^{-1} de Bialaphos tem sido amplamente utilizada para seleção de calos embriogênicos de milho, inclusive do genótipo Hi-II. O uso de uma maior dose de agente seletivo poderia diminuir o número de calos escapes. Uma alternativa seria o uso de 5 mg.L^{-1} (FRAME, et al 2006) no meio de seleção. Novos teste já estão sendo realizados no LBV-UPF com novas dosagens do herbicida Bialaphos, na indução de calos embriogênico, para solucionar este problema.

Um fator que pode ter gerado escapes foi a elevada quantidade de L-prolina utilizada no meio de Seleção dos calos ($2,88 \text{ g.L}^{-1}$). A L-prolina favorece o crescimento dos calos (CAMARA et al, 2000) e, segundo Delauney e Verna (1993), a L-prolina contribui para uma adaptação do tecido quando este é submetido ao estresse. Entre as diversas funções atribuídas a prolina em tecidos vegetais submetidos a

estresse destacam-se a osmorregulação, a manutenção do pH citoplasmático, a proteção contra a desnaturação de enzimas, o sequestro de radicais livres além de servir como reserva de carbono e nitrogênio e ser um dos produtos de desintoxicação do íon amônio (BELLINGER et al., 1991; FEDINA et al., 1994; CAMARA et al., 2000). A L-prolina é comumente utilizada em meios de cultura de tecidos de milho, ela pode aumentar a frequência da embriogênicidade em calos oriundos de embriões zigóticos imaturos dessa cultura (ARMSTRONG & GREEN, 1985; SONGSTAD et al, 1992), portanto, a prolina pode beneficiar a recuperação dos calos em transformados em meio de seleção, devido à melhoria do seu tecido. Há poucas informações sobre a interação de prolina e agentes seletivos baseados em PPT na seleção de calos transformados. Porém DEKEYSER et al, (1989) indica que a prolina e alguns outros Aas podem interferir na seleção baseada em PPT em arroz e sugerem que estes não devem ser incluídos no meio seletivo. Para tal, nos próximos experimentos será reduzida a concentração de L-prolina para $0,7 \text{ mg/L}^{-1}$ como a maioria dos protocolos utilizam (FRAME, 2002; 2006; 2011), a fim de reduzir a quantidade de escapes.

Não foi possível regenerar plantas nesse experimento, nem dos calos PCR positivos ou calos que não passaram pela análise de PCR. A não regeneração pode ser atribuído a troca do tipo de herbicida do meio de seleção (Bialaphos) para regeneração (Glufosinato de Amônio) ocorrendo um colapso nas células vegetais o que culminou na não regeneração e sim na necrose dos calos. Essa troca é feita devido o alto custo do Bialaphos, Frame et al, (2011) também realiza a troca de herbicida quando passa para a regeneração

o genótipo B104 que possui calo do tipo I assim como o genótipo BR 451. Outro motivo pode ter sido a ausência da L-prolina em meio de regeneração, já que os calos provinham de subcultivos com alta concentração da mesma, deixando de dar suporte para os mesmo sobreviverem em meio com presença do herbicida.

Para superar os problemas encontrados necessita ser empregadas novas estratégias que permitirão regenerar plantas transgênicas, como segue: (a) redução do escape da seleção pelo aumento do herbicida no meio de seleção e redução de agentes químicos no meio de cultura que favorecem o escape, como é o caso da L-Prolina (b) Permanecer com o mesmo agente seletivo na regeneração.

4 CONCLUSÕES

A realização do teste histoquímico de GUS após cinco dias da infecção permite melhor acesso a frequência e intensidade da transformação transiente do que após três dias.

Para a transformação genética dos genótipos Hi-II e BR 451 as melhores condições de co-cultivo de embriões zigóticos imaturos com *A. tumefaciens* é cinco dias a 20 °C.

Neste estudo é otimizado a transformação transiente para os genótipos Hi-II e H3MT-2.

REFERÊNCIAS

ALIMOHAMMADI, M.; BAGHERIEH-NAJJAR, M. B. Agrobacterium-mediated transformation of plants: Basic principles and influencing factors. *African Journal of Biotechnology*. Lagos, v. 8, n. 20, p. 5142-5148, 2009.

ANDRADE, G.M.; SARTORETTO, L.M.; BRASILEIRO, A.C.M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, v. 28 p. 465-476, 2003.

ASCONSELOS, M. J. V . P AIV A, E.; LOPES, M.A. Milho transgênico. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, n.15, p. 42-46, 2000.

ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta*, Berlin, v. 164, p. 207 - 214, 1985.

ARMSTRONG, C. L.; GREEN C. E.; PHILLIPS, R. L. Development and availability of germoplasm with high type II culture formation response. *Maize Genetics and Cooperation Newsletter*, Columbia, v. 65, p. 92-93, 1991.

ARMSTRONG, C. L.; Regeneration of plants from somatic cell cultures: Application in vitro genetic manipulation. In: FREELING, M.; WALLBOT, V. *The Maize Handbook*. New York: Springer Verlag, 1994. p. 663-671.

AKOYI, J.; MGUTU, A.J.;MACHUKA, J.; LIJSEBETTENS, M.; TARACHA, C.; ANAMI, S.E. Dicamba Growth Regulator Promotes Genotype Independent Somatic Embryogenesis from Immature Zygotic Embryos of Tropical Maize Inbred Lines. *Journal of Life Sciences*. [S.I], v. 7, n. 7, p. 677-689. 2013.

BELLINGER, Y; BENSOUUD, A.; LARHER, F. Physiological significance of proline accumulation, a trait of use to breeding for stress tolerance. In: ACEVEDO, E.; CONESA, A.P.; SRIVASTAVA,

J.P. (Eds.) Physiology- breeding of winter cereals for stressed mediterranean environments. *INRA*, Paris, p. 449-458. 1991.

BEVAN, M. W. Binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, London, v. 12, p. 8711-8721, 1984.

BHASKARAN, S.; SMITH, R. H. Regeneration in cereal tissue culture: A review. *Crop Science*, Madison, v. 30, p. 1328-1336, 1990.

BINKA, A.; ORCZYK, W.; NADOLSKA-ORCZYK, A. The *Agrobacterium*-mediated transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (x *Triticosecale* Wittmack): role of the binary vector system and selection cassettes. *Journal of Applied Genetics*, Poznan, v. 53, n. 1, p. 1-8, 2012.

BINOTT, J.; SONGA, J.; ININDA, J.; NJAGI, E. and MACHUKA, J. Plant regeneration from immature embryos of Kenyan maize inbred lines and their respective single cross hybrids through somatic embryogenesis. *African Journal of Biotechnology*, Lagos, vol. 7, no. 8, p. 981-987. 2008.

BINNS, A. N.; TOMASHOW, M. F. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plant. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v. 42, p. 575-606. 1988.

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

BRASILEIRO, A. C.; CARNEIRO, V. T. C. *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998, 309 p.

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-SPI- Embrapa-CNPQ. v.2, p. 354. 1999.

BONACIN, G. A.; DI MAURO, A. O.; OLIVEIRA, R. C.de; PERECIN, D. Induction of somatic embryogenesis in soybean: physicochemical factors influencing the development of somatic embryos. *Genetics and Molecular Biology*, Alto da Boa Vista, v. 23, n. 4, p. 865-868, 2000.

BULL, L.T. *Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba: Potafos, 1993. 301 p.

CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; TORNÉ, J. M.; MANICK, A.; SANTOS, M. A. Efeito do estresse salino e da prolina exógena em calos de milho. *Rev. Bras. Fisiol. Veg. lavras*, v.12, n.2, p. 146-155. 2000.

CARVALHO, C. H. S.; BOHOROVA, N.; BORDALLO, P. N.; ABREU, L. L.; VALICENTE, F. H.; BRESSAN, W.; PAIVA, E. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 17, p. 73-76, 1997.

CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P. CARVALHO, C. H. S.; VASCONSELOS, M. J. V . P AIV A, E.; LOPES, M.A. Milho transgênico. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, n.15, p. 42-46, 2000.

CARNEIRO, A. A.; PINTO, G.T da C.; PÔSSA, K. F.; PEREIRA, M. de F.; VASCONCELOS, M. J.V.; CARNEIRO, N. B. *Transformação Genética de Embriões Zigóticos da Linhagem de Milho Tropical L3 Mediada por Agrobacterium Tumefaciens*. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Sete Lagoas, 2009.

CLOSE, K.R.; GALLAGHER-LUDEMAN, L.A. Structure-activity relationships of auxin-like plant growth regulators and genetic influences on the culture induction responses in maize (*Zea mays* L). *Plant Science*, Ireland, v.61, p.245-252, 1989.

CHE, P.; LOVE, T. M.; FRAME, B. R.; WANG, K.; CARRIQUIRY, A. L.; HOWELL, S. H. Gene expression patterns during somatic maize Hi II callus culture. *Plant Molecular Biology*. Dordrecht, v. 62, n.1, p. 1-14, 2006.

CHENG, M., FRY, J. E., PANG, S., ZHOU, H., HIRONAKA, C. M., DUNCAN, D. R. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* Rockville, v. 115, p. 971–980. 1997.

CHILTON, W.S. et al. Structure and characterization of the crown gall opines heliopine, vitopine and rideopine. *Phytochemistry*, Oxford, v.58 p.137-142. 2001.

CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C. ; CHU, C. Y. Establishment of an efficient medium for rice anther culture through comparative experiments on the nitrogen source. *Scientia Sinica*, v. 16, p. 659-668, 1975.

CHUGH, A.; KHURANA, P. Gene expression during somatic embryogenesis. *Current Science*, v. 83, n. 6, p. 715-730, 2002.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: Grãos. Quarto levantamento, março 2014, Brasília, v. 3, n. 4, p. 1-67, 2014.

DEBLOCK, M. et al. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *Embo Journal*, Hoboken, v. 6, p. 2513-2518, 1987.

DE KLERK, G.; SCHMITT, B. A.; LIEBEREI, R.; NEUMANN, K. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia Plantarum*, Dordrecht, v. 39, p. 53-66, 1997.

DEKEISER, D.; CLAES, B.; MARICHAL, M.; MONTAGU, M.B.; CAPLAN, A. Evaluation of selectable markers for rice transformation. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 90, p. 217-223, 1989.

DELAUNEY, A.J. & VERMA, D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, v. 4, p. 215-223, 1993.

DING, L.; LI, S.; GAO, J.; WANG, Y.; YANG, G. HE, G. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. *Molecular Biology Reports*, The

Hague, v. 36, n. 1, p. 29-36, 2009.

DÍAZ-PÉREZ, J.C.; SUTTER; E.G.; SHACKEL, K.A. Acclimatization and subsequent gas-exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 95, p. 225-232. 1995.

DUNCAN, D. R.; WILLIAMS, M. E.; ZEHER, B. E.; WIDHOLM. J. M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* L. genotypes. *Planta*, Berlin, v. 165, p. 322-332, 1985.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa 2011. Disponível em <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm>. Acesso em 11 de fev de 2015.

EZHOVA, T.A. Genetic control of totipotency of plant cells in an in vitro culture. *Journal of Developmental Biology*, Russian v. 34, p. 197-204, 2003.

FANCELLI, A.L. *Fisiologia, Nutrição e Adubação do Milho para alto Rendimento*. Departamento de agricultura/ESALQ/USP. Piracicaba.14p, 2003.

FARAH, S.B. *DNA Segredos e Mistérios*. Sarvier, São Paulo. 2000. 276p.

FEDINA, I.S.; TSONEV, T.D. and GULEVA, E.I. ABA as a modulator of the response of *Pisum sativum* to salt stress. *Journal of Plant Physiology*, Jena, v. 143, p. 245-249, 1994.

FERNANDES, E. H.; PRIOLI, A. J.; SCAPIM, C. A.; SCHUSTER, I.; VIEIRA, E. S. N., AMARAL, A. T. J.; MOTERLE, L. M. Embriogênese somática a partir de embriões imaturos em genótipos de milho. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2604-2607, 2008.

FRAME, B.; ZHANG, H.; COCCIOLONE, S.; SIDORENKO, L.; DIETRICH, C.; PEGG, S.; ZHEN, S.; SCHNABLE, P.; WANG, K.

Production of transgenic maize from bombarded Type II callus: effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. *In Vitro Cell Dev Biol- Plant*. Largo, v. 36, p. 21-29. 2000

FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R. K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T. M.; PEGG, S. E. K.; LI, B.; NETTLETON, D. S.; PEI, D.; WANG, K. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Maize Embryos Using a Standard Binary Vector System Breakthrough Technologies. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 129, p.13-22, 2002.

FRAME, B. R.; MCMURRAY, J. M.; FONGER, T. M.; MAIN, M. L.; TAYLOR, K.W. TORNEY, F. J.; PAZ, M. M.; WANG, K. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. *Plant Cell Reports, Genetic Transformation e Hybridization*, Ames, v. 25, p.1024-1034, 2006.

FRAME, B.; MAIN, M.; SCHICK, R.; WANG, K. Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos. In: THORPE, A.; YEUNG, E. C. *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, v. 710, p. 327-341, 2011.

FULLNER, J. K.; Lara, C, J.; Nestert, E, W. Pilus assembly by agrobacterium T-DNA transfer genes. *Science*. Nova York, v. 273, p. 1107-1109, 1996.

FULLNER, K. J & NESTER, E. W. Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol*. Washington, v.178, p.1498–1504. 1996.

GARCÍA-MARTÍN, G.; MANZANERA, J. A.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E. Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, The Hague, v. 80, p. 171-177, 2005.

GELVIN, S.B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. Palo Alto, v. 51, p. 223–256, 2003.

GORDON-KAMM, W.; SPINCER, T. M.; MANGANO, M. L.; ANDANS, T. R. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *The Plant Cell*, Rockville, v. 2, p. 603-618, 1990.

GORDON-KAMM, W.; DILKES, B.P.; LOWE, K.; HOERSTER, G.; SUN, X.,; ROSS, M.; CHURCH, L.; BUNDE, C.; FARRELL, J.; MADDOCK, S.; SNYDER, J.; SYKES, L.; LI, Z.; WOO, Y. M.; BIDNEY, D.; LARKINS, B. A. Stimulation of the cell cycle and maize transformation by disruption of the plant retinoblastoma pathway. *Proc. Natl Acad. Sci*, Washington, v. 99, p. 11975–11980. 2002.

GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. J. Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Science*, Madison, v. 15, p. 417-421, 1975.

GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. J. Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Science*, Madison, v. 15, p. 417-421, 1975.

GRANDO, M. F.; EICHLER, L.; TANABE, C. R.; SANTOS, J. F.; SANTOS, C. M. Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v. 2, v. 5, p. 139-144, 1993.

GRANDO, M. F. *Genetic transformation approach for improving forage/silage nutritional value*. Tese (Doctor of Philosophy), University of Florida, 2001.

GRANDO, M. F.; SMITH, R. L.; MOREIRA, C; SCULLY, B. T.; SHATTERS, R. Developmental changes in abundance of the VSPb protein following nuclear transformation of maize with the Soybean vspb cDNA. *BMC Plant Biology*, London, v. 5, n. 3, 2005.

GRANDO, M. F.; VARNIER, L. M.; SILVA, M. R.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M.; EMYGDIO, B. M.; PEREIRA, L. R.; CECCHETTI, D. Comportamento *in vitro* e produção de calos embriogênicos a partir de pendão imaturo de trinta e nove genótipos de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 50, 2004, Florianópolis. *Resumos...2004*. CD ROM.

GRANDO, M. F.; VARNIER, M. L.; EMYGDIO, B. M.; PEREIRA, L. R.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M.; SILVA, M. R.; BORTOLIN, S.; CECCHETTI, D. Embriogênese somática e regeneração de plantas em genótipos de milho. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE MILHO/34 REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE SORGO, 51, 2006, Passo Fundo. *Resumos...* Passo Fundo, 2006.

GRANDO, M. F.; FRAME, B. R.; WANG, K. Transformação Genética de Embriões Zigóticos Imaturos do Híbrido Hi-II no Setor de Transformação de plantas da Iowa State University , Ames, EUA. In: 6 Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2011, Búzios-RJ. *6 Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas*, 2011.

GRANDO, M.F; VARNIER, M.L; SILVA, M.R.; EMYDIO, B.M; PEREIRA, L.R; SUZIN, M. Immature tassels as alternative explants in somatic embryogenesis and plant regeneration in South Brazilian maize genotypes. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringa, v.16 p.39-47, 2013.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPASPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. v. 2, p. 533-568.

GUIMARÃES, P. E. DE O.; PARENTONI, S. N.; PACHECO, C. A. P.; PAES, M. C. D.; VASCONCELOS, M. J. V.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGNAVACA, R.; LOPES, M. A.; SANTOS, M. X.; GAMA, E. E. G.; MEIRELLES, W. F. BR 451 – Milho de alta qualidade proteica. Comunicado Técnico, 111. Sete Lagoas, MG, 2004

GONÇALVES, S.; FERNANDES, L.; ROMANO, A. High-frequency in vitro propagation of the endangered species *Tuberaria major*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v. 101, n. 3, p. 359-363, 2010.

HIEI, Y. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the DNA. *Plant J*. Oxford, v. 6, p. 271–282, 1994.

HIEI, Y., OHTA, S., KOMARI, T., AND KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*, Oxford, v. 6, p. 271–282. 1994

HIEI, Y.; ISHIDA, Y.; KOMARI, T. Progress of Cereal Transformation Technology Mediated by *Agrobacterium Tumefaciens*. *Frontiers in Plant Science*, Lausanne, v. 5 p. 628. 2014

HODGES, T. K.; KAMO, K. K.; IMBRIE; C. W.; BECWAR, M. R.; SCHROLL, S. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. *Bio/Technology*, New York, n. 4, p. 219-223, 1986.

HUANG, X. Q.; WEI, Z. M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 22, p. 793-800, 2004.

HUANG, X. Q.; WEI, Z. M. Successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of maize elite inbred lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 83. p. 187-200, 2005.

IBGE- *Instituto Brasileiro de Geografia e estatística*. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/>> Acesso em: 11 de fev. 2015.

ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium* mediated transformation of maize. *Nature Protocols*, London, v.2, n.7. p.1614-1621, 2007.

ISHIDA, Y.; TSUNASHIMA, M.; HIEI, Y; KOMARI, T. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos, in *Agrobacterium* Protocols: Vol. 1, *Methods in Molecular Biology*, v. 1223, p. 189–198. 2014.

(ISAAA), International Service For The Acquisition Of Agri-Biotech Applications 2014. Disponível em:<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=237>. Acesso em: 20 de janeiro de 2015.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. ISAAA Brief, n. 44, ISAAA: Ithaca, New York, 2013.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. ISAAA Brief, n. 44, ISAAA: Ithaca, New York, 2014.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in high plants. *Embo Journal*, Oxford, v. 6, p. 3901-3907, 1987.

JHA, P.; SHASHI, R. A.; AGNIHOTRI, P. K.; KULKARNI, V. M.; BHAT, V. Efficient Agrobacterium-mediated transformation of Pennisetum glaucum (L.) R. Br. Using shoot apices as explants source. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* Dordrecht, v. 107, p. 501-512. 2011.

JI, Q.; XU, X.; WANG, K. Genetic transformation of major cereal crops. *Int. J. Dev. Biol*, Spain, v. 57, p. 495-508. 2013

JIMÉNEZ, V. M.; BANGERTH F. Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus culture derived from them as related to morphogenesis in vitro. *Plant Science*, Limerick, v.160, n. 2 p. 247-257, 2001.

JIMENEZ, V. M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Campinas, v. 13, n. 2, p. 196-223, 2001.

JÚNIOR, O. L. F. G.; DELIZA, R.; BRESSAN-SMITH, R.; PEREIRA, G. P.; CHIQUIERE, T. B. Seleção de genótipos de milho mais promissores para o consumo in natura. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas v. 26, 00-00, 2006

KAEPPLER, H.; AKULA, C.; AKULA, A.; KAEPER, S. M.; CHADLER, V.; SIDORENKO, L.; NAPOLI, C.; JORGENSEN, R. Agrobacterium-mediated transformation of maize optimization of parameters for utilization of nonsuperbinary vector s. In: *PLANTE ANIMAL GENOME CONFERENCE*, 9, San Diego, 2001

KOMAMINE, A.; KAWAHARA, R.; MATSUMOTO, M.; SUNABORI, S.; TOYA, T.; FUJIMURA, A.; TSUKAHARA, M.; SMITH, J.; ITO, M.; FUKUDA, H.; NOMURA, K.; FUJIMURA, T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell culture. Physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, Columbia, v. 28, p. 11-14, 1992.

LACORTE, C. β -Glucuronidase (GUS). In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília Embrapa SNPI/Embrapa Cenergem, 1998, p. 309.

LACROIX, B. TZFIRA, T. VAINSTEIN, A. CITOVSKY, V. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. *Trends in Genetics*, London, v. 22, p. 29-37, 2006.

LAI, E. M.; CHESNOKOVA, O.; BANTA, L.; KADO, C.I. Genetic and environmental factors affecting T-pilin export and T-pilus biogenesis in relation to flagellation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 182, n. 13, p. 3705-3716, 2000.

LEE, B. L.; KENNON, A. R.; CHEN, X.; JUNG, T. W.; AHN, B. O.; LEE, J. Y.; ZHANG, Z. J. Recovery of transgenic events from two highly recalcitrant maize (*Zea mays* L.) genotypes using *Agrobacterium*-mediated standart-binary-vector transformation. *Maydica*, v. 52, p. 457-469. 2007.

LEE, L. Y.; GELVIN, S. B.; T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, v. 146, p. 325-332, 2008.

LELJAK-LEVANIC, D.; BAUER, N.; MIHALJEVIC, S.; JELASKA, S. Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Reports*, New York, v. 23, p. 120-127, 2004.

MATTHYSSE, A.G. et al. A region of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome containing genes required for virulence and attachment to host cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. Amsterdam, v. 1490 p. 208-212, 2000.

MCCANN, A. W.,; COOLQT, G.; DRESE, J., Tissue and organ culture, *Plant, cell.* v. 14 p. 103-110. 1988

MILACH, S. et al. Regeneração de plantas no cultivo de calos de genótipos brasileiros de trigo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 26, n. 11, p. 1947-1956, 1991.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 15, p. 473-497, 1962.

OMBORI, O.; GITONGA, N. M.; MACHUKA, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea Mays* L.) *Inbred Lines Biotechnology*, Faisalabad, v. 7, n. 2, p. 224-232, 2008.

OMBORI, O., MUOMA, J., AND MACHUKA, J. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of selected tropical inbred and hybrid maize (*Zea mays* L.) lines. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* Dordrecht, v.113, p. 11–23. 2013.

OMER, R.A.; MATHEKA, J.M.; ALI, A.M. MACHUKA, L. Transformation of Tropical Maize with the NPK1 Gene for Drought Tolerance. *International Journal of Genetic Engineering.* v. 3, n. 2, p. 7-14. 2013.

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescence of *Triticum aestivum* L (wheat): evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*, New York, v. 110, p. 95-105, 1982.

PACURAR, D.I.; THORDAL-CHRISTENSEN, H.; PACURAR M.L.; PAMFIL, D.; BOTEZ, C.; BELLINI, C. *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 76, n. 2, p. 76-81, 2011.

PERES, L. E. P. Bases Fisiológicas e Genéticas da Regeneração de Plantas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, n. 25, p.

44-48, 2002

PETRILLO, C. P.; CARNEIRO, N. P.; PURCINO, A. A. C.; CARVALHO, C. H. S.; ALVES, J. D.; CARNEIRO, A. A. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. *Pesquisa Agropecuária brasileira*, Brasília, v. 43, n. 3, p. 371-378, 2008.

PINGALI, P.L. (ed.). 2001. CIMMYT 199-2000 World Maize Facts and Trends. Meeting World Maize Needs: Technological Opportunities and Priorities for the Public Sector. Mexico, D.F.: CIMMYT.

QUE, Q.; ELUMALAI, S.; LI, X.; ZHONG, H.; NALAPALLI, S.; SCHWEINER, M.; FEI, X.; NUCCIO, M.; KELLIHER, X.; GU, W.; CHEN, Z.; CHILTON, M-D. M. Maize transformation technology development for commercial event generation. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, p. 379. 2014

RAGHAVAN, V. Origin and development of pollen embryoids and pollen calluses in cultured anther segments of *Hyoscyamus niger* (henbane). *American Journal of Botany*, Columbus, v. 65, n. 9, p. 984-1002, 1997.

ROCHA, M.A.C.; COSTA, M.A.P.C.; SILVA, S.A.; LEDO, C.A.S. MOREIRA, M. J.S.; BASTOS, L.P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 769-774. 2008.

SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR-PERENCIN, M. L. R. de. Genótipos de milho com alta capacidade para embriogênese somática e regeneração de plantas obtidas a partir de calos. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 717-722, 2000.

SELLMER, J. C.; RITCHIE, S. W.; KIM, I. S.; HODGES, T. K. Initiation, maintenance and plant regeneration of type II callus and suspension cells. In: FREELING, M.; WALLBOT, V. (Ed.). *The maize handbook*. New York, v.1994. p. 671-677.

SILVA, M. R. Embriogênese somática, melhoramento das resposta *in vitro* e transformação de milho (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*. 2008. *Dissertação de Mestrado* (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade de Passo Fundo, 2009.

SILVA, M. R. Cultivo *in vitro* e Transformação Genética de Milho com *Agrobacterium tumefaciens*. 2013. *Tese de doutorado* (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade de Passo Fundo, 2013.

SONGSTAD, D. D.; PETERSEN, W. L.; ARMSTRONG, C. L.; Establishment of friable embryogenic (type II) callus from immature tassels of *Zea mays* (Poaceae). *American Journal of Botany*, Columbus, v. 76, n.7, p. 761-764, 1992.

SONGSTAD, D. D.; ARMSTRONG, C. L.; PETERSEN, W. L. Silver nitrate increases type II callus production from immature embryo of maize inbred B73 and its derivatives. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 9, p. 699-702, 1991.

SHRAWAT, A. K.; GOOD, A. G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of cereals using immature embryos. *Methods Molecular Biology*. v. 710, p. 355-72. 2011.

THEOLOGIS, A. Rapid gene regulation by auxin. *Annual Review of Plant Biology*, v. 37, p. 407-438, 1986.

TINGAY, S.; MCELROY, D.; KALLA, R.; FIEG, S.; WANG, MB.; THORNTON, S.; BRETTELL, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J. Oxford*. v.11, p.1369–1376, 1997.

TOMES, D. T.; SMITH, O. S. The effect of parental genotypes on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germoplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 70, p. 505-509, 1985.

TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology*,

Malden, v.1 p. 201-212. 2000.

TZFIRA, T.; RHEE, Y.; CHEN, MH.; KUNIK, T.; CITOVSKY, V. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. *Annual Reviews Microbiology*, Palo Alto, v. 4 p.187- 219. 2000.

URU, P.M.S.B. de. *Do milho à Pamonha 2007*. Monografia (especialização) – Universidade de Brasília, Centro de Excelência em Turismo, 2007.

USDA, (United States Department of Agriculture) 2014. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdHome.aspx>. Acesso em 03 de janeiro de 2015.

VARNIER, L. M. GRANDO, F. M.; SILVA, M. R.; BORTOLINI, S; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M.; EMYGDIO, M.B.; PEREIRA, R.L.; CECCHETTI, D. Uso de diferentes explantes para indução de calos embriogênicos em genótipos selecionados de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 50, 2004, Florianópolis-SC. *Resumos...* Florianópolis, 2004. CD ROM.

VARNIER, M. L. Produção de calos embriogênicos e regeneração de plantas em genótipos de milho para manipulação genética. 2004. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2004.

VASIL, V.; VASIL, I. K. Induction and maintenance of embryogenic callus culture of Gramineae. In: VASIL, V. *Cell Culture and somatic cell genetic of plants*, New Iork, Academic press, p. 36-42, 1984.

VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *Journal of Plant Physiology*, Jena, v. 128, n. 3, p. 193-218, 1987.

VYSKOT, B.; GAZDOVA, B.; SIROKY, J. Methylation patterns of two repetitive DNA sequences in tobacco tissue cultures and their regenerants. *Biolgia Plantarum*, v. 35, n. 3, p. 321-327, 1993.

VEGA, J. M.; YU, W.; KENNON, A.; CHEN, X.; ZHANG, Z. J. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 27. p.297-305, 2008.

WALTERS, D. A.; VETSCH, C. S.; POTTS, D. E.; LUNDQUIST, R. C. Transformation and inheritance of a hygromycin phosphatase gene in maize plants. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 18, p. 189-200, 1992.

WANG, Y.L.; XU, M.X. YIN, G.X.; TAO, L.L.; WANG, D.W.; YE, X.G. Transgenic wheat plants derived from *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryo tissues. *Cereal Research Communications*, v. 37, n. 1, p. 1–12, 2009.

WANG, J.; SUN, Y.; LI, Y. Maize (*Zea mays*) genetic transformation by co-cultivating germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnology Applied Biochemistry*, Beijing, v. 46, p. 51-55, 2007.

WU, H.; SPARKS, C.; AMOAH, B. JONES, H.D. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Reports*, New York, v. 21, n. 7, p. 659-668, 2003.

ZANETTINI, M.H.B. PASQUALI P. Plantas transgênicas In: MIR, Luis (Coord.). *Genômica*. São Paulo: Atheneu, 2004, p. 1114.

ZHANG, Y. et al. Stability of inheritance of transgenes in maize (*Zea mays* L.) lines produced using different transformation methods. *Euphytica*, Wageningen, v. 144, p. 11-22, 2005.

ZHAO, Z. Y; CAI, T.; TAGLIANI, L.; MILLER, M.; WANG, N.; PANG, H. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. *Plant Mol. Biol.* Dordrecht, v. 44, p. 789–798. 2000.

ZHAO, Z.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L.; HONDRED, D.; BOND, D.; SCHROEDER, S.; RUDERT, M.; PIERCE, D. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. *Molecular Breeding*, Netherlands, v. 8. p. 323-333, 2001.

ZHAO, T., Gu, T.; RICE, H.C.; MCADAMS, K.L.; ROARK, K.M.; LAWSON, K.; GAUTHIER, S.A.; REAGAN, K.L.; HEWES, R.S. A *Drosophila* gain-of-function screen for candidate genes involved in steroid-dependent neuroendocrine cell remodeling. *Genetics*, Baltimore, v.178, n. 2, p. 883-901. 2008.

ZIEMIENOWICZ, A. Agrobacterium-mediated plant transformation: factors, applications and recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2013.

ZUPAN, J. et al. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, Oxford, v. 23 p.11-28. 2000.