

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

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA, MELHORAMENTO
DA RESPOSTA *IN VITRO* E TRANSFORMAÇÃO DE
MILHO (*Zea mays* L.) VIA *Agrobacterium tumefaciens***

MARILIA RODRIGUES DE SILVA

**Dissertação apresentada ao programa
de Pós - Graduação em Agronomia da
Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária da Universidade da UPF,
para a obtenção do título de Mestre
em Agronomia - Área de
Concentração em Produção Vegetal.**

Passo Fundo, junho de 2009.

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

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA, MELHORAMENTO
DA RESPOSTA *IN VITRO* E TRANSFORMAÇÃO DE
MILHO (*Zea mays* L.) VIA *Agrobacterium tumefaciens***

MARILIA RODRIGUES DE SILVA

Orientadora: Ph. D Magali Ferrari Grando

**Dissertação apresentada ao programa
de Pós - Graduação em Agronomia da
Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária da Universidade da UPF,
para a obtenção do título de Mestre
em Agronomia - Área de
Concentração em Produção Vegetal.**

Passo Fundo, junho de 2009.



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

“Embriogênese somática, melhoramento da resposta *in vitro* e transformação de milho (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*”

Elaborada por

MARÍLIA RODRIGUES E SILVA

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

Aprovada em: 26/06/2009
Pela Comissão Examinadora


Dra. Magali Ferrari Grando
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora


Dr. Wilson Antonio Klein
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia


Dra. Sandra Patussi Brammer
Embrapa Trigo


Dr. Mauro Antonio Rizzardi
Diretor FAMV


Dra. Elene Yamazaki Lau
Embrapa Trigo

S586e Silva, Marília Rodrigues de
Embriogênese somática, melhoramento da resposta *in vitro* e transformação de milho (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*. – 2009.
196 f.: il.; 25 cm.

Orientação: Prof. Ph.D Magali Ferrari Grando.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de
Passo Fundo, 2009.

1. Milho – Melhoramento genético. 2. Produção
vegetal. 3. Milho – Doenças e pragas. I. Grando,
Magali Ferrari, orientadora. II. Título.

Catálogo: bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

DEDICO ESTA DISSERTAÇÃO

À minha família...

Meus pais Maurilio e Marisa;

Minha Irmã Maisa e Meu Cunhado Dijian;

Meus Avós Adb, Eloá, Miguelina;

Meu namorado Jeferson Leandro.

À todos que torceram para esta conquista, que sempre acreditaram em mim, me apoiando e incentivando, e que cujos gestos de amor e carinho fizeram parte dessa importante etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Passo Fundo e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo pela oportunidade para a realização do curso;

À Professora Magali Ferrari Grando, Ph.D., minha orientadora, pela dedicação, confiança, orientação, conhecimentos transmitidos e, sobretudo, pela grande amizade, compreensão e apoio em todos os momentos desta caminhada;

Ao Dr. Henrique Pereira e Dra. Beatriz Marti Emydio da Embrapa Trigo, Dra. Andréa Almeida e Dr. Sidney Parentoni da Embrapa Milho e Sorgo e ao Dr. Brian Scully da Universidade de Florida pela disponibilização de materiais vegetais;

Ao Dr. Giancarlo Pasquali da CBiot/UFRGS e ao Dr. Robert G. Shatters Jr da Universidade da Florida, pelo apoio técnico prestados na realização deste trabalho;

Ao Dr. Luiz Gonçalves Esteve Vieira pelas disponibilização da estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* e plasmídeo pCambia 3301, utilizados nos experimentos de transformação genética;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

À FAPERGS pelo apoio técnico;

Aos professores do curso pelos conhecimentos transmitidos e amizade, especialmente, a Professora Dra. Jurema Schons e a Professora Dra. Norimar Denardin pela contribuição na realização no experimento de transformação de milho;

A pesquisadora da Embrapa Trigo Dra. Elene Yamazaki Lau, pela contribuição, ensinamentos e disponibilidade prestados na realização do experimento de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*;

A grande Família e eternos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF, em especial a Professora Engenheira

Agrônoma Dra. Lizete Augustin, Engenheira Agrônoma Msc. Marilei Suzin, Clarício Machado dos Santos, Maico Salvodi, pela colaboração, orientações, disponibilidade, grande amizade e apoio em todos os momentos desta jornada. A Marilei Suzin pela orientação e auxílio nas análises estatísticas;

Aos estagiários do Laboratório Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF, em especial ao acadêmico de Agronomia, Thomás Paulo Kazmirski e aos acadêmicos de Biologia Bibiane Lago de Castro, Lorryne Molina, Thiago Reimers, Felipe Lazaro Alves e Vanessa Toigo de Souza pela amizade e auxílio na realização desta pesquisa;

Aos colegas de curso pelas grandes amizades formadas e boas lembranças dos momentos em que estivemos juntos;

A todos que estiveram envolvidos neste trabalho de forma direta ou indireta;

À Deus principalmente pelo Dom da vida.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Quadros.....	xii
Lista de Figuras.....	xiii
RESUMO GERAL.....	1
ABSTRACT.....	4
INTRODUÇÃO.....	7
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Origem Evolutiva e Classificação Botânica do Milho.....	12
2.2 Importância do milho.....	14
2.3 Milho: linhagens, híbridos e variedades.....	14
2.4 Melhoramento e transformação pela engenharia genética.....	16
2.5 Métodos de transformação genética.....	21
2.5.1 Transformação de milho via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
2.5.2 Vantagens da transformação de plantas liliopsidas pelo método <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
2.5.3 Comportamento do transgene em milho.....	29
2.5.4 Fatores que afetam a transformação com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
2.5.4.1 Estirpes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e Plasmídios.....	33
2.5.5 Explantes utilizados na transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
2.5.6 Efeito genotípico na transformação por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
2.5.7 Etapas metodológicas da transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
2.5.7.1 Período de co-cultivo.....	43
2.5.7.2 Período de descanso.....	45
2.5.7.3 Período de seleção.....	46
2.5.8 Genes repórteres e marcadores	47
2.6 Utilização da cultura de tecidos como ferramenta para obtenção de plantas transgênicas.....	49
2.6.1 Cultura de tecidos.....	51
2.6.2 Cultura de tecidos em liliopsidas e milho.....	52
2.6.3 Explante para iniciar culturas embriogênicas.....	56
2.6.4 Calos embriogênicos do tipo I e II.....	59
2.6.5 Bases genéticas e fisiológicas da regeneração.....	62

CAPITULO I	
AVALIAÇÃO DE EXPLANTES FOLIARES DE MILHO PARA INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA VISANDO A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA	64
Resumo.....	64
Abstract.....	67
1 Introdução.....	70
2 Material e Métodos.....	76
2.1 Local.....	76
2.2 Material vegetal.....	76
2.3 Indução de calos embriogênicos a partir de diferentes sistemas.....	77
2.3.1 Meios de indução de calos.....	77
2.3.2 Explantes para indução de calos.....	78
2.3.3 Manutenção e seleção e dos calos embriogênicos.....	82
3 Resultados e Discussão.....	84
4 Conclusões.....	97
CAPÍTULO II	
MELHORAMENTO DA CAPACIDADE EMBRIOGENÉTICA A PARTIR DE CRUZAMENTOS ENTRE LINHAGENS DE MILHO SELECIONADAS <i>IN VITRO</i>.....	98
Resumo.....	98
Abstract.....	101
1 Introdução.....	103
2 Material e Métodos.....	108
2.1 Local.....	108
2.2 Obtenção dos Híbridos.....	109
2.3 Avaliação de híbridos quanto a indução de calos embriogênicos a partir de pendão imaturo de milho.....	110
2.4 Seleção e manutenção dos calos embriogênicos.....	111
2.5 Delineamento experimental e análise estatística.....	112
3 Resultados e Discussão.....	113
4 Conclusões.....	127

CAPITULO III	
TRANSFORMAÇÃO DE PENDÕES IMATUROS E CALOS	
EMBRIOGÊNICOS DE MILHO VIA <i>Agrobacterium</i>	
<i>tumefaciens</i>.....	128
Resumo.....	128
Abstract.....	131
1 Introdução.....	134
2 Material e Métodos.....	140
2.1 Local.....	140
2.2 Material vegetal.....	141
2.3 Obtenção dos explantes.....	141
2.4 Estirpe de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e vetores.....	142
2.5 Confirmação da presença do pCambia 3301 na	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105.....	143
2.6 Protocolo de Transformação.....	144
2.6.1 Formulações dos meios de cultura.....	145
2.6.2 Cultivo da <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	146
2.6.3 Infecção, co-cultivo e descanso.....	147
2.7 Avaliação, delineamento experimental e análise	
estatística.....	150
3 Resultados e Discussão.....	151
3.1 Transformação de segmentos de pendões imaturos com	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	151
3.2 Transformação de calos embriogênicos obtidos de	
pendões imaturos com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	158
3.3 Seleção dos calos embriogênicos resistentes à	
herbicida.....	168
4 Conclusões.....	172
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	173
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	175

LISTA DE TABELAS

Tabela

1. Características introduzidas no milho pela engenharia genética cultivados no mundo..... 20

CAPÍTULO I

Tabela

1. Porcentagem de calos embriogênicos aos 42 e 84 dias de cultivo a partir de 3 explantes de milho. Passo Fundo, FAMV/UPF – 2008..... 84
2. Porcentagem de calos embriogênicos aos 42 e 84 dias de cultivo em diferentes meios de cultura. Passo Fundo, FAMV/UPF – 2008..... 87
3. Massa fresca de calos embriogênicos obtidos de pendão imaturo e folha de planta jovem do genótipo L20 nos meios de indução de calos M1 e M2. Passo Fundo, FAMV/UPF – 2008..... 94
4. Taxa de crescimento dos calos embriogênicos de calos embriogênicos obtidos de pendão imaturo e folha de planta jovem do genótipo L20 nos meios de indução de calos M1 e M2. Passo Fundo, FAMV/UPF – 2008..... 96

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro

- | | | |
|----|---|----|
| 1. | Genótipos de milho selecionados e programas de melhoramento de origem. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008..... | 77 |
| 2. | Meios de cultura para indução de calos embriogênicos de milho baseados no meio N6. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008..... | 78 |

CAPÍTULO III

Quadro

- | | | |
|----|---|-----|
| 1. | Explantos utilizados para a transformação e respectivos genótipos com seus programas de origem. Passo Fundo, FAMV, 2009..... | 141 |
| 2. | Meios de cultura usados nas diferentes etapas da transformação de calos e pendões imaturos de diferentes genótipos de milho com a linhagem de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA 105: pCambia. Passo Fundo, FAMV, 2009..... | 145 |
| 3. | Meios de cultura utilizados para crescimento da <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Passo Fundo, FAMV, 2009..... | 147 |

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura

1. Mapa funcional de um plasmídio Ti do tipo nopalina: T-DNA (corresponde ao segmento de DNA que é transferido para a célula vegetal); região *vir* (genes responsáveis pelo corte e transferência do T-DNA); região de transferência conjugativa (genes responsáveis pela transferência do plasmídio Ti entre linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*); região de replicação (funções ligadas a replicação, manutenção e estabilidade do plasmídio Ti dentro da bactéria); região *noc* (genes responsáveis pelo catabolismo das opinas). Fonte: Brasileiro & Lacorte, 1998..... 24
2. Sistema binário: o vetor binário, contendo o gene de interesse entre as extremidades do T-DNA, se mantém em uma linhagem desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* de forma independente do plasmídio Ti desarmado, cujos oncogenes foram eliminados e a região *vir* mantida. Fonte: Brasileiro & Lacorte, 1998..... 26
3. Esquema generalizado das diferentes etapas de transformação de plantas por co-cultura com uma linhagem desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* em fragmentos de folhas de fumo. Fonte: Brasileiro, 1998..... 42

CAPÍTULO I

Figura

1. Diferentes explantes de milho avaliados para verificação da capacidade de indução de embriogênese somática. a) planta com 6 semanas de cultivo no estágio de retirada do explante folha jovem e pendão imaturo; b) segmento do último nó da planta de milho de onde foram retirados os segmentos de folha de planta jovem e pendão imaturo; c) detalhe do pendão imaturo de 2-3 cm de comprimento; d) sementes germinadas *in vitro* em meio ½ MS para obtenção do explante folha de plântula; e) plântula com 5 dias após a germinação (detalhe da região em que foram retirados os segmentos); f, g, h) placas contendo os explantes: segmentos de folha de plântula germinada *in vitro*, segmentos foliares de planta jovem e segmentos de pendão imaturo respectivamente; i) detalhe do explante segmento de folha (2X2mm) de plântula germinada *in vitro*; j) detalhe do explante segmento planta jovem (2X2mm) e l) detalhe do explante segmento de pendão imaturo (2mm) cultivados *in vitro*. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008..... 81

2. Calos embriogênicos obtidos de planta jovem e pendão imaturo do genótipo L20 aos 84 dias de cultivo. a, b) calos embriogênicos obtidos de planta jovem do genótipo L20 cultivados no meio M2, c,d,e) calos embriogênicos obtidos de pendão imaturo do genótipo L20 cultivados no meio M1. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008..... 93

3. Placa de petri evidenciando o tamanho e qualidade dos calos embriogênicos obtidos de pendão imaturo do genótipo L20 cultivados no meio M1 aos 84 dias de cultivo. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008..... 95

CAPÍTULO II

Figura

1. Detalhe dos cruzamentos entre as linhagens L2 e L20 de milho: a) inflorescências masculinas protegidas com sacos de papel; b) inflorescências femininas protegidas com sacos plásticos para evitar polinizações indesejáveis; c) detalhe das inflorescências da linhagem L20. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008..... 110
2. Cruzamentos entre as linhagens L2 e L20 de milho para obtenção de híbridos. a) genitores e híbrido F1 (H3MT-1) obtido do cruzamento Linhagem L2 X L20; b) genitores e híbrido F1 (H3MT-2) obtido do cruzamento L20 X L2. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008..... 114
3. Obtenção do explante pendão imaturo dos genitores e híbridos de milho a) plantas com 6 semanas de onde foram obtidas os pendões imaturos; b) pendão imaturo com aproximadamente 3 cm de comprimento; c) placa contendo meio de indução de calos com os segmentos de 2mm do pendão imaturo. Passo Fundo, FAMV/UPF – 2008..... 115

4.	Porcentagem de calos totais de milho observados aos 42 dias de cultivo a partir de pendão imaturo das linhagens parentais L2 e L20 e seus híbridos F1 (H3MT-1 e H3MT-2). Passo Fundo, FAMV/UPF – 2008.....	115
5.	Porcentagem de calos embriogênicos de milho observados aos 42 dias de cultivo a partir de pendão imaturo das linhagens parentais L2 e L20 e seus híbridos F1 (H3MT-1 e H3MT-2). Passo Fundo, FAMV/UPF – 2008.....	116
6.	Aspectos dos calos embriogênicos de milho obtidos de pendão imaturo do genitor L20 e dos híbridos F1 H3MT-1 e H3MT-2, aos 42 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Passo Fundo, FAMV/UPF – 2009.....	117
7.	Massa fresca de calos embriogênicos de milho observados aos 84 dias de cultivo a partir de pendão imaturo das linhagens parentais L2 e L20 e seus híbridos F1 (H3MT-1 e H3MT-2). Passo Fundo, FAMV/UPF – 2009.....	125
8.	Detalhe das linhagens genitoras (L2 e L20) e dos híbridos (H3MT-2 e H3MT-1) desenvolvidas em vasos em ambiente protegido. Passo Fundo, FAMV/UPF – 2008.....	126

CAPÍTULO III

Figura

1. Representação esquemática do T-DNA (4,9 Kb) do pCambia 3301, contendo os gene *gus* (*Uida*) e *bar*. LB e RB - bordas esquerda e direita do T-DNA, respectivamente; P35S e T35S- promotor e terminador CaMV 35S, respectivamente; *bar*- região codificadora do gene fosfinotricina acetiltransferase, o qual determina resistencia ao herbicida basta; *Int-gus* (*Uida*)- gene da β -glucuronidase contendo intron; Tnos- terminador nopaline sintase. Fonte: Huang & Wei (2005)..... 143

2. Análise de PCR confirmando a presença do gene *gus* na *Agrobacterium tumefaciens* estirpe EHA 105. Linha 1: plasmídeo pCambia 3301 (controle positivo), linhas 2, 3, 4 e 5: diferentes colônias da estirpe EHA 105 da *Agrobacterium tumefaciens*. Passo Fundo, FAMV, 2009..... 144

3. Etapas da transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. a) *Agrobacterium tumefaciens* crescida em shaker a 28°C por 16 horas; b) *Pellet* de *Agrobacterium tumefaciens* formado após a centrifugação; c) ressuspensão da *Agrobacterium tumefaciens* em meio de infecção; d) explantes submersos em meio de infecção contendo *Agrobacterium tumefaciens* por 20 minutos. e) explantes sobre papel filtro para a retirada do excesso de solução. f e g) explantes inoculados em meio de co-cultivo por 3 dias e descanso por 7 dias, respectivamente. h) placas contendo os explantes em câmara BOD com temperatura controlada (22°C). Passo Fundo, FAMV, 2009..... 149

4. Níveis de intensidade da cor azul resultante do teste histoquímico de GUS utilizado para classificar a baixa intensidade (valor 1), intensidade média (valor 5) e alta intensidade (valor 10) em segmentos de pendões imaturos. Passo Fundo, FAMV, 2009..... 153
5. Intensidade de coloração azul observada após teste histoquímico de GUS em pendões imaturos co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 (pCambia 3301) (PT) e controles não infectados (C) de diferentes genótipos de milho. Passo Fundo, FAMV, 2009..... 154
6. Porcentagem de pendões imaturos infectados e controle do genótipo H3MT-1 que apresentaram as diferentes categorias de intensidade de cor azul (alto, médio e baixo) após teste histoquímico de GUS. Passo Fundo, FAMV, 2009..... 155
7. Aspectos dos segmentos de pendão imaturo submetidos ao teste histoquímico de GUS. a) Repetição do controle; b) aspecto pendão imaturo do controle, c) Repetição dos infectados; d) aspecto pendão imaturo co-cultivado com *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 (pCambia 3301). Passo Fundo, FAMV, 2009..... 156
8. Porcentagem de calos embriogênicos dos diferentes genótipos de milho expressando cor azul após teste histoquímico de GUS. Passo Fundo, FAMV, 2009..... 159
9. Níveis de intensidade da cor azul resultante do teste histoquímico de GUS utilizado para classificar a baixa intensidade (valor 1), intensidade média (valor 5) e alta intensidade (valor 10) dos calos embriogênicos de milho. Passo Fundo, FAMV, 2009..... 160

10. Intensidade coloração azul observada após teste histoquímico de *gus* em calos embriogênicos de diferentes explantes co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 (pCambia 3301) (PT) e controles não infectados (C) de diferentes genótipos de milho. Passo Fundo, FAMV, 2009..... 161
11. Porcentagem de calos embriogênicos infectados e controle do genótipo L2 que apresentaram as diferentes categorias de intensidade de cor azul (alto, médio e baixo) após teste histoquímico de GUS. Passo Fundo, FAMV, 2009..... 162
12. Nível de intensidade de coloração azul observada após teste histoquímico de *gus* em calos embriogênicos de diferentes explantes dos genótipos de milho. Passo Fundo, FAMV, 2009..... 163
13. Expressão da coloração azul em calos embriogênicos submetidos ao teste histoquímico de GUS em calos embriogênicos da linhagem L2 de milho. Passo Fundo, FAMV, 2009..... 164
14. Nível de intensidade coloração azul após teste histoquímico de GUS em calos embriogênicos e pendões imaturos da linhagem L2 co-cultivada com *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 (pCambia 3301). Passo Fundo, FAMV, 2009..... 165

15. Seleção dos explantes transformados com *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105: pCambia 3301 em meio seletivo contendo 5 mg.L⁻¹ de BASTA por 21 dias. a, b) Segmentos de pendão imaturo co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* evidenciando a formação de calos; c) explantes de pendão imaturo controle (não co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens*); d) explantes calos embriogênicos co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* crescendo em meio seletivo; e) Calos embriogênicos controle em meio seletivo (não co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens*). Passo Fundo, FAMV, 2009..... 169

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA, MELHORAMENTO DA
RESPOSTA *IN VITRO* E TRANSFORMAÇÃO DE MILHO
(*ZEA MAYS* L.) VIA *Agrobacterium tumefaciens***

Marilia Rodrigues de Silva¹, Magali Ferrari Grandó²

RESUMO

A engenharia genética de plantas abre novas perspectivas na obtenção de genótipos superiores de milho (*Zea mays* L.). A transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, tem sido o método preferido para este fim, para isso a cultura de tecidos é um pré-requisito. No entanto, o milho é considerado uma das culturas mais recalcitrantes para o cultivo *in vitro* e transformação genética. Os pontos críticos para utilização desta técnica se referem ao uso de genótipos responsivos *in vitro*, tipos de explantes utilizados para iniciar a cultura embriogênica e protocolos bem ajustados para a transferência de T-DNA via *Agrobacterium tumefaciens*. Desta forma, este trabalho objetivou testar explantes foliares e segmentos de pendão imaturo para acelerar o processo de obtenção de calos embriogênicos, desenvolver híbridos através do cruzamento sexual de duas linhagens responsivas para melhoria da capacidade de resposta *in vitro* e avaliar a transferência do T-DNA através da infecção de calos embriogênicos

¹ Engenheira Agrônoma, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro), Área de Concentração em Produção Vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

² Orientadora, Bióloga, Ph.D. em Agronomia com ênfase em Biologia Molecular de Plantas, Professora do Curso de Agronomia (FAMV) e Ciências Biológicas (ICB) da UPF e PPGagro., FAMV/UPF.

e segmentos de pendão imaturo com *Agrobacterium tumefaciens*. Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Biotecnologia Vegetal, Bacteriologia e Virologia da FAMV/UPF. Para avaliação dos explantes foliares foram utilizados quatro genótipos selecionados (L20, HS1, HS2 e V4), os explantes utilizados foram: segmentos de pendão imaturo, de folhas basais de plântulas obtidas *in vitro* e de folha de plantas com 6-7 semanas, e três diferentes meios de indução de calos baseados no meio N6. Neste experimento concluiu-se que segmentos foliares de milho apresentam baixo potencial de embriogênese somática nos genótipos testados não superando a resposta do pendão imaturo. Para o melhoramento da resposta *in vitro*, duas linhagens (L2 e L20) com alta frequência produção de calos embriogênicos a partir de pendão imaturo foram usadas em cruzamentos recíprocos produzindo os híbridos H3MT-1 (L2 X L20) e H3MT-2 (L20 XL2). Pendões imaturos das linhagens e seus híbridos foram avaliados *in vitro*. Os híbridos F1 de milho não diferiram do genitor L20 na produção de calos embriogênicos. No entanto, a utilização de plantas híbridas é vantajosa pois apresentam alto vigor quando comparado à linhagens. Para avaliar a transferência do T-DNA em milho, calos embriogênicos e pendões imaturos de diferentes genótipos foram infectados com *Agrobacterium tumefaciens* da linhagem EHA 105, portadora do plasmídeo pCambia 3301 (este plasmídeo carrega o gene repórter *gus* e o gene marcador *bar*) utilizando o protocolo modificado de Vega et al. (2008). A transferência do T-DNA foi avaliada por meio de ensaio histoquímico para GUS (JEFFERSON et al., 1987). Os controles dos dois explantes (não infectados com a *Agrobacterium tumefaciens*) apresentaram

background (expressão de um gene semelhante ao *gus*). Os pendões do genótipo H3MT-1 e os calos embriogênicos da linhagem L2 apresentaram intensidade de coloração azul superior aos seus respectivos controles sugerindo a transferência de T-DNA.

Palavras-chaves: engenharia genética, explantes, calos embriogênicos, gene *gus*, melhoramento genético.

SOMATIC EMBRYOGENESIS, IMPROVEMENT OF *IN VITRO* RESPONSE AND TRANSFORMATION IN MAIZE (*Zea mays* L.) VIA *Agrobacterium tumefaciens*

Marilia Rodrigues de Silva¹, Magali Ferrari Grando²

ABSTRACT

Plant genetic engineering opens new perspective in obtaining superior maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Agrobacterium tumefaciens* transformation has been the preferred method for this purpose and for that the tissues culture is a requirement. However, maize is considered the most *in vitro* culture and genetic transformation recalcitrant crop. The critical points for *Agrobacterium tumefaciens* mediate transformation refer to the use of *in vitro* responsive genotypes, type of explants used to initiate embryogenic culture and protocols well adjusted for the transfer of T-DNA by the *Agrobacterium tumefaciens*. This study aimed (1) to evaluate leaf explants to accelerate the embryogenic callus obtaining process, (2) to develop hybrids by crossing two *in vitro* responding inbred lines to improve capacity of embryogenic callus inducing, and (3) evaluate the transfer of T-DNA by infection of embryogenic calli and immature tassel segments with *Agrobacterium tumefaciens*. The experiments were developed in the

¹ Agronomist, Master student in Agronomy Graduation Program, Major in Plant Production at Department of Agronomy and Veterinarian Medicine (PPGAgro)-University of Passo Fundo (UPF).

² Advisor, Biologist, Ph.D. in Agronomy, Faculty member of Department of Agronomy and Veterinarian Medicine and Agronomy Graduation Program - University of Passo Fundo (UPF).

of Plant Biotechnology, Bacteriology and Virology Laboratories at FAMV/UPF. To evaluate the leaf explants four selected genotypes (L20, HS1, HS2 and V4), and the explants immature tassel segments, basal leaves from *in vitro* seedlings and leaves of plants with 6-7 weeks were cultivated on three different calli induction media based on N6 medium. In this experiment it was possible to conclude that maize leaf segments have low potential for somatic embryogenesis in the genotypes tested, not overcoming the immature tassel. For the breeding *in vitro* response, two inbred lines (L2 and L20) with high production of embryogenic calli were used in reciprocal crosses producing the F1 hybrids H3MT-1 (L2 x L20) and H3MT-2 (L20 x L2). Immature tassels of the inbred lines and hybrids were evaluated *in vitro*. The maize hybrids did not surpass the L20 parent line in the production of embryogenic callus. However, the use of hybrid plants is advantageous because simple hybrids show hybrid vigor when compared to homozygous lines. To evaluate the T-DNA transfer into maize, immature tassels and embryogenic calli of different genotypes were infected with the EHA105 strain of *Agrobacterium tumefaciens* carrying the pCambia 3301 plasmid, which contains the *gus* reporter gene and the bar marker gene using the Vega et al. (2008) based protocol. The T-DNA transfer was evaluated by the GUS histochemical assay. The two explants control (not infected with *Agrobacterium tumefaciens*) showed background (expression of a *gus*-like gene). The tassel of H3MT-1 hybrid and embryogenic calli of L2 inbred line showed higher intensity of blue color compared to their respective controls suggesting the T-DNA transference.

Key words: genetic engineering, explants, embryogenic callus, *gus* gene, genetic breeding.

1 INTRODUÇÃO

Milho (*Zea mays* L.) é uma das maiores commodities na agricultura internacional e uma fonte importante de nutrientes para homens e animais. Segundo dados do IBGE, no Brasil, em 2008, foram produzidos 51,6 milhões de toneladas, colocando o país como o terceiro maior produtor mundial de milho, após os Estados Unidos e a China (RANKBRASIL, 2008). O Rio Grande do Sul é responsável por 42,9% da produção nacional de milho. Esta cultura destaca-se como uma cultura de demanda crescente devido à expansão de atividades ligadas a exploração animal.

Há muito tempo novas variedades de milho vêm sendo produzidas a partir de técnicas tradicionais de melhoramento, visando melhoria das características agronômicas, nutricionais, sanitárias, adaptação a diferentes ambientes e estresses ambientais. A escassez de água e terras agricultáveis, uma população em expansão, os estresses ambientais, a grande demanda por qualidade e quantidade, são fatores que exercem pressão para uma resposta mais rápida do melhoramento genético (HUANG & WEI, 2004).

Assim, novas ferramentas surgem como forma de melhorar e tornar mais eficiente este processo, entre elas ressalta-se as técnicas de engenharia genética que surgem como um importante instrumento por permitir a introdução de genes que conferem características agronômicas desejáveis. No entanto, a maioria dos estudos de manipulação genética, em milho, têm sido realizados em poucos genótipos, sendo estes adaptados ao clima temperado.

Um sistema de cultura de tecidos apropriado para a produção

de tecidos regeneráveis é um ponto crítico para a produção e regeneração de plantas transgênicas, pois o gene geralmente é introduzido em células totipotentes e plantas devem ser regeneradas a partir das mesmas. Portanto, o estabelecimento de um protocolo adequado para o cultivo e regeneração de plantas é pré-requisito em estudos com transformação genética (RITALA et al., 1995).

Em milho, o calo embriogênico, tem sido um tecido útil na transferência de genes devido ao seu alto potencial de regeneração de plantas e por poder ser mantido em cultivo por um tempo prolongado. No entanto, a produção deste tecido é altamente dependente do genótipo, do explante utilizado para iniciar a cultura e das condições de cultivo *in vitro*.

No período de 2001 a 2004, vários experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF, para identificar meios de cultura e genótipos de milho com capacidade de produzir calos embriogênicos, a partir de pendão imaturo, e regenerar plantas *in vitro*. Foram analisados 39 genótipos provenientes de diferentes programas de melhoramento, sendo selecionados seis genótipos que expressaram capacidade embriogênica de longa duração e regeneração de plantas *in vitro*. Diferentes explantes como embrião imaturo e meristema apical também foram testados, onde o primeiro apresentou comportamento comparável ao pendão imaturo com 1 a 2 cm de comprimento (VARNIER, 2004). Porém, para a obtenção do pendão e embrião imaturos há necessidade de cultivo de plantas em casa de vegetação, o que demanda tempo e recursos.

Recentemente, Ahmadabadi et al. (2006) obteve sucesso na

utilização de explantes foliares de obtenção de alta frequência de indução de calos embriogênicos de tipo I em milho, o que representou economia de tempo no processo de obtenção de plantas transformadas. Sendo assim, estes estudos em genótipos sul brasileiros são fundamentais para que genótipos transgênicos possam ser introduzidos com maior eficiência no sistema agrícola do Rio Grande do Sul.

Ressalta-se ainda que o domínio de novas tecnologias, bem como a consolidação do conhecimento e treinamento técnico, são fundamentais para a obtenção de plantas transgênicas, o que pode causar grande impacto no crescimento econômico do Rio Grande do Sul, uma vez que este caracteriza-se por ser essencialmente agrícola. Segundo Chaves & Grando (em preparação), a vantagem de se utilizar a engenharia genética em vez do melhoramento convencional é a inexistência de barreiras reprodutivas e necessidade de compatibilidade genética entre as espécies doadora e receptora do gene em questão, visto que o gene é introduzido em laboratório.

Os métodos mais utilizados atualmente para a introdução de transgenes no genoma de plantas são biobalística e a agrobactéria (CARNEIRO et al., 2004). O milho é uma liliopsida que tem sido alvo de inúmeros estudos de manipulação genética utilizando, principalmente, o método da biobalística.

Segundo Frame et al. (2002) relatórios recentes têm demonstrado que a transformação do milho mediada por *A. tumefaciens* pode oferecer uma alternativa melhor do que a biobalística. As principais vantagens do sistema de transformação por agrobactéria em liliopsidas, são a alta frequência de transformação,

baixo número de cópias do gene inserido, alta eficiência de transformação e maior nível de expressão do transgene. Além disso, a integração do gene no genoma do hospedeiro é mais precisa e intacta, sendo possível a integração de segmentos relativamente grandes de T-DNA no genoma da planta com raros rearranjos, sendo herdados conforme padrão mendeliano (HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996; LOPOTTO et al., 1998; SLUYS, 1999; ZHAO et al., 1998; HIEI et al., 2000; ZHAO et al., 2000; DAI et al., 2001; CONTI et al., 2003; SHOU et al., 2004; DANILOVA & DOLGIKH, 2005; ZHANG et al., 2005; FRAME et al., 2006; ISHIDA et al., 2007; VEGA et al., 2008).

Assim, o presente trabalho busca contribuir na consolidação da linha de pesquisa em biologia molecular e biotecnologia na Universidade de Passo Fundo, contribuindo, também, para a formação de recursos humanos em novas tecnologias além do fortalecimento da cooperação técnico-científica com grupos de pesquisa nacional (Embrapa Trigo e UFRGS), considerado um fator importante na transferência de tecnologia e na busca de competência para solucionar problemas agrícolas num sistema mais globalizado. Para isto, o primeiro passo é desenvolvimento de protocolos eficientes de cultura de tecidos, além da otimização de algumas técnicas já utilizadas rotineiramente por outros laboratórios e adaptação para nossas condições e genótipos.

Tendo em vista o estabelecimento de técnicas para transformação genética em milho, o presente trabalho teve como objetivo geral otimizar protocolos de indução de embriogênese somática e de transformação de plantas mediada por *Agrobacterium*

tumefaciens em genótipos pré-selecionados de milho. Os objetivos específicos foram:

- Aperfeiçoar o protocolo de produção de calos embriogênicos a partir de genótipos de milho pré-selecionados, para utilização em experimentos de transformação genética;

- Avaliar explante folhas jovens, obtidos de plântulas de sementes germinadas *in vitro*, e de plantas com 6 a 7 semanas, quanto ao potencial embriogênico visando acelerar o sistema de cultivo e regeneração de plantas *in vitro*;

- Obter híbrido de milho com elevada capacidade de embriogênese somática através do cruzamento recíproco de duas linhagens selecionadas quanto à resposta *in vitro*;

- Adaptar protocolo para a transformação genética dos genótipos de milho V4, L20, L2, H3MT-1 e H3MT-2 utilizando a transformação pelo método da *Agrobacterium tumefaciens*;

- Avaliar os explantes alvos calos embriogênicos e pendão imaturo quanto à ocorrência e intensidade de transformação;

- Verificar a ocorrência da inserção do gene *gus* nos explantes testados mediante teste histoquímico de GUS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Origem Evolutiva e Classificação Botânica do Milho

Consumido pelos povos americanos desde o ano cinco mil a.C., o milho hoje é cultivado e consumido em todos os continentes, desde a Latitude 58° Norte (União Soviética) até 40° Sul (Argentina), e sua produção, atualmente, só perde para a do trigo e do arroz (CEREALPAR, 2003).

Originado do México, o milho apresenta grande variabilidade e atualmente existem cerca de 250 raças (PATERNIANI & CAMPOS, 1999). A partir da segunda metade do século XX, o desenvolvimento de híbridos aumentou a produtividade e a qualidade do milho. No Brasil, esta cultura ocupa extensas áreas. Entre as principais regiões produtoras estão o norte do Paraná, o Triângulo Mineiro, o oeste de São Paulo e o Vale do Taquari, no Rio Grande do Sul.

O milho é uma planta herbácea, monóica, isto é, possui os dois sexos na mesma planta em inflorescências diferentes, é uma planta anual, ou seja, completa o ciclo em quatro a cinco meses (CAMPOS & CANÉCHI, 1973; PONS & BRESOLIN, 1981).

Dentro da classificação botânica, o milho é uma gramínea da família *Poaceae*, tribo *Maydeae*, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. É taxonomicamente identificado como *Zea mays* L. spp *mays*, para distinguir do seu parente silvestre mais próximo, o teosinto, ambos com $2n = 2x = 20$ cromossomos (PATERNIANI & CAMPOS, 1999).

O milho é planta alógama com praticamente 100% de reprodução cruzada (PATERNIANI & CAMPOS, 1999). Como

originou-se do teosinto, a literatura traz vários relatos científicos mostrando as semelhanças e diferenças entre estas duas espécies (SANGOI & SALVADOR, 1996). Doebley apud Sangoi & Salvador (1996) identificaram genes envolvidos na evolução do milho, encontrando cinco regiões no genoma responsáveis pelo controle da maioria das diferenças existentes entre milho e teosinto.

Paterniani & Goodman apud Paterniani & Campos (1999) salientam que a grande diversidade genética encontrada em milho, é considerada um exemplo de evolução, uma vez que a evolução corresponde a mudanças nas frequências gênicas ao longo das gerações. Dentre os fatores que contribuem para a evolução temos a seleção, mutação, oscilação genética, migração e hibridação, sendo os mais importantes a hibridação e a seleção. Segundo Wellhausen et al. apud Paterniani & Campos (1999), a hibridação seria o fator mais importante que levaria ao desenvolvimento de raças.

O milho é a planta cultivada que atingiu o mais elevado estágio de domesticação, uma vez que não sobrevive sem a interferência do homem (Beaddle apud PATERNIANI & CAMPOS, 1999).

Para Paterniani & Campos (1999), subsequente à seleção deve ter acontecido a diminuição do número de espigas por colmo, favorecendo o aumento do tamanho da espiga e a redução do número de perfilhos. A colheita de plantas individuais permite que o milho seja bem adaptado à seleção pelo homem, uma vez que a produção de cada planta e as características de cada espiga são imediatamente identificadas.

2.2 Importância do milho

Devido ao potencial produtivo, à composição química e ao valor nutricional, o milho constitui-se num dos mais importantes cereais do mundo. Devido a sua multiplicidade de aplicações na alimentação humana ou animal, tem um importante papel social e econômico, sendo matéria-prima impulsionadora de diversificados complexos agro-industriais (FRANCELLI, 2001; HUANG & WEI, 2004).

O milho movimenta um mercado de, aproximadamente, US\$ 40 bilhões anuais entre indústrias de produção de alimentos para consumo humano, rações e centenas de produtos industrializados (CARNEIRO et al., 2000).

Segundo dados do IBGE no Brasil, no ano de 2008 foram produzidas 51,6 milhões de toneladas o que mantém o Brasil como o terceiro maior produtor mundial de milho, após os Estados Unidos e a China (RANKBRASIL, 2008). Em torno de 75% da produção nacional de milho destina-se ao consumo animal (CEREALPAR, 2003), na forma de ração e silagem.

2.3 Milho: linhagens, híbridos e variedades

As linhagens são altamente homozigotas e são obtidas a partir de sucessivas autofecundações de plantas selecionadas para fins de utilização como genitores nos programas de melhoramento. Em função da morfologia dos órgãos reprodutivos da planta de milho, do número de sementes que se consegue com uma única autofecundação

é praticamente ilimitado o número de linhagens que se pode obter. As espigas colhidas, por sua vez, serão avaliadas, selecionadas e plantadas para realização de nova seleção. Nas primeiras autofecundações ocorre uma rápida perda do vigor, estabilizando-se a partir da sétima geração de autofecundação quando a linhagem é considerada “pura” ou homozigótica (PATERNIANI & CAMPOS, 1999).

O milho está entre as espécies em que a hibridação é recomendada como método adequado de melhoramento devido à relativa facilidade de se obterem altos níveis heteróticos. Vários tipos de híbridos têm sido comercialmente produzidos: Intervarietal (Variedade A x Variedade B), Top cross (Linhagem x Variedade), Híbrido duplo [(Lin. A x Lin. B) x (Lin. C x Lin. D)], Híbrido triplo modificado [(Lin. A x Lin. B) x (Lin. C x Lin. C')], Híbrido triplo [(Lin. A x Lin. B) x Lin. C], Híbrido simples modificado [(Lin. A x Lin. A') x Lin. B] e Híbrido simples (Lin. A x Lin. B), sendo citados em ordem decrescente de variabilidade. Entende-se por variedade uma população de polinização livre (PATERNIANI & CAMPOS, 1999).

O híbrido simples é resultante da primeira geração do cruzamento controlado de duas linhagens (Linhagem A x Linhagem B), sendo potencialmente o mais produtivo de todos os híbridos, mas é igualmente exigente em solo, clima, fertilidade e água (OLIVEIRA, 1984). A uniformidade genética pode ser favorável em determinado ambiente ou desfavorável se o híbrido fosse plantado numa série de ambientes (PATERNIANI & CAMPOS, 1999). Os milhos híbridos podem ser cruzados naturalmente entre si, o que aliás, é viável com quaisquer variedades ou raças de milho.

2.4 Melhoramento e transformação pela engenharia genética

A seleção e cruzamento de plantas ocorrem há muitos anos com o objetivo de utilização como alimento, a fim de melhorar suas características, como a resistência a doenças e insetos, maior rendimento, e também alguns aspectos relacionados à qualidade (sabor, aroma, textura, tamanho, etc.). Porém, nas últimas décadas, ocorreu um grande avanço na área da biologia molecular, o que tem proporcionado uma revolução de fatos e conceitos relacionados ao melhoramento vegetal, em função da aplicação das técnicas de manipulação do DNA, visando à obtenção de alimentos geneticamente modificados. A tecnologia do DNA recombinante diz respeito a técnicas de engenharia genética que permite a transferência de genes entre diferentes organismos por métodos assexuais.

Sob as pressões exercidas pelos recursos limitados da terra e de água, população de expansão e os estresses ambientais, a grande demanda para milho com maior qualidade e quantidade requer uma melhoria genética mais rápida (HUANG & WEI, 2004). A engenharia genética é útil na obtenção de plantas transgênicas com diferentes objetivos: alimentos mais nutritivos, estáveis ao armazenamento, mais saudáveis, com melhoramento da produção, tolerância a estresses bióticos e abióticos, uso de áreas marginais, redução do impacto ambiental, obtenção de fármacos e vacinas a partir de plantas transgênicas (VALOIS, 2001).

As espécies de cereais, tais como o arroz, o milho e o trigo, são as culturas alimentícias mais importantes no mundo, portanto

técnicas viáveis e reproduzíveis que facilitem uma eficiente transformação genética de plantas liliopsidas são imprescindíveis, juntamente com as técnicas de regeneração *in vitro* que permitem a produção de plantas inteiras a partir de uma única célula (AHMADABADI et al., 2006).

Os primeiros relatos de produção de milho transgênico fértil ocorreram no início da década de 90 (GORDOM-KAMM et al., 1990; FROMM et al., 1990; WALTERS et al., 1992). Desde então, genes cuja exploração através de métodos tradicionais de melhoramento é inviável, têm sido introduzidos via transformação genética (Kozziel et al., Murry et al., Armstrong et al. apud SANTOS-SEREJO & AGUIAR- PERECIN, 2000).

No milho, esta técnica tem se mostrado útil na produção de plantas resistentes a insetos e vírus, tolerantes a herbicidas, bem como na expressão de proteínas farmacêuticas (MURRY et al., 1993; Daniell et al., 2001) e no melhoramento da digestibilidade pela redução de formação de lignina pela tecnologia anti-senso (HE et al., 1990). O milho tem sido engenheirado para aumentar a expressão da zeína na semente pela manipulação de promotores (ANTONY et al., 1997; CARNEIRO et al., 2000), visando o aumento da metionina no grão de milho. A tecnologia do DNA recombinante pode ser utilizada para melhorar a concentração de proteína também na parte vegetativa da planta, a qual é utilizada na formulação de silagem (GRANDO, 2001).

Segundo relatório da CIB (2008) os genes estão sendo incorporados ao cereal para aumentar a estabilidade e a produtividade das plantas de milho por meio de tolerância à seca e resistência a

doenças. Também estão sendo estudados genes que melhoram a composição de proteínas, aumentando a solubilidade no trato digestivo e a absorção de minerais pelos suínos e recentemente, os cientistas vêm trabalhando no isolamento de genes buscando melhorar a conversão do amido de milho em álcool.

Trabalhos desenvolvidos por Al-Abed, et al. (2006), obtiveram sucesso na obtenção de plantas transgênicas de milho contendo o gene *cbf3* que apresentaram alta tolerância à seca, frio e salinização.

Além da aplicação da engenharia genética no melhoramento de plantas, esta tecnologia tem sido empregada, com sucesso, na produção de biofábrica. Plantas transgênicas apresentam um novo sistema de produção de diferentes classes de peptídeos e proteínas de valor industrial e biofarmacêutico e várias companhias de biotecnologia estão desenvolvendo, testando a campo e patenteando sistemas de expressão de plantas e realizando testes clínicos (GIDDINGS et al., 2000).

Atualmente, muitas proteínas são produzidas por bactérias e células de mamíferos crescidas em sistema de fermentação a altos custos. Plantas, ao contrário podem ser produzidas de uma forma barata em escala agrícola (STOGER et al., 2000; 2002; 2005; MA et al., 2005), e mais importante, plantas são capazes de dobrar e montar proteínas complexas e garantir as modificações pós-traducionais de uma maneira semelhante a células de mamíferos, pois possuem sistema de membranas (retículo endoplasmático e complexo de Golgi) onde é realizado o processamento pós-traducional necessário ao bom funcionamento de certas proteínas humanas, como é o caso da eritropoietina, que é uma glicoproteína (STOGER, 2005).

Segundo revisão recente de Ramessar et al. (2008), o milho apresenta vantagens sobre outras plantas, pois apresenta alta produtividade, alta estabilidade da proteína durante o armazenamento, além de apresentar alta produção de biomassa a baixos custos, comparado com outras plantas, bem como já ter a vantagem de ter sistemas de transformação genética bem estabelecidos. Além disso sementes de milho são órgãos naturais de armazenamento de proteínas, sendo assim um veículo ideal para o acúmulo de proteínas recombinantes tais como anticorpos (STOGER, 2005).

Conforme Ramessar et al. (2008), várias proteínas farmacêuticas e industriais e para diagnóstico estão sendo produzidas em escala comercial a partir de milho transgênico até a presente data, sendo elas: avidina, tripsina, aprotinina, β -glucuronidase, peroxidase, (Empresa norte-americana de Biotecnologia Prodigene), lactoferrina, Vacina Lt-B (para diarreia), gene da fusão e glicoproteína S.

Isso demonstra a eficiência do milho e sua eficácia como biofábrica de produtos de alto valor comercial. Um exemplo da utilização do milho como biofábrica no Brasil é a produção de pro-insulina humana a partir de milho transgênico pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, 2004).

Já estão sendo plantados diversos eventos de milho transgênico em diversos países, a tabela 1 exemplifica características já introduzidas no milho pela transformação genética, estes já estão sendo cultivados mundialmente.

Tabela 1. Características introduzidas no milho pela engenharia genética cultivados no mundo

Característica transgênicas	Países
Tolerância ao herbicida glufosinato de amônio	Argentina, Austrália, Canadá, Japão e EUA
Tolerância ao herbicida glifosato	Argentina, Canadá, Japão, África do Sul e EUA
Resistência a lepidópteros	Japão, EUA, Argentina, Canadá, alguns países da União Européia, Filipinas, África do Sul
Resistência a coleópteros	Canadá, Japão e EUA
Resistência múltipla a lepidópteros e a coleópteros	Canadá, Japão e EUA
Resistência a lepidópteros e tolerância ao herbicida glifosato	União Européia, Canadá, Japão e EUA
Resistência a coleópteros e tolerância ao herbicida glifosato	Canadá, Japão e EUA
Resistência a lepidópteros e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio	Argentina, Canadá, Japão (teste alguns países da União Européia (teste), Uruguai e EUA), Canadá, Japão e EUA
Resistência múltipla a lepidópteros e a coleópteros e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio	Canadá, Japão e EUA
Macho-esterilidade e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio	Canadá e EUA

Fonte: CIB (2008).

No Brasil, a transformação genética em milho está sendo desenvolvida pelo Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo/Embrapa (Minas Gerais), onde genes do próprio milho estão sendo engenheirados para alterar sua expressão visando aumentar a concentração de zeína e metionina ao nível de grão (ANTONY et al., 1997; CARNEIRO et al., 2000), sendo que genótipos de milho tropical estão sendo utilizados para tal fim. Sendo que os eventos aprovados pela CTNbio (comissão técnica nacional de Biosegurança) são tolerância ao herbicida glufosinato de amônio (LL), resistência a insetos da ordem Lepidoptera (lagartas) (Yieldgard), resistência a

insetos da ordem Lepidóptera (lagartas) (Bt11), sendo que ainda aguardam liberação comercial os eventos com as características de tolerância ao herbicida glifosato (RR2) e (GA21), resistência a insetos da ordem Lepidóptera (ICP-4), resistência a insetos e tolerância ao glufosinato de amônio (Herculex) (CIB, 2008).

2.5 Métodos de transformação genética

Segundo Brasileiro & Carneiro (1998), métodos de obtenção de plantas transgênicas vêm sendo desenvolvidos e alguns já estão bem estabelecidos. A *Agrobacterium tumefaciens*, é um eficiente vetor na engenharia genética de plantas, principalmente de magnoliopsidas. Outras técnicas de transferência de genes que podem ser aplicadas tanto em magnoliopsidas e liliopsidas são conhecidos como métodos diretos de transformação, permitindo a introdução de DNA exógeno da célula vegetal por meio de mecanismos químicos ou físicos, entre eles estão a eletroporação, a biobalística e a microinjeção.

2.5.1 Transformação de milho via *Agrobacterium tumefaciens*

Embora plantas férteis de milho transgênico (*Zea mays* L.) foram produzidas pela primeira vez utilizando a biobalística (GORDON-KAMM et al., 1990), relatos recentes indicam que a transformação do milho mediada por *Agrobacterium tumefaciens* pode ser uma alternativa melhor do que a biobalística na inserção de transgenes milho (FRAME et al., 2002).

Atualmente a transformação mediada por agrobactéria está sendo recomendada para variedades de milho com boa resposta na cultura de tecidos (SHOU et al., 2004; HUANG & WEI, 2005; ISHIDA et al., 2007; LEE et al., 2007).

O primeiro relato de plantas transgênicas de milho produzidas pelo método da *Agrobacterium tumefaciens* foi realizado por Ishida et al. (1996) com a transformação de embriões imaturos da linhagem A188. Estes autores observaram frequências de transformação entre 5 a 30%, obtendo plantas com morfologia normal e férteis, apresentando integração estável do gene com a herança confirmadas por análises moleculares e genéticas.

Inicialmente esta tecnologia de transformação de plantas via *A. tumefaciens* não era bem compreendida e não podia ser estendida a plantas liliopsidas, pois estas não eram naturalmente infectados por este patógeno (ISHIDA et al., 2007). Entretanto Hiei, et al. (1994) mostraram que isto era possível de modo altamente eficiente em arroz. Posteriormente outros trabalhos de transformação de cereais como o do milho (ISHIDA et al., 1996), trigo (Cheng et al. apud ISHIDA et al., 2007), cevada (Tingay et al. apud ISHIDA et al., 2007) e sorgo (ZHAO et al., 1998) foram publicados. O sucesso da transferência de genes em embriões imaturos de milho mediado por várias estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* foi posteriormente relatado (LUPOTTO et al., 1998; ZHAO et al., 1998; ZHAO et al. 2001; FRAME et al., 2002; FRAME et al., 2006 e VEGA et al., 2008).

O uso desta tecnologia usada na transformação de milho deve-se aos grandes progressos que foram feitos nos últimos anos nos estudos sobre o mecanismo de transformação por *Agrobacterium*

tumefaciens e sua aplicação. Segundo Wei et al. (2000) muitos detalhes dos eventos moleculares das células bacterianas envolvidas na transferência de T-DNA foram elucidados, assim como fatores relativos às plantas, por exemplo, muitas espécies, que eram recalcitrantes, ou não eram hospedeiros de *A. tumefaciens*, podem agora serem transformada por este método (cereais, gimnospermas, leveduras e fungos).

A *Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria de solo gram negativa, capaz de transferir e integrar parte do seu DNA o T-DNA, no genoma nuclear de células vegetais (Koukolíková-Nicola et al. apud SHEN et al., 1993).

A capacidade de infectar células vegetais está associada à presença, na *Agrobacterium tumefaciens*, de um plasmídeo Ti (do inglês *tumor-inducing*) (Figura 1), que contém genes que causam um tumor colhecido como galha da coroa. Inicialmente, os pesquisadores associaram o desenvolvimento dessas galhas ao câncer animal, o que estimulou numerosas pesquisas visando à elucidação das causas desta doença. Esses estudos concluíram que o surgimento desta doença é, na realidade, o resultado de um processo natural de transferência de genes da bactéria para a célula vegetal, que passam a sintetizar substâncias que estimulam a divisão celular no sítio de infecção (BRASILEIRO & LACORTE, 1998).

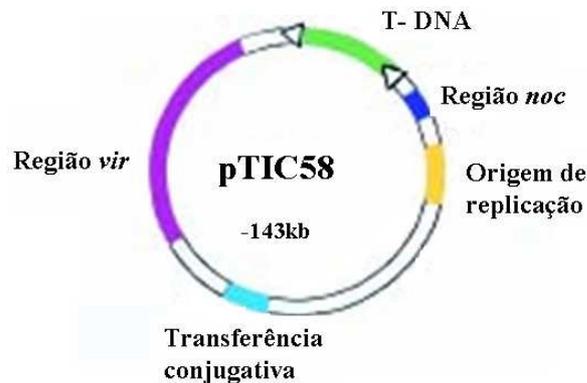


Figura 1. Mapa funcional de um plasmídeo Ti do tipo nopalina: T-DNA (corresponde ao segmento de DNA que é transferido para a célula vegetal); região *vir* (genes responsáveis pelo corte e transferência do T-DNA); região de transferência conjugativa (genes responsáveis pela transferência do plasmídeo Ti entre linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*); região de replicação (funções ligadas a replicação, manutenção e estabilidade do plasmídeo Ti dentro da bactéria); região *noc* (genes responsáveis pelo catabolismo das opinas). Fonte: Brasileiro & Lacorte, 1998.

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 incontroladamente devido à produção de citocininas e auxinas e, quanto mais elas se dividem, mais produzem opinas que vão sendo utilizadas pela bactéria.

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). As regiões das bordas que limitam a região T são caracterizados por 25 pares de bases diretamente repetidos em cada extremidade e definem a porção do plasmídeo que será transferida.

Uma vez estabelecido que os genes contidos no T-DNA não interferiam em sua transferência da célula bactéria para a célula vegetal, Zambryski et al. apud Sluys (1999) 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.

O mecanismo de transferência de T-DNA é um mecanismo elaborado que engloba uma série de genes de virulência (*vir*) do plasmídeo Ti que possui o T-DNA. Estes genes *vir* são induzidos por sinais químicos liberados por células injuriadas da planta (CHILTON, 1993)

O plasmídeo Ti é grande (em torno de 200kpb) por isso é de difícil manuseio *in vitro*. Portanto, vetores alternativos contendo a região T integral ou parcial foram construídos a partir dos plasmídios da agrobactéria. Estes vetores menores tem o tamanho aproximado de 10kb, podendo ser agrupado em vetores co-integrados e vetores binários (Klee et al. apud SLUYS, 1999).

A figura 2 ilustra a *Agrobacterium tumefaciens* contendo o sistema de vetor binário, ou seja, contendo o plasmídeo Ti desarmado

(somente a região *vir* que promove a transferência do T-DNA) e o plasmídio adicional portando a região do T-DNA (DNA que será transferido para a planta).



Figura 2. Sistema binário: o vetor binário, contendo o gene de interesse entre as extremidades do T-DNA, se mantém em uma linhagem desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* de forma independente do plasmídeo Ti desarmado, cujos oncogenes foram eliminados e a região *vir* mantida. Fonte: Brasileiro & Lacorte, 1998.

Carvalho et al. (2004) relataram que as dificuldades do método de transformação por *Agrobacterium tumefaciens* em liliopsidas pode ser devido a multiplicidade de fatores que influenciam a transformação. Uma limitação importante do sistema da Agrobactéria para a transferência de genes para liliopsidas 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.

Na Natureza, plantas liliopsidas não são infectadas por *A. tumefaciens*. Acredita-se que determinados sinais das moléculas indutoras da região *vir* na *Agrobacterium tumefaciens* não são

suficientemente ativas em liliopsidas. Foi demonstrado que a indução da região *vir* com exsudatos de plantas magnoliopsidas ou substâncias sintéticas fenólicas, como a acetoceringona, aumentam a eficiência de transformação em cereais (Dekeyser et al., Stachel apud DANILOVA & DOLGIKH, 2004).

O efeito positivo da adição de acetoseringona no aumento da eficiência na transformação de algumas culturas de milho foi também demonstrada por Ishida et al. (1996), Sairam et al. (2003), Lupotto et al. (1998) e Wang et al. (2007).

Segundo Wojtaszek apud Frame et al. (2002) em uma interação incompatível de patógeno-hospedeiro, a invasão do patógeno pode ser interrompido pelas plantas causando morte celular no local da infecção. Este mecanismo de resistência, ou resposta de hipersensibilidade, é mediada por uma explosão oxidativa em que podem ocorrer uma rápida e transiente produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio. No milho, células de calos infectadas com *A. tumefaciens* mostraram sofrer uma rápida hipersensibilidade com um tipo de morte celular (apoptose) (Hansen apud FRAME et al., 2002).

O uso de antioxidantes no meio de cultura de infecção pode aumentar a compatibilidade patógeno-hospedeiro pela melhoria do efeito prejudicial da resposta hipersensível, levando a um aumento na taxa de sobrevivência de células infectadas com *A. tumefaciens* e assim um aumento na eficiência da transformação estável (LOPOTTO et al., 1998). Em milho o uso do antioxidante L-cisteína elevou a frequência de transformação em embriões imaturos de milho (FRAME et al., 2002; 2006). Da mesma forma, Vega et al. (2008) elevaram a

eficiência de transformação em milho de 5,5 para 12% utilizando a combinação de combinação de L-cisteína com o outro antioxidante, o dithiothreitol (DTT).

2.5.2 Vantagens e desvantagens da transformação de plantas liliopsidas pelo método *Agrobacterium tumefaciens*

A Biobalística e *Agrobacterium tumefaciens* são dois métodos populares correntemente usados para produzir milho transgênico. Pelo método de *A. tumefaciens* é possível introduzir baixo número de cópias dos transgenes nos cromossomos vegetais, geralmente uma ou duas (HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 1998; 2001; SHOU et al., 2004; RIBAS et al., 2006; ISHIDA et al., 2007), isto é positivo pois a inserção 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).

A eficiência do método via *A. tumefaciens* é relativamente alta. Zhao et al. (1998) obtiveram com o método da Agrobactéria uma frequência de transformação maior (33-51% dos embriões tratados) em comparação ao método da biobalística (7-10% dos embriões tratados), sendo que a eficiência foi citada como vantagem por diversos autores como Hiei et al. (1994); Ishida et al. (1996), Zhao et al. (1998), Klaeper et al. (2001) e Frame et al. (2002).

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 de T-

DNA 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), os genes seguem padrão de herança mendeliana (ISHIDA et al., 1996; Potrykus apud SLUYS, 1999; FRAME et al., 2002; SHOU et al., 2004; ISHIDA et al., 2007).

A limitação associada a este método é que a eficiência da transformação depende de diversos fatores, entre eles dos vetores binários utilizados e estirpes da *Agrobactéria* (SHEN et al., 1993; LUPOTTO et al. 1998; SAIRAM et al., 2003; SHOU et al., 2004; HUANG & WEI, 2005; FRAME et al., 2006; VEGA et al., 2008). Além disso, a cultura de tecidos é uma condição prévia tanto para a transformação tanto com *agrobactéria* como *biobalística*. Ishida et al. (1996) afirmaram que a principal barreira na transformação não é na distribuição de fragmentos de DNA nas células das plantas, mas na recuperação de células que adquiriram o T-DNA em seus cromossomos através da regeneração de plantas *in vitro*.

2.5.3 Comportamento do transgene em milho

O transgene quando integrado nas plantas se comporta como um gene com segregação mendeliana e dominante. Ishida et al. (1996) reportaram que todas as linhagens transformadas analisadas mostraram que o transgene estava incorporado de modo estável no genoma da planta e tinham transmissão mendeliana normal dos genes *bar* e *gus*. Frame et al. (2002) confirmaram por Southern-Blot e análises de progênie a integração, a expressão, e a herança do gene *bar* e *gus* nas gerações R0, R1 e R2 dos eventos transgênicos.

Shou et al. (2004) trabalhando com os genótipos Hi-II e B73 mostraram segregação na taxa de 1:1 quando cruzado com planta não transgênica, o que era esperado pois a inserção do transgene era dominante no locus. Confirmando estas afirmativas, Ishida et al. (2007) obtiveram transformantes com uma ou duas cópias do transgene mostrando herança mendeliana.

Já por métodos diretos, como a biobalística várias cópias e grandes rearranjos de DNA foram encontrados em plantas transformadas. A transformação por *Agrobactéria* gerou 92% de transgenes com número de cópias baixo (menos que 3) e 8% médio (3 a 9), já a transformação por biobalística 33% continha número de cópias média ou alta e 67% tinham mais de 10 cópias. Além disso, quando se utilizou a *Agrobacterium tumefaciens* como método de transformação, 41% dos eventos tinham alto nível de expressão, 55% médio e somente 5% baixo. Porém quando se utilizou a biobalística 44% tiveram expressão média e 56% baixa (SHOU et al., 2004).

Outra característica do comportamento do transgene na planta é que este exibe dominância completa, sem interação com o resto do genoma (Mumm, 2007).

2.5.4 Fatores que afetam a transformação com *Agrobacterium tumefaciens*

Vários parâmetros incluindo estirpe de *A. tumefaciens*, genótipo de milho, composição do meio de cultura e temperatura afetam a eficiência da transferência de T-DNA quando plasmídios não superbinários são utilizados (KAEPLER et al., 2001).

Hung & Wei (2005) testaram diversos parâmetros a fim de otimizar o protocolo de transformação de plantas de milho pelo método da *Agrobacterium tumefaciens* entre eles: efeitos das estirpes de *A. tumefaciens* (GV310, EHA105, LBA4404), densidade celular da *A. tumefaciens* (A600: 0,4; 0,8 ou 1,2) e tempo inoculação (5, 10, 20, 40 ou 60 minutos), período de co-cultivo: 1 a 6 dias, pH no meio co-cultivo (5,0; 5,2; 5,4; 5,6; 5,8 ou 6,0), temperatura de co-cultivo (19°C; 22 °C; 25 °C; 28 °C) efeito do surfactante Tween 20 no meio de infecção (0,01; 0,1 ou 1%). Os resultados mostraram que nas condições do experimento os melhores parâmetros foram: estirpe EHA 105 apresentado 23,8% na eficiência de transformação, ainda a densidade de A600=0,8 por 20 minutos, a inclusão 0,1% em Tween 20 no meio de infecção, o co-cultivo em meio ácido (pH 5,4) a 22 °C durante 3 dias.

Ishida et al (1996) também testaram a concentração do inóculo, sendo que a concentração 5×10^9 cfu/ml foi a que produziu os melhores resultados. Em concentrações mais baixas como 1.0×10^9 cfu/ml foram obtidos calos transformados, porém em menor frequência e em concentração menor que esta não obtiveram transformantes.

Zhao et al. (2001) obtiveram um aumento de 40% na transformação utilizando os seguintes parâmetros: a concentração bacteriana de 0.5×10^9 cfu/ml, tempo de contato com o meio de inoculação de 5 min, a etapa de co-cultivo por 3 dias e descanso por 4 dias, temperatura de 28°C em cada subcultivo, o que aliado a outras melhorias como meio de cultura N6 sem nitrato de prata na

inoculação, uso de 100 mg.L^{-1} de carbenicilina para eliminar a bactéria após a inoculação.

Outro protocolo otimizado utilizado rotineiramente pela Universidade de Missouri apresenta ainda parâmetros como o período de crescimento da bactéria por três dias a 28°C no escuro, a concentração de $\text{OD}_{550} = 0.35$ ($0.5 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$), tempo inoculação de 10 minutos e temperatura de co-cultivo de 28°C (VEGA et al., 2008).

As baixas temperaturas no co-cultivo 19 e 22°C comparadas com 25°C favoreceram a transformação (LEE et al., 2007). Para Frame et al. (2002) a redução da temperatura no co-cultivo de 23°C para 20°C e a presença de L-cisteína (400 ml.L^{-1}), elevaram a frequência de transformação em milho.

Uma etapa de pré-incubação foi adicionada aos protocolos de Frame et al. (2002) e Vega et al. (2008) visando aumentar a estabilidade da transformação. Esta etapa consistiu na agitação da cultura da *Agrobacterium tumefaciens* a 160 rpm numa temperatura de 23°C por 4 horas na presença de acetossiringona, antes da inoculação com o explante a ser transformado.

Ainda ao se estabelecer um protocolo de transformação, diferentes fatores devem ser levados em consideração. Na planta, a transferência do T-DNA é influenciada pela fisiologia (estágio e tipo de tecido utilizado) (CARVALHO et al., 2004; ISHIDA et al., 2007), genótipos e explantes de milho (ISHIDA et al., 1996; FRAME et al., 2006; LEE et al., 2007), técnicas de cultura de tecidos, em especial a composição dos meios de cultura de tecidos, escolha dos vetores e

estirpes, (ISHIDA et al., 2007), seleção de genes marcadores (ISHIDA et al., 1996).

Em adição os principais fatores que limitam a aplicação da transformação genética de milho são a baixa frequência de regeneração de plantas e a fraca virulência da *Agrobactéria* em relação aos cereais (ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 2001; DANILOVA & DOLGIKH, 2004; HUANG & WEI, 2005).

2.5.4.1 Estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* e Plasmídios

Estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* desempenham um papel importante no processo de transformação, pois são responsáveis pela infecção e eficiência da transferência do T-DNA. Elas abrigam o plasmídio contendo os genes de interesse e os genes responsáveis pela transferência do T-DNA. Em milho, a diferença na eficiência de transformação de diferentes estirpes de *A. tumefaciens* tem sido relatada por Shen et al. (1993), Lupotto et al. (1998), Huang & Wei (2005), Frame et al., (2006), Vega et al. (2008).

Até o ano de 2005, todas as transformações de milho por *Agrobacterium tumefaciens* tinham sido realizadas utilizando a cepa LBA4404. Porém, Huang & Wei (2005) provaram que a estirpe supervirulenta EHA 105 foi superior (23,8%) a LBA4404 (18,3%) e GV3101(3,9%). A melhoria da eficiência da transformação de plantas observados com EHA105 foi provavelmente devido ao aumento da indução da transferência de T-DNA pelos genes *vir* adicionais *virB*, *virC*, e *virG*. EHA105 também foi mais adequada para a transformação de outros cereais (RASHID et al., 1996).

Por outro lado, Sairam et al. (2003) transformaram meristemas apicais de milho utilizando as estirpes EHA105, LBA4404, e GV3101, estes autores observaram que a eficiência da transferência de T-DNA foi independente de estirpes supervirulentas da mesma forma que Hiei et al. (1997).

Atualmente os vetores binários são os mais utilizados e se baseiam na propriedade da região *vir* atuar na transformação mesmo não estando na região do T-DNA a ser transferida. Os vetores binários são assim denominados por crescerem tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium tumefaciens*, devido à presença de uma origem replicação no plasmídeo a qual permite a sua duplicação em ambas bactérias. Estes vetores apresentam sempre as bordas direita e esquerda delimitando a região a ser transferida, além de genes que conferem resistência a antibiótico ou herbicida (gene marcador) que permitem a seleção de células transformadas e cassetes de expressão onde são inseridos em geral os cDNAs ou genes inteiros que se deseja transferir. Após a construção em *E. coli*, o vetor é transferido por choque térmico, conjugação triparental ou eletroporação para *Agrobacterium tumefaciens* (SLUYS, 1999).

Vetores super binários apresentam cópias extra de *virB*, *virC*, e *virG* na sua constituição (KOMARI, 1990) e foram utilizados primeiramente em milho para infectar embriões zigóticos imaturos da linhagem A188 (ISHIDA et al., 1996). Porém, o custo de licenciamento para o uso desta tecnologia privada em escala mais ampla dificulta o uso em laboratórios públicos, de forma que uso de vetores binário padrão são preferidos (FRAME et al., 2002).

Os recentes avanços na transformação do milho com *Agrobacterium tumefaciens* tornaram possível ao público a transformação de milho utilizando vetores binário padrão sem a necessidade do vetor superbinário (VEGA et al., 2008). Frame et al. (2002) foram os primeiros a relatar o uso de um sistema binário padrão gerando um método que produziu plantas férteis e com transformação estável, utilizando embriões imaturos de milho do genótipo Hi-II com o gene marcador P35S-*bar* (gene fosfinotricina acetiltransferase com o promotor do mosaico da couve-flor vírus (CaMV 35S) e um gene repórter P35S-*gus* (β -glucuronidase - gene com um intron com o promotor CaMV 35S) na *A. tumefaciens* estirpe EHA101.

2.5.5 Explantes utilizados na transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

O desenvolvimento de um protocolo de transformação eficiente inclui entre outros fatores a identificação de explante transformável, de rápida proliferação *in vitro* e competência para a regeneração a partir de células transgênicas (SAIRAM et al., 2003).

Para algumas espécies, genes exógenos devem ser transferidos para células não diferenciadas, desdiferenciados ou diferenciadas que estão se dividindo ativamente ou mantêm a capacidade de divisão e regeneração de plantas (ISHIDA et al., 2007). Assim, é necessário um sistema eficiente de cultivo *in vitro* e regeneração de plantas, pois além do milho apresentar forte efeito genotípico na resposta *in vitro*,

somente explantes jovens contendo células meristemáticas ou embriogênicas são responsivos à cultura de tecidos.

Conforme mencionado anteriormente, o milho pode ser transformado e regenerado na cultura de tecido usando diferentes explantes entre eles embriões imaturos, meristemas apicais e calos embriogênicos. O processo morfogenético mais usado na regeneração de plantas de milho é a embriogênese somática (LU et al., 1982; NOVAK et al., 1983; VASIL et al., 1984; TOMES & SMITH, 1985; ARMSTRONG & GREEN, 1985; VASIL & VASIL, 1986, PRIOLI & SILVA, 1989), embora também possa ser utilizada também a organogênese (SAIRAM et al., 2003).

A regeneração de plantas de milho *in vitro* também apresenta inúmeras dificuldades, que vão desde limitações associadas com a regeneração de embriões imaturos, meristemas apicais e calos embriogênicos a problemas associados ao efeito genotípico, variação somaclonal, chimeras, a dificuldade em manter a totipotência por longos períodos, baixa frequência da indução de calos e regeneração de plantas (LU et al., 1982, TOMES & SMITH 1985; VASIL et al., 1985; VASIL & VASIL, 1987, VARNIER, 2004).

O primeiro relato de transformação de lilipsidas foi na cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) em que os autores utilizaram diferentes explantes (meristema apical, segmentos de raízes de plântulas jovens, escutelo e células em suspensão induzidos de escutelo, embriões imaturos e calos de raízes jovens e escutelo), sendo que os calos de escutelo tiveram alta capacidade de transformação, propagação e regeneração e produziram a maior frequência de tecidos resistentes a higromicina (23%) (HIEI et al., 1994).

Em milho também foi desenvolvido um método de transformação mediado por *Agrobacterium tumefaciens* através da infecção de calos embriogênicos. No entanto, a eficiência foi baixa devido ao uso de gene marcador ineficiente (*nptII*) que confere resistência ao antibiótico canamicina. Este antibiótico, utilizado como agente seletivo, contribuiu para o efeito inibitório na morfogênese e os calos perderam a capacidade de embriogênese e regeneração (DANILOVA & DOLGIKH, 2004).

Lupotto et al. (1998) utilizaram calos embriogênicos primários de milho em seus experimentos e constataram que estes eram bons tecidos para a transformação de milho e que podem ter alta taxa de infecção, mas este tecido apresentou problemas de necrose e dificuldade na recuperação do crescimento.

Embora existam trabalhos utilizando o calo embriogênico como explante inicial na transformação de milho, o embrião imaturo ainda é o explante mais utilizado em experimentos de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Segundo Ishida et al. (2007) os determinantes primários para o sucesso da transformação é a resposta dos embriões à cultura de tecidos, tipos de células que se desenvolvem *in vitro* e regeneração de plantas. Para estes autores a qualidade do embrião é um passo crítico na eficiência da transformação. Para isto, embriões devem ser obtidos de plantas vigorosas crescidas em casa de vegetação com controle adequado de ar e luz. Geralmente para o genótipo A188, 150 grãos são obtidos de cada espiga, assim um número muito abaixo deste indica que as condições não foram ideais. Outro passo crítico ressaltado por

estes autores é o tamanho dos embriões imaturos que devem ter de 1 a 1,2 mm.

Já os autores Zhao et al. (2001) e Carvalho et al. (2004) usaram em seus experimentos embriões zigóticos de 1,0-1,5 mm obtidos de espigas do híbrido Hi-II, 9-12 dias após a polinização. Vega et al. (2008) utilizaram embriões zigóticos imaturos, de cerca de 1,5 mm (1,4-1,8 mm).

Em uma análise dos dias após polinização mais adequados para a obtenção de embriões imaturos visando à transformação por *Agrobacterium tumefaciens*, Lupotto et al. (1998) retiraram embriões a cada 24 horas do dia 11 ao dia 15 após a polinização. As observações mostraram que os dias 11 e 12 se apresentam no melhor estágio para a cultura e regeneração de tecidos (87 e 94% respectivamente), e esta fase também resultou na maior taxa de infecção (76 e 90%, respectivamente).

Outro explante utilizado na transformação por *Agrobacterium tumefaciens* em milho é o meristema apical. Sairam et al. (2003) relataram que a transferência de T-DNA aos meristemas apicais é elevada, variando no meio 60 e 87%, e não é dependente do uso de estirpes de *A. tumefaciens*. Este estudo mostrou que usando meristemas apicais, plantas de milho podem ser regeneradas em uma alta frequência com organogênese e embriogênese somática. Meristemas apicais da linhagem A188 e células em suspensão do genótipo Black Mexican Sweet foram infectados com *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pSB131) (ISHIDA et al., 1996).

Wang et al. (2007) inovaram a transformação de plantas utilizando o explante sementes germinada em contato direto com

Agrobacterium tumefaciens eliminando os passos trabalhosos e demorados da cultura de tecidos. Estas tentativas demonstram a busca por explantes alternativos que possam ser rapidamente obtidos e que não apresentam efeito genotípico na resposta *in vitro* tão predominante (AL-ABED et al., 2006).

2.5.6 Efeito genotípico na transformação por *Agrobacterium tumefaciens*

O sucesso na recuperação de eventos transgênicos tem sido atribuído, em parte à elevada frequência de indução e manutenção de calos embriogênicos, as quais são características bastante dependentes do genótipo utilizado (Songstad et al.; Brettschneider et al.; Ishida et al.; Lupotto et al.; Lowe et al. apud FRAME et al., 2006).

Todos os parâmetros utilizados na transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, visam aplicar esta tecnologia em genótipos agronomicamente relevantes, tais como variedades, híbridos e linhagens importantes utilizadas em programas de melhoramento de milho. Para Ishida et al. (2007) infelizmente alguns genótipos de milho, especialmente as variedades elite, são pobres quanto à resposta a cultura de tecidos e isto limita o número de genótipos que foram eficientemente transformados.

É altamente desejável engenheirar híbridos e genótipos elite, pois podem ser utilizados como recursos genéticos primários ou como materiais melhorados. Variedades de milho elite têm grande significância econômica e representam os últimos produtos da pesquisa e melhoramento.

Atualmente, o híbrido Hi-II, com os genitores A188 e B73, tem sido largamente utilizado para a transformação do milho em inúmeros laboratórios (LUPOTTO et al., 1998; ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; SHOU et al., 2004; VEGA et al., 2008). A principal vantagem do híbrido Hi-II é sua alta frequência de indução de calos embriogênicos tipo II (VEGA et al., 2008), sendo este friável, com crescimento rápido e altamente embriogênico (ARMSTRONG & GREEN, 1985).

Além do híbrido Hi-II, a linhagem A188 que é um dos genitores do Hi-II tem sido utilizada para a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, pois esta linhagem é bem adaptada a cultura de tecidos (ISHIDA et al., 1996, DANILOVA & DOLGIKH, 2004). Apesar de um número limitado de linhagens terem sido transformadas (HUANG & WEI, 2005), várias linhagens recalcitrantes cruzadas com A188 geraram híbridos que puderam ser transformados, por exemplo A188 × R91 (DANILOVA & DOLGIKH, 2004), W117 x A188, W59E x A188, A554 x A188, W153R x A188 e H99 x A188 (ISHIDA et al., 1996).

Os resultados de Ishida et al. (2007) evidenciam a diferença genotípica na eficiência de transformação de milho, variando de 51,7% no genótipo A188 a 7,9% no genótipo H99, utilizando o mesmo plasmídeo pSB131.

Pelas razões citadas, a pesquisa esta focada na transformação de genótipos de milho pouco ou não relacionados ao Hi-II, por exemplo, o híbrido Chi 31 × Cateto S.G e a linhagem R91 que apresentaram alto potencial morfo genético (DANILOVA & DOLGIKH, 2004) e as linhagens W117, W59E, A554, W153R e H99

sem sucesso (ISHIDA et al., 1996). Diferentes genótipos foram testados mediante a infecção de meristema apical, tais como: LH 74 × A 641, LH 262 × LH 252, LH 198 × LH 227, FR 1064 × FR1064 (SDMS) × LH 185, LH 176 e LH 177 × DMS e R23 (SAIRAM et al., 2003).

Frame et al. (2006) avaliaram três linhagens endogâmicas de milho (B104, B114, e Ky21) quanto à frequência de indução de calos embriogênicos e de transformação usando um sistema vetor binário padrão em embriões imaturos de milho. Estas linhagens representavam diversos pedigrees não relacionadas com linhagens A188 e H99. Assim a frequência média de transformação foi de 6,4% (para B104), 2,8% (para B114), e 8% (para Ky21).

Lee et al. (2007) testaram 2 variedades americanas H99 e OH43 e duas linhagens coreanas de milho Jangdaok e Chalok2 obtendo sucesso na transformação somente nas variedades.

2.5.7 Etapas metodológicas da transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

O método clássico de transformação genética mediada por *A. tumefaciens* inclui a inoculação, seguida por um curto prazo de co-cultura dos explantes com *A. tumefaciens*, a eliminação de *A. tumefaciens* por antibióticos, a seleção dos tecidos transformados em meio de cultura contendo agentes seletivos e a regeneração de plantas (Figura 3).

A aplicação deste método de introdução de DNA no genoma do milho exige algumas modificações das condições em cada etapa da

transformação (DANILOVA & DOLGIKH, 2004; FRAME et al., 2002; 2006). Em milho, geralmente o processo de transformação pode ser dividido em 5 etapas sequenciais: inoculação da bactéria, co-cultivo, descanso, seleção de plantas e regeneração, sendo que no passo de descanso não é incluído o agente que vai selecionar os explantes resistentes (ZHAO et al., 2001).



Figura 3. Esquema generalizado das diferentes etapas de transformação de plantas por co-cultura com uma linhagem desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* em fragmentos de folhas de fumo. Fonte: Brasileiro, 1998.

2.5.7.1 Período de co-cultivo

Após a infecção do explante com a *Agrobacterium tumefaciens*, o que pode variar de 5 a 20 minutos (ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; HUANG & WEI, 2005, FRAME et al., 2006; LEE et al., 2007; VEGA et al., 2008) é realizado o co-cultivo, ou seja, o explante é transferido para um meio de cultura sólido sem a presença do agente seletivo para que ocorra a transferência do T-DNA da *A. tumefaciens* para a célula vegetal. Segundo Ishida et al. (2007), o co-cultivo é um dos fatores mais importantes do protocolo de transformação juntamente com o estágio de desenvolvimento correto dos embriões imaturos de milho.

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 3 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 & Wei (2005) testaram diferentes temperaturas durante o período de co-cultivo (19 a 28 °C) sendo que a temperatura mais adequada foi 22°C,

e níveis inferiores de expressão de *gus* foram observados em 19 e 28 °C, sendo que outros autores utilizaram a temperatura de 25°C durante esta etapa (ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 2001, ISHIDA et al., 2007, VEGA et al., 2008).

Outro fator a ser considerado é o pH. Huang & Wei (2005) testaram a influencia do pH durante o período de co-cultivo, sendo que o pH 5,4 produziu mais alta frequência de calos transformados comparados com os pHs (5,0; 5,2; 5,6; 5,8 e 6,0) resistentes a fosfinotricina (PPT) e verificaram que a inclusão do surfactante Tween 20 teve efeito positivo sobre a expressão transitória do gene *gus* e à produção de calos resistentes PPT. Já Vega et al. (2008), que publicaram um protocolo melhorado para transformação de milho utilizaram pH 5,2 no meio de co-cultivo.

Outra substância utilizada nesta etapa para a transformação de milho é o nitrato de prata (AgNO_3), um antagonista do etileno. O AgNO_3 tem sido utilizado normalmente em meio de cultivo de embriões e pendões imaturos de milho para elevar a frequência de indução de calos embriogênicos por impedir que o etileno endógeno, gerado pelos danos mecânicos causados ao explante e pelo processo de cultivo *in vitro*, afete a resposta embriogênica (VAIN et al., 1989; SONGSTAD et al., 1991; 1992; CARVALHO et al., 1997).

No entanto, o uso de AgNO_3 pode reduzir a frequência de transformação dos explantes por *Agrobacterium tumefaciens*. Zhao et al. (2001), observaram a redução da frequência de transformação de 2-4 vezes quando AgNO_3 era usado no meio de infecção, mas a frequência de transformação estável aumentou 1,7 vezes com $0,85 \text{ mg.L}^{-1}$ AgNO_3 usado no meio de co-cultivo.

Isto ressalta a complexidade dos fatores envolvidos no processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. Assim, as condições relacionadas a estirpes, crescimento da agrobactéria, genótipos, explantes e meios de cultura devem estar bem ajustadas.

2.5.7.2 Período de descanso

Após o co-cultivo os explantes são transferidos para meio de descando sem agentes seletivos, mas que contém antibióticos para eliminar a agrobactéria. Ishida et al. (2007) colocam a etapa de descanso como um passo necessário. Possivelmente para a recuperação das células vegetais dos explantes que sofreram com a infecção da *Agrobacterium tumefaciens*. Este período varia de 4 a 8 dias (ZHAO et al., 2001; VEGA et al., 2008).

Nesta etapa a eliminação da agrobactéria deve ser realizada de forma eficiente. Geralmente se utiliza a carbenicilina ou a cefotaxima para este fim (HEI et al., 1994; LUPOTTO et al., 1998; ZHAO et al., 2001; SAIRAM et al., 2003, DANILOVA & DOLGIKH, 2004).

Entretanto, o antibiótico cefotaxima (250 mg.L⁻¹) (ISHIDA et al., 1996), apresentou efeitos nocivos em calos de Hi-II. Experimentos realizados comparando o efeito dos antibióticos carbenicilina e cefotaxima mostraram que a frequência média de transformação, quando se utiliza 100 mg.L⁻¹ de carbenicilina, foi cerca de 3 vezes maior que com 250 mg.L⁻¹ de cefotaxima (ZHAO et al., 2001). Lupotto et al. (1998) visando combater os efeitos nocivos da cefotaxima nos calos embriogênicos (como necrose e dificuldade de

retomada de crescimento do calo), obtiveram sucesso na substituição da cefotaxima pelo antibiótico timentin combinado com outros parâmetros como o uso de antioxidantes no meio de cultura.

2.5.7.3 Período de seleção

Os tecidos submetidos à transformação devem passar por um processo de seleção que permita que somente as células transformadas se multipliquem e dêem origem a plantas modificadas geneticamente. Para plantas liliopsidas geralmente tem-se utilizado o gene *bar* como marcador e o herbicida fosfinotricina (ppt) e glufosinato de amônio (Bialaphos, Basta) como agentes seletivos (FRAME et al., 2002 e 2006, LEE et al., 2007, VEGA et al., 2008).

É relativamente fácil conseguir condições para boa expressão para o gene repórter *gus*. Entretanto, calos resistentes a herbicidas é um evento mais raro. No experimento de Ishida et al. (1996), a maior parte dos calos expressaram *gus* após o co-cultivo, mas poucos calos eram resistentes ao herbicida fosfinotricina (ppt).

Frame et al. (2002) utilizaram 3 mg.L^{-1} de bialaphos para a seleção de calos resistentes, ou seja, contendo o gene de resistência a herbicida. Já Frame et al. (2006) utilizaram 3 mg.L^{-1} e, em seguida, a 5 mg.L^{-1} de bialaphos em intervalos de 2 semanas e aqueles que continuaram a multiplicar-se no meio com 5 mg.L^{-1} de bialaphos foram considerados transformados com o gene *bar*. Vega et al., (2008) utilizaram uma dose menor $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ por 2 semanas para a seleção inicial. A seleção com bialafos também foi utilizada por Lee et al.

(2007) nas concentrações de 2,5 mg.L⁻¹ e após com 5 mg.L⁻¹ até que os calos resistentes atingissem a maturação.

2.5.8 Genes repórteres e marcadores

Durante o processo de otimização da transformação genética, são utilizados vetores que, além do “gene de interesse”, tenham um gene marcador de seleção e um gene repórter. Genes reporteres 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).

Genes utilizados como reporters são os genes *lucA* da luciferase II (detectado com luminômetro), o gene *cat* da cloranfenicol acetinase (detectados com radioisótopos) e o gene *gfp* (green fluorescence protein) que foi isolado de *Aequorea victoria* e expressa uma proteína na cor verde fluorescente quando em contato com luz ultra violeta. Este ultimo permite uma análise não destrutiva, podendo ser visualizada em células vivas (BRASILEIRO & DUCI, 1999). No entanto, o mais amplamente usado é o gene *gus* que foi isolado de *Escherichia 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-glucoronidase 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 *gus* pode ser detectada horas após o episódio de transformação sendo útil desta forma na determinação da frequência de transformação transitória.

O gene *gus* tem sido amplamente utilizado para monitorar experimentos de transformação em milho via agrobactéria sendo explorada a interação direta ente *Agrobacterium tumefaciens* e células de milho usando o gene da β -glucoronidase que contém um íntron que representa a marcação de células transformadas se expressando em plantas. A introdução deste gene repórter se mostrou dependente do genótipo de milho utilizado com receptor e requer genes com virulência ativa das estirpes de *A. tumefaciens* usadas como receptoras dos genes (SHEN et al., 1993).

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 gene marcador *bar* (DEBLOCK et al., 1987) clonado de *Streptomyces hygroscopicus*, codifica para a fosfinotricina acetiltransferase (PAT) que confere resistência ao herbicida PPT (fosfinotricina) (BRASILEIRO & DUCI, 1999), auxilia na seleção de calos transgênicos, pois somente os mesmos sobrevivem quando cultivados em meio de cultura contendo o herbicida glufosinato de

amônio (agente ativo fosfinotricina). 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). Com este gene pode-se obter frequência de transformação estável e é mais eficiente na regeneração de plantas onde plantas possivelmente transgênicas são testadas com a aplicação do herbicida nas suas folhas. Outro gene utilizado como marcador é o gene *nptII* (Neomicin fosfotransferase II) que confere resistência ao antibiótico canamicina e neomicina.

Para comprovar a presença do gene de interesse nas plantas regeneradas de um experimento de transformação é necessário utilizar testes moleculares como o “PCR” que amplifica o DNA inserido ou o “Southern blot” que utiliza uma sonda marcada para hibridizar com o gene transferido. A expressão do gene ao nível de proteínas pode ser detectada pelo teste de Western blot, o qual utiliza um anticorpo marcado específico que reconhece a proteína transgênica (GRANDO, 2001).

2.6 Utilização da cultura de tecidos como ferramenta para obtenção de plantas transgênicas

A produção de transgênicos depende da integração do gene exógeno na célula alvo e da eficiência com que plantas são regeneradas a partir destas células (ARMSTRONG, 1999). A capacidade de regenerar plantas transgênicas de milho está correlacionada com a habilidade de formação de calos embriogênicos.

Entretanto, nem todos os calos embriogênicos regeneram plântulas (HUANG & WEI, 2004).

Nos experimentos de transferência de genes em liliopsidas, calos embriogênicos têm sido frequentemente utilizados como tecido alvo na biobalística. Plantas transgênicas de milho (GORDON-KAMM et al., 1990; GENOVESI et al., 1992; WALTERS et al., 1992; SONGSTAD et al., 1992; WAN et al., 1995; GRANDO, 2001), trigo (VASIL et al., 1992; CHO et al., 1999), cevada (WAN & LEMAUX, 1994), arroz (SIVAMANI et al., 1996), cana-de-açúcar (BOWER & BIRCH, 1992; GALLO-MEAGHER & LRVINE, 1996) e pensacola (SMITH et al., 2001) têm sido obtidas a partir do bombardeamento de calos embriogênicos com partículas de metais revestidas com DNA.

Nos experimentos de transformação genética em milho via *Agrobacterium tumefaciens*, embora o tecido alvo mais utilizado seja células de embrião imaturo, a regeneração de plantas se dá a partir de embriogênese somática indireta, ou seja, pela indução de calos embriogênicos (ISHIDA et al., 1996; LUPOTTO et al., 1998, ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; CONTI et al., 2003; SHOU et al., 2004, HUANG & WEI, 2005; FRAME et al., 2006; ISHIDA et al., 2007; LEE et al., 2007; VEGA et al., 2008).

O sucesso na obtenção de calos embriogênicos em milho é fortemente determinado pelo genótipo, qualidade da planta fornecedora do explante, estágio de desenvolvimento do explante e composição do meio de cultura. Estes fatores contribuem para a maior ou menor eficiência apresentada no estabelecimento de protocolos de cultivo *in vitro* (Luhrs & Lorz, Maes et al., Dahleen, Dahleen &

Bregitzer apud SHARMA et al., 2005). Santos-Serejo & Aguiar-Perecin (2000) discutem o efeito genotípico em genótipos de milho adaptados a regiões tropicais e subtropicais na capacidade para produção de calos embriogênicos. Grandó et al., (2002) e Varnier (2004) relataram o efeito genotípico em linhagens, variedades e híbridos de genótipos brasileiros de milho na resposta ao cultivo *in vitro*.

A habilidade de controlar a morfogênese *in vitro* é muito importante para tornar eficientes os métodos de transformação genética de plantas (Phillips apud LOZOVAYA et al., 2006).

2.6.1 Cultura de tecidos

É um processo no qual explantes (pequenos fragmentos de tecido vegetal vivo), são retirados de plantas e cultivados em um meio nutritivo, em condições assépticas. Explantes podem ter o tamanho de células individuais ou protoplastos, de onde se originam calos que, pelo uso de certos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultivo, podem se diferenciar em raízes, brotos, e enfim produzir uma planta inteira *in vitro* (SERAFINI et al., 2001).

A cultura de tecidos se baseia no princípio da totipotencialidade, onde uma célula mesmo diferenciada é capaz de dar origem a uma planta inteira. Segundo Santos (2003) todas as células vegetais são totipotentes. A escolha do explante é realizada de acordo com o grau de competência e com os objetivos a serem alcançados.

2.6.2 Cultura de tecidos em liliopsidas e milho

Por um longo tempo, plantas liliopsidas foram consideradas recalcitrantes para as manipulações *in vitro*. No entanto, o uso de tecidos meristemáticos e embriogênicos para iniciar o cultivo permitiu o desenvolvimento das manipulações *in vitro* para gramíneas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Atualmente, embriões zigóticos imaturos são a fonte de explantes de maior confiança para estabelecer culturas de calos competentes para a regeneração, suspensões de células ou protoplastos para a transformação genética de milho. Entretanto, estas técnicas são trabalhosas, consomem tempo, são restritas a um número limitado de genótipos e requerem geralmente o crescimento de planta até maturação e cruzamentos contínuos entre linhagens puras para obtenção de híbridos para fornecer uma fonte contínua de embriões zigóticos imaturos (ARMSTRONG 1999; HANSEN & WRIGHT 1990; BILANG et al., 1999; AHMADABADI et al., 2006).

A regeneração de plantas através da cultura de tecidos é possível graças aos dois processos morfogenéticos: a organogênese e a embriogênese. Na cultura do milho não é diferente, havendo várias referências de regeneração em milho via embriogênese somática (LU et al., 1982; NOVAK et al., 1983; VASIL et al., 1984; VASIL & VASIL, 1984; TOMES & SMITH, 1985; ARMSTRONG & GREEN, 1985; ARMSTRONG et al., 1994; DUNCAN et al., 2003; AHMADABADI et al., 2006). A regeneração de plantas via embriogênese somática foi confirmada microscopicamente por Vasil et al., McCain et al., Everett et al. apud Duncan et al. (2003).

A morfogênese pode ocorrer de forma direta ou indireta. O primeiro caso ocorre quando o explante já possui células meristemáticas (organogênese direta) ou embriogênicas (embriogênese direta). Já quando há necessidade de desdiferenciação do explante, com a formação de calo prévia ao estabelecimento das células competentes, ocorrerá organogênese ou embriogênese indireta com a formação de calos (PERES, 2002).

O calo embriogênico é uma massa celular que apresenta coloração opaca, branco para amarelo claro, e estruturas globulares representando embriões somáticos, que aparecem na superfície do calo após, aproximadamente, 2 semanas de cultivo (VASIL et al., 1984).

Como a organogênese normalmente envolve a regeneração de gemas a partir de grupos de células meristemáticas, existem 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 e brotos (PERES, 2002).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), na embriogênese a planta é regenerada a partir de embriões somáticos formados no tecido cultivado e, também, pode ocorrer de duas maneiras: direta e indireta. Na forma direta os embriões somáticos se formam na superfície do explantes sem passar pela fase de calo, já na indireta os embriões somáticos se formam na superfície do calo, na massa celular

desordenada.

Estudos citológicos mostraram que a embriogênese é a rota mais comum para regeneração de plantas em lilipsidas (VASIL et al, 1985).

A capacidade de uma cultura regenerar eficientemente plantas normais pode ser relacionada com a similaridade entre processo de regeneração e o processo de embriogênese somática. A potencialidade de formar plantas normais podem articular-se com a habilidade da manipulação e com condições de cultivo, de modo que regeneração da planta imita o embriogênese somática normal (DUNCAN et al., 2003).

O sucesso dos protocolos de regeneração está sujeito a limitações associadas ao genótipo, a variação somaclonal, a dificuldades na totipotência, baixas frequências da indução de calos e de regeneração da planta (VASIL et al., 1985; VASIL & VASIL, 1987; LU et al., 1983; TOMES & SMITH, 1985), limitando a produção eficiente de transgênicos de modo geral (SAIRAM et al., 2003).

O meio nutritivo mais amplamente usado para indução e manutenção de calos embriogênicos em gramíneas é o meio básico MS desenvolvido por Murashige & Skoog (1962) (VASIL & VASIL, 1984). Em pensacola (*Paspalum notatum* Fluegge), este meio induziu duas vezes mais calos embriogênicos quando o comparado o meio básico de Schenk & Hildebrandt (SH) (1972) (GRANDO et al., 2002).

Carlos Miller & Skoog, em 1957 demonstraram que a formação de dois órgãos *in vitro*, caules e raízes, era controlada pelas concentrações relativas entre auxina e citocinina (PERES, 2002). Segundo Skoog & Miller apud Peres (2002), meios de cultura

contendo um balanço auxina/citocinina favorável à auxina promoveram a formação de raízes em calo em tabaco (*Nicotiana tabacum*). De modo inverso, balanços hormonais favoráveis à citocinina formaram gemas caulinares e, finalmente, balanços hormonais intermediários não levaram a uma diferenciação das células e sim a uma maior multiplicação delas e conseqüente crescimento do calo.

O herbicida sintético 2,4 ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) é a auxina mais utilizada na indução e manutenção de calos embriogênicos, onde as concentrações utilizadas variam 0.5 a 5.0 mgL⁻¹ (VASIL & VASIL, 1984). Geralmente a citocinina não é requerida para indução de calos na maioria das gramíneas, mas pode ser utilizada em combinação com 2,4-D para elevar a frequência de calos embriogênicos em algumas espécies (VASIL & VASIL, 1984; BASKARAN & SMITH, 1990). O uso combinado de BA (6 Benziladenina) e auxina resultou num aumento de 20 vezes na frequência de calos embriogênicos obtidos de sementes maduras de pensacola (GRANDO et al., 2002).

Em milho, o estabelecimento de grande quantidade de calos embriogênicos do tipo friáveis (tipo II) a partir de segmentos de pendão imaturo foi primeiramente demonstrado por Songstad et al. (1992), utilizando o híbrido Hi-II e seus parentais (A188 e B73), num sistema de cultivo baseado no meio N6, suplementado com 1mg L⁻¹ de 2,4-D, 25 mM de L- prolina, 10 µM de AgNO₃ e 0,2% de Phytigel. O uso de L-prolina, AgNO₃ e Phytigel elevaram significativamente a produção de calos tipo II a partir de pendão imaturo, como anteriormente observado a partir de embrião imaturo. Esforços

anteriores para indução de calos de segmentos de pendão imaturo cultivados em meio de cultura baseado no meio básico MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), utilizando genótipos de mesma origem, resultou quase que exclusivamente na formação de calos embriogênicos compactos (PAREDDY & PETROLINO, 1990; RODGESC et al., 1986). No entanto, nos experimentos conduzidos por Songstad et al. (1992), não foi observada diferença estatística entre os meios básicos MS e N6, mas o N6 foi selecionado por promover uma resposta maior na formação de calos tipo friáveis.

2.6.3 Explante para iniciar culturas embriogênicas

Para iniciar a cultura de tecidos, a primeira etapa é a indução de calo primário a partir do explante. Porém, nem todas as células em um explante contribuem para a formação do calo e, mais importante, somente certos tipos de células são competentes para regenerar estruturas organizadas (SMITH, 2000).

O milho pode ser regenerado na cultura de tecido e ser transformado usando uma variedade de tecidos. Os estudos precedentes determinaram que células e tecidos imaturos são os melhores tipos de explantes para a regeneração da planta, especialmente em culturas recalcitrantes como liliopsidas (SHARMA et al., 2005).

Podem ser usados como explantes anteras, micrósporos, ápices de plântulas, suspensão de células, glumas (SUPRASANNA et al., 1986), sementes maduras (CHO et al., 2004), embriões maduros e base da folha (VASIL & VASIL, 1984; SAIRAM et al., 2003), folhas

novas (AHMADABADI et al., 2006) segmentos de plântula, embriões imaturos, inflorescências jovens, meristema apical (VARNIER, 2004).

Embriões imaturos e inflorescências jovens são amplamente utilizados para iniciar culturas embriogênicas capazes de regenerar plantas em cereais como o milho (GREEN & PHILLIPS, 1975; ARMSTRONG & GREEN, 1985; SONGSTAD et al., 1992, VARNIER, 2004; GRANDO et al., 20005), trigo (OZIAS-AKINS & VASII, 1982; HE et al., 1990; BARAKAT & ADBEL-LATIF, 1995), aveia (RINES & MCCOY, 1981; GRANDO et al., 1993), cevada (BREGITZER, 1992; BREIMAN, 1995; RITALA et al., 1995) e arroz (ABE & FUTSUHARA, 1986; WANG et al., 1987; AYERS & PARK, 1994).

O embrião imaturo é o explante mais utilizado para produção de calos embriogênicos de milho (GREEN & PHILLIPS, 1975; ARMSTRONG & GREEN, 1985; SONGSTAD et al., 1991), pois calos derivados de embrião imaturo são mais eficientes para a regeneração da planta do que os calos de outros explantes (HUANG & WEI, 2004).

No entanto, o pendão imaturo é mais fácil e rapidamente obtido, pois não há necessidade da polinização, fertilização e desenvolvimento do embrião. Em segmentos de inflorescência cultivados, calos embriogênicos são formados principalmente pela proliferação do primórdio floral jovem, sendo que a quantidade e qualidade dos calos estão na dependência do genótipo, da idade da inflorescência utilizada bem como da concentração de 2,4-D (2,4 ácido diclorofenoxiacético) no meio de cultura (BOTTE & VASIL, 1984).

O tamanho inicial do pendão imaturo utilizado influencia a formação de calos embriogênicos. Pendões de 1-3 cm de comprimento produziram maior frequência deste tipo de calo enquanto pendão maior que 4 cm mostrou uma habilidade decrescente para produzir calo tipo II (SONGSTAD et al., 1992). Este declínio na iniciação da embriogênese é, provavelmente, devido às mudanças fisiológicas dentro do explante durante o curso do seu desenvolvimento. No Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF foram conduzidos experimentos testando pendões imaturos de 1 a 6 cm de comprimento, e os melhores resultados foram obtidos de pendões de 1-2 cm (VARNIER, 2004; VARNIER et al., 2004)

Outro explante já utilizado foi o meristema apical isolado de sementes maduras germinadas *in vitro* em gramíneas como cevada, sorgo, trigo e aveia (BHASKARAN & SMITH, 1990). No milho, este tipo de explante se mostrou eficiente para produção de calos embriogênicos e de brotações por organogênese e foram utilizados para a transformação genética via sistema *Agrobacterium tumefaciens* (ZHONG et al., 1992; ZHONG et al., 1996; Zhang et al.; O'Connor-Sánchez et al.; Goldman et al. apud SAIRAM et al., 2003). No entanto para Souza et al. (2006), este explante não foi eficiente na formação de calos embriogênicos.

Segmentos basais de folha também podem ser utilizados na iniciação da cultura de tecidos. Alternativamente Ahmadabadi et al. (2006), propuseram a utilização do explante folha jovem obtido de sementes germinadas *in vitro* e de plantas com 6 a 7 semanas de idade e desenvolveram um sistema de cultivo adequado para este explantes obtendo 65% de calos tipo I. Baseado nesta informação seria

interessante avaliar o potencial deste explante em genótipos adaptados a região sul do Brasil.

2.6.4 Calos embriogênicos do tipo I e II

Mais de um tipo de calo é produzido quando tecidos de plantas liliopsidas são cultivados *in vitro*. O calo não embriogênico é feito de tecido translúcido (aquoso), granular e macio, composto por células alongadas e vacuoladas não capazes de regenerar plantas (WELTER et al., 1995).

Os calos de milho regeneráveis são classificados geralmente como tipo I e o tipo II de acordo com seu grau de diferenciação, morfologia, friabilidade e modalidade da regeneração (Armstrong apud LOZOVAYA et al., 2006)

O calo tipo I é altamente indiferenciado, não friável e capaz de regenerar plantas através do organogênese e do embriogênese samática (LOZOVAYA et al., 2006). São embriogênicos, compactos, nodulares, de cor branco-amarelados e podem se proliferar em uma mistura de tecidos complexos exibindo embriões somáticos, brotos e estruturas similar ao escutelo, devendo ser subcultivados com auxílio de um bisturi (GREEN & PHILLIPS, 1975). Este calo é caracterizado pelo crescimento lento ou pela inabilidade de serem cultivados por longo período de tempo, podendo ocorrer germinação precoce dos seus embriões somáticos (OZIAS-AKINS & VASIL, 1982; ARMSTRONG & GREEN, 1985). A maioria das publicações referentes à indução de calos embriogênicos de milho encontrados na literatura descrevem o aparecimento exclusivamente deste tipo de

calo, exemplo. Ishida et al. (2007) encontraram usualmente calo tipo I nas linhagens de milho A188, A634, H99 e W117. Este tipo de calo tem sido obtido em genótipos brasileiros de milho (VARNIER, 2004; GRANDO et al., 2005).

Já o calo tipo II é altamente diferenciado, muito friável e regenerável (LOZOVAYA et al., 2006). Apresentam crescimento rápido, apresentando numerosos embriões no estágio globular que não se diferenciam no meio de manutenção de calos. Geralmente estes embriões estão dispostos sobre uma estrutura semelhante a um suspensor o qual se estende de uma base indiferenciada (WELTER et al., 1995). Regenera-se quase exclusivamente por embriogênese somática e ocorre em frequência menor quando comparado com calo tipo I (ARMSTRONG & GREEN, 1985; ARMSTRONG, 1994). Mantém uma alta taxa de atividade embriogênica por um tempo prolongado, podendo ser mantido por um ano em subcultivo sem perder sua capacidade de regeneração de plantas. Devido a estes aspectos, estes calos são empregados em muitas manipulações e assim apropriados para serem utilizados como alvos para a biobalística (ARMSTRONG, 1994).

Em plantas de milho, a regeneração a partir de cultura *in vitro* foi relatada primeiramente por Green & Phillips (1975) e um melhoramento progressivo tem sido feito nos sistemas de cultivo, apropriando seu uso nos estudos de manipulação genética. A indução de calos embriogênicos do tipo I a partir de embriões imaturos e regeneração de plantas de milho tem sido relatada por vários autores (LU et al., 1982; NOVAK et al., 1983; DUNCAN et al., 1985; TOMES & SMITH, 1985; VASIL et al., 1985; HODGES et al., 1985;

1986; ISHIDA et al., 1996; SAIRAM et al., 2003; SILVA et al., 2003; DANILOVA & DOLGIKH, 2004; GRANDO et al., 2004; VARNIER, 2004; GRANDO et al., 2005; FRAME et al., 2006; LEE et al., 2007; ISHIDA et al., 2007).

A produção de calos embriogênicos a partir de pendão imaturo foi relatada em milho por Songstad et al. (1992), Pareddy & Petrolino (1990) e Varnier (2004).

Protocolos de indução de calos tipo II a partir de embriões imaturos para os genótipos A118, B73 e seus híbridos foram desenvolvidos utilizando meio básico N6 (CHU et al., 1975), modificado por Armstrong & Green (1985), com adicionais modificações realizadas por Songstad et al. (1991). O uso do meio básico N6, L-prolina, caseína hidrolisada, baixa concentração de 2,4-D (ARMSTRONG & GREEN, 1985), adição de AgNO_3 ao meio de indução de calos, a substituição do ágar pelo phytigel como agente solidificante, bem como o subcultivo frequente das culturas (Songstad et al., 1991), foram modificações no protocolo que causaram grande impacto na frequência da indução de calo tipo II. O meio básico N6 também tem se mostrado superior na indução de calos tipo II quando comparado ao meio básico MS (ARMSTRONG & GREEN, 1985; KAMO et al., 1985, KAMO & HODGES, 1986). Isso pode ser devido a menor taxa de nitrogênio inorgânico contido no meio N6. O genótipo também se mostrou um fator limitante na indução de calos tipo II a partir de pendão imaturo. Songstad et al. (1992) estudou diferentes genótipos A188, B73 (linhas homozigotas) e seus híbridos A188 X B73(Hi-II), e B73 X A188 somente o último genótipo demonstrou uma resposta eficiente (SONGSTAD et al., 1992). Os

genótipos pré-selecionados pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo produziram somente calos do tipo I.

2.6.5 Bases genéticas e fisiológicas da regeneração

Os mecanismos envolvidos na aquisição de competência para regeneração não foram totalmente elucidados, mas a biotecnologia vegetal tem como apoio para estudos a fisiologia e genética vegetal, abordando mais especificamente o desenvolvimento, que refere-se ao crescimento integrado das várias partes de um organismo pluricelular envolvendo através dos processos de divisão, expansão e diferenciação celular e a consequente formação de tecidos, órgãos e sistemas (PERES, 2002).

Para este autor, a princípio, a formação de embriões a partir de tecidos somáticos *in vitro* imita a embriogênese zigótica, que ocorre nos órgãos reprodutivos das plantas. Desse modo, tanto a embriogênese somática quanto a zigótica culminam na formação de uma planta inteira a partir de uma única célula.

Segundo o mesmo autor, a regeneração de plantas *in vitro* consiste em tentar reproduzir as etapas de embriogênese e organogênese sob condições artificiais. Apesar de as descobertas feitas até a década de 30, principalmente no campo da nutrição mineral, terem possibilitado o crescimento de órgãos isolados *in vitro*, a indução deles em condições artificiais só foi possível a partir de um conhecimento mais aprofundado acerca da natureza dos hormônios vegetais.

Tendo em vista o estabelecimento de técnicas para transformação genética de milho via *Agrobacterium tumefaciens* o presente trabalho buscou testar explantes alternativos, meios de cultura e diferentes genótipos na indução de embriogênese somática, bem como produção de um híbrido com boa resposta *in vitro* e testar diferentes explantes e genótipos na capacidade de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*.

CAPITULO I

AVALIAÇÃO DE EXPLANTES FOLIARES DE MILHO PARA INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA VISANDO A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

Marilia Rodrigues de Silva¹, Magali Ferrari Grando², Thomás Paulo Kazmirski³, Marilei Suzin⁴

RESUMO

Em milho (*Zea mays* L.) a engenharia genética representa uma estratégia útil na obtenção de genótipos melhorados, sendo que para isso a cultura de tecidos é um pré-requisito. A indução de embriogênese somática em milho é uma característica altamente dependente do genótipo e das condições de cultivo *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar explantes, meios de cultura e genótipos pré-selecionados de milho, visando acelerar a indução de embriogênese somática. O experimento foi desenvolvido no Laboratório de

¹ Engenheira Agrônoma, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

² Orientadora, Bióloga, Ph.D. em Agronomia com ênfase em Biologia Molecular de Plantas, Professora do Curso de Agronomia (FAMV), Ciências Biológicas (ICB), PPGagro, FAMV/UPF.

³ Acadêmico do Curso de Agronomia da FAMV/UPF.

⁴ Engenheira Agrônoma, Ms.C. Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF.

Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF, Passo Fundo-RS. Foram utilizados quatro genótipos selecionados (HS1, HS2, L20 e V4); três explantes (segmentos de pendão imaturo, segmentos de folhas basais de plântulas obtidas *in vitro* e de folha de plantas com 6-7 semanas), e três diferentes meios de indução de calos baseados no meio N6 modificado por Songstad et al. (1992), com variações na concentração de 2,4-D, AgNO₃ e espermidina. As variáveis analisadas foram: frequência de calos embriogênicos aos 42 e 84 dias de cultivo, massa fresca de calos embriogênicos aos 42 e 84 dias de cultivo e taxa de crescimento de calos embriogênicos dos 42 aos 63 dias de cultivo. O delineamento experimental foi o DCC com 5 repetições, sendo a unidade experimental uma placa de petri com 10 explantes. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA, sendo as médias comparadas por Tukey a 5% e dados de massa fresca e taxa de crescimento comparadas por Duncan a 5%. Utilizando o pendão imaturo, foi possível obter calos embriogênicos de todos os genótipos testados não sendo verificado o efeito genotípico para esta característica. Os genótipos HS1, HS2 e V4 produziram calos embriogênicos somente a partir de pendão imaturo. O explante folha de planta jovem somente produziu calos embriogênicos no genótipo L20, não diferindo do pendão imaturo. Os meios M1 e M2 foram superiores ao M3, este último meio não foi eficaz na indução de calos embriogênicos de explantes foliares. Para massa fresca do genótipo L20, o explante folha no meio M2 induziu calos de maior massa fresca que o meio M1. Para pendão imaturo os meios não apresentaram diferenças. Os calos embriogênicos de pendão imaturo no meio M1 apresentaram maior massa fresca e taxa de crescimento

que os calos obtidos de folhas. No meio M2 não houve diferença entre folha de planta e pendão imaturo. Neste experimento foi possível inferir que segmentos foliares de milho apresentam baixo potencial de embriogênese somática, sendo que o pendão imaturo é o explante mais vantajoso para indução de calos embriogênicos somática nos genótipos de milho testados.

Palavras-chave: pendão imaturo, *Zea mays* L., calos embriogênicos, cultivo *in vitro*.

EVALUATION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCTION IN MAIZE LEAF EXPLANTS FOR GENETIC TRANSFORMATION

Marilia Rodrigues de Silva¹, Magali Ferrari Grando², Thomás Paulo Kazmirski³, Marilei Suzin⁴

ABSTRACT

In maize (*Zea mays* L.), the genetic engineering represents a useful strategy for plant breeding. Somatic embryogenesis is the morphological pathway which transgenic plants are regenerated *in vitro*. The somatic embryogenesis expression in maize is a genotype and *in vitro* cultivation conditions highly dependent trait. The objective of this experiment was to evaluate the *in vitro* response of explants, culture media and pre-selected maize genotypes to accelerate the production of embryogenic callus. The experiment was carried out at Plant Biotechnology Laboratory at FAMV/UPF, Passo Fundo-RS. It were evaluated four genotypes (HS1, HS2, L20 e V4); three explants (segments of immature tassel, basal leaves segments from *in vitro* seedlings and plant leaves with 6-7 weeks), and three different calli

¹ Agronomist, Master student in Agronomy Graduation Program, Major in Plant Production at Department of Agronomy and Veterinarian Medicine - University of Passo Fundo (UPF).

² Advisor, Biologist, Ph.D. in Agronomy, Faculty member of Department of Agronomy and Veterinarian Medicine and Agronomy Graduation Program - University of Passo Fundo (UPF).

³ Undergrad Student at Department of Agronomy and Veterinarian Medicine (UPF)

⁴ Agronomist, Ms.C. Plant Biotechnology Laboratory. University of Passo Fundo (UPF).

induction media (M1, M2 and M3) based on N6 medium (SONGSTAD et al., 1992), with variations in the concentration of 2,4-D, AgNO₃ and spermidine. The analyzed variables were embryogenic callus frequency and fresh weight at 42 and 84 days of cultivation, as well as the growth rate from 42 to 64 days of cultivation. The experiment design was the completely randomized, with five replications, the experimental unity was one petri dish with 10 tassel segments. The data were submitted to ANOVA and the average percentage compared by Tukey test at 5%, the data of fresh weight and growth rate compared by Duncan test at 5%. Using immature tassels, it was possible to obtain embryogenic callus from all tested genotypes, with no statistic difference among them. The young plant leaf explants only produced embryogenic callus in L20 genotype, not differing of the immature tassel. No callus were produced from basal leaves from *in vitro* seedlings. The M1 and M2 medium were superior to M3, this medium was not effective to the induction of embryogenic callus from leaf explants. For the L20 genotype, the leaf explant produced callus with higher fresh weight in the M2 than in the M1 medium. For immature tassel the culture media were not different. The embryogenic callus from immature tassel cultivated on M1 medium presented higher fresh weight and growth rate than he callus obtained from leaves. For the M2 medium, there was no difference between plant leaf and immature tassel. It was concluded that leaf segments of maize have lower potential for somatic embryogenesis, and that immature tassel is a more responding explant to callus embryogenic production in maize tested genotypes.

Keywords: immature tassel, *Zea mays* L., embryogenic callus, culture, *in vitro*.

1 INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais cultivados do mundo, sendo considerado a cultura de maior importância nos países industrializados e em muitos países em desenvolvimento (HUANG & WEI, 2005). O Brasil é o terceiro produtor mundial de milho (RANKINGBRASIL, 2007), produzindo 51,6 milhões de toneladas em 2008 (IBGE, 2008).

Em função do milho representar uma grande fonte de alimentação para homens e animais, o melhoramento genético desta cultura vem sendo amplamente estudado, sendo que as técnicas de biotecnologia e engenharia genética representam importante instrumento para este fim (HUANG & WEI, 2005).

Juntamente com o desenvolvimento dos métodos de transferência de genes, as técnicas de cultura de tecidos são críticas para a produção de plantas transgênicas, pois o gene deve ser introduzido em células totipotentes capazes de regenerar plantas completas. Portanto, um método eficiente para a propagação e regeneração de plantas *in vitro* é de grande importância para a obtenção de plantas geneticamente modificadas (AHMADABADI et al., 2006). No entanto, os cereais são as plantas mais difíceis de manipular *in vitro* (HANSEN & WRIGHT, 1990; GENOVESI et al., 1992; SONGSTAD et al., 1992; WALTERS et al., 1992; LUPOTTO et al., 1998; BILANG et al., 1999; GRANDO, 2001; ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; SHOU et al., 2004; GRANDO et al., 2005; VEGA et al., 2008), o que limita severamente as estratégias de melhoramento pela engenharia genética (AHMADABADI et al., 2006).

Estudos precedentes determinaram que células e tecidos imaturos, tecidos meristemáticos e embriogênicos são o melhores tipos de explantes para a regeneração da planta *in vitro*, especialmente em culturas recalcitrantes como as liliopsidas (SHARMA et al., 2005).

Para iniciar a cultura de tecidos de liliopsidas, a primeira etapa é a indução de calo primário a partir do explante, o qual é definido como o tecido utilizado para iniciar o cultivo *in vitro* (SERAFINI et al., 2001). Porém, nem todas as células em um explante contribuem para a formação do calo e, mais importante, somente certos tipos de células são competentes para regenerar estruturas organizadas (SMITH, 2000). O calo embriogênico é uma massa celular que apresenta coloração opaca, branco para amarelo claro, e estruturas globulares representando embriões somáticos, que aparecem na superfície do calo após, aproximadamente, 2 semanas de cultivo. Estes embriões somáticos apresentam a capacidade de germinar e dar origem a uma planta completa (VASIL et al., 1984).

Explantes tais como embriões imaturos e inflorescências jovens são amplamente utilizados para iniciar culturas embriogênicas capazes de regenerar plantas em cereais como o milho (GREEN & PHILLIPS, 1975; ARMSTRONG & GREEN, 1985; SONGSTAD et al., 1992; WALTERS et al., 1992; HUANG & WEI, 2005; GRANDO et al., 2005; ISHIDA et al., 2007; LEE et al., 2007); trigo (OZIAS-AKINS & VASIL, 1982; HE et al., 1990; BARAKAT & ADBEL-LATIF, 1995), aveia (RINES & MCCOY, 1981; GRANDO et al., 1993), cevada (BREGITZER, 1992; BREIMAN, 1995; RITALA et al., 1995) arroz (ABE & FUTSUHARA, 1986; WANG et al., 1987; AYERS & PARK, 1994).

Em milho, embrião zigótico imaturo é o explante mais utilizado para estabelecer a cultura de calos embriogênicos e para transformação genética (GREEN & PHILIPS, 1975; ARMSTRONG & GREEN, 1985; HANSEN & WRIGHT, 1990; SONGSTAD et al., 1991; ISHIDA et al. 1996; BILANG et al., 1999; LUPOTTO et al., 1998; ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; CONTI et al., 2003; HUANG & WEI, 2005; FRAME et al., 2006; ISHIDA et al., 2007; LEE et al. , 2007; VEGA et al., 2008), pois calos derivados de embrião imaturo são mais eficientes para a regeneração da planta do que os calos obtidos de outros explantes (HUANG & WEI, 2005). Para todos os cereais importantes, a maioria dos protocolos eficientes e reproduzíveis de regeneração de planta foram desenvolvidos baseado neste explante (Vasil, Repellin et al. apud SHARMA et al., 2005). Calos embriogênicos foram obtidos a partir de embriões imaturos (2 mm de comprimento) em genótipos brasileiros tropicais e subtropicais de milho (CARNEIRO et al., 2000), bem como em genótipos adaptados a clima temperado (VARNIER, 2004; VARNIER et al., 2004; SILVA et al., 2005; GRANDO et al., 2005), demonstrando a viabilidade de obtenção deste tipo de calo em genótipos variados.

Entretanto, a produção de embriões imaturos é um processo exigente que demanda tempo e atividades laboriosas, como plantio, polinizações e excisão do embrião imaturo, além da dependência do crescimento das plantas em casa de vegetação.

O uso explantes alternativos ao embrião imaturo visa acelerar o processo de obtenção de plantas *in vitro*. Em milho, o estabelecimento de grande quantidade de calos embriogênicos do tipo

II, a partir de segmentos de pendão imaturo, foi primeiramente demonstrado por Songstad et al. (1992), utilizando as Linhagens A188 e B73 e seus híbridos, num sistema de cultivo baseado no meio N6 suplementado com 2,4D, L-prolina e AgNO₃. O uso de L-prolina e AgNO₃ elevaram significativamente a produção de calos.

Segundo Vasil & Vasil (1984), primórdios das flores de inflorescências pré-meióticas jovens e não emergidas, são considerados excelentes explantes para iniciar culturas embriogênicas. Em segmentos de inflorescência cultivados, calos embriogênicos são formados principalmente pela proliferação do primórdio floral jovem (BOTTE & VASIL, 1984), sendo que a quantidade e qualidade dos calos estão na dependência do genótipo, da idade da inflorescência utilizada, bem como da concentração de 2,4-D no meio de cultura (BOTTE & VASIL, 1984).

O uso de pendão imaturo foi utilizado com sucesso na obtenção de calos embriogênicos e regeneração de plantas férteis de híbridos, linhagens e variedades brasileiras de milho (VARNIER et al., 2003; VARNIER, 2004; SILVA et al., 2003; 2004 e 2005; GRANDO et al., 2004 e 2005), embora tenha sido observado um forte efeito genotípico na resposta *in vitro* entre os genótipos testados. Varnier (2004) demonstrou ainda, que, para genótipos selecionados, os pendões imaturos apresentam potencial similar ao embrião imaturo, onde cerca de 20% dos explantes produziram calos embriogênicos com alta longevidade.

No entanto, para obtenção de pendões imaturos, ainda há necessidade do crescimento das plantas em casa de vegetação por cerca de 6 semanas, tempo necessário para a obtenção de pendões

imaturos de tamanho ideal para o cultivo *in vitro*.

Outro explante alternativo testado para cultivo *in vitro* de milho foi o meristema apical (ZHONG et al., 1992; 1996). Porém, este explante apresenta um número reduzido de células e também foi pouco eficiente para genótipos brasileiros testados (SOUZA et al., 2006).

Segmentos basais de folhas também podem ser utilizados para iniciar culturas embriogênicas em milho. Este explante foi testado inicialmente por Conger et al. (1987) e Ray & Ghosh (1990), mas a eficiência na produção de calos embriogênicos foi muito baixa. Recentemente um grupo de pesquisadores alemães, Ahmadabadi et al. (2006), desenvolveram um sistema de indução de calos embriogênicos, regeneração e transformação genética de milho a partir do cultivo de folhas obtidas de sementes maduras germinadas *in vitro*, obtendo 65% de calos tipo I no híbrido Pa91 X H99, quando explantes foram cultivados em meio básico N6 (CHU et al., 1975) suplementados com 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D, espermidina e alta concentração de nitrato de prata.

Explante foliar obtido de semente madura germinada *in vitro*, por ser rapidamente obtido, independente do crescimento em casa de vegetação e disponível o ano todo, o que reduziria a mão de obra e o tempo necessário para o estabelecimento de culturas embriogênicas e obtenção de plantas transformadas.

Além do explante, outros fatores influenciam para o estabelecimento de calos embriogênicos em milho, entre eles meio de cultura e genótipo (GREEN & PHILLIPS, 1975; GREEN, 1982; TOMES, 1985; BASKARAN & SMITH, 1990). O nível de

reguladores de crescimento na planta (auxina, citocinina, giberelina, etileno, etc.) é um dos fatores de maior importância no controle da formação do calo *in vitro*. Estes níveis podem variar de acordo com a espécie e podem depender da fonte do explante ou da planta matriz, bem como o transporte hormonal polar dentro do explante (SMITH, 2000).

Para a embriogênese induzida *in vitro*, as auxinas, entre elas o ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D), são consideradas as substâncias responsáveis por desencadear os processos de dediferenciação (embriogênese indireta) e rediferenciação (embriogênese direta), alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes (GUERRA et al., 1999).

O genótipo da planta doadora do explante exerce um efeito pronunciado na resposta *in vitro*. Em experimentos anteriores, realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF, foram testados 39 genótipos de milho proveniente de diferentes programas de melhoramento, utilizando o pendão imaturo como explante, resultando na seleção de seis materiais com capacidade de produção de calos embriogênicos de longa duração e capacidade de regeneração de plantas (VARNIER, 2004).

Portanto, as dificuldades relacionadas às condições de cultivo *in vitro* representam uma das maiores limitações para os laboratórios desenvolverem protocolos de transformação genética em milho. Neste sentido, o presente trabalho foi desenvolvido objetivando avaliar três explantes (folha de plântula germinada *in vitro*, folha jovem de planta com 6 a 7 semanas de idade e pendão imaturo), três meios de cultura (meio básico N6 com variações na concentração de

2,4-D, espermidina e nitrato de prata) e 4 genótipos pré-selecionados de milho (HS1, HS2, L20 e V4), visando acelerar o processo de indução de embriogênese somática, para uso futuro em experimentos de transformação genética.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, em Passo Fundo - RS, no período de março de 2007 a dezembro de 2008.

2.2 Material vegetal

Para avaliar o potencial de indução de calos embriogênicos a partir de diferentes explantes e sistemas de cultivo *in vitro*, foram utilizados 4 genótipos de milho selecionados em experimentos anteriores (VARNIER, 2004) por apresentarem bom desempenho *in vitro*. No quadro 1 estão listados os genótipos utilizados nos experimentos e seus programas de origem.

Quadro 1. Genótipos de milho selecionados e programas de melhoramento de origem. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008.

Genótipos	Programas de melhoramento de origem
HS1 (Híbrido PF963173 X PF963244)	Embrapa Trigo
HS2 (Híbrido PF 963027 X PF963244)	Embrapa Trigo
L20 (Linhagem MF14G4)	Universidade da Florida
V4 (Variedade comercial BR 451)	Embrapa Milho e Sorgo

Os genótipos HS1 e HS2 foram gentilmente cedidos pelo Dr. Henrique Pereira e Dr^a. Beatriz Marti Emydio da Embrapa Trigo, Passo Fundo-RS; e a linhagem L20 foi cedida pelo Dr. Brian Scully da Universidade de Florida, Gainesville-FL. A variedade V4 (BR451) foi gentilmente cedida pela Dr^a.Andreia Carneiro e Dr. Sidney Parentoni da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagos- MG.

2.3 Indução de calos embriogênicos a partir de diferentes sistemas

Foram avaliados diferentes meios de cultura para indução e manutenção de calos embriogênicos, bem como diferentes explantes obtidos de tecidos jovens com capacidade de expressão da totipotência.

2.3.1 Meios de indução de calos

Três meios de cultura foram avaliados para indução de calos, sendo o meio básico N6 desenvolvido por Chu et al. (1975), diferindo em alguns componentes, como apresentados no quadro 2.

Quadro 2. Meios de cultura para indução de calos embriogênicos de milho baseados no meio N6. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008.

Meios	Suplementos adicionados ao meio básico N6
M1	100 mg.L ⁻¹ de caseína hidrolisada, 2,88 g.L ⁻¹ de L-prolina, 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), 10µM de AgNO ₃ , 20 g.L ⁻¹ de sacarose, 2 g.L ⁻¹ Phytigel e 100 mg.L ⁻¹ de mio-inositol, 1 mg.L ⁻¹ de 2,4-D (Songstad et al., 1992).
M2	Idêntico ao meio M1, porém com 2 mg.L ⁻¹ de 2,4-D.
M3	100mg.L ⁻¹ de caseína hidrolisada, 2,88 g.L ⁻¹ de L-prolina, vitaminas Ericson, 800 mg.L ⁻¹ de AgNO ₃ , 20g.L ⁻¹ de sacarose, 2g Phytigel, 100 mg.L ⁻¹ de mio-inositol, 0,5 mM.L ⁻¹ de espermidina, 650 m g.L ⁻¹ do MgCl ₂ , 2 mg.L ⁻¹ de 2,4-D. Adaptado de Ahmadabadi et al. (2006).

O pH dos meios foi ajustado para 5,8 com KOH (hidróxido de potássio) antes da autoclavagem e o AgNO₃ foi esterilizado por filtragem e adicionado ao meio de cultura após a autoclavagem do mesmo a 121°C por 20 minutos. No caso do meio M3 a espermidina foi adicionada após autoclavagem.

2.3.2 Explantes para indução de calos

Para determinação da capacidade embriogênica foram utilizados três tipos de explantes: segmentos de folhas basais de plântulas de sementes germinadas *in vitro*; segmento de folhas de plantas jovens com 6-7 semanas de cultivo e o explante pendão

imaturu de 2-3 cm de comprimento (Figura 1). O pendão imaturu foi utilizado como controle por apresentar boa capacidade de indução de embriogênese somática em experimentos anteriores (Varnier, 2004).

a) Indução de calos embriogênicos a partir de pendão imaturu de milho

Os genótipos de milho doadores dos explantes foram cultivados em vasos mantidos no telado do Laboratório de Biotecnologia Vegetal. Foram coletas plantas com cerca de 6-7 semanas, para obtenção do pendão imaturu, conforme descrito por Songstad et al. (1992). Após a remoção das folhas externas foi realizada uma desinfecção rápida e superficial com álcool 70%, sendo que as folhas que cobrem o pendão imaturu foram removidas em câmara de fluxo laminar e pendões imaturos medindo 1-3 cm foram cortados em segmentos de 2-3 mm e inoculados em placas de petri, (100 x 15mm) contendo 25 ml de meio de indução de calo.

b) Indução de calos embriogênicos a partir de folhas basais de plantas jovens com 6-7 semanas de cultivo

Para indução de calos das folhas de plantas jovens, após a remoção do pendão imaturu, primeiramente foram descartadas de três a quatro folhas (as mais velhas). Posteriormente, uma seção de 10-20 cm da porção inferior da planta foi cortada, sendo as duas folhas mais velhas removidas sob condições estéreis. Então, as folhas de número 7, 8 e 9 foram separados das folhas restantes (mais novas) e

esterilizadas superficialmente com etanol 70% (20-30 segundos) e imediatamente lavadas com água esterilizada. As folhas foram segmentadas em pedaços de 2 X 2 mm. Os segmentos da folha foram colocados em placas de petri, contendo 25 ml de meio de indução de calo.

c) Indução de calos embriogênicos a partir de folhas basais de plântulas de milho germinadas *in vitro*

Sementes de genótipos de milho foram esterilizadas superficialmente e germinadas sob condições assépticas na metade da concentração dos sais do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) contendo 10 g.L⁻¹ de sacarose e solidificada com 2 g.L⁻¹ de Phytigel. Quando as plântulas apresentavam 5-10 cm de altura, os fragmentos foram excisados de 1-2 cm da parte do inferior da plântula. Depois da remoção do coleóptilo, os segmentos individuais da folha foram seccionados longitudinalmente com um estilete em duas a quatro tiras finas. Então as tiras foram cortadas em cortes transversais finos que geraram pedaços de folha de aproximadamente 2 X 2 mm, estes foram transferidos subsequentemente para placas de petri, contendo 25 ml de meio de indução de calo.



Figura1. Diferentes explantes de milho avaliados para verificação da capacidade de indução de embriogênese somática. a) planta com 6 semanas de cultivo no estágio de retirada do explante folha jovem e pendão imaturo; b) segmento do último nó da planta de milho de onde foram retirados os segmentos de folha de planta jovem e pendão imaturo; c) detalhe do pendão imaturo de 2-3 cm de comprimento; d) sementes germinadas *in vitro* em meio $\frac{1}{2}$ MS para obtenção do explante folha de plântula; e) plântula com 5 dias após a germinação (detalhe da região em que foram retirados os segmentos); f, g, h) placas contendo os explantes: segmentos de folha de plântula germinada *in vitro*, segmentos foliares de planta jovem e segmentos de pendão imaturo respectivamente; i) detalhe do explante segmento de folha (2X2mm) de plântula germinada *in vitro*; j) detalhe do explante segmento planta jovem (2X2mm) e l) detalhe do explante segmento de pendão imaturo (2mm) cultivados *in vitro*. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008.

2.3.3 Manutenção e seleção dos calos embriogênicos

As culturas foram mantidas no escuro a 28°C e aos 42 dias os calos embriogênicos foram identificados e selecionados com auxílio de lupa estereomicroscópica. Calos embriogênicos ou setores contendo calos embriogênicos foram pesados e transferidos para meio de manutenção o qual é similar aos meios de indução, diferindo apenas pela ausência de AgNO_3 e pelo aumento da concentração de 2,4-D para 2 mg.L^{-1} no meio M1 e M2 (ARMSTRONG et al., 1994). Os calos embriogênicos induzidos no meio M3 foram transferidos para meio de manutenção idêntico ao meio de indução diferindo pela ausência de espermidina e contendo somente 10 mg.L^{-1} de nitrato de prata (protocolo adaptado de Ahmadabadi et al. 2006).

As culturas foram subcultivadas a cada 21 dias para meio de manutenção fresco para multiplicação dos calos. Somente calos ou setores embriogênicos foram subcultivados. O aumento da massa dos calos foi registrado a cada duas semanas até os 84 dias de subcultivo para avaliar o crescimento dos mesmos.

As variáveis analisadas foram: frequência de calos embriogênicos aos 42 e 84 dias de subcultivo, massa fresca dos calos embriogênicos aos 42 e 84 dias de subcultivo e taxa de crescimento dos 42 aos 63 dias de subcultivo. A massa fresca foi determinada através de pesagem dos calos embriogênicos selecionados em placa de petri pré pesada em câmara de fluxo laminar durante a transferência para os meios de manutenção.

Foi adotada a metodologia de Conner & Meredith apud Yoshida & Yoshida (2002), para avaliar a taxa de crescimento dos calos embriogênicos. Para isto utilizou-se fórmula:

TC= (MFf – MFi) x 100 /MFi, onde:

TC= Taxa de crescimento de calos em massa fresca (%);

MFf= Massa fresca final de calos;

MFi= Massa fresca inicial de calos.

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado com 5 repetições para cada tratamento. A unidade experimental foi uma placa de petri contendo 10 segmentos dos diferentes explantes. Sendo que o experimento consistiu num fatorial com a utilização de 4 genótipos, 3 meios de indução de calos embriogênicos e 3 explantes.

Os dados relativos à porcentagem foram transformados por transformação angular segundo a fórmula ($\arcsin \sqrt{x/100}$) e dados relativos a massa fresca foram transformados por transformação logarítmica segundo a fórmula ($\log x$).

Para análise estatística foi utilizado a ANOVA, sendo a diferença das médias da porcentagem de embriogênicos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de massa fresca e taxa de crescimento foram comparados pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAS (Statistics Analysis System) (SAS INSTITUTE, 1998).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação entre explante x meio de cultura e explante x genótipo na produção de calos embriogênicos aos 42 e 84 dias de cultivo.

Os genótipos HS1, HS2 e V4 produziram calos embriogênicos somente a partir de pendão imaturo, o que indica a incapacidade dos explantes foliares destes genótipos responderem *in vitro* (Tabela 1). Para o explante pendão imaturo não houve diferença entre os genótipos na produção de calos embriogênicos, aos 42 e aos 84 dias de cultivo.

Tabela 1. Porcentagem de calos embriogênicos aos 42 e 84 dias de cultivo a partir de 3 explantes de milho. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008

Genótipo	Explantes					
	Pendão		Folha de planta jovem		Folha de plântula <i>in vitro</i>	
Porcentagem de calos embriogênicos aos 42 dias						
HS1	A	26,2 a	B	0 b	B	0 a
HS2	A	18 a	B	0 b	B	0 a
L20	AB	12,7 a	A	15,3 a	B	0 a
V4	A	15,8 a	B	0 b	B	0 a
Porcentagem de calos embriogênicos aos 84 dias						
HS1	A	27,2 a	B	0 a	B	0 a
HS2	A	8 a	A	0 a	A	0 a
L20	A	14,5 a	A	15,3 a	B	0 a
V4	A	14,4 a	B	0 a	B	0 a

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. CV 42 dias= 107,64%. CV 84 dias= 110,11%.

Nenhum calo embriogênico foi obtido a partir do cultivo de folhas de plântula obtida *in vitro* nos genótipos testados.

O explante folha de planta jovem somente foi eficiente na indução de embriogênese somática quando o genótipo L20 foi utilizado (15,3%), não diferindo da frequência de calos embriogênicos obtidos a partir do pendão imaturo aos 42 dias (12,7%) e 84 dias de cultivo (14,5%). Na figura 2 são mostrados aspectos dos calos embriogênicos obtidos dos explantes foliares e de pendão imaturo do genótipo L20.

Em cereais, notavelmente em milho, tem sido amplamente demonstrado que o genótipo desempenha um papel significativo na iniciação de culturas embriogênicas (GREEN & PHILLIPS, 1975; DUNCAN et al., 1985; TOMES & SMITH, 1985; HODGES, et al., 1986; PRIOLI & SILVA, 1989; CARVALHO et al., 1997; SILVA et al., 2003; VARNIER, 2004, GRANDO et al., 2004; GRANDO et al., 2005; GRANDO et al., 2006). A resposta diferencial entre os genótipos pode ser explicada pela presença de genes envolvidos na receptibilidade dos reguladores de crescimento (CLOSE & GALLAGHER-LUDEMAN, 1989), bem como com as variações nos níveis de hormônios endógenos do explante (Norstog apud BHASKARAN & SMITH, 1990). Além disso, Wernicke & Brettell (1982), relatam que diferentes explantes obtidos a partir de um único genótipo não respondem identicamente ao cultivo, provavelmente devido às variações de gradiente dos hormônios endógenos.

Jiménez & Bangerth (2001), visando à otimização de protocolos para produção de calos embriogênicos em milho com alta longevidade, avaliaram os níveis de hormônios endógenos do explante

embrião imaturo e nos calos gerados de diferentes genótipos de milho. Eles verificaram que apenas as diferenças nos níveis AIA (Ácido 4-Cl-3-indolacético) endógeno tiveram correlação com as variações nas propriedades morfogênicas dos calos, sendo que níveis endógenos mais altos de AIA eram típicas de calos embriogênicos. Eles também observaram que a perda da capacidade embriogênica dos calos devido a um período prolongado na cultura ocorre concomitantemente com uma redução nos níveis de AIA. O hormônio ABA (ácido abscísico) teve maiores níveis nos calos embriogênicos, já os níveis do hormônio GAs (ácido giberélico) foram menores em calos embriogênicos que em calos não embriogênicos. Ainda os menores níveis de Z/ZR (Z= zeatina e ZR= trans zeatina ribósido) foram encontrados nos calos embriogênicos.

Lozovaya et al. (2006) identificou as seguintes características de tecidos de milho com elevado potencial para regenerar plantas: altos níveis de asparagina, asparatato e indol-3-butenol, menores níveis de açúcar e DIMBOA; baixos níveis de GABA e ácido clorogênico, comparado a tecidos não regeneráveis.

A resposta embriogênica dos genótipos estudados no presente trabalho se manteve até os 84 dias ressaltando a longevidade dos calos obtidos.

Segundo Jiménez & Bangerth (2001) e Varnier (2004), é importante que os calos embriogênicos tenham longevidade, pois os mesmos, depois de submetidos a transformação genética devem passar pelo processo de seleção para obtenção de linhagens transgênicas antes de serem transferidos para o meio de regeneração de plantas. Surpreendentemente Piralov & Abraimova (1999) conseguiram a

regeneração de calos embriogênicos de milho após cinco anos da indução de calos.

Os meios de cultura M1 e M2 foram superiores na indução de calos embriogênicos para pendão imaturo aos 42 e 84 dias de subcultivo, comparado ao meio M3 (tabela 2). O meio M3 também não foi eficiente na indução de calos embriogênicos a partir de explantes foliares dos genótipos testados. Este meio foi desenvolvido por Ahmadabadi et al. (2006) para indução de calos embriogênicos a partir de explantes foliares.

Tabela 2. Porcentagem de calos embriogênicos aos 42 e 84 dias de cultivo em diferentes meios de cultura. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008

Meios	Explantes		
	Pendão imaturo	Folha de planta jovem	Folha de plântula <i>in vitro</i>
Porcentagem de calos embriogênicos aos 42 dias			
M1	A 26,9 a	B 2 a	B 0 a
M2	A 25,7 a	B 9,5 a	B 0 a
M3	A 2 b	A 0 a	B 0 a
Porcentagem de calos embriogênicos aos 84 dias			
M1	A 24,4 a	B 2 a	B 0 a
M2	A 20,2 a	AB 9,5 a	B 0 a
M3	A 4 b	A 0 a	A 0 a

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. CV 42 dias=107,64%. CV 84 dias=110,11%.

Todos os meios de cultura utilizados neste estudo tem como base o meio N6 suplementado com o regulador de crescimento 2,4-D, diversos estudos têm confirmado que a utilização do 2,4-D foi um fator crítico na indução de calos a partir de embriões imaturos de milho (ARMSTRONG & GREEN, 1985; BOHOROVA et al., 1995; CARVALHO et al., 1997, HUANG & WEI, 2005). Em embriões de milho da linhagem A118, foram testadas diferentes concentrações de 2,4-D variando de 0,002 a 2 mg.L⁻¹ e concentração ótima para a indução de calos embriogênicos foi 2 mg.L⁻¹ (BRONSEMA et al., 2001). Esta concentração foi usada no meio M2 e M3 no presente experimento. No entanto, o meio M3 contém ainda alta concentração de AgNO₃ (800 mg.L⁻¹ ou seja 4,71 mM) e 0.5 mM.L⁻¹ de espermidina. Os meios M1 e M2 apresentam 10µM de AgNO₃ e ausência de espermidina. A espermidina foi utilizada recentemente para indução de embriogênese somática em *Ocotea catharinensis* (DIAS et al., 2007).

O nitrato de prata (AgNO₃) é conhecido por ser um potente inibidor da ação de etileno endógeno dos explantes, que influencia a divisão celular e citodiferenciação (SONGSTAD et al., 1988). O efeito positivo de AgNO₃ foi observado em alguns genótipos de milho (VAIN et al. 1989; SONGSTAD et al. 1991) e trigo (FERNANDEZ et al. 1999). Carvalho et al. (1997) também relataram que a adição de AgNO₃ ao meio de indução aumentou significativamente a produção de calos embriogênicos de embriões imaturos de genótipos de milho tropicais quando utilizado na concentração de 88 µM.

No caso do meio M3 o nitrato de prata foi utilizado em alta concentração, o que pode ter tido um efeito prejudicial no processo de

indução de calos embriogênicos dos materiais testados. Concordando com os resultados de Huang & Wei (2005) que relataram que a concentração de 10 mg.L^{-1} de AgNO_3 aumentou significativamente embriogênese somática, porém concentrações maiores (20 mg.L^{-1}) inibiram fortemente a formação de calos embriogênicos, o que pode ter sido devido ao efeito prejudicial de íons Ag^+ nos calos.

Ao contrário dos dados obtidos neste experimento, Ahmadabadi et al. (2006), obtiveram sucesso na indução de calos embriogênicos de segmentos de folhas em um híbrido de milho (Pa91 X H99) utilizando o meio de indução de calos M3, sendo induzido calos em 65% dos explantes cultivados. Os calos obtidos mantiveram sua embriogenicidade e capacidade de regeneração por pelo menos um ano. Uma observação importante deste autor foi que a resposta embriogênica decresceu conforme o grau de diferenciação do tecido, sendo que a frequência de calos embriogênicos aumentou com a diminuição da idade da folha, folhas mais amareladas produziram calo tipo I com alta eficiência em 20-30% dos segmentos de folhas.

Os dados mostrados no presente experimento evidenciam claramente o efeito do explante na indução de calos embriogênicos de milho. Esta diferença na resposta reflete a existência de diferentes tipos de células e graus de diferenciação entre os mesmos.

Para Santos (2003), ao longo da vida ontogenética da célula, há uma canalização do desenvolvimento que leva a incapacidade progressiva de alterar a programação genética. Esta canalização se chama determinação celular, sendo que este conceito está diretamente associado ao de competência celular, que é a capacidade da célula responder a sinais químicos ou físicos específicos (luz, temperatura,

reguladores de crescimento, etc.) e assim seguir uma rota específica. Quanto maior o nível de determinação da célula menor será sua competência em responder a sinais externos, assim mais forte deverá ser o mensageiro químico para que esta célula tenha seu destino alterado (CHRISTIANSON & WARNICK, 1985; 1988).

Existem células na planta que se encontram num estado indiferenciado ou indeterminado, estas células tem grande plasticidade podendo seguir diferentes vias de desenvolvimento em resposta as condições ambientais impostas, sendo facilmente manipuláveis (tecidos meristemáticos e embrionários). A célula vegetal tem a capacidade de desdiferenciação, ou seja, a capacidade de regressar ao estado meristemático ocorrendo uma desprogramação fisiológica com reprogramação gênica (SANTOS, 2003). A rediferenciação de uma ou mais células pode em condições adequadas de cultura *in vitro* resultar na formação de uma planta completa. Este é o princípio da totipotência celular, ou seja, a capacidade que uma célula tem de regenerar um organismo completo e diferenciado do qual ela é derivada.

Tanto a aquisição de competência, quanto a determinação são reflexos da expressão diferencial de genes envolvidos nos processos de desenvolvimento (PERES, 2002). Isto se reflete também na idade do explante. Explantes mais velhos respondem menos *in vitro*, Varnier (2004) testou o efeito de diferentes tamanhos de pendões imaturos na indução de calos embriogênicos de milho (1 a 6 cm de comprimento), obtendo maior frequência de calos em pendões de 1-2 cm. Pendões acima de 4 cm não respondem *in vitro*.

Em aveia, o efeito da idade do explante foi observado em cinco cultivares, onde embriões imaturos de 2-3 mm produziram, em média, 20% de calos embriogênicos (BISPO et al., 2003), enquanto que embriões imaturos, dos mesmos genótipos, produziram cerca de 4,6% deste tipo de calos (SOUZA et al., 2002).

Este declínio na iniciação da embriogênese é, provavelmente, devido às mudanças fisiológicas dentro do explante durante o curso do seu desenvolvimento. Os resultados obtidos no presente experimento sugerem que os explantes foliares, por serem mais especializados e diferenciados, são mais determinados que os pendões imaturos e portanto menos competentes à resposta *in vitro*.

A tentativa do presente trabalho de identificar um explante rapidamente disponível como é o caso do explante foliar de plântulas germinadas *in vitro* não foi frutífera para os genótipos utilizados.

Da mesma forma, Souza et al. (2006) ao selecionarem explantes mais rapidamente disponível, testaram diferentes explantes (meristema apical obtido de sementes germinadas *in vitro*, sementes maduras de milho; segmentos de coleótilos obtidos de sementes germinadas *in vitro*, base do mesocótilo e mesocótilo, dos mesmos genótipos utilizados no presente estudo, porém nenhum superou o explante pendão imaturo.

Ao contrário dos resultados obtidos no presente experimento, Conger et al. (1987) visando a aceleração de tempo e melhor utilização de espaço, avaliaram segmentos foliares de milho quanto à indução de embriogênese somática e após 3 a 4 semanas já observaram a formação de calos, e indicaram que células de folhas de milho eram totipotentes e capazes de diferenciação em embriões.

Ahmadabadi et al. (2006) utilizaram com sucesso o explante folha jovem obtido de sementes germinadas *in vitro* e de plantas com 6 a 7 semanas de idade.

Em aveia, Lamb et al. (2001) utilizaram o explante base da folha na produção de calos embriogênicos que possibilitou reduzir o tempo de regeneração de plantas para 5 meses e regenerar genótipos considerados sem habilidade de regeneração de plantas. Flach et al. (2003) utilizaram o explante base da folha em aveia e obteve sucesso, sendo este explante considerado como ideal para aveia, pois é independente do genótipo, com alto potencial embriogênico e pode ser disponibilizado em todas as épocas do ano.

O genótipo L20 foi o único genótipo a produzir calos embriogênicos a partir de folhas, e sua frequência foi semelhante ao pendão imaturo do mesmo genótipo (Tabela 2). No entanto, observou-se um lento desenvolvimento dos calos obtidos de folha. Os calos eram pequenos com crescimento reduzido comparado com calos obtidos de pendão. Para quantificar o comportamento diferencial dos calos embriogênicos obtidos de folha e de pendão do genótipo L20 induzidos nos meios M1 e M2 foram realizadas avaliações de massa fresca do calo aos 42 dias e aos 84 dias de cultivo (Figura 2).

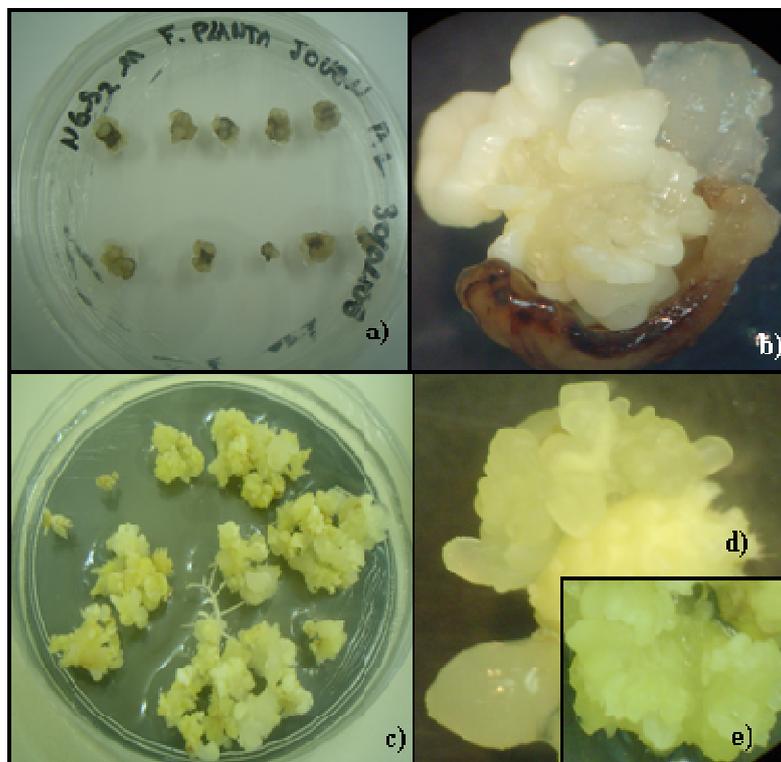


Figura 2. Calos embriogênicos obtidos de planta jovem e pendão imaturo do genótipo L20 aos 84 dias de cultivo. a, b) calos embriogênicos obtidos de planta jovem do genótipo L20 cultivados no meio M2, c,d,e) calos embriogênicos obtidos de pendão imaturo do genótipo L20 cultivados no meio M1. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008.

A interação entre meios de cultura e explantes foi significativa tanto na análise aos 42 dias como aos 84 dias de cultivo. Para o explante folha, o meio M2 induziu calos de maior massa fresca que o meio M1 tanto aos 42 dias como aos 84 dias. Já utilizando explante pendão imaturo os meios não apresentaram diferenças significativas (Tabela 3). Com base na massa fresca de calos analisamos a taxa de crescimento dos mesmos (Tabela 4).

Tabela 3. Massa fresca de calos embriogênicos obtidos de pendão imaturo e folha de planta jovem do genótipo L20 nos meios de indução de calos M1 e M2. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008

Meios de cultura	Explantes					
	Pendão imaturo			Folha de planta jovem		
Massa fresca calos embriogênicos 42 dias (mg)						
M1	A	2556	a	B	64	b
M2	A	833	a	A	387,4	a
Massa fresca calos embriogênicos 84 dias (mg)						
M1	A	14452	a	B	191,5	b
M2	A	2559	a	A	1286,8	a

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem pelo teste de Duncan a 5%. Cv 42 dias= 17,2%. CV 84 dias= 15,0%.

Os calos induzidos de pendão imaturo cultivados no meio M1 apresentaram maior massa fresca (2956 mg) que os calos obtidos de folhas (64 mg) aos 42 dias de cultivo neste meio (Tabela 3). Esta superioridade foi mantida aos 84 dias de cultivo, onde os calos de pendão apresentaram massa fresca média de 14452 mg e de folha 191,5 mg.

Em trabalhos com aveia, Bispo et al. (2003), avaliaram a massa fresca de calos embriogênicos obtidos de embriões imaturos de aveia de cinco cultivares, cultivadas em dois meios de cultura, verificando a interação entre cultivares e meios de cultura aos 60 dias de subcultivo, porém não foi observado efeitos de meios de cultura, cultivares e interação entre eles na avaliação dos 90 e 120 dias. Flach et al. (2003), utilizaram os mesmos genótipos de aveia de Bispo et al. 2003, porém com o explante meristema apical. Neste trabalho não foi verificada a influência dos meios de cultura na massa fresca dos calos embriogênicos na avaliação de 60 e 90 dias de cultivo.

A massa fresca é uma medida que indica a qualidade do calo embriogênico, bem como seu potencial de crescimento. A figura 3 mostra o aspecto dos calos embriogênicos produzidos a partir de pendão imaturo do genótipo L20 no meio M1.

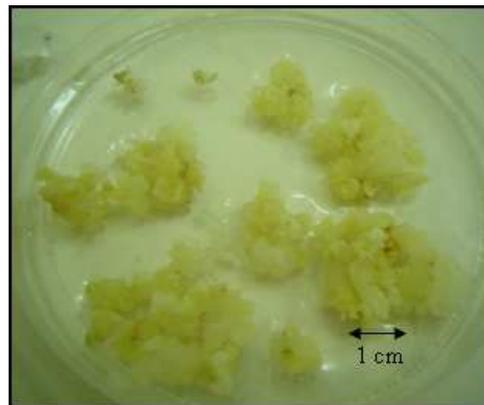


Figura 3. Placa de petri evidenciando o tamanho e qualidade dos calos embriogênicos obtidos de pendão imaturo do genótipo L20 cultivados no meio M1 aos 84 dias de cultivo. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008.

Com base na massa fresca de calos embriogênicos obtidos do genótipo L20 foi calculada a taxa de crescimento, expressa em porcentagem destes calos em um ciclo de subcultivo, dos 42-63 dias, de forma que também foi observada a mesma interação entre meio de cultura e explante observada para a variável massa fresca de calos embriogênicos. A medida da taxa de crescimento dos calos é útil uma vez que não leva em consideração a massa fresca inicial do calo e sim seu crescimento em termos de porcentagem.

Os calos embriogênicos obtidos de folha cresceram mais intensamente quando cultivados no meio M2 (587,7% de crescimento) comparados ao meio M1 (49,1%). Para calos embriogênicos obtidos

de pendão imaturo os meios de cultura não influenciaram no crescimento (Tabela 4).

A medida da taxa de crescimento dos calos obtidos de pendão imaturo foi superior (3787%) a taxa de crescimento de calo do explante folha jovem (49,1%) cultivados no meio M1 (Tabela 4). Esta diferença no crescimento não foi observada quando estes explantes foram cultivados no meio M2.

Tabela 4. Taxa de crescimento dos calos embriogênicos embriogênicos obtidos de pendão imaturo e folha de planta jovem do genótipo L20 nos meios de indução de calos M1 e M2. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008

Meios de cultura	Taxa de crescimento 42 a 63 dias (%)	
	Explantes	
	Pendão imaturo	Folha de planta jovem
M1	A 3787 a	B 49,1 b
M2	A 1 872 a	A 586,7 a

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem pelo teste de Duncan a 5%. Cv: 16,6%.

Em trabalhos com aveia, Bispo et al. (2003) e Flach et al. (2003), verificaram que a taxa de crescimento dos calos embriogênicos durante o primeiro subcultivo também não foi influenciado pelo meio de cultura e genótipos testados.

Assim dos vinte e quatro tratamentos testados para explantes foliares (2 explantes, 3 meios e 4 genótipos) somente um tratamento resultou na formação de calos embriogênicos (explante folha de planta jovem no genótipo L20), evidenciando as limitações de uso deste explante.

4 CONCLUSÕES

- Segmentos foliares de milho apresentam potencial limitado de embriogênese somática para os genótipos testados;
- Calos embriogênicos de explantes foliares foram obtidos somente no genótipo L20;
- O pendão imaturo é o explante mais vantajoso na indução de calos embriogênicos comparado aos explantes foliares;
- O meio M3 não foi eficaz na indução de calos embriogênicos nas condições testadas;
- Não houve diferença entre os genótipos na produção de calos embriogênicos quando se utilizou o pendão imaturo como explante.

CAPITULO II

MELHORAMENTO DA CAPACIDADE EMBRIOGÊNICA A PARTIR DE CRUZAMENTOS ENTRE LINHAGENS DE MILHO SELECIONADAS *IN VITRO*.

Marilia Rodrigues de Silva¹, Magali Ferrari Grandó², Thomás Paulo Kazmirski³, Lizete Augustin⁴, Marilei Suzin⁵

RESUMO

A engenharia genética é um potente instrumento no melhoramento do milho. O cultivo *in vitro* é um pré-requisito para a obtenção de plantas transformadas. Diferenças genotípicas tem um papel significativo na iniciação de culturas embriogênicas nesta espécie. O objetivo deste trabalho foi desenvolver híbridos a partir do cruzamento recíproco de duas linhagens de milho (L2 e L20) selecionadas *in vitro* quanto a capacidade de indução de embriogênese somática e avaliar a capacidade dos híbridos na produção de calos

¹ Engenheira Agrônoma, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

² Orientadora, Bióloga, Ph.D. em Agronomia com ênfase em Biologia Molecular de Plantas, Professora do Curso de Agronomia (FAMV) e Ciências Biológicas (ICB) da UPF e PPGagro., FAMV/UPF.

³ Acadêmico do Curso de Agronomia FAMV/UPF.

⁴ Engenheira Agrônoma, Dra. em Agronomia. Professora da FAMV/UPF.

⁵ Engenheira Agrônoma, Ms.C. Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF.

embriogênicos visando sua utilização em experimentos de engenharia genética. O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF. Duas linhagens (L2 e L20), com alta frequência de calos embriogênicos, foram usadas em cruzamentos recíprocos para obtenção de híbridos. Para avaliação da capacidade embriogênica, pendões imaturos (1-2 cm) das linhagens e seus híbridos H3MT-1 (L2 X L20) e H3MT-2 (L20 X L2) foram cultivadas no meio básico N6 modificado por Songstad et al. (1992). Aos 42 dias de subcultivo foram avaliadas as frequências de calos totais e embriogênicos e aos 42 e 84 dias foi avaliada a massa fresca dos calos embriogênicos. O delineamento experimental utilizado foi o DCC com 5 repetições para cada tratamento e as unidades experimentais foram placas de petri contendo 10 segmentos de pendão imaturo. Para análise estatística foi utilizado a ANOVA, sendo a diferença das médias da frequência de calos comparadas por Tukey a 5% e os dados de massa fresca comparadas por Duncan a 5%. Foi possível a obtenção de híbridos utilizando as duas linhagens como genitores femininos e masculinos. Quando analisada a produção de calos totais os genótipos L2 e H3MT-2 produziram 87,1% e 86,3% respectivamente, mostrando superioridade ao genótipo L20 (40%), mas não diferiram do híbrido H3MT-1 (61,7%). Para porcentagem calos embriogênicos o híbrido F1 H3MT-2 (32,5%) foi superior à linhagem L2, mas não se diferenciou da linhagem L20 (32%) e do híbrido H3MT-1 (17,7%). Para massa fresca de calos embriogênicos aos 42 dias de cultivo não houve diferença entre os genótipos. Já aos 84 dias os calos embriogênicos do genitor L20 foram mais pesados (6016mg) e este mostrou superioridade aos genótipos H3MT-1 (1402

mg) e H3MT-2 (1100mg) e a linhagem L2 (318mg) quanto à massa fresca de calos embriogênicos. Embora os híbridos tenham superado o genitor L20 na produção de calos embriogênicos e massa fresca de calo, a utilização de plantas híbridas é vantajosa pois híbridos simples são plantas que apresentam alto vigor quando comparado à linhagens. Com estes resultados verificamos que foi possível a obtenção de híbridos a partir do cruzamento das linhagens selecionadas para resposta *in vitro*, que híbridos F1 de milho não diferiram do genitor L20 no que diz respeito a produção de calos embriogênicos.

Palavras chaves: *Zea mays* L., embriogênese somática, genótipos responsivos *in vitro*.

IMPROVEMENT OF EMBRIOGENIC CAPACITY BY CROSSING *IN VITRO* SELECTED MAIZE INBRED LINES *IN VITRO*

Marilia Rodrigues de Silva¹, Magali Ferrari Grando², Thomás Paulo Kazmirski³, Lizete Augustin⁴, Marilei Suzin⁵

ABSTRACT

Genetic engineering is a powerful tool in maize improvement. The *in vitro* cultivation is a requirement for obtaining transformed plants. Genotypic differences play a significant role in the initiation of embryogenic cultures in this species. This work aimed to develop maize hybrid with high embryogenic capacity by crossing two inbred lines presenting high *in vitro* response related to the capacity of somatic embryogenesis induction. The experiment was conducted at the Laboratory of Plant Biotechnology at FAMV/UPF. Two inbred lines (L2 and L20) were used in reciprocal crosses to obtain F1 hybrids. Immature tassel (1-2 cm) from inbred lines and their hybrids H3MT-1 (L2 x L20) and H3MT-2 (L20 x L2) were cultivated on basic media N6 modified by Songstad et al. (1992) for callus induction. At 42 days of cultivation it was evaluated the frequencies of total and

¹ Agronomist, Master student in Agronomy Graduation Program, Major in Plant Production at Department of Agronomy and Veterinarian Medicine - University of Passo Fundo (UPF).

² Advisor, Biologist, Ph.D. in Agronomy, Faculty member of Department of Agronomy and Veterinarian Medicine and Agronomy Graduation Program - University of Passo Fundo (UPF).

³ Undergrad Student at Department of Agronomy and Veterinarian Medicine- UPF

⁴ Agronomist, Dr. in Agronomy. Faculty member of Department of Agronomy and Veterinarian Medicine - University of Passo Fundo (UPF).

⁵ Agronomist, Ms.C. Plant Biotechnology Laboratory. University of Passo Fundo (UPF).

embryogenic callus. The fresh weight was evaluated at 42 and 84 days of cultivation. The experiment was randomized completely designed, with five replications, and the experimental unity was one petri dish with 10 tassel segments. The data were submitted to the ANOVA and the difference among callus frequency average was compared by Tukey test at 5%, and the data on callus fresh weight compared by Duncan test at 5%. It was possible to obtain hybrids using the two inbred lines as male and female parents. When examining the total callus production, the inbred line L2 and the hybrid H3MT-2 produced 87.1% and 86.3% respectively, higher than L20 genotype (40%) but not differing from H3MT-1 hybrid (61.7%). For embryogenic callus percentage, the F1 hybrid H3MT-2 (32.5%) was superior to the inbred line L2 (0%), but not different from L20 (32%) and hybrid H3MT-1 (17.7%). For fresh weight of embryogenic callus at 42 days of cultivation there was no difference between genotypes. But at 84 days of cultivation, the parent line L20 produced embryogenic callus with higher fresh weight (6.016mg), showing superiority to H3MT-1 (1.402 mg) and H3MT-2 (1.100mg) hybrids and parent line L2 (318mg). Although the hybrids presented the same embryogenic potential compared to the parental line L20, the use of hybrid plants is beneficial because the plants present the hybrid vigor compared to the inbred lines. In this experiment it was possible to develop maize hybrids with high capacity to produce embryogenic callus.

Key words: *Zea mays* L., somatic embryogenesis, responsive *in vitro* genotypes.

1 INTRODUÇÃO

Em função de seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo, o milho constitui-se num dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo. A engenharia genética representa um potente instrumento no melhoramento genético dessa cultura por permitir a introdução de genes que conferem características desejáveis.

Entretanto, a produção de plantas geneticamente transformadas depende da integração do gene exógeno na célula alvo e da eficiência com que plantas são regeneradas a partir destas células. Assim, as técnicas de biologia molecular em associação com as técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* constituem a base para a obtenção de uma planta transgênica. Portanto, o estabelecimento de um protocolo adequado para o cultivo e regeneração de plantas é pré-requisito em estudos com transformação genética (RITALA et al., 1995).

Os sistemas mais utilizados em milho para a regeneração de plantas *in vitro* têm sido a partir de calos embriogênicos induzidos de explantes jovens contendo células embriogênicas ou meristemáticas, como embriões e pendões imaturos (GREEN & PHILIPS, 1975; SONGSTAD et al., 1992; ZHAO et al., 2001; SILVA et al., 2003; 2004; 2005; VARNIER, 2004; GRANDO et al., 2004; 2005; ISHIDA et al. 2007; VEGA et al., 2008).

Calos embriogênicos são compostos de massa celular pouco diferenciada, apresentando estruturas globulares representando embriões somáticos que germinam e dão origem a plantas completas

(VASIL et al., 1984), podendo regenerar plantas a partir de uma única célula (WELTER et al., 1995). Desta forma a capacidade de indução de calos embriogênicos com potencial de regeneração de plantas, tem sido essencial para a obtenção de plantas geneticamente modificadas (ARMSTRONG, 1999).

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; PRIOLI & SILVA, 1989; 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 adaptados a regiões de clima temperado 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 pouco 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; DANILOVA & DOLGIKH, 2004).

Um grande avanço no cultivo *in vitro* ocorreu pelo desenvolvimento do híbrido Hi-II, a partir do cruzamento entre as linhagens A188 x B73. A formação de calos embriogênicos da linhagem B73 foi incrementada drasticamente pela introgressão de fragmentos de cromossomo da linhagem A188 por retrocruzamento (ARMSTRONG et al., 1991). A linhagem A188 apresenta boa capacidade embriogênica enquanto que a linhagem B73 produz calos não embriogênicos (JIMÉNEZ & BANGERTH, 2001). A linhagem A188 tem sido considerada o melhor genótipo para iniciar culturas embriogênicas (GREEN & PHILIPS, 1975; HODGES & KAMO 1986), enquanto a linhagem B73 apresenta fraca resposta *in vitro* (HODGES & KAMO 1986). No entanto, o híbrido Hi-II apresenta excelente resposta *in vitro* em termos de produção de calos embriogênicos do tipo II 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 (GENOVESI et al., 1992; SONGSTAD et al., 1992; WALTERS et al., 1992; GRANDO, 2001; GRANDO et al., 2005) como via *Agrobacterium tumefaciens* (LUPOTTO et al., 1998; ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; SHOU et al., 2004; VEGA et al., 2008).

Da mesma forma, a linhagem A188 tem sido muito utilizada para este fim (ISHIDA et al., 1996; 2007; DANILOVA & DOLGIKH, 2005) e isso demonstra a importância e necessidade de identificar

genótipos responsivos *in vitro* para a utilização da engenharia genética em milho.

Várias linhagens recalcitrantes cruzadas com A188 formaram híbridos que foram usados na transformação pelo método da *Agrobacterium tumefaciens*, por exemplo, W117 x A188, W59E x A188, A554 x A188, W153R x A188 e H99 x A188 (ISHIDA et al., 1996) e A188 × R91 (DANILOVA & DOLGIKH, 2004). Essa estratégia tem sido utilizada pois embora a linhagem A188 tem pobres características agrônômicas ele apresenta ótima resposta *in vitro*.

Outros genótipos responsivos *in vitro*, além da linhagem A188 e do híbrido americano Hi-II, têm sido identificados por vários grupos e já utilizados na transformação de plantas. Inúmeros outros genótipos já foram testados para este fim, as linhagens W117, W59E, A554, W153R e H99 (ISHIDA et al., 1996), o híbrido Chi31×CatetoS.G e a linhagem R91 (DANILOVA & DOLGIKH, 2004); os híbridos LH74×A641, LH262×LH252, LH198×LH227, FR1064×FR1064 (SDMS)×LH185, LH176 e LH177×DMS e R23 (SAIRAM et al., 2003); B104, B114, e Ky21 (FRAME et al., 2006); H99, OH43, Jangdaok, Chalok2 (LEE at al., 2007) e o híbrido H99 (ISHIDA et al., 2007).

O milho está entre as espécies em que a hibridação é recomendada como método adequado de melhoramento devido à relativa facilidade de se obter altos níveis heteróticos (PATERNIANI & CAMPOS, 1999). O melhoramento genético de milho é um dos mais ativos campos da genética aplicada.

As linhagens utilizadas nos programas de melhoramento de milho são altamente homozigotas e obtidas a partir de sucessivas

autofecundações de plantas selecionadas para os objetivos de melhoramento. Nas primeiras autofecundações, ocorre uma rápida perda do vigor, estabilizando-se em seguida, a partir da sétima geração de autofecundação, a linhagem é considerada homozigótica (PATERNIANI & CAMPOS, 1999). A escolha das linhagens na produção de híbridos é de fundamental importância, visto que o desempenho de um híbrido depende da contribuição das linhagens per se (locos em homozigose) e da heterose entre elas (locos em heterozigose) (Vencovsky & Barriga apud BISOIN et al., 2003).

Heterose ou vigor híbrido é o aumento de vigor, da altura de planta, do conteúdo de carboidratos, da produtividade e da intensidade de outros fenômenos biológicos, decorrente do cruzamento de indivíduos contrastantes (BORÉM, 1997). Para Semel et al. (2006) o vigor híbrido representa a força genética que mais contribui para a produção mundial de alimentos, sendo que a base genética para a heterose não é clara, porém as hipóteses mais aceitas são a da dominância, sobredominância e epistasia.

A hipótese da dominância no híbrido pode ser explicada pelo fato de genes deletérios recessivos permanecem acobertados pelos alelos dominantes. A teoria da sobredominância supõe que a existência de alelos contrastantes em cada locus provocaria a ativação de rotas bioquímicas, que somadas resultariam em heterose superior ao daqueles indivíduos que apresentam um único tipo alélico em cada locus. Já a epistasia ocorreria em virtude da complexa interação de produtos gênicos em diferentes loci (Shull; Bruce apud BORÉM, 1997).

Existem diversos tipos de híbridos. O híbrido simples se refere

a primeira geração do cruzamento de duas linhas homozigóticas é potencialmente mais produtivo que os outros híbridos (OLIVEIRA, 1984), sendo considerado o topo da pirâmide dos híbridos quanto à uniformidade e produtividade (PATERNIANI & CAMPOS, 1999).

Visto que a possibilidade de obtenção de plantas geneticamente transformadas é bastante dependente da capacidade de produzir calos embriogênicos e regeneração de plantas *in vitro*, a obtenção de um híbrido de milho adaptado a região sul do Brasil e altamente responsivo *in vitro*, representaria um grande avanço na utilização da engenharia genética no melhoramento desta espécie.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver híbridos a partir do cruzamento recíproco de duas linhagens de milho (L2 e L20) selecionadas *in vitro* e avaliar a capacidade dos híbridos na produção de calos embriogênicos visando sua utilização em experimentos de engenharia genética.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

O experimento foi desenvolvido no telado, estufa e Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo-RS, no período de março de 2008 a fevereiro de 2009.

2.2 Obtenção dos Híbridos

As linhagens L2 (programa de melhoramento de milho da Embrapa trigo, gentilmente cedido pelo Dr. Henrique Pereira e Dra. Beatriz Marti Emydio) e linhagem L20 (do programa de melhoramento do milho da Universidade de Florida, gentilmente cedido pelo Dr. Brian Scully) foram semeadas no período de 11/01/08 à 17/01/08 em telado contendo substrato previamente analisado e corrigido; foram realizados controles de pragas e doenças conforme a recomendação da cultura.

Quando na fase de reprodução, as plantas emitiram a inflorescência feminina, esta foi coberta com saco plástico para evitar contaminação com pólen de outros genótipos. Quando o pendão (inflorescência masculina) se apresentava em fase viável (Figura 1) para cruzamento, foi realizada a coleta do pólen e subsequente cruzamento entre as linhagens, de forma que ambos fossem usados com progenitores femininos e também como progenitores masculinos, ou seja, em cruzamentos recíprocos para verificação do efeito materno. Após a polinização as espigas maduras foram coletas e realizou-se a contagem das sementes formadas.



Figura 1. Detalhe dos cruzamentos entre as linhagens L2 e L20 de milho: a) inflorescências masculinas protegidas com sacos de papel; b) inflorescências femininas protegidas com sacos plásticos para evitar polinizações indesejáveis; c) detalhe das inflorescências da linhagem L20. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008.

2.3 Avaliação de híbridos quanto à indução de calos embriogênicos a partir de pendão imaturo de milho

Os híbridos resultantes dos cruzamentos foram avaliados e comparados aos genitores (L2 e L20), quanto à capacidade de indução de calos embriogênicos. Para tal, as sementes destes genótipos foram semeadas em vasos em ambiente protegido e os pendões imaturos foram utilizados como explante para indução de calos embriogênicos.

Os pendões imaturos foram obtidos de plantas com cerca de 6-7 semanas, conforme descrito por Songstad et al. (1992) e Varnier (2004). Após a remoção das folhas externas foi realizada uma desinfecção rápida e superficial com álcool 70%. As folhas que cobrem o pendão imaturo foram removidas em câmara de fluxo laminar e pendões imaturos medindo 1-3 cm foram cortados em

segmentos de 2-3 mm e inoculados em placas de petri, (100 x. 15 mm) contendo 25 ml de meio de indução de calo.

O meio de indução de calos era composto de meio básico N6 (CHU et al., 1975) suplementado com 100 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 2,88 g.L⁻¹ de L-prolina, 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), 10 µM de nitrato de prata (AgNO₃), 20 g.L⁻¹ de sacarose, 2 g.L⁻¹ Phytigel e 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D (SONGSTAD et al., 1992). O pH do meio foi ajustado para 5,8 com KOH (hidróxido de potássio) antes da autoclavagem e o AgNO₃ foi esterilizado por filtração e adicionado ao meio de cultura após a autoclavagem do mesmo a 121°C por 20 minutos. Este meio foi previamente selecionado para obtenção de calos embriogênicos a partir de pendões imaturos dos progenitores (VARNIER, 2004; GRANDO et al., 2004).

2.4 Seleção e manutenção dos calos embriogênicos

As culturas foram mantidas no escuro a 28°C e aos 42 dias os calos embriogênicos foram identificados e selecionados com auxílio de lupa estereomicroscópica. Calos embriogênicos ou setores contendo calos embriogênicos foram pesados e transferidos para meio de manutenção, o qual é similar ao meio de indução, diferindo apenas pela ausência de AgNO₃ e pelo aumento da concentração de 2,4-D para 2 mg.L⁻¹ (ARMSTRONG et al., 1994).

As culturas foram subcultivadas a cada 21 dias para meio de manutenção para multiplicação dos calos. O aumento da massa fresca

dos calos foi registrado a cada 21 dias até os 84 dias de cultivo para avaliar o crescimento dos calos.

As variáveis analisadas foram: frequência total de calos (embriogênicos e não embriogênicos) aos 42 dias de cultivo, calos embriogênicos aos 42 dias de cultivo, massa fresca dos calos embriogênicos aos 42 e 84 dias de cultivo. A massa fresca foi determinado através de pesagem dos calos embriogênicos selecionados em placa de petri pré pesada em câmara de fluxo laminar durante a transferência para os meios de manutenção.

2.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado com 5 repetições para cada tratamento. As unidades experimentais foram placas de petri contendo 10 segmentos de pendão imaturo de 2mm de comprimento.

Os dados relativos à porcentagem foram transformados por transformação angular segundo a fórmula ($\arcsin \sqrt{x/100}$) e dados relativos a massa fresca foram transformados por transformação logarítmica segundo a fórmula ($\log x$).

Para análise estatística foi utilizado a ANOVA, sendo a diferença das médias da porcentagem de calos totais e embriogênicos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de massa fresca comparados pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAS (Statistics Analysis System) (SAS Institute, 1998).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível a obtenção de híbridos utilizando as duas linhagens como progenitores femininos e masculinos (Figura 2 a e b). As linhagens parentais utilizadas nestes cruzamentos são de diferentes programas, sendo a L2 proveniente do programa de melhoramento da Embrapa Trigo e a L20 do programa de melhoramento da Universidade de Florida e se destacaram por apresentarem alta frequência de calos embriogênicos obtidos de pendões imaturos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF (VARNIER, 2004; GRANDO et al., 2005). Foram obtidas 511 sementes do cruzamento L2 X L20 a partir de duas inflorescências polinizadas e 860 sementes do cruzamento L20 X L2 a partir de 8 inflorescências. Também foi possível realizar a autopolinização das linhagens genitoras para multiplicação do material genético, o qual era bastante escasso. O Híbrido resultante do cruzamento L2 X L20 foi denominado de H3MT-1 e o híbrido resultante do cruzamento L20 X L2 foi denominado de H3MT-2.

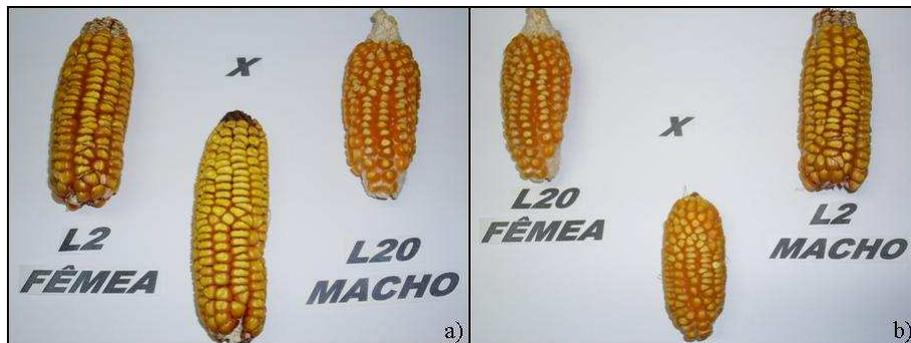


Figura 2. Cruzamentos entre as linhagens L2 e L20 de milho para obtenção de híbridos. a) genitores e híbrido F1 (H3MT-1) obtido do cruzamento Linhagem L2 X L20; b) genitores e híbrido F1 (H3MT-2) obtido do cruzamento L20 X L2. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008.

Este trabalho visou à geração de híbridos de milho que produzam alta frequência de calos embriogênicos, a exemplo do Híbrido Americano Hi-II desenvolvido por melhoramento convencional e utilizado por inúmeros laboratórios de Biotecnologia no hemisfério Norte. Para avaliar a resposta *in vitro*, as sementes híbridas F1 e os progenitores foram semeadas em ambiente protegido e cultivadas *in vitro*. A figura 3 mostra aspectos das plantas e pendão imaturo utilizados neste experimento.

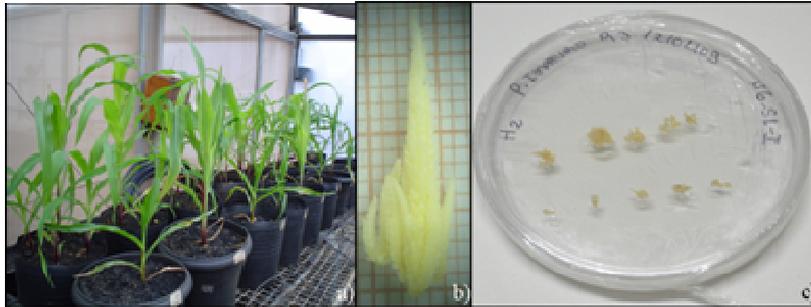
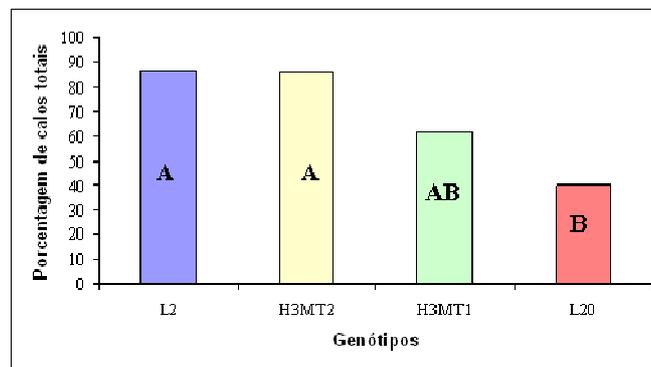


Figura 3. Obtenção do explante pendão imaturo dos genitores e híbridos de milho a) plantas com 6 semanas de onde foram obtidas os pendões imaturos; b) pendão imaturo com aproximadamente 3 cm de comprimento; c) placa contendo meio de indução de calos com os segmentos de 2mm do pendão imaturo. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008.

Houve diferença significativa ($p=0,02$) entre os genótipos na porcentagem de calos totais aos 42 dias de cultivo (Figura 4). Na categoria total de calos estão contabilizados os calos aquosos, organogênicos e embriogênicos.



*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. CV=29,5%.

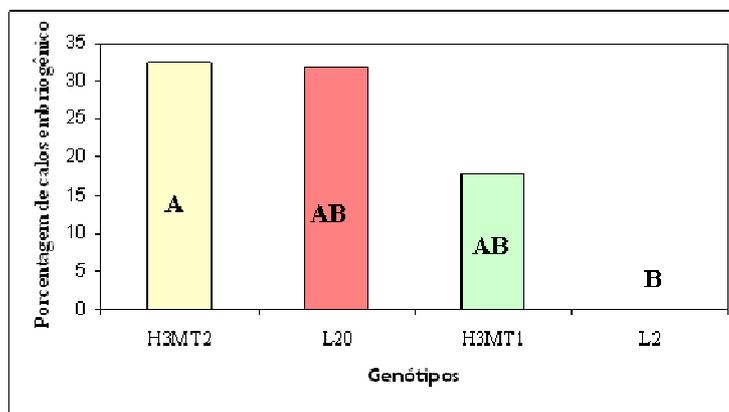
Figura 4. Porcentagem de calos totais de milho observados aos 42 dias de cultivo a partir de pendão imaturo das linhagens parentais L2 e L20 e seus híbridos F1 (H3MT-1 e H3MT-2). Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008.

A linhagem L2 e o híbrido H3MT-2 produziram 87,1% e 86,3% respectivamente, mostrando superioridade quando comparados a linhagem L20 que produziu (40%), não sendo diferente do híbrido H3MT-1 (61,7%).

Varnier (2004) constatou que houve efeito genotípico na indução de calos totais, sendo que a maior porcentagem de calos foi observada no genótipo L2 (56,4%), comparado a outros híbridos e linhagens de milho.

Em aveia, Souza et al. (2002), também observaram efeito genotípico para a variável frequência total de calos obtidos de embriões maduros de genótipos sulbrasileiros de aveia, sendo que esta frequência variou de 51 a 91 %.

Foi observado efeito do genótipo na indução de calos embriogênicos aos 42 dias de cultivo (Figura 5).



*Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%. CV=79,3%.

Figura 5. Porcentagem de calos embriogênicos de milho observados aos 42 dias de cultivo a partir de pendão imaturo das linhagens parentais L2 e L20 e seus híbridos F1 (H3MT-1 e H3MT-2). Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008.

O híbrido F1 H3MT-2 (32,5%) foi superior à linhagem L2, mas não se diferenciou da linhagem L20 (32%) e do híbrido H3MT-1 (17,7%), isto indica a ausência de efeito materno para esta característica. Os calos embriogênicos obtidos de pendão imaturo dos diferentes genótipos L20, H3MT-1 e H3MT-2 são mostrados na figura 6.

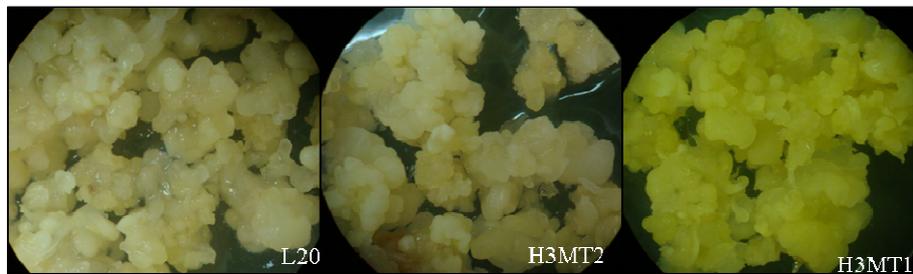


Figura 6. Aspectos dos calos embriogênicos de milho obtidos de pendão imaturo do genitor L20 e dos híbridos F1 H3MT-1 e H3MT-2, aos 42 dias de cultivo *in vitro*. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

Neste experimento, aos 42 dias, o genótipo L2 não produziu calos embriogênicos, embora esta linhagem se mostrou altamente embriogênica em experimentos anteriores. Em experimentos independentes conduzidos no ano de 2004, esta linhagem produziu 53,6 e 27,3% de calos embriogênicos (VARNIER, 2004). Em outro experimento, a produção de calos embriogênicos desta linhagem foi e 22,2%. Ainda, a linhagem L2 (27,3%) foi superior a 33 genótipos de milho testados, sendo estes 16 linhagens, 14 híbridos e 3 variedades, não diferindo da linhagem L20 (12,7%) (VARNIER, 2004). Para o mesmo autor, as linhagens L2 e L20 tiveram capacidade de regenerar

plantas *in vitro*, característica essa limitada a poucos genótipos avaliados. Estes dados justificam a escolha destas linhagens como genitores na produção de híbridos com alta capacidade de produção de calos embriogênicos.

A baixa performance da Linhagem L2 no presente experimento, pode ser justificado pelo baixo vigor que as plantas apresentaram quando crescidas para a doação dos explantes. Muitas das plantas não se desenvolveram eficientemente, se mostrando frágeis e com crescimento deficiente, indicando a perda de vigor das sementes utilizadas. Este aspecto impediu a comparação da performance dos híbridos com os genitores. O estado fisiológico dos explantes, estação do ano e condições de crescimento das plantas doadoras do explante pode modificar a expressividade dos genes que controlam a indução de embriogênese somática a regeneração de plantas de milho (PRIOLI & SILVA, 1989).

No entanto, os híbridos gerados neste experimento apresentaram uma eficiente resposta *in vitro*, não diferindo da linhagem L20 usada como genitor feminino do híbrido H3MT-2 e masculino do híbrido H3MT-1.

No presente experimento não foi possível investigar o tipo de interação alélica que determina a herança para esta característica, pois não foi possível acessar adequadamente a performance da linhagem L2 e nem gerações posteriores, mas provavelmente não ocorreu heterose para esta característica, e também não ocorreu efeito materno.

Varnier (2004) avaliou 9 híbridos em contraste com suas linhagens genitoras, na indução de calos embriogênicos obtidos de

pendões imaturos aos 42 dias de cultivo. Só um híbrido apresentou frequência de calos superior (7%) a ambos os genitores (3,7 e 0%). Três híbridos produziram menor frequência de calos que ambos os pais. A linhagem L2 (27,3%) cruzada com a linhagem L5 (0%) produziu híbrido com apenas 2% de calos embriogênicos.

Dados de experimentos com embriões imaturos de milho avaliados por Hodges e Kamo (1986) mostraram que híbridos obtidos do cruzamento da linhagem A188 com linhagens de milho recalcitrantes apresentavam alta competência para indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas. Este fato ilustra claramente que o genótipo é um fator importante na resposta *in vitro* e na regeneração de plantas.

Duncan et al. (1985) analisaram 101 linhagens de milho, destas somente 49 genótipos produziram calos embriogênicos e 35 desses genótipos regeneraram plantas. Já segundo Lu et al. (1982), que analisaram 12 diferentes genótipos a variação na produção de calos embriogênicos variou de 3,3 a 40 % entre os diferentes genótipos.

Estudos realizados por Varnier (2004) e Grandó et al., (2004) em 39 genótipos de milho, indicaram que somente 54% dos genótipos produziram calos embriogênicos, e destes 25,6% regeneraram plantas, evidenciando o efeito genotípico.

A expressão da embriogênese somática nos diferentes genótipos é explicada pela presença de um ou um bloco de genes ativos (WILLMAN et al., 1989; BHASKARAN & SMITH, 1990). Para Galiba et al. (1986), a capacidade de indução de calos e regeneração de plantas está parcialmente sob controle genético, e pode ser controlada por um sistema poligênico. Em experimentos com

sorgo, a capacidade de formação de calos regeneráveis variou entre os genótipos, foi herdável e se expressou como uma característica dominante onde, no mínimo, dois pares de genes estavam envolvidos (MA et al., 1987).

Hodges et al. (1986), avaliaram 25 linhagens de milho e seus híbridos F1 e F2 e concluíram que genes nucleares exibindo dominância são importantes para a formação de embriões somáticos e regeneração de plantas. Estes autores sugeriram a existência de genes supressores da embriogênese em algumas linhagens, devido ao fato de produzirem híbridos com capacidade inferior mesmo quando cruzadas com excelentes genótipos. Este efeito não foi observado no presente experimento, visto que a produção de calos embriogênicos dos híbridos não foi inferior aos pais.

Tomes & Smith (1985) relatam que o controle da herança genética em milho para a formação de calos embriogênicos é do tipo aditiva, com efeito materno e heterose significativos. Portanto, esta característica pode ser utilizada na seleção de germoplasma de milho, para maximizar a regeneração de plantas *in vitro*. Para Tomes (1985) a resposta de calos embriogênicos é determinada por poucos genes, a herança é principalmente nuclear, mas com forte efeito materno em algumas combinação híbridas. Nos resultados do presente experimento não observou-se a ocorrência do efeito materno pois os híbridos recíprocos obtidos foram semelhantes na produção de calos embriogênicos.

Decompondo a variação genotípica para a resposta de calos tipo I, a partir da análise dialélica, Tomes (1985), observou que 60% da variabilidade genética poderia ser explicada pela performance dos

pais ou por sua capacidade geral de combinação (efeito aditivo), enquanto somente 30% da variabilidade pode ser explicada nas combinações híbridas específicas. O mesmo não é verdadeiro para o calo tipo II, que apresenta um componente genético diferente, sendo que somente 30% da variação genotípica pode ser explicada pela capacidade geral de combinação enquanto que 50% da variação refere-se a capacidade específica de combinação, dessa forma, cruzamentos específicos são mais adequados para maximizar a produção de calos tipo II. Em alguns estudos, a amostragem de apenas linhagens sozinhas não revelou o seu potencial na produção desse tipo de calo, sendo que essa capacidade pode somente ser expressa no híbrido (TOMES, 1985; TOMES & SMITH, 1985).

Na literatura já existem trabalhos sobre genes envolvidos na embriogênese somática e regeneração de plantas de milho. Para Lozovaya et al. (2006) se genes que podem controlar o totipotência puderem ser identificados, então a habilidade da regeneração de genótipos desejados poderiam ser realçado através da engenharia genética.

Wang et al. apud Santos-Serejo & Aguiar-Perecin (2000) identificaram, através da análise de RFLP, seis regiões cromossômicas envolvidas na resposta ao cultivo *in vitro*. Armstrong et al. (1992), verificaram que a região mais crítica para a formação de calos encontrava-se no braço longo do cromossomo nove do milho.

Para Armstrong et al. (1992), três das cinco regiões genômicas da linhagem A188 que foram conservadas no retrocruzamento de linhas (A188/B73*B73), selecionados para a alta frequência de iniciação de culturas embriogênicas, foram igualmente associados

com a produção de calos embriogênicos. Os resultados dos experimentos com meristema apical conduzidos por Li et al. (2003) sugeriram que vários genes importantes estão envolvidos na capacidade de regeneração de plantas de milho, sendo que foram identificados cinco marcadores RAPD relevantes para a porcentagem de regeneração de plantas de milho. Recentemente, Krakowsky et al. (2006) mapearam por 11 QTL em 8 cromossomos do milho envolvidos na indução de embriogênese somática, sendo 8 QTLs de maior peso e muitos QTLs estavam próximos a regiões contendo genes envolvidos no metabolismo e ABA (ácido abscísico). Duncan et al. 2003, identificaram um gene (Glb1/Globolin1) que pode ser útil como um marcador para determinar a capacidade de regeneração de culturas de milho.

Close & Gallagher-Ludeman (1989) sugeriram que a indução de calos regeneráveis de milho é um fenômeno fisiológico, podendo ser manipulado no tipo ou concentração dos reguladores de crescimento, independente do genótipo e origem do explante. Estes pesquisadores sugeriram a existência de genes envolvidos na receptibilidade dos reguladores de crescimento. Assim, a base genética da variabilidade na resposta a cultura de tecidos e morfogênese poderia ser devido a diferenças no metabolismo hormonal no tecido cultivado, sendo essas diferenças estabelecidas pelo nível de expressão gênica do explante. Norstog apud Bhaskaran & Smith (1990), também relatou que as diferenças genótípicas podem ser relacionadas com as variações nos níveis de hormônios endógenos do explante.

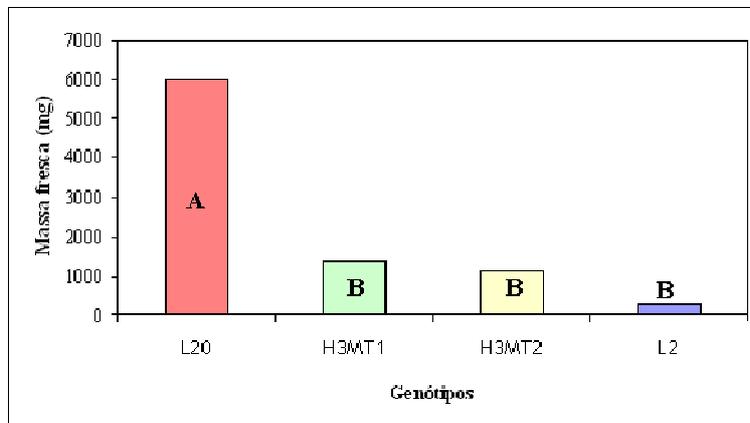
Jiménez & Bangerth (2001), para elucidar as diferenças na capacidade de embriogênese somática, avaliaram os níveis de hormônios existentes nos explantes e também após a formação de calos. Eles observaram que níveis da citocinina IP/IPA [N^6 (Δ^2 -isopentenil) adenina: N^6 (Δ^2 -isopentenil) adenosina] nos calos embriogênicos da linhagem A188 (genótipo responsivo *in vitro*) eram superiores aos calos não embriogênicos da linhagem B73 (genótipo pouco responsivo *in vitro*); e que níveis desse hormônio no genótipo A188 não foram diferentes para calos embriogênicos e não embriogênicos. Outro hormônio estudado por este autor foi a auxina, neste trabalho ele relatou a existência de 16-20 vezes menos auxinas nos grãos de A188 que na linhagem Missouri-17 que é menos competente na cultura *in vitro*. A hipótese elaborada por este autor é que uma maior concentração de auxina poderia ser um inibidor da formação de calos.

Para estes autores os níveis absolutos de hormônios podem, por si só, não explicar todas as diferenças morfogenéticas entre genótipos. A sensibilidade dos genótipos aos hormônios também têm desempenhado um papel importante nas diferenças observados no desenvolvimento entre as linhagens (A188 e B73).

Bronsema et al. apud Jiménez & Bangerth, (2001) relataram que uma das principais diferenças entre as linhagens mais e menos competentes de milho é a distribuição de 2,4-D (regulador de crescimento utilizado para indução de calos embriogênicos) dentro dos embriões. Foi observado que a captação de 2,4 D foi menor em calos não embriogênicos que calos embriogênicos. Já para os níveis de hormônio IAA (ácido 3- indol- acético), não foram encontradas

diferenças estatisticamente significativas em embriões imaturos de A188 e B73. Considerando os calos embriogênicos da linhagem A188 continham maiores níveis de IAA que os calos não competentes para a resposta embriogênica.

Outro aspecto analisado no presente experimento foi a massa fresca de calos embriogênicos produzidos pelas linhagens genitoras e os dois híbridos F1. Aos 42 dias de cultivo não houve diferença significativa na massa fresca dos calos embriogênicos obtidos dos genótipos que produziram este tipo de calo (L20, H3MT-1 e H3MT-2). Em média, os calos apresentaram 1074,66 mg de massa fresca. Já aos 84 dias de cultivo todos os genótipos apresentaram formação de calos embriogênicos, sendo possível a análise da massa fresca de calos embriogênicos obtidos de pendão imaturos dos diferentes genótipos. O genótipo L20 (6016mg) foi superior aos híbridos H3MT-1 (1402 mg) e H3MT-2 (1100mg) e a linhagem L2 (318mg) quanto a massa fresca de calos embriogênicos aos 84 dias de cultivo (Figura 7). Isso indica que calos da linhagem L20 apresentam uma boa manutenção e crescimento *in vitro*, característica essa muito importante no processo de obtenção de plantas transformadas, uma vez que o calo passa por um longo processo de seleção em meio de cultura contendo herbicidas antes de ser transferido para o meio de regeneração de plantas. Calos longevos e que mantêm bom crescimento são, portanto, desejáveis num sistema de transformação de plantas.



* Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan a 5%. Cv= 153,51%.

Figura 7. Massa fresca de calos embriogênicos de milho observados aos 84 dias de cultivo a partir de pendão imaturo das linhagens parentais L2 e L20 e seus híbridos F1 (H3MT-1 e H3MT-2). Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

Em milho a limitação do número de genótipos que tem sido eficientemente transformado esta ligada à baixa resposta *in vitro* da maioria dos genótipos (ISHIDA et al., 2007). Portanto, a identificação e desenvolvimento de genótipos responsivos *in vitro* são de fundamental importância para o desenvolvimento das técnicas de transferência de genes.

Neste experimento obtivemos sucesso na obtenção de híbridos. Os híbridos F1 apresentaram uma porcentagem de calos embriogênicos similar a linhagem genitora L20, mostrando potencial de serem utilizados em experimentos subsequentes de transformação genética. Embora os híbridos F1 não superaram a Linhagem L20 na produção de calos embriogênicos e massa fresca de calo aos 84 dias de cultivo, a utilização de plantas híbridas é vantajosa pois os híbridos simples são plantas que apresentam alto vigor (vigor híbrido) quando

comparado com as linhagens homozigotas. A figura 8 ilustra a diferença no desenvolvimento das plantas das linhagens e híbridos utilizados neste experimento. Plantas com mais vigor e qualidade originam explantes com qualidade superior para desenvolvimento *in vitro*.

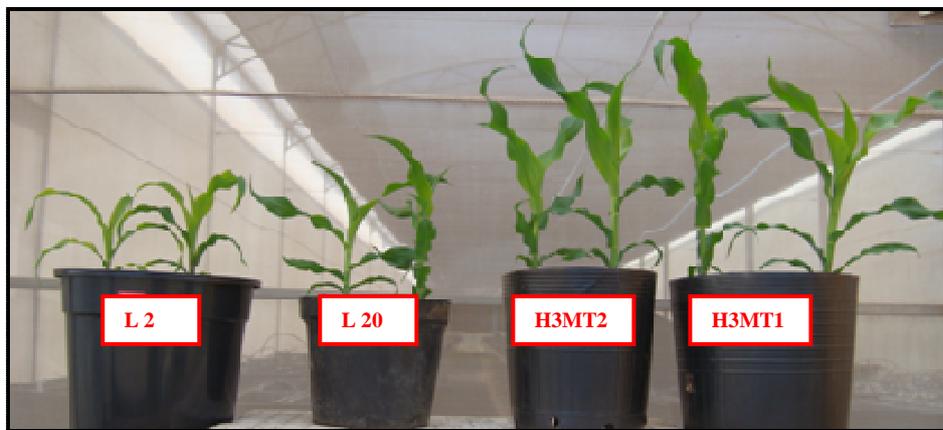


Figura 8. Detalhe das linhagens genitoras (L2 e L20) e dos híbridos (H3MT-2 e H3MT-1) desenvolvidas em vasos em ambiente protegido. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2008.

É imprescindível avaliar a capacidade de regeneração destes híbridos em comparação com os genitores. Em experimentos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, híbridos apresentaram menor frequência de calos embriogênicos que as linhagens, no entanto apresentaram maior capacidade de regeneração de plantas (VARNIER, 2004). Da mesma forma, estes genótipos devem ser avaliados para a capacidade de transferência de genes pelo método *Agrobacterium tumefaciens*, visando à produção de plantas transgênicas.

4 CONCLUSÕES

- Foi possível a obtenção de híbridos a partir do cruzamento das linhagens selecionadas para eficiente resposta *in vitro*;

- Os híbridos F1 de milho não diferiram do genitor L20 no que diz respeito à produção de calos embriogênicos obtidos de pendão imaturo.

- A linhagem genitora L20 apresentou maior crescimento de calos embriogênicos ao longo dos subcultivos.

CAPITULO III

TRANSFORMAÇÃO DE PENDÕES IMATUROS E CALOS EMBRIOGÊNICOS DE MILHO VIA *Agrobacterium tumefaciens*

Marilia Rodrigues de Silva¹, Magali Ferrari Grando², Elene Yamazaki Lau³, Bibiane Lago de Castro⁴, Thomás Paulo Kazmirski⁵, Lizete Augustin⁶, Marilei Suzin⁷, Jurema Schons⁸, Norimar Denardin⁹

RESUMO

A engenharia genética de plantas abre novas perspectivas para o melhoramento genético de milho (*Zea mays* L.), permitindo a transferência de genes visando genótipos superiores. A transformação por *Agrobacterium tumefaciens*, tem sido o método preferido para este

¹ Engenheira Agrônoma, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro), Área de Concentração em Produção Vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

² Orientadora, Bióloga, Ph.D. em Agronomia com ênfase em Biologia Molecular de Plantas, Professora do Curso de Agronomia (FAMV) e Ciências Biológicas (ICB) e PPGAgro, FAMV/UPF.

³ Engenheira Florestal, Dra. em Genética e Melhoramento Pesquisadora Embrapa/Trigo.

⁴ Acadêmica do Curso de Biologia do ICB/UPF.

⁵ Acadêmico do Curso de Agronomia da FAMV/UPF.

⁶ Engenheira Agrônoma, Dra. em Agronomia. Professora da FAMV/UPF.

⁷ Engenheira Agrônoma Ms.C. em Fitotecnia. Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF.

⁸ Bióloga, Dra. em Ciências Biológicas. PPGAgro - FAMV/UPF.

⁹ Bióloga., Dra. em Agronomia. PPGAgro - FAMV/UPF.

fim. No entanto, o milho é considerado uma das culturas mais recalcitrantes para transformação genética. Os pontos críticos para utilização desta tecnologia se referem ao uso de genótipos responsivos *in vitro*, estágio de desenvolvimento dos explantes, linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*, condições de infecção e co-cultivo, bem como os meios para indução de calos embriogênicos, seleção e regeneração de plantas. Este trabalho objetivou avaliar a possibilidade de transferência de genes em segmentos de pendão imaturo e calos embriogênicos de cinco genótipos de milho pré-selecionados *in vitro*. O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, de Bacteriologia e de Virologia da FAMV/UPF. Os explantes foram inoculados com a estirpe EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o plasmídeo pCambia 3301, o qual carrega os genes *gus* e *bar* sob controle do promotor CaMV 35S. Para a transformação foi utilizado o protocolo adaptado de Vega et al. (2008). Para avaliação da transferência do T-DNA foi utilizado o ensaio histoquímico para GUS (JEFFERSON et al., 1987) 10 dias após a infecção. Os explantes não inoculados com a *Agrobacterium tumefaciens* apresentaram background de coloração azul. Para distinguir a expressão do gene *gus* e do background foi realizada uma avaliação da intensidade de coloração, atribuindo diferentes notas (1-baixa, 5-média ou 10-alta). Dos pendões imaturos co-cultivado com *Agrobacterium tumefaciens* 91,2% apresentaram a coloração azul. Os pendões do genótipo H3MT-1 apresentaram intensidade superior ao controle e 53% dos pendões infectados deste genótipo apresentaram alta intensidade da cor azul, esta diferença entre controle e infectados não foi observada nos genótipos H3MT-2 e L2. A porcentagem de

calos do genótipo L2 que apresentaram coloração azul foi superior ao genótipo L20 e não diferiu do V4. Os genótipos L20 e V4 apresentaram intensidade de coloração semelhante aos seus controles, já no genótipo L2 a intensidade de calos infectados foi superior ao respectivo controle. Nesta linhagem a frequência de calos infectados com alta intensidade é o dobro da frequência dos controles, isto não foi observado nos genótipos L20 e V4. Para o genótipo L2 o explante calo embriogênico foi mais eficiente que o pendão imaturo na transferência do T-DNA. Os dados sugerem que foi possível transferir genes via *Agrobacterium tumefaciens* em pendões imaturos do genótipo H3MT-1 e em calos embriogênicos da linhagem L2 de milho.

Palavras-chaves: engenharia genética; vetor binário padrão, gene *gus*, pCambia 3301, EHA 105.

GENETIC TRANSFORMATION OF MAIZE IMMATURE TASSEL AND EMBRYOGENIC CALLUS VIA *Agrobacterium tumefaciens*

Marilia Rodrigues de Silva¹, Magali Ferrari Grando², Elene Yamazaki Lau³, Bibiane Lago de Castro⁴, Thomás Paulo Kazmirski⁵, Lizete Augustin⁶, Marilei Suzin⁷, Jurema Schons⁸, Norimar Denardin⁹

ABSTRACT

Plant genetic engineering opens new perspectives for the genetic improvement of maize (*Zea mays* L.), allowing gene transfer for superior genotypes development. The transformation by *Agrobacterium tumefaciens* has been the preferred method for this purpose. However, maize is considered the most recalcitrant crop to genetic transformation. The critical points to use this technology are

¹ Agronomist, Master student in Agronomy Graduation Program, Major in Plant Production at Department of Agronomy and Veterinarian Medicine - University of Passo Fundo (UPF).

² Advisor, Biologist, Ph.D. in Agronomy, Faculty member of Department of Agronomy and Veterinarian Medicine and Agronomy Graduation Program - University of Passo Fundo (UPF).

³ Forest Engineer. Dr. in Genetic and Breeding. Researcher at Embrapa Trigo- Passo Fundo (UPF).

⁴ Undergrad Student at Biological Science Institute- UPF

⁵ Undergrad Student at Department of Agronomy and Veterinarian Medicine - University of Passo Fundo (UPF).

⁶ Agronomist, Dr. in Agronomy. Faculty member of Department of Agronomy and Veterinarian Medicine - University of Passo Fundo (UPF).

⁷ Agronomist, Ms.C. Plant Biotechnology Laboratory. University of Passo Fundo (UPF).

⁸ Biologist, Dr. in Biology. Faculty member of Department of Agronomy and Veterinarian Medicine and Agronomy Graduation Program - University of Passo Fundo (UPF).

⁹ Biologist, Dr. in Agronomy. Faculty member of Department of Agronomy and Veterinarian Medicine and Agronomy Graduation Program - University of Passo Fundo (UPF).

relates to the use of *in vitro* responsive genotype, type and development stage of the explants, strains of *Agrobacterium tumefaciens*, conditions of infection and co-cultivation, as well as the culture media for embryogenic callus induction, selection and plant regeneration. This study aimed to evaluate the possibility of transferring genes in embryogenic calli and immature tassel of five maize genotypes pre-selected *in vitro*. The experiment was conducted at the Laboratory of Plant Biotechnology, Bacteriology and Virology at FAMV/UPF. The explants were infected with the strain EHA 105 of *Agrobacterium tumefaciens* containing the plasmid pCambia 3301 carrying the *gus* reporter and the *bar* marker genes controlled by the CaMV35S promoter. The protocol used was adapted from Vega et al. (2008). To evaluate the transfer of T-DNA to the inoculated tissues, it was used the GUS histochemical assay (JEFFERSON et al., 1987) 10 days after infection. The controls explants, not infected with *Agrobacterium tumefaciens*, showed a blue staining background. Thus, to distinguish the *gus* expression and the background, the intensity of blue staining was evaluated, assigning different scores (1-low, 5-average or 10-high blue staining). From the immature tassel co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens*, 91.2% presented blue staining. The tassels of H3MT-1 hybrid showed higher intensity compared to the control and 53% of infected tassels presented high blue staining intensity. This difference between control and infected tassels was not observed in H3MT-2 and L2 genotypes. The L2 genotype presented higher percentage of embryogenic calli presenting blue staining than L20 genotype, but did not differ from V4. The genotypes L20 and V4 had similar intensity of staining to their

controls, but the blue staining intensity of the infected calli of the L2 genotype was higher than the respective control. In this line, the frequency of embryogenic calli infected with high intensity was twice the frequency of control. This behavior was not observed for L20 and V4 genotypes. For the L2 genotype, embryogenic callus explants was more efficient than immature tassel in the transfer of T-DNA. The data suggest that was possible to transfer genes via *Agrobacterium tumefaciens* in immature tassel of H3MT-1 F1 hybrid and embryogenic calli of maize inbred line L2.

Key words: genetic engineering, standard binary vectors, *gus* gene, pCambia 3301, EHA 105

1 INTRODUÇÃO

Milho (*Zea mays* L.) é um dos três cereais mais importantes em nível de produção no mundo, sendo ainda considerado uma planta modelo de liliopsidas para os estudos de genética, genômica e biologia molecular (VEGA et al., 2008). A engenharia genética tem possibilitado aos melhoristas de plantas o acesso a novas fontes de variabilidade genética para o desenvolvimento de cultivares superiores (CARNEIRO et al., 2004). Além de genes de tolerância a herbicidas e resistência a insetos, estão sendo transferidos para o milho novos genes que conferem tolerância à seca, frio e salinidade (AL-ABED et al., 2006), melhoria do valor nutricional (CARNEIRO et al., 2004; GRANDO et al., 2005; ZHU et al., 2007; NAQVIA et al., 2009); produção de biocombustível (Spartan Corn III) (CIB, 2008), produção de diferentes compostos de valor industrial e biofarmacêutico (GIDDINGS et al., 2000, 2005; WOODARD et al., 2003; MA et al., 2005; LAW et al., 2006).

Plantas férteis de milho transgênico (*Zea mays* L.) foram produzidas pela primeira vez utilizando a biobalística (GORDON-KAMM et al., 1990), porém, segundo relatos recentes, a transformação do milho mediada por *Agrobacterium tumefaciens* oferece uma alternativa mais eficiente que a biobalística na transferência de transgenes em milho. Essa preferência é em grande parte devido às vantagens da transferência de T-DNA sobre os outros sistemas de distribuição de genes (FRAME et al., 2002).

O primeiro relato de plantas transgênicas de milho produzidas pelo método da *Agrobacterium tumefaciens* foi realizado por um

grupo de pesquisadores japoneses (ISHIDA et al., 1996) com a transformação de embriões imaturos do genótipo A188 de milho, e posteriormente por americanos (ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002, 2006; VEGA et al., 2008) e chineses (HUANG & WEI, 2005).

Pelo método de *Agrobacterium tumefaciens* é possível a integração de baixo número de cópias dos transgenes, geralmente uma ou duas (ISHIDA et al., 1996, 2007; ZHAO et al., 2001), o que favorece a expressão estável do gene (KLAEPER et al., 2001; VEGA et al., 2008). A transformação via *A. tumefaciens* apresenta eficiência relativamente alta, com padrão de inserção simples, integração mais precisa e intacta (sem rearranjos) e maiores níveis de expressão do transgene (HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 1998; SHOU et al., 2004; VEGA et al., 2008), herança estável e com padrão mendeliano (Potrykus apud SLUYS, 1999; SHOU et al., 2004, ZHANG et al., 2005) e ainda segmentos relativamente grandes de T-DNA podem ser integrados no genoma da planta.

Os pontos críticos para utilização desta tecnologia se referem ao uso de genótipos responsivos *in vitro*, ótimo estágio de desenvolvimento dos explantes, utilização de linhagens de *A. tumefaciens* competentes para transformação e condições de cultivo *in vitro* (SAIRAM et al., 2003; SHOU et al., 2004; HUANG & WEI, 2005; FRAME et al., 2006; VEGA et al., 2008).

Estirpes da agrobactéria desempenham um papel importante no processo de transformação, pois são responsáveis pela infecção e eficiência da transferência do T-DNA. Em milho vários relatos têm documentado uma diferença na eficiência de transformação quando se utilizam diferentes estirpes de *A. tumefaciens* (HUANG & WEI, 2005;

FRAME et al., 2006; VEGA et al. 2008). Até o estudo de Huang & Wei (2005) todas as transformações de milho por *A. tumefaciens* tinham sido realizadas utilizando a cepa LBA4404. Porém nesse estudo eles provaram que a estirpe EHA 105 foi superior (23,8%) a LBA4404 (18,3%) e GV3101(3,9%) nas condições analisadas. A melhoria da eficiência transformação de plantas, observados com EHA105 foi provavelmente devido ao aumento da indução da transferência de T-DNA pelos genes *vir*. Esta estirpe supervirulenta contém cópias extras de genes de virulência: *virB*, *virC*, e *virG* (SAIRAM et al., 2003). A linhagem EHA105 também foi mais adequada para transformação de outros cereais (RASHID et al., 1996).

Atualmente, os vetores binários são os mais utilizados quando se deseja utilizar o sistema de transformação de plantas por *A. tumefaciens* (SLUYS, 1999). Os vetores super binários apresentam cópias extra de *virB*, *virC*, e *virG* na sua constituição (KOMARI, 1990), e foram utilizados primeiramente em milho para infectar embriões zigóticos imaturos da linhagem modelo A188 (Ishida et al., 1996, 2007) e do híbrido modelo Hi-II (ZHAO et al., 2001). No entanto, estes plasmídeos são protegidos por patentes não podendo ser utilizados publicamente. Frame et al. (2002) foram os primeiros a relatar o uso de um sistema binário padrão (“standard binary vectors”) na produção de plantas férteis e com transformação estável, utilizando embriões imaturos de milho do genótipo Hi-II. A utilização de plasmídeos binários padrão resulta numa eficiência de transformação mais baixa (~5% a 8%) (FRAME et al., 2002; 2006) quando comparada com os vetores superbinários (5 a 30%) (ISHIDA et al, 1996) e (15 a 50%) (ISHIDA et al., 2007).

Alguns parâmetros modificados no processo de infecção e cultivo *in vitro* têm resultado num aumento de frequência de transformação. O uso da acetosiringona para induzir a região *vir* da agrabactéria, mostrou ter efeito positivo no aumento da eficiência na transformação de culturas de milho (ISHIDA et al., 1996; SAIRAM et al., 2003; DANILOVA & DOLGIKH, 2004; WANG et al., 2007). O uso de L-cisteína no meio de cultura tem aumentado significativamente a transformação do híbrido Hi-II empregando vetores binários padrão (FRAME et al., 2002; VEGA et al., 2008). A L-cisteína é um antioxidante que reduz a resposta hipersensível de alguns explantes infectados com *A. tumefaciens*, elevando a sobrevivência das células infectadas (FRAME et al., 2002). O emprego de 400 mg.L⁻¹ deste antioxidante aumentou a porcentagem de embriões imaturos expressando o gene *gus* (56%) comparado aos embriões cultivados na ausência deste antioxidante (17%) (FRAME et al., 2002). No entanto, para alguns genótipos testados a inclusão de L-cisteína reduziu a indução de calos embriogênicos (FRAME et al., 2006). De forma oposta, o nitrato de prata (AgNO₃), adicionado ao meio de cultura para elevar a frequência de indução de calos embriogênicos, pode reduzir a frequência de transformação dos explantes pela *A. tumefaciens* (ZHAO et al., 2001).

A redução da concentração de sais no meio de cultura, durante a infecção e co-cultivo, tem resultado num aumento da frequência de transformação (LEE et al., 2007; VEGA et al., 2008) e tem sido utilizada como estratégia adicional para melhorar a transferência do T-DNA, embora o preciso mecanismo de melhoramento da transformação não é compreendido.

Recentemente, uma equipe de pesquisadores da Universidade de Missouri (VEGA et al., 2008) desenvolveu um protocolo otimizado para a transformação do híbrido Hi-II de milho com agrobactéria utilizando plasmídeo binário pCambia 3301 que contém o gene repórter *gus* e o gene *bar* controlados pelo promotor CaMV-35S. Este protocolo apresenta ajustes nos meios de infecção e co-cultivo, como a utilização da metade da concentração dos sais N6, uso do tampão MES, nitrato de prata, L-cisteína e DTT (antioxidantes) em determinados estágios do processo de infecção e co-cultivo, além do ajuste do pH 5,2 para a infecção e 5,8 para meios seguintes. Estes ajustes resultaram num aumento da eficiência de transformação para 12% em média, sendo que a maior frequência obtida foi de 18%. Esta frequência é superior as obtidas por Frame et al. (2002; 2006) (5 a 8%), utilizando vetores binários padrão.

Estes parâmetros ressaltam a complexidade dos fatores envolvidos no processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, assim as condições relacionadas a estirpes, crescimento da bactéria e meios de cultura devem estar bem ajustadas.

Apesar do esforço e dedicação de diversos grupos de pesquisa, o milho, como em outras liliopsidas de importância agrícola, tem sido difícil de ser transformado geneticamente. O desenvolvimento de um protocolo eficiente de transformação inclui ainda, outros fatores importantes, como a identificação de explante transformável, de rápida proliferação *in vitro* e competência para a regeneração de plantas a partir de células transgênicas (SAIRAM et al., 2003). 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.

O explante preferencialmente utilizado para transformação e regeneração de plantas de milho *in vitro* tem sido o embrião imaturo (ISHIDA et al., 1996, 2007; LUPOTTO et al., 1998; ZHAO et al., 1998; 2001; FRAME et al., 2002, 2006; HUANG & WEI, 2005; LEE et al., 2007; VEGA et al., 2008). Outros explantes utilizado na transformação desta espécie via *A. tumefaciens* são o meristema apical (SAIRAM et al., 2003), calos embriogênicos (DANILOVA & DOLGIKH, 2005); sementes maduras partidas (AL-ABED et al., 2007) e sementes germinando em contato direto com a *A. tumefaciens* (WANG et al., 2007). Isso reflete a busca por explantes alternativos que possam ser rapidamente obtidos e não apresentam efeito genotípico tão predominante na resposta *in vitro* (AL-ABED et al., 2006).

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., Ishida et al., Lupotto et al., Lowe et al., apud FRAME et al., 2006).

Atualmente, a linhagem de milho A188 e seus híbridos (notavelmente o híbrido Hi-II), têm sido os genótipos mais utilizados na transformação genética do milho (ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; SHOU et al 2004; DANILOVA & DOLGIKH, 2004; VEGA et al., 2008), devido à alta capacidade embriogênica destes genótipos. O Híbrido Hi-II apresenta alta frequência de indução de calos embriogênicos friáveis (tipo II) de

crescimento rápido e altamente embriogênico (ARMSTRONG & GREEN 1985).

No entanto, um grande esforço tem sido dispensado na transformação de genótipos agronomicamente relevantes, como variedades, híbridos e linhagens importantes utilizadas em programas de melhoramento de milho. Até o momento, um número limitado de genótipos tem sido transformados usando o método da *Agrobacterium tumefaciens* (ISHIDA et al., 1996; 2007; SAIRAM et al., 2003; SHOU et al., 2004; DANILOVA & DOLGIKH, 2004; HUANG & WEI, 2005; LEE et al., 2007; FRAME et al., 2006).

Não há relatos na literatura sobre transformação de genótipos brasileiros de milho com agrobactéria. O desenvolvimento deste sistema de transformação possibilitará o uso da engenharia genética para o melhoramento do milho e o desenvolvimento agrícola do país.

Este trabalho objetivou avaliar a possibilidade de transferência de genes em segmentos de pendão imaturo e calos embriogênicos de cinco genótipos de milho, previamente selecionados para resposta *in vitro*, com a linhagem EHA 105 da *Agrobacterium tumefaciens*, portadora do plasmídeo pCambia 3301, utilizando um protocolo adaptado de Vega et al (2008).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (setor de Cultura de Tecidos e setor de Biologia

Molecular), Laboratório de Bacteriologia e Virologia da Faculdade de Agronomia da Universidade de Passo Fundo no período de dezembro de 2008 à fevereiro de 2009.

2.2 Material vegetal

Para avaliar o potencial de transformação genética pelo método da *Agrobacterium tumefaciens* nos explantes calo embriogênico e segmentos de pendão imaturo foram utilizados os genótipos de milho listados no quadro 1.

Quadro 1. Explantes utilizados para a transformação e respectivos genótipos com seus programas de origem. Passo Fundo, FAMV, 2009.

Explantes	Genótipos	Origem
Calo embriogênico	L2 (Linhagem PF963027)	Embrapa Trigo
	L20 (Linhagem MF14G4)	Universidade da Florida
	V4 (Variedade BR 451)	Embrapa Milho e Sorgo
Pendão imaturo	L2 (Linhagem PF963027)	Embrapa Trigo
	H3MT-1 (L2XL20)	LBV*/UPF
	H3MT-2 (L20XL2)	LBV*/UPF

* Laboratório de Biotecnologia Vegetal, FAMV/UPF.

2.3 Obtenção dos explantes

Os genótipos de milho doadores dos pendões imaturos foram cultivados em telado. Plantas com cerca de cerca de 6-7 semanas, semeadas no solo, foram coletadas para obtenção do pendão imaturo, conforme descrito por Songstad et al. (1992). Após a remoção das

folhas externas foi realizada uma desinfecção rápida e superficial com álcool 70%, as folhas que cobrem o pendão imaturo foram removidas em câmara de fluxo laminar e pendões imaturos medindo 1-2 cm foram utilizados para infecção com *Agrobacterium tumefaciens*.

Para obtenção dos calos embriogênicos, pendões imaturos de 2-3 cm foram cortados em segmentos de 5mm e cultivados em placas de petri, (100 x. 15mm) contendo 25 ml de meio de indução de calo (N6 - Chu et al. (1975)), sendo subcultivados a cada 21 dias, por 10 meses. Calos embriogênicos foram selecionados e fragmentados em 5mm de diâmetro para serem utilizados nos experimentos de transformação genética.

2.4 Estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* e vetores

Foi utilizada para transformação a *Agrobacterium tumefaciens* estirpe supervirulenta EHA105 (HOOD et al. 1986), contendo o vetor binário padrão pCambia 3301 (CAMBIA, Austrália) (Figura 1). Este material foi gentilmente cedido pelo Dr. Luiz Gonçalves Esteve Vieira (IAPAR, Londrina, PR). O plasmídeo pCambia 3301 contém, no seu T-DNA, o gene repórter *gus* (JEFFERSON et al., 1987) que codifica a β -glucuronidase (GUS), contendo um íntron que impede sua expressão em bactéria e o gene *bar* (DEBLOCK et al., 1987), que codifica fosfinotricina acetiltransferase (PAT), ambos controlados pelo promotor constitutivo CaMV-35S (Figura 1).

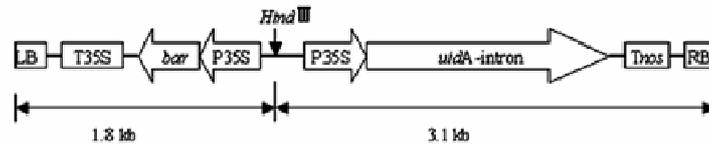


Figura 1. Representação esquemática do T-DNA (4,9 Kb) do pCambia 3301, contendo os genes *gus* (*UidA*) e *bar*. LB e RB - bordas esquerda e direita do T-DNA, respectivamente; P35S e T35S- promotor e terminador CaMV 35S, respectivamente; *bar*- região codificadora do gene fosfinotricina acetiltransferase, o qual determina resistência ao herbicida basta; *Int-gus* (*Uida*)- gene da β -glucuronidase contendo intron; Tnos- terminador nopaline sintase. Fonte: Huang & Wei (2005).

2.5 Confirmação da presença do pCambia 3301 na *Agrobacterium tumefaciens* EHA105

Antes do trabalho ser iniciado, a confirmação da presença do plasmídeo pCambia 3301 na linhagem EHA 105, foi realizada pela amplificação do gene *gus* por PCR. O plasmídeo isolado da *Escherichia coli* (DH 5 α) foi utilizado como controle positivo. Com um palito foi coletado uma colônia da *A. tumefaciens* crescida em meio de cultura LB e acrescentada diretamente no tubo de PCR. Um fragmento de 643 pb do gene *gus* foi amplificado utilizando os primers GusRev 647-AGTTCAACGCTGACATCACC e GusFor 4-TTACGTCCTGTAGAAACCCC. As reações de amplificação de PCR continham 1 μ L de DNA; 2 μ L da mistura de dNTP a 2,5 mM de cada nucleotídeo; 2 μ L de MgCl; 5 μ L Tampão (5X); 0,25 μ L da Taq polimerase (5U por μ L); 1 μ L do primer 1; 1 μ L primer 2 em 25 μ L do volume final. A reação de amplificação foi efetuada através do termociclador (MiniciclerTM-MJ Research), com um ciclo de 95°C por 5

min, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (30'') (desnaturação), 52°C por 30 segundos (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão), uma extensão final de 72°C por 5 minutos. O produto amplificado foi separado em eletroforese de gel agarose 0,5% a ~110 V por 90 min e corado com brometo de etídio. O produto da amplificação do PCR foi a visualizado em gel de agarose em transluminador (Ultraviolet transluminator-Spectroline) com lâmpada ultravioleta (254 nm) (Figura 2).

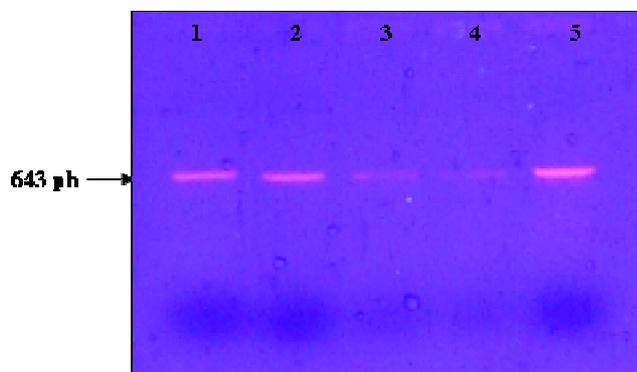


Figura 2. Análise de PCR confirmando a presença do gene *gus* na *Agrobacterium tumefaciens* estirpe EHA 105. Linha 1: plasmídeo pCambia 3301 (controle positivo), linhas 2, 3, 4 e 5: diferentes colônias da estirpe EHA 105 da *Agrobacterium tumefaciens*. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

2.6 Protocolo de Transformação

O processo de transformação foi dividido em quatro etapas sequenciais: infecção, co-cultivo, descanso e seleção, sendo que o protocolo utilizado foi baseado no protocolo desenvolvido por Vega et al. (2008). Adaptações foram realizadas para acomodar diferenças de explantes e genótipos empregados neste estudo.

2.6.1 Formulações dos meios de cultura

Os meios utilizados para infecção e cultivo *in vitro* foram adaptados de Zhao et al. (1998), Frame et al. (2002) e Vega et al. (2008), com algumas modificações, e estão listados no quadro 2. Este protocolo apresenta ajustes importantes realizados por pesquisadores da Universidade de Missouri (VEGA et al., 2008), como o emprego de 50% dos sais do meio básico N6 (CHU et al. 1975) em ambos meios de inoculação e co-cultivo e a adição de L-cisteína no meio de co-cultivo (FRAME et al., 2002).

Quadro 2. Meios de cultura usados nas diferentes etapas da transformação de calos e pendões imaturos de diferentes genótipos de milho com a linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*, EHA 105:pCambia. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

Componentes (1 L)	Meio Infecção	Meio Co-cultivo	Meio Descanso	Meio Seleção 1	Meio Seleção 2
Sais do meio básico N6	50%*	50%*	100%	100%	100%
Vitaminas Ericson**	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml
Sacarose	68,5g	30g	30g	30g	30g
Glicose	36mg	-	-	-	-
L-prolina	0,7g	0,7g	2,88g	2,88g	2,88g
MES	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g
2,4-D	1mg	1mg	2mg	2mg	2mg
L-cisteína	-	0,4g	-	-	-
Phytigel	-	2g	2g	2g	2g
Ajuste de pH (KOH)	5,2	5,8	5,8	5,8	5,8
Nitrato de prata (AgNO ₃)	-	10µM	10µM	-	-
Acetossiringona	100mM	100mM	-	-	-
Cefotaxima	-	-	250mg	250mg	250mg
BASTA	-	-	-	3 mg	5 mg

Meio básico N6 (Chu, et al., 1975); *Metade da concentração dos sais N6; **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); MES (Ácido sulfônico 2-(4-morfolino)-etano); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

O pH dos meios foi ajustado com KOH (hidróxido de potássio) antes da autoclavagem. A acetossiringona, Cefotaxima, Basta e o AgNO_3 foram adicionados após a autoclavagem, sendo que este último foi esterilizado por filtração.

2.6.2 Cultivo da *Agrobacterium tumefaciens*

A *Agrobacterium tumefaciens* estirpe EHA105 (contendo o plasmídeo (pCambia3301) foi multiplicada em meio LB sólido suplementado com o antibiótico canamicina (50 mg.L^{-1}) a partir do estoque em glicerol mantido a -20°C . A placa contendo a bactéria foi incubada a 28°C por até 3 dias no escuro onde colônias isoladas foram desenvolvidas. Uma colônia única foi semeada novamente no mesmo meio fresco, sendo incubada sob as mesmas condições, até que as colônias bacterianas estivessem desenvolvidas plenamente.

Desta placa foram colhidos dois “loops” completos com a alça de platina e ressuspensos em 50ml de meio Rhizo líquido com o antibiótico canamicina (50 mg.L^{-1}) (Quadro 3). Esta cultura (figura 3a) foi posicionada em um shaker por 16 horas a aproximadamente 150 rpm (rotações por minuto) aquecido a 28°C .

Quadro 3. Meios de cultura utilizados para crescimento da *Agrobacterium tumefaciens*. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

Meios	Composição
LB sólido	10 g.L ⁻¹ de NaCl, 10 g.L ⁻¹ de triptona, 5 g.L ⁻¹ de extrato de levedura, 15 g.L ⁻¹ de ágar.
RHIZO líquido	5 g.L ⁻¹ de extrato de levedura; 0,5 g.L ⁻¹ de caseína ácida hidrolisada; 8 g.L ⁻¹ manitol; 2 g.L ⁻¹ de (NH ₄)SO ₄ ; 5 g.L ⁻¹ NaCl; pH 6,6.

2.6.3 Infecção, co-cultivo e descanso

Após o crescimento das bactérias conforme descrito no item anterior, estas foram centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos (Figura 3b) e posteriormente foram ressuspensas em meio de infecção listados no quadro 3 até densidade ótica de OD₆₀₀ = 0,5. A densidade ótica foi medida em espectrofotômetro (Figura 3c). O meio de infecção possui 100µM de acetossiringona para estimular a transferência do T-DNA para a célula vegetal.

Os explantes, calo embriogênico e pendão imaturo foram colocados em contato com a suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* (em meio de infecção) por 20 minutos (Figura 3d), sendo posteriormente secados em papel filtro a fim de retirar o excesso da solução (Figura 3e) e transferidos para uma placa de petri contendo 25 ml de meio de meio de co-cultivo (Quadro 3), a placa foi selada com parafilme e mantidas por 3 dias no escuro na temperatura de 22°C (Figura 3f,h). O meio de co-cultivo é suplementado com 100µM de

acetosiringona, 4g.L^{-1} de L-cisteína; $10\mu\text{M}$ de Nitrato de prata (AgNO_3), a sacarose é reduzida para 30g.L^{-1} e a glicose é ausente.

O passo seguinte foi a transferência dos explantes para placas de petri contendo 25 ml de meio descanso (Quadro 3), estas placas foram seladas e incubadas por 7 dias no escuro a 22°C (Figura 3 g,h). Este meio não contém acetosiringona e é acrescido de 250mg.L^{-1} de cefotaxima, para eliminar a *A. tumefaciens*.

Após a etapa de descanso os explantes foram transferidos para meio contendo o agente seletivo 3mg.L^{-1} de BASTA, um herbicida que contém o ingrediente ativo ppt (Quadro 3).

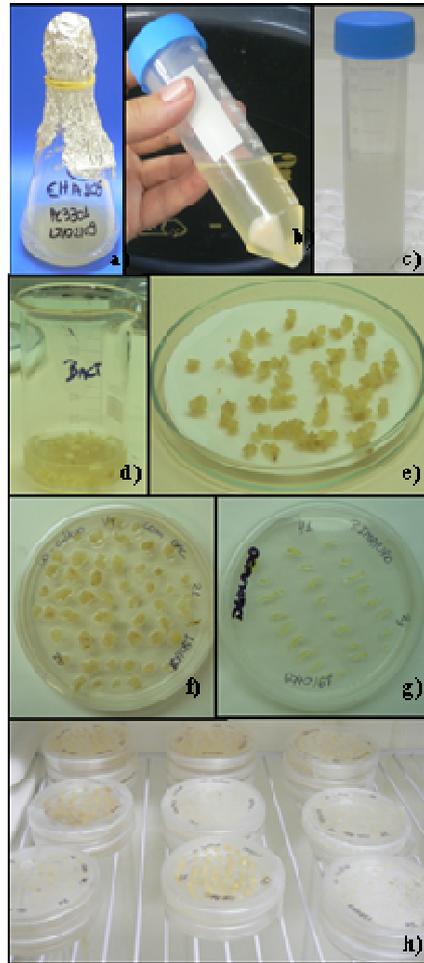


Figura 3. Etapas da transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. a) *Agrobacterium tumefaciens* crescida em shaker a 28°C por 16 horas; b) Pellet de *Agrobacterium tumefaciens* formado após a centrifugação; c) ressuspensão da *Agrobacterium tumefaciens* em meio de infecção; d) explantes submersos em meio de infecção contendo *Agrobacterium tumefaciens* por 20 minutos. e) explantes sobre papel filtro para a retirada do excesso de solução. f e g) explantes inoculados em meio de co-cultivo por 3 dias e descanso por 7 dias, respectivamente. h) placas contendo os explantes em câmara BOD com temperatura controlada (22°C). Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

2.7 Avaliação, delineamento experimental e análise estatística

Para detecção da transferência do T-DNA em segmentos de pendões imaturos e calos embriogênicos de milho, foi utilizado o ensaio histoquímico para β -glucuronidase (JEFFERSON et al., 1987) o qual é um indicativo da expressão do gene *gus* presente no T-DNA do plasmídeo pCambia 3301.

No décimo dia após a infecção (VEGA et al., 2008) calos embriogênicos e segmentos de pendão imaturo foram submetidos ao teste utilizando a seguinte solução: 50mM de Ferrocianeto de potássio; 50 mM de Ferrocianeto de potássio; 0,5 M de NaPO₄ (pH 7,0); 0,5 M de EDTA, Triton 10% (10ml/100ml) e o substrato X-Glic (dissolvido a 2,5mg.L⁻¹ em 10 μ l de DMF (dimetil formamida). Os explantes foram expostos a esta solução por 16 horas a 37°C.

Foi avaliada a frequência de explantes *gus* positivos em relação ao número total de explantes avaliados. A intensidade da coloração azul foi avaliada através da atribuição de valores, onde valor 1 representava a intensidade fraca, valor 5 a intensidade mediana e valor 10 intensidade alta.

O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado com 6 repetições para cada tratamento. Para o experimento com calos embriogênicos, a unidade experimental foi uma placa de petri contendo 50 calos de 5mm de diâmetro. Para o experimento com pendão imaturo, a unidade experimental foi uma placa contendo 25 segmentos de 5mm de comprimento.

Nestes experimentos, também foram utilizados controles negativos (explantes não infectados) para monitoramento da transformação e análise da influência dos meios utilizados na capacidade embriogênica do explante nos estágios futuros.

Para análise histoquímica de GUS, uma amostra representativa dos explantes (20 calos embriogênicos e 10 segmentos de pendão imaturo por repetição) foi utilizada.

A eficiência de transformação com *gus* dos diferentes genótipos foi comparada em cada explante isoladamente. Para comparação da eficiência de transformação dos diferentes explantes foi utilizado o genótipo L2, o qual foi o genótipo utilizado nos dois experimentos.

Para análise estatística foi utilizado a ANOVA, sendo a diferença das médias comparadas pelo teste F na comparação entre controles e explantes co-cultivados com a *Agrobacterium tumefaciens* ou pelo Teste Tukey a 5% de significância nas demais comparações.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 *Transformação de segmentos de pendões imaturos com Agrobacterium tumefaciens*

A expressão do gene *gus* através do teste histológico da β -glucuronidase, enzima produzida pelo referido gene, tem sido amplamente utilizada para monitorar a transferência do T-DNA em várias espécies, inclusive no milho (SHEN et al., 1993; ISHIDA et al., 2007; VEGA et al., 2008). Para tal, tem sido utilizado a porcentagem

de explantes apresentando a coloração azul ou ainda a porcentagem da área do explante apresentando tal característica.

No presente experimento, em média 91,2% dos pendões imaturos co-cultivado com *Agrobacterium tumefaciens*, apresentaram a coloração azul, não havendo diferença estatística entre os genótipos ($p=0,1707$). A coloração azul foi observada também em 83,3% dos controles (pendões não infectados).

Este background, ou seja a expressão de um gene semelhante ao *gus* (“*gus* like gene”), não é comum, porém já foi relatado especialmente em órgãos reprodutivos (Plegt & Bino, Hu et al., Hodal et al., apud LACORTE, 1998). No entanto, este background tende a ser de um azul claro (Giancarlo Pasquali, comunicação pessoal) e portanto menos intenso, quando comparado à expressão do gene *gus*, o qual produz um azul índico intenso na presença do seu substrato.

Para separar estes eventos, foi avaliada a intensidade de coloração, atribuindo-se uma nota para este fim (1, 5 ou 10) (Figura 4).



Figura 4. Níveis de intensidade da cor azul resultante do teste histoquímico de GUS utilizado para classificar a baixa intensidade (valor 1), intensidade média (valor 5) e alta intensidade (valor 10) em segmentos de pendões imaturos. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

Em média, os pendões infectados dos genótipos H3MT-2 e L2, apresentaram um valor de intensidade média semelhante aos seus respectivos controles (Figura 5). No entanto, os segmentos de pendões do genótipo H3MT-1 infectados com a *A. tumefaciens*, apresentaram intensidade média superior (7,1) que a observada no controle não infectado (3,4) ($p=0,06$) (Figura 5).

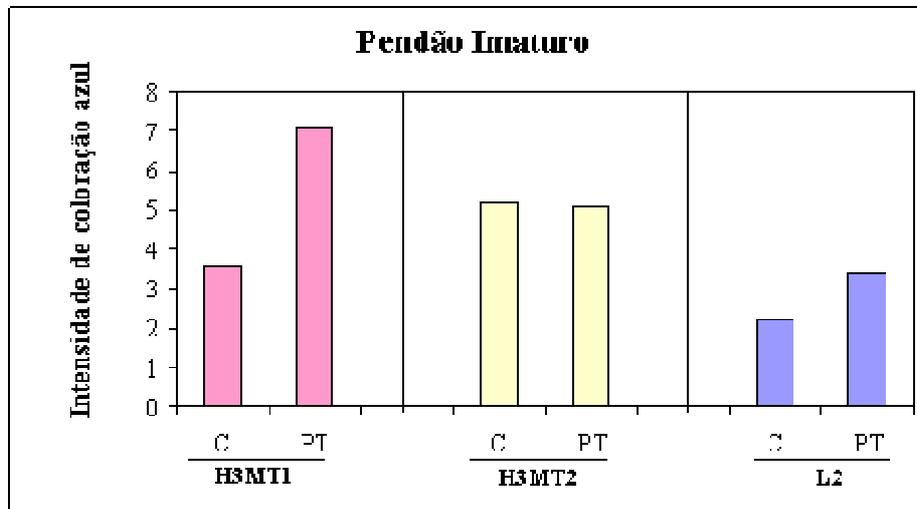


Figura 5. Intensidade de coloração azul observada após teste histoquímico de GUS em pendões imaturos co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 (pCambia 3301) (PT) e controles não infectados (C) de diferentes genótipos de milho. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

A porcentagem das diferentes categorias de intensidade observada em pendões do genótipo H3MT-1 co-cultivado com *Agrobacterium tumefaciens* e pendões controles é mostrada na figura 6. Aproximadamente 53% dos pendões infectados apresentaram alta intensidade da cor azul, sendo enquanto que somente 20% dos controles apresentavam esta característica. Inversamente, a maioria dos pendões controles foi classificada como de baixa intensidade.

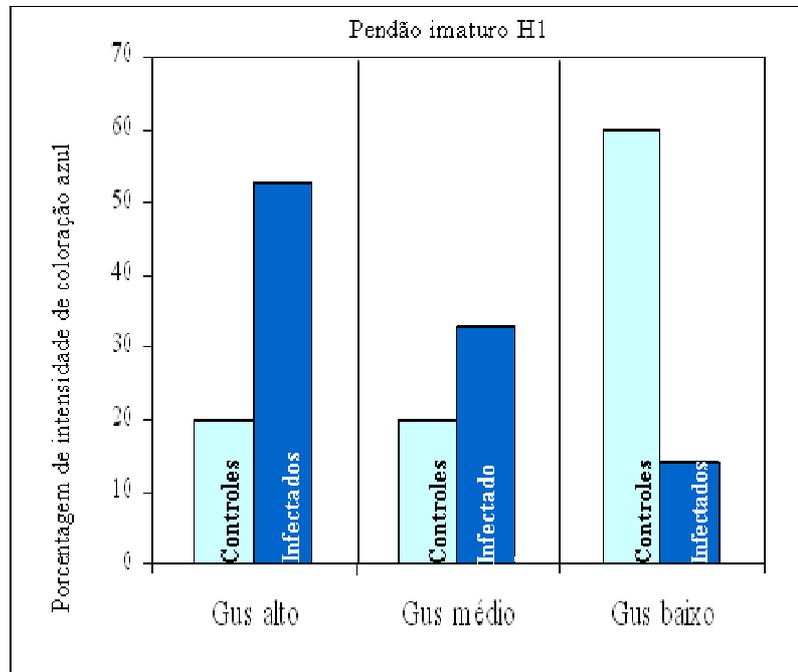


Figura 6. Porcentagem de pendões imaturos infectados e controle do genótipo H3MT-1 que apresentaram as diferentes categorias de intensidade de cor azul (alto, médio e baixo) após teste histoquímico de GUS. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

A figura 7 mostra aspectos dos segmentos de pendão imaturo do controle após o teste histoquímico de GUS, mostrando que a maioria destes segmentos apresentam baixa intensidade de cor azul (representando background) (Figura 7 a,b) e pendões imaturos co-cultivado com *A. tumefaciens*, mostrando que a maioria dos segmentos apresentam alta intensidade de cor azul (Figura 7c,d). Este comportamento não foi observado nos outros dois genótipos de milho utilizados nestes experimentos (Linhagem L2 e Híbrido H3MT-2).

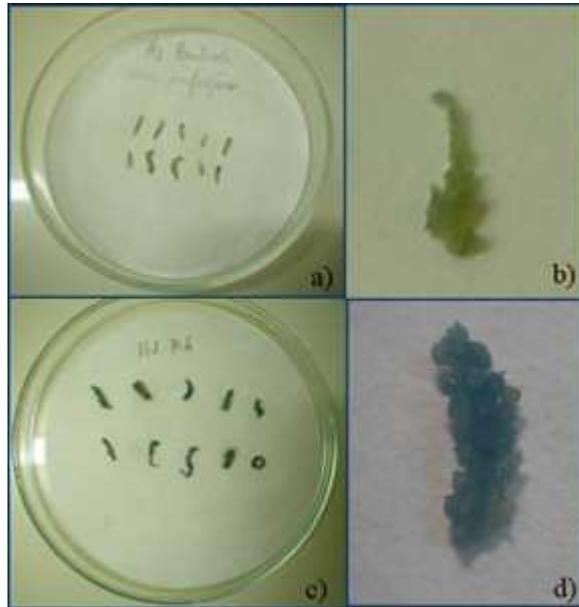


Figura 7. Aspectos dos segmentos de pendão imaturo submetidos ao teste histoquímico de GUS. a) Repetição do controle; b) aspecto pendão imaturo do controle, c) Repetição dos infectados; d) aspecto pendão imaturo co-cultivado com *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 (pCambia 3301). Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

Estes resultados sugerem que pendões imaturos do híbrido H3MT-1 podem estar expressando o gene *gus* devido à transferência do T-DNA do plasmídeo pCambia 3301. Calos resistentes ao herbicida, obtidos em etapas subsequentes da seleção, devem ser avaliados molecularmente para confirmação da introdução do gene *gus* e obtenção da frequência de transformação estável.

O híbrido H3MT-1 foi produzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal a partir do cruzamento entre duas linhagens responsivas *in vitro*, a linhagem L2 do programa de Melhoramento de

milho da Embrapa Trigo e linhagem L20, do programa de melhoramento de milho da Universidade da Florida como demonstrado no capítulo II.

A Linhagem L2 não apresentou pendões expressando alta intensidade de cor azul, e o Híbrido H3MT-2 não diferiu dos controles em relação a frequência das diferentes categorias de intensidade (dados não mostrados). Isso sugere diferenças genótípicas na capacidade de infecção com *Agrobacterium tumefaciens* destes explantes.

A influência do genótipo receptor na transferência do T-DNA foi primeiramente relatada em milho por Shen et al. (1993). Estes autores avaliaram a expressão do gene *gus* em explante meristemas apicais de 5 genótipos co-cultivados com duas linhagens de bactérias e diferentes plasmídeos e apontaram genótipos competentes e não competentes para a transferência do T-DNA.

O dados sugerem que pendão imaturo pode ser um explante eficiente na transformação do milho.

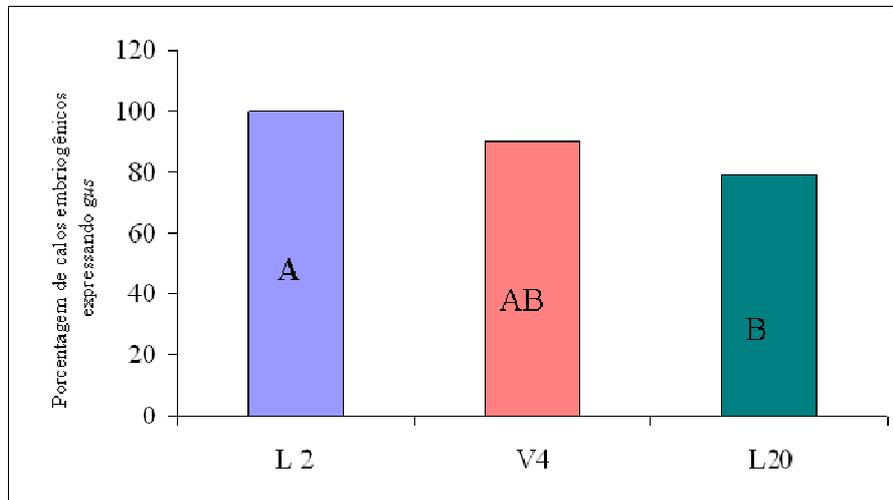
Não há relatos da transformação de milho utilizando pendões imaturos. No entanto, em sorgo, Carvalho et al. (2004) não obtiveram sucesso na utilização deste explante. Inflorescências imaturas de sorgo, depois de cortadas ou lesionadas, produziram compostos tóxicos, que inibem o crescimento da *Agrobacterium tumefaciens* durante o co-cultivo.

Embora a transformação do milho tenha sido realizada utilizando diferentes explantes alvos como o embrião imaturo, meristemas apicais (SAIRAM et al., 2003), calos embriogênicos (DANILOVA & DOLGIKH, 2005); sementes maduras partidas (AL-

ABED et al., 2007) e sementes germinado em contato direto com a *Agrobacterium tumefaciens* (WANG et al., 2007). O explante preferencial para transformação desta espécie via *Agrobacterium tumefaciens* é o embrião imaturo de aproximadamente 2mm de comprimento (ISHIDA et al., 1996, 2007; LUPOTTO et al., 1998; ZHAO et al., 1998; 2001; FRAME et al., 2002, 2006; HUANG & WEI, 2005; LEE et al., 2007; VEGA et al., 2008). No entanto, o pendão imaturo, apresentando inflorescências em estágio pré-meiótico, apresenta a vantagem de ser mais fácil e rapidamente obtido, pois não há necessidade da polinização, fertilização e desenvolvimento do embrião.

3.2 Transformação de calos embriogênicos obtidos de pendões imaturos com *Agrobacterium tumefaciens*

Calos embriogênicos de três genótipos de milho foram infectados e co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105: pCambia 3301 e após 10 dias da infecção (após o estágio de descanso), foi realizado o teste histológico para GUS. Foi observada diferença significativa ($p=0.0146$) na frequência de calos expressando a cor azul entre os genótipos. A porcentagem de calos embriogênicos do genótipo L2 que apresentaram coloração azul foi superior (100%) ao genótipo L20 (79,2%), não diferindo do genótipo V4 (90%) (Figura 8).



* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

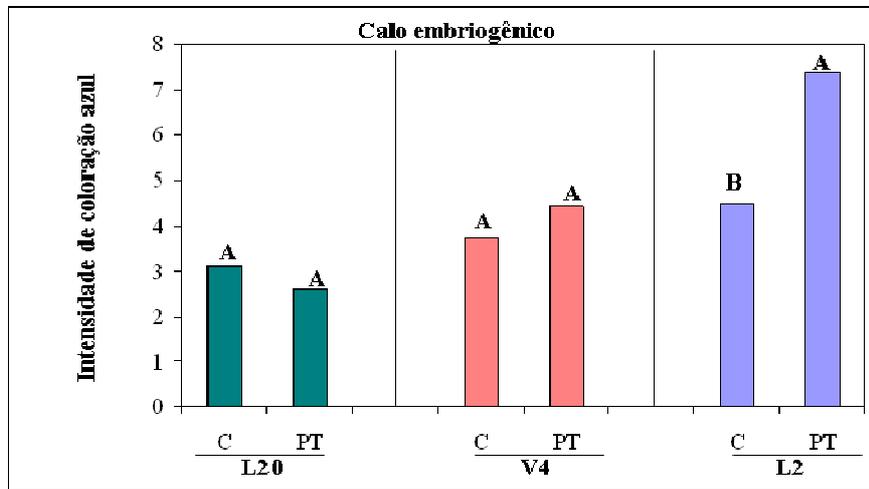
Figura 8. Porcentagem de calos embriogênicos dos diferentes genótipos de milho expressando cor azul após teste histoquímico de GUS. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

A coloração azul foi observada também em 85 % dos controles (calos não infectados), demonstrando a existência de background. Portanto, a classificação da intensidade de coloração também se fez necessária na avaliação destes dados. Os níveis de intensidade e notas atribuídas são apresentadas na figura 9.



Figura 9. Níveis de intensidade da cor azul resultante do teste histoquímico de GUS utilizado para classificar a baixa intensidade (valor 1), intensidade média (valor 5) e alta intensidade (valor 10) dos calos embriogênicos de milho. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

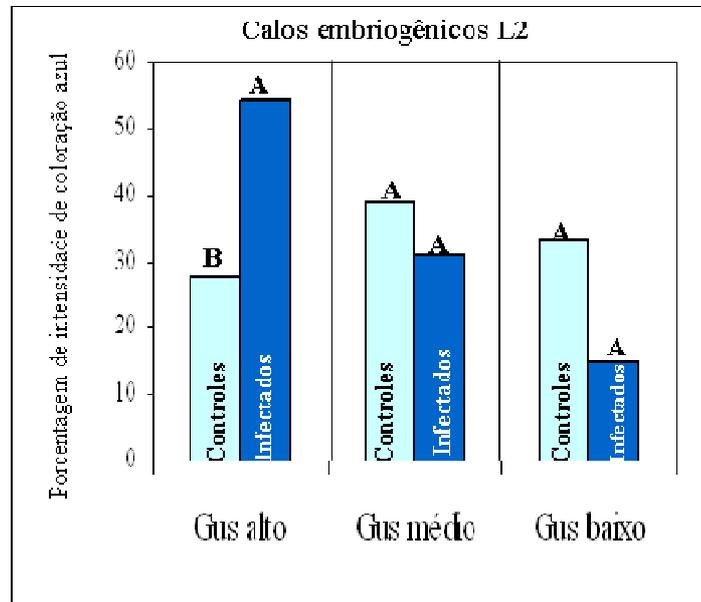
Os genótipo L20 e V4 apresentaram intensidade de coloração pelo teste histoquímico de GUS semelhante aos respectivos controles (Figura 10). Já, os calos embriogênicos do genótipo L2 co-cultivado com *Agrobacterium tumefaciens* apresentaram uma intensidade superior (7,4) ao controle não infectado (4,4) ($p=0,0071$) (Figura 10).



* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo F teste ($p=0,05$).

Figura 10. Intensidade coloração azul observada após teste histoquímico de *gus* em calos embriogênicos de diferentes explantes co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 (pCambia 3301) (PT) e controles não infectados (C) de diferentes genótipos de milho. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

A porcentagem das categorias de intensidade observada em calos embriogênicos da linhagem L2 co-cultivada com *Agrobacterium tumefaciens* e controle pode ser observada na figura 11. A frequência de calos infectados apresentando alta intensidade é o dobro (54,2%) da frequência de calos controles (27,8%) apresentando alta intensidade da coloração azul, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,0035$). Da mesma maneira, o controle apresenta o dobro de calos de coloração azul claro (baixa intensidade: 33%), comparada ao infectado (15%) (Figura 11).

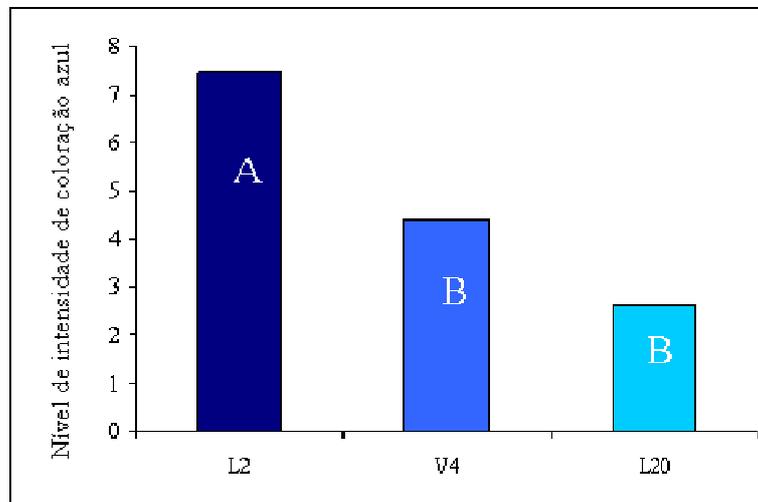


* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo F teste ($p=0,05$).

Figura 11. Porcentagem de calos embriogênicos infectados e controle do genótipo L2 que apresentaram as diferentes categorias de intensidade de cor azul (alto, médio e baixo) após teste histoquímico de GUS. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

Este comportamento não foi observado nos outros dois genótipos de milho utilizados nestes experimentos (Linhagem L20 e Variedade V4), sugerindo diferenças genotípicas na capacidade de infecção do calo embriogênico de milho.

Da mesma forma, quando foi avaliado o nível de expressão da coloração azul dos calos embriogênicos entre os genótipos, a linhagem L2 (7,44) se mostrou superior à variedade V4 (4,41) e a linhagem L20 (2,61) (Figura 12).



*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Figura 12. Nível de intensidade de coloração azul observada após teste histoquímico de *gus* em calos embriogênicos de diferentes explantes dos genótipos de milho. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

A Figura 13 mostra aspectos dos calos embriogênicos da linhagem L2 expressando a cor azul em alta intensidade, sugerindo o sucesso na transferência do gene *gus* via *Agrobacterium tumefaciens*.

A linhagem L2 pertence ao programa de melhoramento de Milho da Embrapa Trigo e foi o genótipo mais responsivo para a cultura *in vitro* em experimentos realizados pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF, quando se comparou com aproximadamente 50 outros genótipos de milho (VARNIER, 2004; GRANDO et al., 2005).

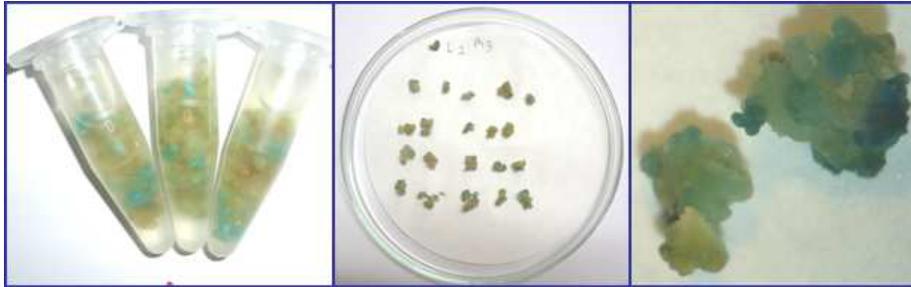
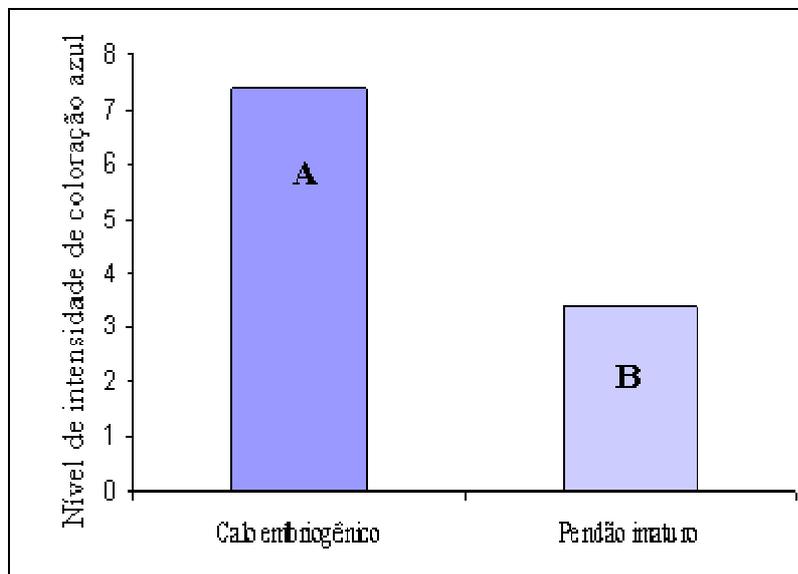


Figura 13. Expressão da coloração azul em calos embriogênicos submetidos ao teste histoquímico de GUS em calos embriogênicos da linhagem L2 de milho. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

Para este a linhagem L2, o explante calo embriogênicos foi mais eficiente que o pendão imaturo na transferência do T-DNA, visto que o nível de expressão de *gus* observados em calos embriogênicos (7,4) foi superior ao pendão (3,4) (Figura 14). Para pendão, não foi observado nenhum explante com nível 10 de expressão neste genótipo. Estes dados indicam que o calo embriogênico pode ser um explante facilmente transformável para este genótipo. Isso pode refletir diferenças na afinidade da *Agrobacterium tumefaciens* em diferentes tecidos e estruturas celulares. Uma série de eventos moleculares devem ocorrer para que a bactéria se ligue a célula vegetal, forme o poro de transferência e transfira seu T-DNA para o citoplasma e núcleo da célula hospedeira. A transformação dos calos embriogênicos será confirmada através de testes moleculares em calos resistentes resultantes do processo de seleção.



*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Figura 14. Nível de intensidade coloração azul após teste histoquímico de GUS em calos embriogênicos e pendões imaturos da linhagem L2 co-cultivada com *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 (pCambia 3301). Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

Segundo Danilova & Dolgikh (2004), calos embriogênicos podem ser uma alternativa de explante na transformação de milho via *Agrobacterium tumefaciens*. Este explante apresenta a vantagem de poder ser manipulado o ano todo, enquanto outros explantes, como o embrião imaturo, tem um período determinado de obtenção, ou seja, uma ou duas vezes por ano. Ainda, o embrião deve ter de 1 a 2 mm de comprimento, obtidos de plantas saudáveis crescidas em condições ambientais controladas para que estes embriões sejam infectados eficientemente (ISHIDA et al., 2007). Carvalho et al. (2004) coloca que quanto maior o tempo de permanência do explante na cultura de

tecidos, maior a sua sobrevivência após co-cultivo, isto também é uma característica interessante para o explante calo embriogênico.

Lupotto et al. (1998) também utilizaram calos embriogênicos em seus experimentos, mas este tecido apresentou problemas de necrose e dificuldade na recuperação do crescimento após a infecção com *Agrobacterium tumefaciens*.

Calos embriogênicos também foram utilizados na transformação de arroz (*Oryza sativa* L.) por Hiei et al. (1994). Estes autores utilizaram diferentes explantes (meristema apical, segmentos de raízes de plântulas jovens, escutelo e células em suspensão induzidos de escutelo, embriões imaturos e calos de raízes jovens e escutelo), sendo que os calos de escutelo tiveram alta capacidade de transformação, propagação e regeneração e produziram a maior frequência de tecidos transformados e resistentes a higromicina (23%).

Estas tentativas demonstram a busca por explantes alternativos que possam ser rapidamente obtidos para tornar o processo de transformação mais independente das estações do ano.

O plasmídeo binário pCambia 3301 contém o gene repórter *gus* (JEFFERSON et al., 1987) que codifica a β -glucuronidase (GUS). Este gene, neste plasmídeo, contém um intron o que impede sua expressão na bactéria, sendo útil na marcação de transformação em plantas (SHEN et al., 1993; HUANG & WEI, 2005).

A enzima β -glucuronidase, na presença de seu substrato X-Gluc produz um precipitado de cor azul índico, facilitando a visualização das células que receberam o gene. O gene *gus* tem sido amplamente utilizado para monitorar experimentos de transformação

em milho via *Agrobacterium tumefaciens*. A expressão do gene *gus* pode ser detectada horas após a transformação sendo útil desta forma na determinação da frequência de transformação transiente, ou seja, a expressão temporária do transgene, o qual ainda pode não ter se inserido no genoma da planta. A expressão do transgene é considerada estável quando o gene já se encontra inserido no DNA, sendo capaz de ser transmitido para a descendência celular. No presente experimento, o teste histológico de GUS foi realizado dez dias após a infecção, sendo que a transformação já é um evento estável neste período.

Ao contrário do que foi observado, normalmente não são encontradas atividade endógena do gene *gus* em tecidos de milho e outras liliopsidas não transformados (SHEN et al., 1993; WEN et al., 2004; CARVALHO et al., 2004; HUANG & WEI, 2005; VEGA et al., 2008).

No presente trabalho, utilizamos, no lugar de X-Gluc um substrato similar, o X-Glic. Este substrato também foi utilizado por Zhao et al. (1998) e Ribas et al. (2006), sem problemas de background. Segundo Kosugi et al. apud Ribas et al. (2006) o uso de 20% metanol no ensaio de *gus* poderá evitar eventuais atividades endógenas de *gus*.

Algumas plantas ou tecidos, particularmente órgão reprodutivos apresentam atividade similar a do *gus* (Plegt & Bino, Hu et al., Hodal et al. apud LACORTE, 1998). Na maioria das vezes esta atividade endógena esta sob controle de um promotor forte. No entanto, dependendo do promotor utilizado e do tipo de tecido, a atividade endógena de *gus* pode ser até mais elevada do que a

resultante da expressão do gene marcador, o que interfere nas análises (Twell et al. apud LACORTE, 1998).

A expressão do gene *gus* é considerada apenas como uma evidencia da transformação, não sendo suficiente como prova definitiva da integração do gene *gus* no genoma da planta (Potrikus apud LACORTE, 1998). Nos experimentos desenvolvidos por Ishida et al. (1996), a maior parte dos calos expressaram *gus* após o co-cultivo, mas poucos calos eram resistentes ao herbicida fosfinotricina (ppt). Segundo estes autores, os dados de expressão do *gus* nem sempre ajudam a ajustar os parâmetros de infecção, pois é relativamente fácil conseguir condições para boa expressão para o gene reportes *gus*, mas calos resistentes a herbicidas é um evento mais raro.

3.3 Seleção dos calos embriogênicos resistentes à herbicida

Os tecidos submetidos à transformação devem passar por um processo de seleção que permita que somente as células transformadas se multipliquem e dêem origem a plantas modificadas geneticamente. O gene *bar* tem sido muito utilizado como gene marcador para o milho e o herbicida fosfinotricina (ppt) e glufosinato de amônio (Bialaphos, Basta) tem sido utilizado como agentes seletivos (FRAME et al., 2002 e 2006, LEE et al., 2007, VEGA et al., 2008).

Atualmente, os calos embriogênicos e pendões imaturos dos experimentos aqui relatados estão em processo de seleção, o qual consiste em sucessivas repicagens em meio seletivo contendo BASTA (Figura 15).

No terceiro ciclo de seleção será avaliada a frequência de calos embriogênicos resistentes ao herbicida, o qual representará a frequência de transformação estável. A comprovação da transformação será realizada pela amplificação do gene *gus* pela técnica de PCR. Plantas regeneradas serão submetidas ao teste de aplicação de herbicida na folha e a testes moleculares para confirmação da transformação e cálculo da eficiência de transformação.



Figura 15. Seleção dos explantes transformados com *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105: pCambia 3301 em meio seletivo contendo 5 mg.L⁻¹ de BASTA por 21 dias. a, b) Segmentos de pendão imaturo co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* evidenciando a formação de calos; c) explantes de pendão imaturo controle (não co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens*); d) explantes calos embriogênicos co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* crescendo em meio seletivo; e) Calos embriogênicos controle em meio seletivo (não co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens*). Passo Fundo, FAMV/UPF, 2009.

O milho, como outras liliopsidas de importância agronômica, apresenta limitações na transformação pelo método da *Agrobacterium tumefaciens*. No milho os pontos críticos para utilização desta tecnologia se referem ao uso de genótipos responsivos *in vitro*, ótimo estágio de desenvolvimento dos explantes, utilização de linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* competentes para transformação, concentração da bactéria no meio de infecção, meio e condições de infecção e co-cultivo (temperatura, pH, pré-tratamentos dos explantes, tempo de co-cultivo, uso de agentes estimuladores da transformação e antioxidantes (como acetosiringona e L- cisteína), bem como os meios apropriados para indução de calos embriogênicos, seleção e regeneração de plantas.

Para realização deste trabalho empregamos um protocolo baseado no agrupamento de parâmetros ajustados por diversos laboratórios que obtiveram sucesso na transformação de milho via *Agrobacterium tumefaciens*. Entre eles estão o uso de meio com baixa concentração de sal (ZENG et al., 2004; ZHANG et al., 2005; LEE et al., 2007; VEGA et al., 2008), uso do antioxidante L-cisteína (FRAME et al., 2002 e 2006; VEGA et al., 2008), utilização de antibióticos adequados para eliminar a *Agrobacterium tumefaciens* (cefotaxima) (DANILOVA & DOLGIKH, 2004), concentração da *A. tumefaciens* (FRAME et al. 2002 e 2006; HUANG & WEI, 2005), uso de MES (VEGA et al., 2008), pH para infecção (LUPOTTO et al., 1998, SAIRAM et al., 2003; HUANG & WEI, 2005 e VEGA et al. 2008).

Sistemas eficientes de transformação do milho via *Agrobacterium tumefaciens* tem se restringido a linhagem modelo

A188 e seu híbrido Hi-II (ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; ZHANG et al., 2005; LUPPOTO et al., 1998; SHOU et al., 2004; DANILOVA & DOLGIKH, 2005; VEGA et al., 2008), sendo que esta linhagem apresenta pobres características agronômicas. Um número limitado de linhagem e híbridos de milho com diferentes backgrounds genéticos tem sido transformado via *Agrobacterium tumefaciens* (HUANG & WEI, 2005; FRAME et al., 2006; WANG et al., 2007; ISHIDA et al., 2007; LEE et al., 2007).

Huang & Wei (2005) regeneraram plantas transgênicas de quatro linhagens de milho, obtendo o máximo de frequência e transformação de 5,25% em uma linhagem chinesa elite de milho (9046).

Frame et al. (2006) avaliaram 11 linhagens de milho e, empregando melhorias no sistema de infecção e cultivo *in vitro*, obtiveram plantas transgênicas a partir de três linhagens, com uma eficiência de transformação de 2,8 a 8%. Utilizando vetores superbinários, pesquisadores Japoneses (Ishida et al., 2007), obtiveram transformantes em três linhagens de milho. Recentemente, Lee et al. (2007) relataram eventos transgênicos de 2 genótipos altamente recalcitrantes de milho utilizando *Agrobacterium tumefaciens* com vetor binário padrão.

No Brasil, não há relatos sobre a obtenção de plantas transgênicas de milho empregando este método indireto de transformação. Genótipos utilizados nos experimentos aqui relatados foram selecionados pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF, pela eficiente resposta *in vitro*. Os híbridos H3MT-1 e H3MT-2 foram desenvolvidos pelo referido laboratório visando para alta

frequência de calos embriogênicos e regeneração de plantas. A utilização do pendão imaturo como tecido alvo para transformação via *Agrobacterium tumefaciens* é uma inovação e busca acelerar o processo de obtenção de explantes alvo e por conseguinte, acelerar o processo de obtenção de plantas transformadas.

Os dados deste trabalho sugerem a possibilidade de transformação de genótipos brasileiros previamente selecionados *in vitro*.

O estabelecimento de um sistema eficiente de transformação genética em milho abre possibilidades inovadoras para o melhoramento desta espécie, principalmente em relação ao incremento do valor nutricional, produtividade, resistência a doenças e tolerância a estresses ambientais, importantes para o desenvolvimento econômico e agrícola do país. O milho ainda pode ser utilizado como biofábrica na produção de proteínas humanas e medicamentos contribuindo para a saúde humana.

4 CONCLUSÕES

Os dados sugerem que foi possível transferir genes via *Agrobacterium tumefaciens* em pendões imaturos do genótipo H3MT-1 e em calos embriogênicos da linhagem L2 de milho.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho buscou identificar explantes alternativos, mais rapidamente disponíveis, para acelerar o processo de obtenção de calos embriogênicos, melhoramento da capacidade embriogênica e a possibilidade de transferência de genes via *Agrobacterium tumefaciens* em calos embriogênicos e pendões imaturos de genótipos brasileiros de milho. Explantes foliares de plântulas germinadas *in vitro*, apresentam a vantagem de ser fácil e rapidamente disponível o ano todo, podendo acelerar o processo *in vitro*. No entanto, a resposta *in vitro* não foi satisfatória, portanto os trabalhos continuarão a ser realizados com pendão e embrião imaturos. Está sendo avaliada no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (LBV), a semente matura partida como um novo explante, esta foi utilizada recentemente como tecido alvo para biobalística para desenvolvimento de plantas de milho tolerantes a estresses ambientais.

Dados sugerem que o novo Híbrido F1 H3MT-1, recebeu o T-DNA da *Agrobacterium tumefaciens* em seus pendões imaturos, sendo o primeiro relato em pendão imaturo de milho. Da mesma forma, há sugestões da transformação de calos embriogênicos da linhagem L2 de milho via *Agrobacterium tumefaciens*. Este explante é favorável, pois pode ser obtido durante o ano todo.

Atualmente, no LBV está sendo avaliada a possibilidade de transformar embriões imaturos de diferentes estádios de desenvolvimento, visto ser, este explante, o mais amplamente utilizado em milho. Nesta avaliação a adição de 20% de metanol na reação histoquímica de GUS eliminou o background e pontos azuis

foram observados em maior frequência em embriões de 1-2 cm, comparado com os de maior tamanho.

O próximo passo será avaliar vários fatores que interferem na eficiência de transformação de plantas via *Agrobacterium tumefaciens* como: metodologias de crescimento, concentração e linhagens da *A. tumefaciens*; processo de infecção (tempo, pH; pré-tratamento dos explantes); uso do antioxidante DTT no meio de co-cultivo; uso do antibiótico Timentin para eliminação da bactéria; uso da concentração adequada do agente seletivo Bialaphos para seleção de tecidos resistentes. Sendo ainda necessário melhorar as taxas de regeneração de plantas *in vitro* e testar os novos híbridos quanto à competência para regeneração de plantas.

O desenvolvimento de protocolos eficientes de transformação genética em milho possibilitará, por exemplo, a transferência do gene *epo* que codifica para a Eritropoietina Humana, visando utilizar o milho como biofábrica na produção deste medicamento. Este projeto será desenvolvido em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia da UFGRS. A eritropoietina (EPO) é um hormônio glicoprotéico que estimula a medula óssea a elevar a produção de heritrócitos e tem sido utilizado no tratamento de várias enfermidades como anemia e insuficiência renal crônica. A eritropoietina utilizada atualmente no Brasil é produzida a partir de células animais modificadas com o gene *epo* Humano e tem sido importada de Cuba a um custo bastante elevado. Da mesma forma, a aplicação da engenharia genética para melhoramento das características agronômicas do milho implementaria o desenvolvimento tecnológico e agrícola do país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, T.; FUTSUHARA, Y. Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 72, p. 3-10, 1986.

AHMADABADI, M.; RUF, S.; BOCK, R. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). *Transgenic Research*, Netherlands, v.16, p. 437-448, 2006.

AL-ABED, D.; MADASAMY, P.; TALLA, R.; GOLDMAN, S.; RUDRABHATLA, S. Genetic Engineering of Maize with the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3. Gene Using Split-Seed Explants. *Crop Science*, Madison, v. 47, p. 2390-2402, 2007.

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*, [S.I.], v. 65, p. 92-93, 1991.

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.; 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.

ARMSTRONG, C. L.; ROMERO-SEVERSON, J.; HODGES, T. K. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 84, p. 755-762, 1992.

ARMSTRONG, C.L. The first decade of maize transformation: a review and future perspective. *Maydica*, [S.I.], v.44, p.101-109, 1999.
AYERS, N. M.; PARK, W. D. Genetic transformation of rice. *Plant Science*, Madison, v. 13, p. 219-239, 1994.

BARAKAT, M. N.; ABDEL-LATIF, T. H., Somatic embryogenesis and plant regeneration in callus from mature and immature embryo cultures of wheat. *Journal of Agricultural Research*, Alexandria, v. 40, p. 113-129, 1995.

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

BILANG, R.; FUTTERER, J.; SAUTTER, C. Transformation of cereals. *Genetic Engineering*, [S.I.], v. 21, p.113–157, 1999.

BIRCH, R.G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. Annual Revision Plant Physiology. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 48, p. 297–326, 1997.

BISPO, N. B.; AUGUSTIN, L.; GRANDO, M. F.; SUZIN, M. Cultura de tecidos *in vitro* visando variações genéticas úteis em aveia. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13, 2003, Passo Fundo. *Resumos...* Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2003. CD ROM.

BOHOROVA, N. W.; ZHANG, P.; JULSTRUM, S.; MCLEAN, B.; LUNA, R. M.; BRITO, L.; DIAZ, M. E.; RAMOS, P.; ESTANOL, M.; PACHECO, M.; SALGADO, D.; HOISINGTON, A. Production of transgenic tropical maize with *cryIAb* and *cryIAc* genes via microprojectile bombardment of immature embryos. *Theoretical and Applied Genetic*, Berlin, v. 99, p. 437–444, 1999.

BOHOROVA, N. E.; LUNA, B.; BRITO, R. M.; HUERTA, L. D.; HOISINGTON, D.A. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude, and highland maize inbreds. *Maydica*, [S.I.], v. 40, P. 275–281, 1995.

BORÉM, A. Melhoramento de plantas. Viçosa:UFV, 1997. 547p.

BOTTI, C.; VASIL, I. K. Ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* L. II. In Cultured immature inflorescence. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 62, p. 1629-1635, 1984.

BOWER, R.; BIRCH, R. G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant Journal*, England, v. 2, p. 409-416, 1992.

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.

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 Co-cultura com linhagens desarmadas de *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A.C.M E CARNEIRO, V. T. C. Manual de transformação genética de plantas. Brasília Embrapa SNPI/embrapa Cenergen, 1998. p. 309.

BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE. C. *Agrobacterium*: Um sistema natural de transferência de genes para plantas. Da galha-da-coroa para as plantas transgênicas, 1998. Disponível em: <<http://www.spi.embrapa.br/>>. Acesso em: 5 dez. 2008.

BREGITZER, P. P. Plant regeneration and callus type in barley: effect of genotype and culture medium. *Crop Science*, Madison, v. 32, p. 1108-1112, 1992.

BREIMAN, A. Plant regeneration from *Hordeum spontaneum* K. and *H. bulbosum* L. immature embryo derived calli. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 4, p. 70-73, 1985.

BRONSEMA, F.B.F.; OOSTVEEN, W.J.F., LAMMEREN, A.A.M. Influence of 2,4-D, TIBA and 3,5-D on the growth response of cultured maize embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. v. 65, p. 45-56, 2001.

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

CARNEIRO, A.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. Transformação Genética de Milho Utilizando o Bombardeamento de Partículas. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo MG. Documentos, 32, 2004. 44p.

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.

CARVALHO, C. H. S.; ZEHR, U. B.; GUNARATANA, N.; ANDERSON, J.; KONONOWICZ, H. H.; HODGES, T. K.; AXTELL, J. D. *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. *Genetic and Molecular Biology*, v. 27, p.259-269, 2004.

CHAVES, A. L.; GRANDO, M. F. Do DNA ao alimento que você consome. Em preparação.

CHENG, M.; LOWE, B. A.; SPENCER, T. M.; Y. E. X.; ARMSTRONG, C. L. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In vitro Cell Developmental Biology Plant*. v. 40, p.31-45, 2004.

CHILTON, M. D. *Agrobacterium* gene transfer: Progress on a “poor man’s vector for maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 90. p. 3119-3120, 1993.

CHO, M. J.; JIANG, W.; LEMAUX, P. G.; High-frequency transformation of oat via microprojectile bombardment of seed-derived highly regenerative cultures. *Plant Science*, Ireland, v. 148, p. 9-17, 1999.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. *HortScience*, [S.l.], v.23, p.515-519, 1988.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. *Developmental Biology*, [S.l.], v. 112, 494-497, 1985.

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*, [S.I.], v.16, p. 659-668, 1975.

CIB, Conselho Nacional de Biosegurança. Boletim informativo: Milho, 2008. Disponível em: <<http://www.cib.com.br/>>. Acesso em: 12 jul. 2008.

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.

CONGER, B.V.; NOVAK, F.J.; AFZA, R.; ERDELSK, Y. K. Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Zea mays*. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 6, p.345–347,1987.

CONTI, E.; LANZANOVA, C.; BALDONI, E.; ALLEGRI, L.; LUPOTTO, E. Improving *in vitro* culture and transformation conditions in *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. *Maize Genetics Coop. Newsletter*, n. 77, p. 8-9, 2003.

DAI, S.; ZHENG, P.; MARMEY, P.; ZHANG, S.; TIAN, W.; CHEN, S.; BEACHY, R.; FAUQUET, C. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding*, Netherlands, v. 7, p. 25-33, 2001.

DANILOVA S. A.; DOLGIKH. Y. I. Optimization of agrobacterial (*Agrobacterium tumefaciens*) transformation of maize embryogenic callus. *Russian Journal of Plant Physiology*, Moscou, v. 52, n.4, p. 535-541, 2005.

DANILOVA, S. A.; DOLGIKH, Y. I. The Stimulatory Effect of the Antibiotic Cefotaxime on Plant Regeneration in Maize Tissue Culture *Russian Journal of Plant Physiology*, Moscou, v. 51, n. 4, p. 559-62, 2004.

DEBLOCK, M.; BOTTERMAN, J.; VANDEWIELE, M.; DOCK, J.; THOEN, C.; GOSSELÉ, V.; RAO, N.; MOVVA, C.; THOMPSON, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *Embo Journal*, [S.l.], v.6, p. 2513-2518, 1987.

DIAS, L. L. C.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; FLOH, E.; IOCHEVET, S. Conteúdo endógeno de AIA, ABA, poliaminas e aminoácidos na maturação de embriões somáticos de *Ocotea catharinensis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 16; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 3; SIMPÓSIO DE PLANTAS ORNAMENTAIS NATIVAS, 1; 2007. *Resumos...*Goiânia, 2007. CD ROM.

DUNCAN, D. R.; KRIZ, A. L.; PAIVA, R.; WIDHOLM, J. M. Globulin-1 gene expression in regenerable *Zea mays* (maize) callus. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 21, p.684-689, 2003.

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.

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.

FERNANDEZ, S.; MICHAUX-FERRIERE, N.; COUMANS, M.; The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Desf): histology and improvement by AgNO₃. *Plant Growth Regulation*, [S.l.], v. 28, p.147-155, 1999.

FLACH, G. A.; GRANDO, M. F.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M. *Uso de coleóptilo como explante para a indução de calos embriogênicos em cinco genótipos de aveia*. 2003. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Iniciação Científica do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo – RS, Passo Fundo, 2003.

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. 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.

FROMM, M. E.; MORRISH, F.; ARMSTRONG, C.; WILLIAMS, R.; THOMAS, J.; KLEIN, T. M. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/technology*, New York, v. 8, p. 833-839, 1990.

GALIBA, G.; KOVÁCS. G.; SUTKA, J. Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat. *Plant Breeding*, Berlin, v. 97, p. 261-263, 1986.

GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J. E. Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the *bar* gene. *Crop Science*, Madison, v. 36, p. 1367-1374, 1996.

GENOVESI, D.; WILLETTS, N.; ZACHWIEJA, S.; MANN, M.; SPENSER, T.; FLICK, C.; GORDON-KAMM, W. Transformation of an elite maize inbred through microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *In vitro Cell Development Biology*, [S.I.], v. 18, p. 189-200, 1992.

GIDDINGS, G.; ALLISON, G.; BROOKS, D.; CARTER. A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*, [S.I.], v. 18, p. 1151-1155, 2000.

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.

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

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.; FRANKLIN C. I.; SHATTERS, R.G. JR. Optimizing embryogenic callus production and plant regeneration from "Tifton 9" bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé) seed explant for genetic manipulation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, [S.I.], v.17, n. 3, p. 213-222, 2002.

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*, EUA, 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.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A.; Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética em plantas*. Brasília: Embrapa - SPI, v. 1, p. 183-260, 1998.

GREEN, C. E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from friable callus of *Zea mays*. In: FUJIWARA, A. *Plant Tissue Culture*, Tokyo, [s.n.], p. 107-108, 1982.

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

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética em plantas*. Brasília: Embrapa - SPI, 1999. v. 2, p. 533-568.

HALLAUER, A. History, Contribution, and Future of Quantitative Genetics in Plant Breeding: Lessons from maize. *Crop Science*, Madison, v.47, p. 4-19, 2007.

HANSEN, G.; WRIGHT, M. S. Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Science*, [S.l.], v. 6, p. 335-340, 1990.

HE, D. G.; YANG, Y. M.; BERTARAM, J.; SCORR, K. J. The histological development of the regenerative tissue derived from immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*, Ireland, v. 68, p. 103-111, 1990.

HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUBO, T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 35. p.205-218, 1997.

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

HIEI, Y.; KOMARI, T.; ISHIDA, Y.; SAITO, H. Development of *Agrobacterium*-mediated transformation method for monocotyledonous plants. *Breeding Research*, [S.l.], v. 2, p. 205–213. 2000.

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.

HOOD, E. E. ; WITCHER, D. R.; MADDOCK, S.; MEYER, T.; BASZCZYNSKI, C.; BAILEY, M.; FLYNN, P.; REGISTER, J.; MARSHALL, L.; BOND, D. ; KULISEK, E.; KUSNADI, A.; EVANGELISTA, R.; NIKOLOV, Z.; WOOGGE, C. ; MEHIGH, R. J.; HERNAN, R.; KAPPEL, W. K.; RITLAND, D.; L. I, C. P.; HOWARD, J. A. Commercial production of avidin from transgenic maize: characterisation of transformant, production, processing, extraction and purification. *Molecular Breeding*, Netherlands, v. 3, p. 291–306, 1997.

HOOD, E .E.; CHILTON, S.W.; CHILTON, M .D.; FRALEY, R.T. TDNA and opine synthetic loci in tumors incited by *Agrobacterium tumefaciens* A281 on Soybean and *Alfalfa* plants. *Journal Bacteriology*, [S.l.], v.168, p. 1283–1290, 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*, [S.l.], 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: 5 jan. 2008.

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

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

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*, [S.l.], v. 6, p.3901-3907, 1987.

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

KAEPLER, 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 vectors. In: PLANTE ANIMAL GENOME CONFERENCE, 9, San Diego, 2001.

KOICHI, T.; BAE, C. H.; SEO, M. S.; SONG, I. J.; LIM, Y. P.; SONG, P. S.; LEE, H. Y. Overcoming of Barriers to Transformation in Monocot Plants. *Plant Biotechnology*, [S.l.], v.4, p.135-141, 2002.

KOMARI, T. Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 303-306, 1990.

KRAKOWSKY, M. D.; LEE, M.; GARAY, L.; WOODMAN-CLIKEMAN, W.; LONG, M. J.; SHAROPOVA, N.; FRAME, B.; WANG, K. Quantitative trait loci for callus initiation and totipotency in maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 113, p. 821–830, 2006.

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.

LAMB, C. R. C.; MILACH, S. C. K.; PASQUALI, G.; BARRO, R.S. Regeneração de plantas a partir de segmentos de base de folhas em aveia. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 751-755, 2001.

LAW, R. D. ; RUSSELL, D. A.; THOMPSON, L. C.; SCHROEDER, S. C.; MIDDLE, C. M.; TREMAINE, M. T.; JURY, T. P.;

DELANNAY, X.; SLATER, S. C. Biochemical limitations to high-level expression of humanized monoclonal antibodies in transgenic maize seed endosperm. *Biochemical Biophysics Acta*, [S.l.], v. 1760, p. 1434–1444, 2006.

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*, [S.I.], v. 52, p. 457-469. 2007.

LI, W.; SUN, G.; LIU, J.; MASILAMANY, P.; TAYLOR, J. H.; YAN, W.; KASHA, K. J.; PAULS, K. P. Inheritance of plant regeneration from maize (*Zea mays* L.) shoot meristem cultures derived from germinated seeds and the identification of associated RAPD and SSR markers. *Theoretical and Appied Genetics*, Berlin, v. 108, p.681-687, 2003.

LOZOVAYA, V.; ULANOV, A.; LYGIN, A.; DUNCAN, D.; WIDHOLM, J. Biochemical features of maize tissues with different capacities to regenerate plants. *Planta*, Berlin, v. 224, p. 1385-1399, 2006.

LU, C.; VASIL, I. K.; OZIAS-AKINS, P. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theoretical and Applied Genetic*, Berlin, v. 62, p. 109-112, 1982.

LUPOTTO, E, REALI, A, PASSERA, S, CHAN, M.T. Maize transformation with *Agrobacterium tumefaciens*.1998 Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu./mnl/72/67lupottp.html>>. Acesso em: 4 jul. 2008.

MA, H.; GU, M.; LIANG, G. H. Plant regeneration from cultured immature embryos of (*Sorghum bicolor* L.), moench. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 73, p. 389-394, 1987.

MA, J. K.; DRAKE, P. M. W.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, [S.I.], v. 4, p. 794-805, 2005.

MUMM, R. H. Backcross versus Forward Breeding in the Development of Transgenic Maize. *Hybrids: Theory and Practice. Crop Science*. Madison, v. 47, p. 164–171, 2007.

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.

OLIVEIRA, J. M. VAZ. *O milho*. Lisboa, Clássica editora, 1984. 218p.

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.

PAREDDY, D. R.; PETROLINO, J.F. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescence of several elite inbreds of maize. *Plant Science*, Ireland, v. 67, p. 24-219, 1990.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa, [s.n.], 1999. p. 429-485.

PERES, L. E. P. Bases Fisiológicas e Genéticas da Regeneração de plantas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília-DF, 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.

PIRALOV, G.; ABRAIMOVA, O. Five-year old embryogenic callus culture of maize inbred DK675. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, v.73, p. 28-29,1999.

PONS, A.; BRESOLIN, M. A cultura do milho. *Trigo e Soja*. Porto Alegre, n. 57, p. 6-31, 1981.

PRIOLI, L. M.; SILVA, W. J. da. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in tropical maize inbreds. *Revista Brasileira de Genética*, [S.I.], v.12, p. 553-566, 1989.

RADEMACHER, T.; SACK, M.; ARCALIS, E.; STADLMANN, J.; BALZER, S.; ALTMANN, F.; QUENDLER, H.; STIEGLER, G.; KUNERT, R.; FISCHER, R.; STOGER, E. Recombinant antibody 2G12 expressed in maize endosperm efficiently neutralizes HIV- 1 and contains predominantly single-GlcNAc N-glycans, *Plant Biotech. J.* for the recovery of recombinant proteins from plants. *Biotechnology Program*, [S.I.], v. 20, p. 1001–1014, 2004.

RAMESSAR, K.; SABALZA, M.; CAPELL, T.; CHRISTOU P. Maize plants: An ideal production platform for effective and safe molecular pharming. *Plant Science*, Ireland, v. 174, p. 409-419, 2008.

RANKINGBRASIL, Brasil no ranking mundial da agricultura. Banco de dados. Disponível em: <http://www.rankbrasil.com.br/mundial/agricultura>. Acessado em: 15 Jul. 2008.

RASHID, H.; YOKOI, S.; TORIYAMA, K.; HINATA, K. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.15, p. 727-730, 1996.

RAY, D. S.; GHOSH, P. D. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured leaf explants of *Zea mays*. *Annals of Botany*, [S.I.], v. 66, p. 497-500, 1990.

RIBAS, A. F.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Production of Herbicide-Resistant Coffee Plants (*Coffea canephora* P.) via *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation. *Brazilian Archives of Biology and Tecnology*, [S.I.], v. 49, n. 1, p. 11-19, 2006.

RINES, H. W.; MCCOY, T. J. Tissue culture initiation and plant regeneration in hexaploid species of oats. *Crop Science*, Madison, v. 21, p. 837-842, 1981.

RITALA, A.; AIKASALO, R.; ASPEGREN, K.; SALMENKALLIO, M. M.; AKERMEN, S.; MANNOREN, L.; KURTÉN, U.; PUUPPONEN-PIMIÄAND, R.; TEERI, T. H.; KAUPPINEN, V. Transgenic barley by particle bombardment. Inheritance of the transferred gene and characteristic of the transgenic barley plants. *Euphytica*, Wageningen, v. 85, p. 81-88, 1995.

RODGESC. A.; GREEN, C. E.; PHILLIPS. Factors affecting tissue culture initiation from maize tassels. *Plant Science*, Ireland, v. 46, p. 225-232, 1986.

SAIRAM. R.V.; PARANI, M.; FRANKLIN, G., Z.; SMITH, L. B.; MACDOUGALL, J.; WILBER, C.; SHEIKHI, H.; KASHIKAR, N.; MEEKER, K.; AL-ABED, D.; BERRY, K.; VIERLING, R.; GOLDMAN, S.L. Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation. *Genome*, [S. l.], v. 46, p. 323-329, 2003.

SANGOI, L.; SALVADOR, R. J. Os primeiros passos na evolução do milho: um tema controvertido. *Universidade & Desenvolvimento*. Florianópolis, v. 3, n. 2, p. 33-70, 1996.

SANTOS, E. K. dos. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B. de.; BERED, F. *Genética e Evolução Vegetal*. Porto Alegre: editora da UFRGS, 2003, p. 415- 444.

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.

SAS INTITUTE. *SAS user guide*: SAS Institut, Cary, 1998, 521p

SEMEL, Y.; NISSENBAUM, J.; MENDA, N. Overdominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [S. l.], v.35, p.12983-12986, 2006.

SHARMA, V. K., HANSCH, R.; MENDEL R.R. SCHULZE, J. Mature embryo axis-based high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from multiple cultivars of barley (*Hordeum vulgare*

L.). *Journal of Experimental Botany*, [S. l.], v. 56, n.417, p.1913-1922, 2005.

SHEN, W.H.; ESCUDERO, J.; SCHLAPPI, M.; RAMOS, C.; HOHN, B. KOUKOLÍKOVÁ-NICOLA, Z. T-DNA transfer to maize cells: Histochemical investigation of β -glucuronidase activity in maize tissues. *Plant biology*, USA, v.90, p.1488-1492, 1993.

SHOU, H.; FRAME, B.R.; WHITHAM, S.A. WANG, K. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation., Netherlands, v.13, p. 201-208, 2004.

SILVA, M. R.; GRANDO, M. F.; VARNIER, M. L.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M.; EMYGDIO, B. M.; CECCHETTI, D. Produção de calos embriogênicos a partir de pendão imaturo de cinco genótipos sulbrasileiros de milho para a manipulação genética. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12, 2003, Passo Fundo-RS. *Resumos...* Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2003. CD ROM.

SILVA, M. R.; GRANDO, M. F.; VARNIER, M. L.; BORTOLIN, S.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M.; EMYGDIO, B. M.; CECCHETTI, D. Uso de diferentes explantes para indução de calos embriogênicos em genótipos selecionados de milho. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14, 2004, Passo Fundo-RS. *Resumos...* Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2004. CD ROM.

SILVA, M. R.; GRANDO, M. F.; VARNIER, M. L.; SOUZA, C. R.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M.; EMYGDIO, B. M.; CECCHETTI, D. Uso de diferentes explantes para indução de calos embriogênicos em genótipos selecionados de milho. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15, 2005, Passo Fundo-RS. *Resumos...* Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2005. CD ROM.

SIVAMANI, E.; PING, S.; OPALKA, N.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. M. Selection of large quantities of embryogenic calli from indica rice seeds for production of fertile transgenic plants using the biolistic method. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.15, p. 322-327, 1996.

SLUYS, M. A. V. *Agrobacterium*: um vetor natural para transformação em plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SP/ Embrapa-CNPq. v.2, 1999, 354p.

SMITH, R. H. Callus induction, In:___ *Plant Tissue Culture*. Techniques and experiments. 2 ed. California: Academic press, p. 83-105, 2000.

SONGSTAD, D.; DUNCAN, D.; WIDHOLM, J. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, silver nitrate, and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.7, p.262–265, 1988.

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.

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*, [S.I.], v. 76, n.7, p. 761-764, 1992.

SILVA, M. R.; GRANDO, M. F.; VARNIER, M. L.; SOUZA, C. R.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M.; EMYGDIO, B. M.; CECCHETTI, D. Uso de diferentes explantes para indução de calos embriogênicos em genótipos selecionados de milho. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15, 2005, Passo Fundo-RS. *Resumos...* Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2005. CD ROM.

SOUZA, C. R.; GRANDO, M. F.; SILVA, M. R.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M.; EMYGDIO, B. M.; CECCHETTI, D. Utilização do meristema apical para acelerar a produção de calos embriogênicos em genótipos pré-selecionados de milho (*Zea mays* L.). In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16, 2006, Passo Fundo-RS. *Resumos...* Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2006. CD ROM.

SOUZA, J. L., GRANDO, M. F., AUGUSTIN, L.; SUZIN, M. *Uso de embriões zigóticos maduros para indução de calos embriogênicos em*

cinco genótipos de aveia. 2002. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2002.

SPARROW, P. A. C.; IRWIN, J. A.; DALE, P. J.; TWYMAN, R. M. C.; MA, J. K. Pharma-Planta: road testing the developing regulatory guidelines for plant-made pharmaceuticals. *Transgenic Research*, Netherlands. v. 16, p. 147-161, 2007.

STOGER, E., SACK, M.; PERRIN, Y.; VAQUERO, C.; TORRES, E.; TWYMAN, R. M.; CHRISTOU, P.; FISCHER, R. Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems. *Molecular Breeding*, Netherlands, v. 9, p.149-158, 2002.

STOGER, E.; SACK, M.; NICHOLSON, L.; FISCHER, R.; CHRISTOU, P. Recent progress in plantibody technology. *Journal Current pharmaceutica*, [S. l.], v. 11, p. 2439-2457, 2005.

STOGER, E.; VAQUERO, C.; TORRES, E.; SACK, M.; NICHOLSON, L.; DROSSARD, J.; WILLIAMS, S.; KEEN, D.; PERRIN, Y.; CHRISTOU, P.; FISCHER, R. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scfv antibodies. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 42, p. 583–590, 2000.

SUPRASANNA, P.; RAO, K.V.; REDDY, G. M. Plantlet regeneration from glume calli of maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetic*. Berlin, v. 72, p.120-122, 1986.

TOMES, D. T. Opportunities and limitations of the genotypic influence on establishment and plant regeneration from callus and cell cultures of crop species. In: ZAITLIN, M. *Biotechnology in plant science: relevance to agriculture in the eighties*. London: Academic Press, p. 3-14, 1985.

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.

UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas. Pesquisa otimiza extração da pré-insulina a partir do endosperma de milho geneticamente modificado. *Jornal da Universidade de Campinas*, Campinas, 22 a 28 de novembro de 2004. Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/novembro2004/ju274pag09.html>. Acesso em: 3 mar. 2009.

VAIN, P.; YEAN, H.; FLAMENT, P. Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. *Journal of Plant Physiology*, Jena, p. 35-540, 1989.

VALOIS, A. C. C. Importância dos transgênicos para a agricultura. *Cadernos de ciência e tecnologia*, Brasília v.18, n.1, p 27-53, 2001.

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.

VARNIER, M. L.; GRANDO, M. F.; AUGUSTIN, L.; RICARDO, L.; EMYGDIO, B. M.; SILVA, M. R.; CECCHETTI, D. Produção de calos embriogênicos a partir de Pendão Imaturo de Genótipos Sulbrasileiros de Milho (*Zea mays* L.) para Manipulação Genética. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49, 2003. *Resumos...* Águas de Lindóia, 2003. CD ROM.

VASIL, V.; VASIL, I. K.; LU, C. Somatic embryogenesis in long-term callus culture in *Zea mays* L. (Gramineae). *American Journal of Botany*, [S.l.], v. 71, p.158-161, 1984.

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 York, Academic press, p. 36-42, 1984.

VASIL, V.; CASTILLO, A. M.; FROMM, M.; VASIL, I. K. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology*, New York, v. 10, p. 667-674, 1992.

VASIL, V.; LU, C.; VASIL, I. K. Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Protoplasma*, New York, v. 127, p. 1-8, 1985.

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.

WAN, Y.; LEMAUX, P. G. Generation of a large number of independent transformed fertile barley plants. *Plant Physiology*, Bethesda, v.104, p.37-48, 1994.

WANG, D.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from inflorescence segments of *Pennisetum purpureum* Schum. (Napier or elephant grass). *Plant Science Let.* Limerick, v. 25, p. 147-154, 1982.

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.

WANG, M. S.; ZAPATA, F. J.; CASTRO, D. C. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature seed and young inflorescence of wild rice (*Oryza perennis* Moench). *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 6, p. 294-296, 1987.

WEI, L.; GUO, G.; ZHENG, G. *Agrobacterium*-mediated transformation: state of the art and future prospect. *Chinese Science Bulletin*, [S.I.], v. 45, n. 17, p.1537-1546, 2000.

WELTER, M. E. Morphotypes of friable embryogenic callus. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.14, p. 725-72, 1995.

WEN, F.; WOO, H.; HIRSCH, A. M.; HAWES, M. Lethality of Inducible, Meristem-Localized Ectopic β -Glucuronidase Expression in Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, [S.I.], v. 22, p. 7-14, 2004.

WERNICKE, W.; BRETTELL, R. I. S. Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor* (L.) culture initiation. *Protoplasma*, New York, v. 111, p. 19-27, 1982.

WILLMAN, M. R.; SCHROLL, S. M.; HODGES, T. K. Inheritance of somatic embryogenesis and planta regeneration from primary (Type 1) callus in maize. *In vitro Cell Development Biology*, [S.I.], v. 25, p. 95-100, 1989.

WOODARD, S. L.; MAYOR, J. M.; BAILEY, M. R.; BARKER, D. K.; LOVE, R. T.; LANE, J. R.; DELANEY, D. E.; MCCOMAS-WAGNER, J. M.; MALLUBHOTLA, H. D.; HOOD, E. E.; GANGOTT, L.J.; TICHY, S.E.; HOWARD, J.A. Maize-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial product from transgenic plants. *Biotechnology Applied Biochemical*, [S.I.], v. 38, p. 123-130, 2003.

ZENG, P.; VADNAIS, D. A; ZHANG, Z.; POLACCO, J.C. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* (L). Merrill). *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 22, p. 478-482, 2004.

ZHANG, Y.; YIN, X.; YANG, A.; L. I. G.; ZHANG, J. 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.; 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, Z.Y.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L.A.; HONDRED, D.; BOND, D.; KRELL, S.; RUDERT, M. L.; BRUCE, W. B.; PIERCE, D.A. Molecular analysis of T0 plants transformed by *Agrobacterium* and comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation with bombardment transformation in maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, v. 72. p.34-37, 1998.

ZHONG, H.; SRINIVASAN, C.; STICKLEN, M. B. *In vitro* morphogenesis in corn (*Zea mays* L.). Differentiation of ear and tassel clusters from cultured shoot apices and immature inflorescences. *Planta*, Berlin, v. 187, p. 490-497, 1992.

ZHONG, H.; SUN, B.; WARKENTIN, D.; ZHANG, S.; WU, R.; STICKLEN, M. B. The competence of maize shoot meristems for integrative transformation and inherited expression of transgenes. *Plant Physiology*, Bethesda, v.110, p. 1097-1107, 1996.