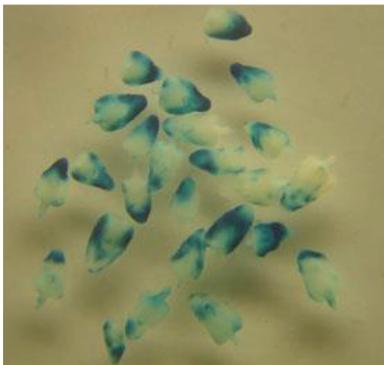


Fatores que Influenciam a Transformação Genética de Milho (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 191

Fatores que Influenciam a Transformação Genética de Milho (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*

Meire de Cássia Alves
Rayanne Pereira de Oliveira
Newton Portilho Carneiro
Andréa Almeida Carneiro

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges

Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Monica Matoso

Campanha, Roberto dos Santos Trindade, Rosângela Lacerda de

Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Andréa Almeida Carneiro

1ª edição

Versão Eletrônica (2015)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

Fatores que influenciam a transformação genética de milho (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium tumefaciens* / Meire de Cássia Alves ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2015.

40 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 191).

1. Melhoramento genético vegetal. 2. Milho. 3. Bactéria. I. Alves, Meire de Cássia. II. Série.

CDD 631.52 (21. ed.)

© Embrapa 2015

Autores

Meire de Cássia Alves

Analista de pesquisa e desenvolvimento,
Embrapa Milho e Sorgo

Rayanne Pereira de Oliveira

Estudante do curso de Ciências Biológicas,
Fundação Educacional Monsenhor Messias
Unifemm - Centro Universitário De Sete Lagoas,
Bolsista PIBIC do Convênio FAPEMIG/Embrapa

Newton Portilho Carneiro

Ph.D em Biotecnologia, Biologia Molecular,
Embrapa Milho e Sorgo. Cx. P 151. 35701-970
Sete Lagoas, MG. newtonc@cnpms.embrapa.br

Andréa Almeida Carneiro

Ph.D em Biotecnologia, Biologia Molecular,
Embrapa Milho e Sorgo. Cx. P 151. 35701-970
Sete Lagoas, MG. andreaac@cnpms.embrapa.br

Apresentação

A transformação genética de plantas intermediada por *Agrobacterium* é uma metodologia que vem sendo usada com muito sucesso em estudos básicos e aplicados para a melhoria de espécies de grande interesse econômico, por exemplo, os cereais. Nas duas últimas décadas presenciamos o desenvolvimento de sistemas eficientes de geração de eventos transgênicos para várias espécies de cereais economicamente importantes, tais como milho, arroz, cevada, sorgo e trigo. Entretanto, a transformação genética da maioria das linhagens-elite ainda permanece inacessível por ser este método genótipo dependente.

Este exemplar da série Documentos tem como objetivo apresentar uma revisão de literatura sobre os estádios iniciais de infecção da célula vegetal pela *Agrobacterium* e discutir alguns fatores que influenciam este processo, objetivando disponibilizar informações úteis que possam auxiliar no desenvolvimento de protocolos de transformação genética via *Agrobacterium* para novas espécies.

Antonio Alvaro Corsetti Purcino
Chefe-Geral
Embrapa Milho e Sorgo

Sumário

Introdução	1
<i>Agrobacterium</i> e a Transformação Genética de Plantas	1
Fatores que influenciam a transferência de genes entre <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e plantas monocotiledôneas	1
Explantes	2
Genótipos	2
Estirpes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	2
Tratamento dos explantes antes da infecção com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	2
Temperatura	2
Meios de Cultivo	2
Conclusões	1
Referências	1

Fatores que Influenciam a Transformação Genética de Milho (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium tumefaciens* simiáticos

*Meire de Cássia Alves*¹

*Rayanne Pereira de Oliveira*²

*Newton Portilho Carneiro*³

*Andréa Almeida Carneiro*⁴

Introdução

Atualmente, informações sobre a organização e regulação do genoma do milho estão sendo disponibilizadas frequentemente, e existe um grande potencial de utilização deste conhecimento para o melhoramento desta cultura através da transformação genética. Além da geração de plantas expressando características agrícolas desejáveis, estas técnicas são rotineiramente empregadas em estudos básicos de fisiologia, bioquímica e genética.

O milho ganha destaque dentre as lavouras biotecnológicas cultivadas, por ser uma das commodities mais comercializadas mundialmente, movimentando um mercado bilionário entre indústrias de produção de alimentos para consumo humano, rações e centenas de produtos industrializados.

Existem vários métodos para a modificação genética do milho (detalhes podem ser obtidos em revisões tais como HOOYKAAS, 2010; BARAMPURAM; ZHANG, 2011; RIVERA et

al., 2012), sendo que, atualmente um dos mais utilizados é a transformação via *Agrobacterium tumefaciens*.

Esta metodologia apresenta diversas vantagens, como uma maior precisão na integração do T-DNA, um menor número de cópias do transgene inseridas no genoma da planta e poucos rearranjos das moléculas de DNA introduzidas, e uma maior estabilidade fenotípica durante muitas gerações de cruzamento (ISHIDA et al., 1996). Em contrapartida, por ser um método genótipo-dependente, a transformação via *Agrobacterium* apresenta limitações, como a recalcitrância em monocotiledôneas.

Desde o primeiro relato de transformação de milho por *A. tumefaciens*, vários fatores que influenciam a transferência do T-DNA e a regeneração de células transgênicas em cultura de tecidos têm sido investigados e aprimorados. O propósito deste documento é apresentar uma breve revisão literária do processo de infecção de células vegetais pela *Agrobacterium tumefaciens* que culminam com a transferência do T-DNA da bactéria para células da planta. Além disso, discutir alguns dos fatores que influenciam este processo na transformação do milho e que devem ser considerados durante o desenvolvimento de protocolos de transformação genética via *Agrobacterium*.

***Agrobacterium* e a Transformação Genética de Plantas**

A *Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria Gram-negativa, comumente encontrada no solo, do tipo bacilo aeróbio, fitopatogênica e pertencente à família Rhizobiaceae

(ZAMBRYSKI, 1988). É o agente etiológico causal da galha-da-coroa em dicotiledôneas e em algumas monocotiledôneas. As células vegetais infectadas pela bactéria adquirem a propriedade de se multiplicarem de maneira autônoma e desordenada, produzindo fitormônios e opinas e formando tumores (NESTER, 2008).

A capacidade da *Agrobacterium* de infectar células vegetais está associada à presença de um plasmídio de alto peso molecular (200 a 800 kb) conhecido como plasmídeo Ti, do inglês *tumor-inducing*, que pode se replicar independentemente do genoma bacteriano. A indução de tumores ocorre por meio da transferência de um segmento deste plasmídeo, denominado T-DNA, para o genoma da planta infectada (GELVIN, 2003).

O processo de infecção via *Agrobacterium* é longo e elaborado, envolvendo as seguintes etapas: 1) Identificação de sinais químicos emitidos pela planta e indução das proteínas de virulência da bactéria; 2) Processamento do T-DNA por meio das proteínas de virulência presentes na bactéria; 3) Infecção da planta-alvo pela *Agrobacterium* e transferência do T-DNA para a célula vegetal; 4) Integração do T-DNA no genoma da planta por intermédio de proteínas hospedeiras; e 5) Expressão do T-DNA e indução de tumores na planta. Os genes codificados pelo T-DNA são responsáveis pela produção de fitormônios que promovem a proliferação desordenada das células vegetais e a produção de opinas, que são os componentes nutritivos utilizados pela bactéria (GUO et al., 2011).

Diversos genes estão envolvidos na transferência do T-DNA, porém a maioria está localizada na região de virulência (*vir*) do plasmídeo Ti. A região *vir* compreende sete óperons de

maior significância: *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG* e *virF*. As proteínas produzidas a partir destes genes são responsáveis pela detecção das moléculas sinais emitidas pela planta, bem como processamento, transferência e integração do T-DNA no genoma vegetal, o qual é expresso de forma estável. O T-DNA apresenta entre 10 e 30 Kb, sendo delimitado pelas bordas direita e esquerda constituídas de 25 pb homólogas (GELVIN, 2003; GUO et al., 2011).

O processo de infecção e transferência do T-DNA inicia-se quando a *Agrobacterium* é atraída por quimiotaxia em direção a compostos sinalizadores, tais como fenóis e açúcares que induzem a expressão dos genes de virulência (*vir*). Apesar de compostos fenólicos serem suficientes para a ativação dos genes de virulência, condições de baixo pH, baixo fosfato e temperaturas abaixo de 30 °C são capazes de aumentar a infecção (STACHEL; ZAMBRYSKI, 1986; WINANS et al., 1988; CANGELOSI et al., 1990). No processo de transformação genética de plantas, a importância do ferimento do tecido vegetal está relacionada ao fato de que nesta região existe alta atividade da via dos fenilpropanoides, baixo pH e síntese de carboidratos associados ao reparo da parede celular (MATSUDA et al., 2003).

Os genes de virulência responsáveis pela transferência do T-DNA ficam inativos até estarem na presença de moléculas sinalizadoras produzidas pela planta. O locus *virA* é o único expresso de forma constitutiva na célula bacteriana e o seu produto age como um quimiorreceptor capaz de detectar a presença no ambiente das moléculas sinalizadoras. A proteína VirA torna-se ativa após ligar-se à acetoseringona, um composto fenólico, e fosforila à proteína VirG, ativando-a. A

proteína VirG fosforilada liga-se às sequências operadoras dos outros genes *vir*, ativando-os e dando sequência ao processo infeccioso (STACHEL; ZAMBRYSKI, 1986).

As proteínas VirA e VirG, que regulam o mecanismo de transformação, pertencem a uma classe conhecida como sistema regulatório de dois componentes (*two-component regulatory system*). Nesse sistema, a proteína VirA funciona como uma proteína quinase sensora que responde aos sinais ambientais (MELCHERS et al., 1989), enquanto a proteína VirG age como um ativador transcricional por ligar-se a regiões promotoras dos operons *vir*, iniciando assim o processo de transferência do T-DNA (JIN et al., 1990).

A ativação dos genes *vir* desencadeia uma cascata de eventos. Proteínas Vir (VirD1 e VirD2) são responsáveis por clivar a fita inferior da região de transferência do plasmídeo Ti, em ambas as bordas flangeadoras, e um T-DNA de fita simples é liberado. VirD2 permanece ligado ao T-DNA, formando o complexo-T que é direcionado para a célula da planta.

A. tumefaciens transfere o complexo-T e proteínas de virulência VirD5, VirE2, VirE3, e VirF para as células hospedeiras (SHENG; CITOVSKY, 1996; ZHU et al., 2000; CHRISTIE, 2004; VERGUNST et al., 2005) utilizando um sistema de secreção do tipo de IV (SST4) codificado pelos operons *virB* e *virD4* (CHRISTIE, 2004).

Os sistemas de secreção de tipo IV (SST4) são grandes complexos de proteínas que atravessam o envelope celular de muitas bactérias. Eles contêm um canal através do qual as proteínas ou complexos formados por DNA-proteína podem ser translocados. Esta translocação é energizada por ATPases

citoplasmáticas que promovem alterações conformacionais no complexo de translocação (REGO et al., 2010). Estruturalmente, na *A. tumefaciens* o sistema é composto de três grupos funcionais: um pilus na superfície bacteriana (*virB2* e *virB5*), um poro transversal às duas membranas (*virB3* e *virB6-10*) e duas ATPases (*virB4* e *virB11*) na superfície citoplasmática da membrana interna que fornecem energia para o sistema, além de transportar substratos (BOSCHIROLI et al., 2002). Os dados disponíveis atualmente indicam que todos os substratos que entram no sistema de transferência de VirB / D4 o fazem através de acoplamento inicial com VirD4. Sinais de localização nuclear presentes em VirD2 e VirE2 direcionam o complexo-T para o núcleo onde o T-DNA é integrado no genoma da planta.

Como visto anteriormente, as duas regiões distintas presentes no plasmídeo Ti essenciais para a transformação genética via *A. tumefaciens* são as regiões do T-DNA e dos genes *vir*. O T-DNA é limitado por duas bordas, direita e esquerda, as quais são compostas por 25 pb repetidas (GELVIN, 2003) e são as únicas sequências necessárias para delimitar os genes que serão transferidos; qualquer tipo de DNA colocado entre estas bordas pode ser transferido pela *Agrobacterium*. A região *vir* é constituída de sete a dez loci (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* e *virG*) que codificam as proteínas de virulência requeridas para o transporte e integração do T-DNA no genoma hospedeiro (ZUPAN; ZAMBRYSKI, 1995).

Na utilização da *Agrobacterium* como uma ferramenta biotecnológica foi necessário o desenvolvimento de sistemas de T-DNA binários. Nestes sistemas, o T-DNA e os genes *vir* estão localizados em replicons separados. O T-DNA é localizado em um vetor binário pequeno (10 a 30 Kb) quando comparado aos

plasmídeos Ti (200 a 800 Kb) e, portanto, de fácil manipulação em laboratórios. As principais características estruturais de um vetor binário são: (i) A presença dos 25 pb repetidas das extremidades direita e esquerda que delimitam o T-DNA; (ii) Um marcador de seleção para as células vegetais (antibiótico, herbicidas, etc); (iii) Presença de sítios para enzimas de restrição dentro do T-DNA, possibilitando a inserção de genes de interesse; (iv) Origens de replicação para permitir a manutenção dos vetores em *E. coli* e *Agrobacterium*; e (v) Genes para resistência a antibióticos que permitem a seleção da presença do vetor binário em *E. coli* e *Agrobacterium* (LEE; GELVIN, 2008). O replicon contendo os genes *vir* é conhecido como “*vir* helper”. Normalmente, agrobactérias desarmadas, ou seja, aquelas que não contêm os genes selvagens no seu T-DNA, carregando o vetor binário e o plasmídeo “helper”, são utilizadas como ferramentas biotecnológicas para a transferência de genes para as plantas.

Fatores que Influenciam a Transferência de Genes entre *Agrobacterium tumefaciens* e Plantas Monocotiledôneas

Algumas espécies vegetais são recalcitrantes à transferência de DNA intermediada por *Agrobacterium*, principalmente as monocotiledôneas, como o milho. Entretanto, estudos de fatores que influenciam a transformação genética de monocotiledôneas via *A. tumefaciens*, tais como a virulência das estirpes bacterianas, os vetores binários utilizados, o tipo e a idade do explante, a densidade da suspensão bacteriana, a composição dos meios de cultura, o genótipo do milho, dentre outros, foram realizados possibilitando a obtenção de

protocolos eficientes de transformação genética de milho via *A. tumefaciens*.

O primeiro protocolo de transformação de milho com alta eficiência utilizando *Agrobacterium* foi descrito em 1996 por pesquisadores da Japan Tobacco Cia, utilizando embriões imaturos da linhagem A188 (ISHIDA et al., 1996).

Trabalhos posteriores descreveram novos protocolos utilizados na transformação, em que diferentes parâmetros foram testados, buscando assim aumentar a eficiência de transformação genética de milho (ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; HUANG; WEI, 2005; ISHIDA et al., 2007; VEGA et al., 2008; REYES et al., 2010).

O desenvolvimento de uma metodologia apropriada e eficiente para a transformação genética de milho via *A. tumefaciens* é uma tarefa complexa, sendo essencial o entendimento de vários fatores capazes de influenciar na transferência, integração e estabilidade do T-DNA no genoma do tecido alvo e na regeneração da planta transformada (GALLEGO et al., 2011).

Nas seções seguintes serão apresentados alguns dos fatores que agem sobre as células bacteriana e vegetal influenciando a eficácia da transformação genética do milho.

Explantes

O estabelecimento de um sistema de regeneração de plantas *in vitro* é requisito primordial para uma eficiente produção de eventos transgênicos (FRAME et al., 2006; VEGA et al., 2008; PITZSCHKE, 2013). Ishida et al. (1996) afirmaram que a principal

barreira na transformação genética não está na transferência de fragmentos de DNA para as células das plantas, mas na recuperação de células que adquiriram o T-DNA em seus cromossomos através da regeneração das plantas em cultura de tecido. Sendo assim, a escolha do explante é um dos fatores primordiais para a eficiência da transformação via *A. tumefaciens*. Preferencialmente, ele deve estar disponível durante todo o ano e ser constituído de um grande número de células regeneráveis e capazes de manter a habilidade de proliferação celular, possibilitando assim o subcultivo em meios de seleção e a regeneração de plantas transgênicas (BIRCH, 1997). Explantes tais como anteras (TING et al., 1981), inflorescências masculinas e femininas imaturas (RHODES et al., 1986; SUPRASANNA et al., 1986; PAREDDY; PETOLINO, 1990; SONGSTAD et al., 1992), segmentos de plântulas (SANTOS et al., 1984; RAY; GHOSH, 1990), meristema apical (ZHANG et al., 2002) e embriões imaturos (ISHIDA et al., 1996; FRAME et al., 2002; HUANG; WEI, 2005; VEGA et al., 2008) têm sido utilizados para a indução de calos e transformação genética de milho. Calos embriogênicos também já foram descritos como explantes promissores para a produção de plantas transgênicas por apresentarem células não diferenciadas, dividindo-se ativamente e com capacidade de regenerar plantas em cultura de tecidos (DANILOVA; DOLGIKH, 2004; SIDOROV et al., 2006). Entretanto, até o momento, o escutelo de embriões imaturos é o explante com a maior eficiência de regeneração, competência para infecção por *A. tumefaciens* e produção de plantas transgênicas, sendo a embriogênese somática o tipo de regeneração preferida para o milho (ISHIDA et al., 1996; FRAME et al., 2002; HUANG; WEI, 2005; VEGA et al., 2008).

Calos embriogênicos somáticos dos Tipos I e/ou II são normalmente formados quando embriões imaturos de milho são subcultivados em meios suplementados com auxinas, tais como 2,4-D e Dicamba (GREEN; PHILLIPS, 1975; ARMSTRONG; GREEN, 1985; DUNCAN et al., 1985; PRIOLI; SILVA, 1989; FRAME et al., 2002; PETRILLO et al., 2008) (Figura 1). Os calos do Tipo I são estruturas compactas, amarelas ou brancas, e normalmente capazes de regenerar plantas (VASIL; VASIL, 1981). Os calos do Tipo II são macios, friáveis e altamente embriogênicos (ARMSTRONG; GREEN, 1985; TOMES; SMITH, 1985). Embora ambos os calos sejam capazes de regenerar plantas, as culturas formadoras de calos do Tipo II crescem mais rapidamente, podem ser mantidas por um longo período de tempo e formam um grande número de embriões somáticos (VASIL, 1987). Como mencionado anteriormente, estas características favorecem a seleção e regeneração de plantas transgênicas (QUE et al., 2014).

O estado fisiológico e o estágio de desenvolvimento do explante no momento da excisão, as estações do ano e interações específicas entre genótipo e condições de cultivo da planta doadora podem modificar a expressividade dos genes que controlam a indução da embriogênese somática e a regeneração de plantas (PRIOLI; SILVA, 1989). Assim, mesmo plantas ou genótipos considerados altamente recalcitrantes podem ser induzidos à morfogênese quando explantes em estádios de desenvolvimento adequados, obtidos de plantas que cresceram sob condições ótimas, são utilizados. Reciprocamente, plantas que normalmente formam calos e se regeneram facilmente *in vitro* podem não se regenerarem quando são utilizados explantes inadequados ou provenientes de plantas cultivadas em condições adversas (VASIL, 1987).

Genótipo

A seleção de genótipos de milho para a produção de plantas transgênicas foca em duas características principais – a capacidade de regeneração *in vitro* e a possibilidade de infecção por *Agrobacterium*. Um genótipo ideal para o programa de produção de plantas transgênicas, além das características citadas anteriormente, deve possuir excelente desempenho agrônomico. Em milho, a iniciação de calos regeneráveis (PHILLIPS et al., 1988) e a frequência de regeneração de plantas são afetadas por um componente genético e dependem do genótipo utilizado (HODGES et al., 1986; PRIOLI; SILVA, 1989). Mediante um ensaio dialélico envolvendo oito linhagens, Beckert e Qing (1984) verificaram herdabilidade significativa para a iniciação de calos embriogênicos e regeneração de plantas de milho. A alta herdabilidade indica que tanto a indução de calos quanto a regeneração de plantas, podem ser aumentadas pelo cruzamento de genótipos recalcitrantes com genótipos altamente responsivos (TOMES; SMITH, 1985; HODGES et al., 1986).

Nos primeiros trabalhos de regeneração *in vitro*, a indução de calos e a regeneração de plantas de milho só eram possíveis em poucos genótipos (GREEN; PHILLIPS, 1975). A ocorrência de calos embriogênicos friáveis do Tipo II não é tão comum, apenas um número restrito de genótipos de milho é capaz de expressar este fenótipo em meio de cultivo, especialmente o híbrido Hill (ARMSTRONG et al., 1991). Entretanto, Hill não é interessante para a avaliação de características agrônomicas, como melhoria da produtividade e tolerância a estresses abióticos, por apresentar um baixo desempenho agrônomico e uma base genética não uniforme (QUE et al., 2014). Portanto, existe grande interesse na seleção de genótipos capazes

de serem infectados por *Agrobacterium*, formarem calos embriogênicos e regenerarem plantas eficientemente.

Com o avanço da metodologia do cultivo in vitro, e particularmente com alterações na composição dos meios de cultura e nas relações e doses dos reguladores de crescimento, foi possível a regeneração de um crescente número de genótipos (NOVAK et al., 1983; RAPELA, 1985; LUPOTTO, 1986; PRIOLI; SILVA, 1989). Apesar de a maioria destes genótipos serem de adaptação a clima temperado, genótipos de adaptação tropical capazes de regeneração também foram identificados (BOHOROVA et al., 1995; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2000; DANSON et al., 2006; FERNANDES et al., 2008; PETRILLO et al., 2008; ANAMI et al., 2010; GORJI et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2012), o que indica a possibilidade de se manipular genótipos-elite tropicais via transformação genética.

Estirpes de *Agrobacterium tumefaciens*

Existe uma especificidade genotípica na interação entre a estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* e o genótipo de milho escolhido, a qual é refletida na habilidade de transferência do T-DNA (VALDEZ-ORTIZ et al., 2007; WANG et al., 2007; OMBORI et al., 2013). As estirpes LBA4404 (OOMS et al., 1982; HOEKEMA et al., 1983), C58 (LAREBEKE et al., 1974), GV3301, EHA 101 (HOOD et al., 1986), AGL0, EHA 105 (cepa derivativa das estirpes EHA101 e AGL0), AGL1(derivativa da EHA101) (LAZO et al., 1991) são as mais citadas em transformações genéticas de milho.

A literatura mostra diversas combinações entre genótipos e estirpes de agrobactérias, por exemplo, as duas cultivares mais utilizadas na transformação do milho - a linhagem A188

e o híbrido Hill - têm sido transformadas utilizando as estirpes LBA4404 (ISHIDA et al., 1996) e EHA 101 (ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002). A estirpe C58 foi utilizada por Sidorov et al. (2006) na transformação de calos de um híbrido triplo (A188, H99 e Pa91) e de algumas linhagens comerciais; as estirpes EHA101 ou C58Z707 foram utilizadas por Frame et al. (2006) na transformação de várias linhagens temperadas (B73, B104, B114, H99, Mo17, Ky21, W64, Oh43, A188, Mp420, GTMas:gk, M37W, W22); as estirpes EHA101 e AGL1 foram capazes de infectar e transformar genótipos provenientes do Canadá (CG69, CG59, CG65, CG68, CG101, CG94, CG37, CG102, CG103, CG74, CG93) e da China (He344, K10, Longfu746) (CAO et al., 2014); a estirpe EHA 105 foi utilizada para a transformação da linhagem A188 e de híbridos dela derivados (LUPOTTO et al., 2004).

Apesar de as estirpes LBA4404, C58 e EHA101 serem as mais citadas nas publicações científicas como casos de sucesso em várias transformações de milho, por causa da especificidade genotípica entre bactéria e planta, é necessário testar diferentes estirpes, para diferentes cultivares de milho, a fim de se obter um processo de transformação eficiente.

Tratamento do Explante antes da Infecção com *Agrobacterium*

Por serem mais recalcitrantes em relação à infecção por *Agrobacterium*, a transformação de monocotiledôneas pode ser melhorada utilizando metodologias que aumentem a eficiência da infecção. Tratamentos físicos capazes de produzir microferimentos nos explantes podem atuar como um importante componente na transferência do T-DNA. Como visto anteriormente, o sistema VirA / VirG, responsável pelo reconhecimento da planta pela bactéria, responde a quatro

classes distintas de sinais moleculares - fenóis, açúcares, baixa concentração de fosfato e pH levemente ácido - e a intensidade da resposta depende da integração entre estes sinais. Portanto, uma provável explicação para a importância da injúria do tecido é a presença destas moléculas indutoras do processo de transferência do T-DNA durante a síntese e reparação da parede da célula vegetal. Adicionalmente, tratamentos físicos podem levar a um aumento no número de sítios de fixação da *Agrobacterium* (TRICK; FINER, 1997; ESCUDERO; HOHN, 1997; SANTARÉM, 2000; MATSUDA et al., 2003).

Em milho, tratamentos físicos aplicados aos explantes antes da infecção com *Agrobacterium*, tais como o bombardeamento de embriões imaturos com micropartículas metálicas, a cavitação acústica (SAAT) e a infiltração a vácuo, já foram utilizados para promover maiores frequências de transformação transiente e regeneração de plantas transgênicas (LUPOTTO et al., 1998; SANTARÉM, 2000; VALDEZ-ORTIZ et al., 2007; BERANOVÁ et al., 2008).

A avaliação de tecidos submetidos à cavitação acústica por microscopia eletrônica de varredura revelou a presença de microcanais e microferimentos, entre 1 μm a 1 mm, na superfície dos explantes. Utilizando estas vias, a *Agrobacterium* é capaz de penetrar e entrar em contato com outros tecidos além dos superficiais. É importante destacar que a duração do pulso sônico é diretamente proporcional à extensão dos ferimentos causados no tecido e que longos tratamentos de pulso afetam a competência do explante para a formação de calos embriogênicos e regeneração do tecido (TRICK; FINER, 1997).

O tratamento a vácuo também facilita a infiltração da *Agrobacterium* nos tecidos vegetais e tem sido utilizado com sucesso na transformação de *Arabidopsis* (CLOUGH; BENT, 1998). Este tratamento também foi utilizado eficientemente no protocolo desenvolvido por Amoah et al. (2001) e Wang et al. (2007) na transformação de trigo e milho, respectivamente.

Temperatura

A temperatura é um fator ambiental que afeta a transferência do T-DNA; isto foi inicialmente relatado por Dillen et al. (1997). A temperatura ideal para a estruturação do sistema VirB / D4, através do qual o T-DNA é transferido entre bactéria e planta, é de 18 a 23 °C. Entre 23 e 28 °C, as proteínas VirB são degradadas e a produção de T-pilus é reduzida; temperaturas de 30 °C ou acima comprometem a formação do T-pilus e a virulência de *Agrobacterium* (ATMAKURI; CHRISTIE, 2007). Apesar de o modo de ação da temperatura sobre o sistema VirB / D4 não ser totalmente conhecido, Atmakuri e Christie (2007) especulam que uma possibilidade é que o estresse de alta temperatura gere uma resposta extracitoplasmática e, em consequência, ocorra a degradação de organelas não essenciais, tais como o sistema T4S. Outra possibilidade que os mesmos autores visualizam é que a temperatura pode influenciar nas propriedades físico-químicas das membranas de *A. tumefaciens*, por exemplo, a composição de fosfolípidios, e por consequência pode impactar a biogênese dos canais VirB / D4 ou T-pilus. Portanto, a temperatura ótima para a transformação deve ser avaliada para cada explante específico e estirpe de *Agrobacterium* envolvidos.

Em milho, a temperatura de cocultivo varia entre 20 e 23 °C. Frame et al. (2002) obtiveram uma alta frequência de transformação cultivando embriões imaturos a 20 °C por 3 dias, após a infecção com *A. tumefaciens*. A temperatura de 23 °C de cocultivo foi a estabelecida para que Rout et al. (2008) obtivessem alta frequência de transformação de milho.

Meios de cultivo

O meio de cultivo geralmente consiste de nutrientes inorgânicos, fontes de carbono e energia, vitaminas, reguladores de crescimento vegetal e suplementos orgânicos (vitaminas, aminoácidos, etc.). Ausência ou concentrações inadequadas destas substâncias são fatores importantes que limitam a eficiência da transformação intermediada por *Agrobacterium* (GUO et al., 2011).

A concentração salina no meio de cultivo foi reportada influenciar a transferência do T-DNA. Elementos minerais são muito importantes na vida de uma planta, portanto estão sempre presentes no meio de cultivo. Os sais constituintes dos meios basais N6 (CHU et al., 1975) e MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) são amplamente utilizados no cultivo in vitro e transformação genética de milho (VEGA et al., 2008; FRAME et al., 2006). A maior diferença existente entre estas duas formulações é seu conteúdo em nitrogênio inorgânico, o meio basal MS possui 3,03 e 1,4 vezes mais NH_4 e NO_3 , respectivamente do que o meio N6. Em alguns relatos, a eficiência da transformação genética foi aumentada quando se utilizou uma baixa concentração de sais durante a infecção com *Agrobacterium* (FRY et al., 1987; ARMSTRONG; ROUT, 2001).

Substâncias produzidas pelas plantas capazes de induzir a expressão dos genes *vir* de *Agrobacterium*, por exemplo, os compostos fenólicos, são necessárias para uma transformação eficiente (STACHEL; ZAMBRYSKY, 1986). Adição de acetoseringona aumentou a indução dos genes *vir* de *Agrobacterium*, durante o período de cocultivo na maioria das culturas estudadas (VIJAYACHANDRA et al., 1995; CHENG et al., 1997; KUMLEHN et al., 2006).

A manipulação do potencial osmótico do meio de cultivo através da alteração das concentrações de glicose e sacarose também foi determinada ser útil durante a infecção de algumas monocotiledôneas por *Agrobacterium* (HIEI et al., 1994). Segundo Wu et al. (2003), a adição de açúcares, como maltose ou sacarose no meio de infecção, é fundamental para o sucesso da transferência do T-DNA.

Estudos determinaram que a suplementação dos meios com antioxidantes ou misturas antinecróticas, tais como a L-cisteína, DTT e PVP (polipirrolidona), aumenta a eficiência de transformação por *A. tumefaciens* (PERL et al., 1996; OLHOFT; SOMERS, 2001; PAZ et al., 2004), na medida em que eleva a capacidade de regeneração das células ao minimizar a necrose celular ocasionada pela oxidação durante o processo de infecção (FRAME et al., 2006; VEGA et al., 2008). A inclusão da cisteína no meio de cocultivo levou a uma maior eficiência na infecção de milho por *Agrobacterium*, demonstrada por um aumento na expressão transiente do gene repórter GUS e na frequência de eventos transgênicos produzidos.

Outro constituinte presente em meios de cultivo que tem otimizado a eficiência de transformação é o nitrato de prata

(AgNO₃). Sua ação é devida provavelmente à supressão do crescimento excessivo da *Agrobacterium* no explante sem afetar a transferência do T-DNA, o que facilita a recuperação das células do milho em cultura, após o período de infecção, aumentando assim a eficiência de transformação (ARMSTRONG; ROUT, 2001; ZHAO et al., 2001; CHENG et al., 2003).

Conclusões

A transformação genética de cereais intermediada por *Agrobacterium* é uma realidade em vários centros de pesquisa privados ou públicos. Entretanto, na maioria dos laboratórios, os protocolos foram desenvolvidos para genótipos modelo que apresentam uma excelente regeneração *in vitro*, mas um pobre desempenho no campo. O desafio atual é ampliar estes protocolos para as linhagens-elites de interesse econômico. Este documento apresenta alguns dos fatores que podem influenciar a transformação de monocotiledôneas via *Agrobacterium* e precisam ser estudados durante a geração de novos protocolos eficientes de produção de plantas transgênicas. Um maior entendimento a nível molecular da ação destes fatores poderá futuramente trazer melhorias para os processos de transformação de cereais via *Agrobacterium tumefaciens* e possibilitar a transformação de um maior número de genótipos.

Referências

AMOA, B. K.; WU, C.; SPARKS, C.; JONES, H. D. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 52, n. 358, p. 1135-1142, 2001.

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

ARMSTRONG, C. L.; ROUT, J. R. **A novel *Agrobacterium*-mediated plant transformation method**. Patente. PCT/US2000/020634. 28 July 2000, 8 Feb. 2001.

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.

ANAMI, S. E.; MGUTU, A. J.; TARACHA, C.; GRIET COUSSENS, G.; KARIMI, M.; HILSON, P.; VAN LIJSEBETTENS, M.; MACHUKA, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 102, p. 285-295, 2010.

ATMAKURI, K.; CHRISTIE, P. J. Translocation of oncogenic T-DNA and effector proteins to plant cells. In: TZFIRA, T.; CITOVSKEY, V. (Ed.). **Agrobacterium: from biology to biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, 2007. p. 315-362.

BARAMPURAM, S.; ZHANG, Z. J. Recent advances in plant transformation. **Methods in Molecular Biology**, v. 701, p. 1-35, 2011.

BECKERT, M.; QING, C. M. Results of a diallel trial and a breeding experiment for in vitro aptitude in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 68, p. 247-251, 1984.

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

BERANOVÁ, M.; RAKOUSKÝ, S.; VÁVROVÁ, Z.; SKALICKY, T. Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax (*Linum usitatissimum* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 94, p. 253-259, 2008.

BOHOROVA, N. E.; LUNA, R.; BRITTO, R. M.; HUERTA, L. D.; HOISINGTON, D. A. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude and highland maize inbreds. **Maydica**, Bergamo, v. 40, p. 275-281, 1995.

BOSCHIROLI, M. L.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; FOULONGNE, V.; MICHAUX-CHARACHON, S.; BOURG, G.; ALLARDET-SERVENT, A.; CAZEVIEILLE, C.; LAVIGNE, J. P.; LIAUTARD, J. P.; RAMUZ, M.; O'CALLAGHAN, D. Type IV secretion and Brucella virulence. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 341-348, 2002.

CAO, S.-L.; MASILAMANY, P.; LI, W.; PAUL, K. P. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of corn (*Zea mays* L.)

multiple shoots. **Biotechnology, Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 2, p. 208-216, 2014.

CANGELOSI, G. A.; ANKENBAUER, R. G.; NESTER, E. W. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 6708-6712, 1990.

CHENG, M.; FRY, J. E.; PANG, S.; ZHOU, H.; HIRONAKA, C. M.; DUNCAN, D. R.; CONNER, T. W.; WAN, Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, Washington, v. 115, p. 971-980, 1997.

CHENG, M.; HU, T.; LAYTON, J.; LIU, C.; FRY, J. E. Desiccation of plant tissues post-*Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 39, p. 595-604, 2003.

CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; BI, C. V. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. **Scientia Sinica**, Pequim, v. 18, p. 659-668, 1975.

CHRISTIE, P. J. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1694, p. 219-234, 2004.

CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 16, n. 6, p. 735-743, 1998.

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**, v. 51, n. 4, p. 559-562, 2004.

DANSON, J. W.; LAGAT, M.; MBOGORI, M. Screening tropical maize lines for the production and regeneration of friable and embryogenic type II callus. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 23, p. 2367-2370, 2006.

DILLEN, W.; DE CLERCQ, J.; KAPILA, J.; ZAMBRE, M.; VAN MONTAGU, M.; ANGENON, G. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*- mediated gene transfer to plants. **Plant Journal**, v. 12, n. 6, p. 1459-1463, 1997.

DUNCAN, D. R.; WILIAMS, M. E.; ZEHR, 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.

ESCUDERO, J.; HOHN, B. Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 2135-2142, 1997.

FERNANDES, E. H.; PRIOLI, A. J.; SCAPIM, C. A.; SCHUSTER, I.; VIEIRA, E. S. N.; AMARAL JR., A. T.; MOTERLE, L. M. Embriogênese somática a partir de embriões imaturos em

genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2604-2607, 2008.

FRAME, B. 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**, v. 25, p. 1024-1034, 2006.

FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R. K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T. M.; PEGG, E. K.; LI, B.; NETTLETON, D. S.; PEI, D.; WANG, K. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. **Plant Physiology**, Washington, v. 129, p. 13-22, 2002.

FRY, J.; BARNASON, A.; HORSCH, R. B. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 321-325, 1987.

GALLEGO, P. P.; LANDÍN, M.; GAGO, J. Artificial neural networks technology to model and predict plant biology process. In: SUZUKI, K. (Ed.). **Artificial neural networks: methodological advances and biomedical applications**. Rijeka: InTech, 2011. p. 197-216.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "genejockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 1, p. 16-37, 2003.

GONZÁLEZ, G. A.; PACHECO, M. G.; ONETO, C. D.; ETCHART, V. J.; KANDUS, M. V.; SALERNO, J. C.; EYHERABIDE, G.;

PRESELLO, D.; LEWI, D. M. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 1, 2012.

Disponível em: <<http://www.scielo.cl/pdf/ejb/v15n1/a09.pdf>>.

Acesso em: 18 nov. 2015.

GORJI, A. H.; ZOLNOORI, M.; JAMASBI, A.; ZOLNOORI, Z. Vitro plant generation of tropical maize genotypes. **International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering**, v. 16, p. 52-59, 2011.

Disponível em: <<http://www.ipcbee.com/vol16/11-E10004.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2015.

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

GUO, M.; BIAN, X.; WU, X. WU, M. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation: history and progress. In: ALVAREZ, M. A. (Ed.). **Genetic transformation**. Rijeka: InTech, 2011. p. 3-28.

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

HODGES, T. K.; KAMO, K. K.; IMBRIE, C. W.; BECWAR, M. R. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. **Nature Biotechnology**, v. 4, p. 219-223, 1986.

HOEKEMA, A.; HIRSCH, P. R.; HOOYKAAS, P. J. J.; SCHILPEROORT, R. A. A binary plant vector strategy based on

separation of vir and T region of *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, London, v. 303, p. 179-180, 1983.

HOOD, E. E.; HELMER, G. L.; FRALEY, R. T.; CHILTON, M. D. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 168, p. 1291-1301, 1986.

HOOYKAAS, P. J. J. **Plant transformation**. Chichester: John Wiley, 2010.

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

ISHIDA, V.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 6, p. 745-750, 1996.

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

JIN, S. G.; ROITSCH, T.; CHRISTIE, P. J.; NESTER, E. W. The regulatory VirG protein specifically binds to a *cis*-acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, p. 531-537, 1990.

KUMLEHN, J.; SERAZETDINOVA, L.; HENSEL, G.; BECKER, D.; LOERZ, H. Genetic transformation of barley (*Hordeum*

vulgare L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 251-261, 2006.

LACROIX, B.; CITOVSKY, V. The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium* mediated genetic transformation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 57, p. 467-481, 2013.

LAREBEKE, N. V.; ENGLER, G.; HOLSTERS, M.; ELSACKER, S. V.; ZAENEN, I.; SCHILPEROORT, R. A.; SCHELL, J. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. **Nature**, London, v. 252, n. 8, p. 169-170, 1974.

LAZO, G. R.; STEIN, P. A.; LUDWIG, R. A. A DNA transformation competent Arabidopsis genomic library in *Agrobacterium*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 9, n. 10, p. 963-967, 1991.

LEE, L.-Y.; GELVIN, S. B. T-DNA binary vectors and systems. **Plant Physiology**, Washington, v. 146, p. 325-332, 2008.

LUPOTTO, E. In vitro culture of isolated somatic embryos of maize (*Zea mays* L.) **Maydica**, Bergamo, v. 31, p. 193-201, 1986

LUPOTTO, E.; REALI, A.; PASSERA, S.; CHAN, M. T. **Maize transformation with *Agrobacterium tumefaciens***. 1998. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/72/67lupotto.html>>. Acesso em: 17 nov. 2015.

LUPOTTO, E.; CONTI, E.; REALI, A.; LANZANOVA, C.; BALDONI, E.; ALLEGRI, L. Improving in vitro culture and regeneration

conditions for *Agrobacterium*-mediated maize transformation. **Maydica**, Bergamo, v. 49, n. 1, p. 21-29, 2004.

MATSUDA, F.; MORINO, K.; MIYASHITA, M.; MIYAGAWA, H. Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in wound-healing potato tuber tissue using stable isotope-labeled tracer and LC-MS spectroscopy. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 44, p. 510-517, 2003.

MELCHERS, L. S.; REGENSBURG-TUINK, T. J.; BOURRET, R. B.; SEDEE, N. J.; SCHILPEROORT, R. A.; HOOYKAAS, P. J. Membrane topology and functional analysis of the sensory protein VirA of *Agrobacterium tumefaciens*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 8, p. 1919-1925, 1989.

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

NESTER, E. **Agrobacterium**: the natural genetic engineer 100 years later. 2008. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Agrobacterium.aspx>>. Acesso em: 16 nov. 2015.

NOVAK, F. J.; DOLEZELA, M.; NESTICKY, M.; PIOVARIC, A. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zea mays* L. **Maydica**, Bergamo, v. 23, p. 381-390, 1983.

OLHOFT, P. M.; SOMERS, D. A. I-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 706-711, 2001.

OOMS, G.; HOOYKAAS, P. J.; VEEN, R. V.; BLEELEN, P. V.; REGENSBURG-TUINK, T. J.; SCHILPEROORT, R. A. Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. **Plasmid**, v. 7, n. 1, p. 15-29, 1982.

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

PAZ, M. M.; SHOU, H.; GUO, Z.; ZHANG, Z.; BANERJEE, A. K.; WANG, K. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. **Euphytica**, Wageningen, v. 136, p. 167-179, 2004.

PAREDDY, D. R.; PETOLINO, J. F. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences of several elite inbreds of maize. **Plant Science**, v. 67, p. 211-219, 1990.

PERL, A.; LOTAN, O.; ABU-ABIED, M.; HOLLAND, D. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during the grape-*Agrobacterium* interactions. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, p. 624-628, 1996.

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.

PHILLIPS, R. L.; SOMERS, D. A.; HIBBERD, K. A. Cell/tissue culture and in vitro manipulation. In: SPRAGUE, G. F.; FUCCILLO, D. A.; PERELMAN, L. S.; STELLY, M. **Corn and corn improvement**. 3. ed. Madison: American Society of Agronomy, 1988. p. 345-387. (Agronomy Monograph, 18).

PITZSCHKE, A. *Agrobacterium* infection and plant defense transformation success hangs by a thread. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-12, 2013.

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

QUE, Q.; ELUMALAI, S.; LI, X.; ZHONG H.; NALAPALLI, S.; SCHWEINER, M.; FEI, X.; NUCCIO, M.; KELLIHER, T.; GU, W.; CHEN, Z.; CHILTON, M. D. M. Maize transformation technology development for commercial event generation. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-19, 2014.

RAPELA, M. A. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissue cultures of Argentina maize (*Zea mays* L.) **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 121, p. 119-122, 1985.

RAY, D. S.; GHOSH, P. D. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences of several elite inbreds of maize. **Plant Science**, v. 46, p. 225-232, 1990.

REGO, A. T.; CHANDRAN, V.; WAKSMAN, G. Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the chaperone-

usher pathway of pilus biogenesis. **Biochemical Journal**, v. 425, n. 3, p. 475-488, 2010.

REYES, F. C.; SUN, B.; GUO, H.; GRUIS, D.; OTEGUI, M. S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize endosperm as a tool to study endosperm cell biology. **Plant Physiology**, Washington, v. 153, p. 624-663, 2010.

RIVERA, A. L.; LIM, M. G.; LOSKE, A. M. Physical methods for genetic plant transformation. **Physics of Life Reviews**, v. 9, p. 308-345, 2012.

RHODES, C. A.; GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. L. Factors affecting tissue culture initiation from maize tassels. **Plant Science**, v. 46, n. 3, p. 225-232, 1986.

ROUT, J. R.; LOWE, B. A.; PURCELL, J.; SPELLETICH, A.; SPENCER, M.; ANDWAY, M. **Method of rapidly transforming monocots**. Patente. PCT/US2007/077366. 31 Aug. 2007, 17 Apr. 2008.

SANTARÉM, E. R. SAAT: transformação de plantas mediada por ultra-som e *Agrobacterium*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 725-730, 2000.

SANTOS, M.; TORNÉ, J. M.; BLANCO, J. Methods of obtaining totipotent tissues. I. Seedling segments culture. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 33, p. 309-315, 1984.

SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Genótipos de milho com alta capacidade para embriogênese somática

e regeneração de plantas obtidos a partir de calos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 717-722, 2000.

SHENG, J.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell interaction: have virulence proteins - will travel. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1699-1710, 1996.

SIDOROV, V.; GILBERTSON, L.; ADDAE, P.; DUNCAN, D. *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 320-328, 2006.

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**, Lancaster, v. 79, n. 7, p. 761-764, 1992.

STACHEL, S. E.; ZAMBRYSKI, P. C. *Agrobacterium tumefaciens* and the susceptible plant cell: a novel adaptation of extracellular recognition and DNA conjugation. **Cell**, Cambridge, v. 47, p. 155-157, 1986.

SUPRASANNA, P.; RAO, K. V.; REDDY, G. M. Plantlet regeneration from glume calli of maize. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 72, p. 120-122, 1986.

TING, Y. C.; YU, M.; ZHENG, W.-Z. Improved anther culture of maize (*Zea mays*). **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 23, n. 2, p. 139-145, 1981.

TOMES, D. T.; SMITH, O. S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.)

germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 70, p. 505-508, 1985.

TRICK, H. N.; FINER, J. J. SAAT: sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 6, p. 329-337, 1997.

VASIL, V.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum* and *P. americanum* X *P. purpurea* hybrid. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 68, p. 864-872, 1981.

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

VALDEZ-ORTIZ, A.; MEDINA-GODOY, S.; VALVERDE, M. E.; PAREDES-LOPEZ, O. A transgenic tropical maize line generated by the direct transformation of the embryo-scutellum by *A. tumefaciens*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 91, p. 201-214, 2007.

VIJAYACHANDRA, K.; PALANICHELYAM, K.; VELUTHAMBI, K. Rice scutellum induces *Agrobacterium tumefaciens* vir genes and T-strand generation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 29, p. 125-133, 1995.

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**, v. 27, p. 297-305, 2008.

VERGUNST, A. C.; VAN LIER, M. C. M.; DEN DULK-RAS, A.; STÜVE, T. A. G.; OUWEHAND, A.; HOOYKAAS, P. J. J. Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 832-837, 2005.

WANG, Y.; FU, S.; WEN, Y.; ZHANG, Z.; XIA, Y.; LIU, Y.; RONG, T.; PAN, G. Selection of maize inbred lines with high regeneration and susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 34, n. 8, p. 749-755, 2007.

WINANS, S. C.; KERSTETTER, R. A.; NESTER, E. W. Transcriptional regulation of the *virA* and *virG* genes of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 4047-4054, 1988.

WINANS, S. C.; MANTIS, N. J.; CHEN, C.-Y.; CHANG, C.-H.; HAN, D. C. Host recognition by the VirA, VirG two-component regulatory proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. **Research in Microbiology**, Paris, v. 145, p. 461-473, 1994.

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

ZAMBRYSKI, P. Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 1-30, 1988.

ZHANG, S.; WILLIAMS-CARRIER, R.; LEMAUX, P. G. Transformation of recalcitrant maize elite inbreds using in

vitro shoot meristematic cultures induced from germinated seedlings. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 263-270, 2002.

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

ZHU, J.; OGER, P. M.; SCHRAMMEIJER, B.; HOOYKAAS, P. J. J.; FARRAND, S. K.; WINANS, S. C. The bases of crown gall tumorigenesis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, p. 3885-3895, 2000.

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



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



CGPE - 12607