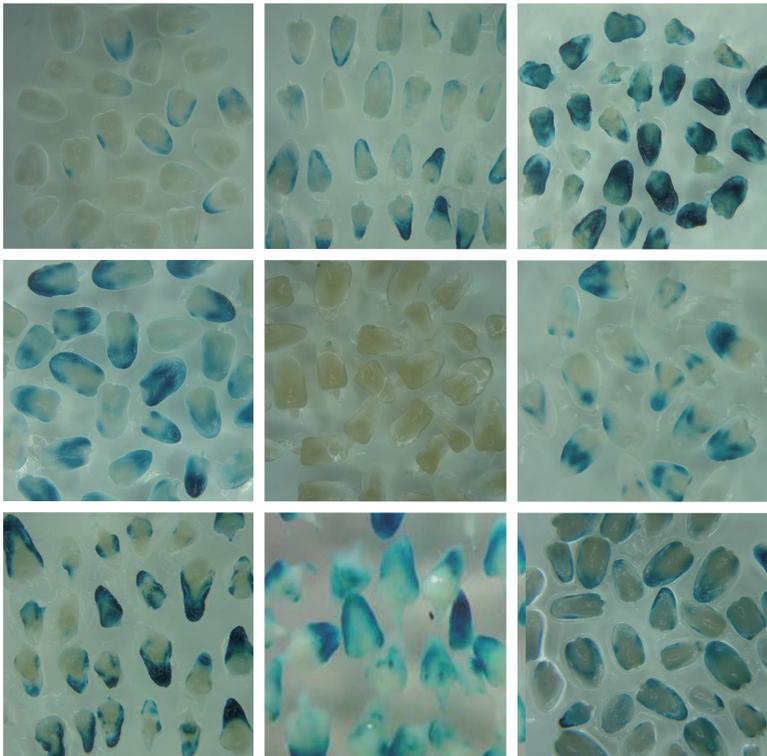


Estudo de Parâmetros que Influenciam a Transformação Genética de Milho (*Zea mays* L.) Hill via *Agrobacterium tumefaciens*



ISSN 1679-0154
Julho 2016

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 137

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

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

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2016

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 (2016)

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

Estudo de parâmetros que influenciam a transformação genética de milho (*Zea mays* L.) Hill via *Agrobacterium tumefaciens* / Meire de Cássia Alves ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2016.

24 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1619-0154; 137).

1. Melhoramento genético. 2. Tecido vegetal. 3. Histologia vegetal. 4. Bactéria. I. Alves, Meire de Cássia. II. Série.

CDD 631.52 (21. ed.)

© Embrapa 2016

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	15
Referências	21

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

Meire de Cássia Alves¹

Rayanne Pereira de Oliveira²

Kamila Ellen Souza de Oliveira³

Newton Portilho Carneiro⁴

Andréa Almeida Carneiro⁵

Resumo

A transformação genética de milho pode ser utilizada para o desenvolvimento de cultivares mais produtivas e adaptadas a diversos estresses ambientais. Existem vários métodos para a modificação genética do milho, sendo que, atualmente, um dos mais utilizados é a transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. Esta metodologia apresenta vantagens como uma maior precisão na integração do T-DNA, um menor número de cópias do transgene inseridas no genoma da planta, poucos rearranjos das moléculas de DNA introduzidas e uma maior estabilidade fenotípica durante muitas gerações de cruzamento. Em contrapartida, é um método genótipo-

¹Bióloga Mestra, Analista Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, meire.alves@embrapa.br

²Bióloga / Bolsista DTI / Fapemig

³Estudante Agronomia Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ) / Bolsista Iniciação Científica / Fapemig

⁴Ph.D em Biotecnologia, Biologia Molecular, Embrapa Milho e Sorgo, Cx. P 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, newton.carneiro@embrapa.br

⁵Ph.D. Biologia Molecular, Embrapa Milho e Sorgo, Cx. P 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, andrea.carneiro@embrapa.br

dependente e recalcitrante em monocotiledôneas. O objetivo deste estudo foi avaliar, através da análise histoquímica da expressão transiente do gene repórter *gus*, alguns fatores capazes de influenciar a transferência do T-DNA visando a implementação de um protocolo eficiente de transformação genética do milho Hill via *A. tumefaciens* no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação Genética do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da Embrapa Milho e Sorgo.

Palavras-chave: análises histoquímicas, cocultivo, embriões imaturos, infecção, GUS.

Study of Parameters Capable of Influencing the Genetic Transformation of Maize (*Zea mays* L.) Hill via *Agrobacterium tumefaciens*

***Meire de Cássia Alves*¹**

***Rayanne Pereira de Oliveira*²**

***Kamila Ellen Souza de Oliveira*³**

***Newton Portilho Carneiro*⁴**

***Andréa Almeida Carneiro*⁵**

Abstract

Genetic transformation of maize may be used for the development of cultivars adapted to various environmental stresses. There are several methods for the genetic modification of maize, and currently one of the most used is the transformation via *Agrobacterium tumefaciens*. This method has the advantages of greater accuracy in the integration of T-DNA, a smaller number of transgene copies inserted in the plant genome, few rearrangements of DNA molecules introduced and increased phenotypic stability for many crossing generations. However, it is a genotype-dependent method and recalcitrant in monocots. The aim of this study was to evaluate, by histochemical analysis of transient expression of *gus* reporter gene, certain factors that can influence the transfer of T-DNA for the implementation of an efficient protocol for genetic transformation of maize Hill, via *A. tumefaciens*, in the Laboratory of Tissue Culture and Genetic Transformation, of Applied Biology Center (NBA), at Embrapa Maize and Sorghum.

Keywords: histochemical analyzes, co-cultivation, immature embryos, infection, GUS.

Introdução

O milho é uma cultura de grande importância agrônômica que movimenta um mercado de bilhões de dólares. Também é usado extensivamente em pesquisas básica e aplicada. Informações sobre a organização e regulação do genoma do milho estão sendo disponibilizadas frequentemente e existe um grande potencial de aplicação deste conhecimento no melhoramento dessa cultura através da integração e expressão de genes de interesse agrônômico via tecnologias de transformação genética e edição de genoma.

Diversos métodos de transformação genética foram descritos para a cultura do milho, dentre eles a biobalística (SANFORD et al., 1987; KLEIN et al., 1992) e a transformação via *Agrobacterium tumefaciens* são os mais empregados (FRAME et al., 2002; ISHIDA et al., 2007; VEGA et al., 2008). Transformação via *A. tumefaciens* apresenta diversas vantagens em comparação com a biobalística, em função do menor número de cópias do transgene inseridas no genoma, dos poucos rearranjos das moléculas de DNA introduzidas e da maior estabilidade fenotípica durante muitas gerações de cruzamento (ISHIDA et al., 1996). Em contrapartida, plantas monocotiledôneas como o milho não são hospedeiros naturais da *A. tumefaciens*, e alguns ajustes devem ser estudados durante a infecção e cocultivo, visando otimizar a transferência de T-DNA para o genoma das plantas receptoras.

Uma vez dentro do núcleo da célula vegetal, os genes presentes no T-DNA podem ser expressos de forma transiente ou estável (JANSSEN; GARDNER, 1990). Na expressão transiente não há necessidade que ocorra a integração do T-DNA no genoma hospedeiro, e a expressão gênica é normalmente detectada três dias após a infecção do tecido vegetal, diminuindo com o passar do tempo (LACROIX; CITOVSKY, 2013). Já na expressão estável, o T-DNA se integra no genoma hospedeiro e é replicado durante a divisão celular, sendo, portanto, a transformação estável responsável pela formação de plantas transgênicas contendo o T-DNA em todas as suas células. Ao contrário da expressão transiente, na expressão estável os genes são transferidos para a progênie.

A transformação transiente via *Agrobacterium* pode ser aplicada para estudos rápidos de expressão gênica, localização celular, interação proteína-proteína, etc. Mais informações sobre o assunto podem ser obtidas em revisões recentes, tais como as de Křenek et al. (2015) e Guidarelli e Baraldi (2015).

O desenvolvimento de uma metodologia adequada e eficiente para a transformação genética de milho através de *A. tumefaciens* é uma tarefa complexa, e, para tanto, é essencial compreender os diversos fatores que influenciam a transferência, a integração e a estabilidade do T-DNA no genoma do tecido-alvo (GALLEGO et al., 2011).

O propósito desta pesquisa foi avaliar, através da análise histoquímica da expressão transiente do gene repórter *gus*, alguns dos fatores capazes de influenciar a transformação genética de milho via *A. tumefaciens* visando a implementação de um protocolo eficiente de transformação genética do híbrido

de milho Hill (ARMSTRONG et al., 1991) via *A. tumefaciens* no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação Genética do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da Embrapa Milho e Sorgo.

Material e Métodos

O protocolo utilizado na transformação genética de milho Hill foi baseado nas pesquisas desenvolvidas por Frame et al. (2002) e Vega et al. (2008).

Obtenção de Embriões Imaturos de Milho

Transformações de milho são realizadas 2 a 3 vezes por semana no Laboratório de Biologia Celular da Embrapa Milho e Sorgo e plantas de milho são requeridas como doadoras de embriões. Para suprir esta demanda, dez vasos (30 L cada) são plantados duas vezes por semana com duas plantas cada. Obtêm-se em média de 10 a 12 espigas por semana. Entre 55 a 60 dias são necessários para o aparecimento e fertilização da inflorescência feminina. Espigas são coletadas entre 10 e 15 dias após a polinização quando os embriões estiverem entre 1,8 e 2,0 mm de comprimento. O tempo da coleta depende da estação do ano. A casa de vegetação opera com um fotoperíodo de 16:8 (luz/escuro). A temperatura durante o dia é de 28 ± 2 °C enquanto que durante a noite é de 21 ± 2 °C.

Transformação Genética de Embriões Imaturos de Hill via *Agrobacterium tumefaciens*

Preparo do Explante

O genótipo utilizado neste protocolo foi o híbrido de milho Hill (ARMSTRONG et al., 1991). Para produção do híbrido Hill (F1), foi utilizado o pólen da cultivar B (Parental B) e os óvulos da cultivar A (Parental A). Para a transformação, sementes F1 foram plantadas, autopolinizadas e os embriões imaturos foram utilizados como explantes. Antes da retirada dos embriões, as espigas foram desinfestadas em uma solução 50% de água sanitária comercial (Qboa 2,75%) com 1-2 gotas de Tween 20, por 20 minutos. Em seguida, enxaguadas com água destilada estéril por 5 minutos, duas vezes. O embrião imaturo foi retirado inserindo-se uma espátula arredondada entre o endosperma e o pericarpo no lado base petal do grão (base da espiga), e girando-se no sentido anti-horário.

***Agrobacterium tumefaciens* e Construção Gênica**

A construção gênica utilizada foi a pTF102 (FRAME et al., 2002) (Figura 1) inserida na *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (HOOD et al., 1986). O T-DNA deste vetor possui 5,9 Kb e compreende as regiões codantes dos genes *bar* e *uidA*, ambas direcionadas pelo promotor *CaMV35S* (FRAME et al., 2002).

Preparo da *Agrobacterium*: Bactérias utilizadas nos experimentos foram iniciadas a partir de placas-estoques mantidas até 30 dias a 4 °C. Para a transformação genética, uma estria da *Agrobacterium* utilizando uma colônia isolada da placa estoque foi feita em meio YEP suplementado com 100 mg.l⁻¹ espectinomicina e 50 mg.l⁻¹ canamicina. Esta placa foi incubada por três dias a 19 °C. Duas horas antes da transformação as

colônias de *Agrobacterium* foram ressuspensas até atingir uma DO₅₅₀ de 0,3 a 0,4, em frasco contendo meio de infecção (N6 sais e vitaminas (1000X), 1,5 mL/L 2,4-D, 0,7 g prolina, 68,4 g sacarose, 36 g glicose, pH 5.2) suplementado com 100 µM acetoseringona imediatamente antes da utilização, em seguida estes foram colocados em posição horizontal em agitador orbital a 150 rpm, 22 °C.

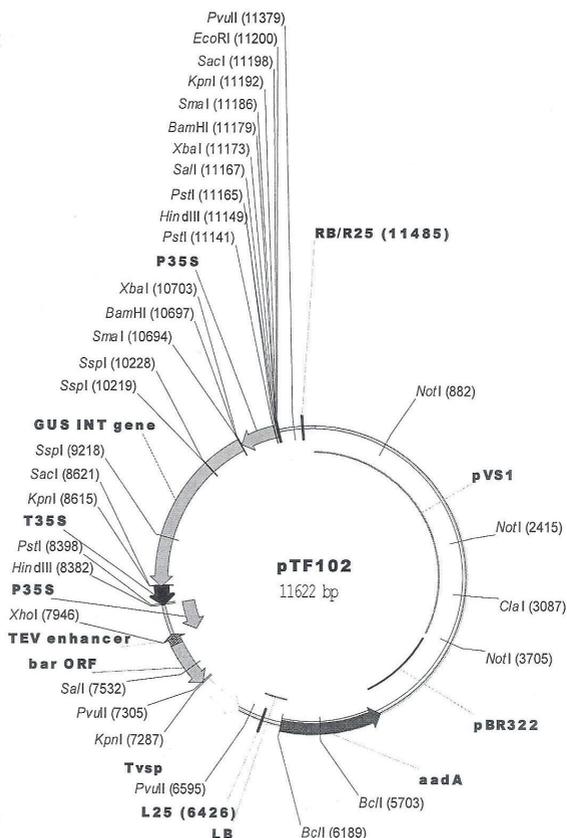


Figura 1. Vetor binário pTF102 (FRAME et al., 2002).

Infecção de Embriões Imaturos de Milho

Trinta embriões foram coletados em 1 ml de meio de infecção acrescido de acetoseringona em microtubos tipo eppendorf com capacidade de 1,5 mL. Momentos antes da infecção os embriões foram lavados duas vezes com meio de infecção novo e 1 mL da cultura bacteriana foi adicionado ao tubo. Os tubos contendo *A. tumefaciens* e embriões imaturos foram homogeneizados por inversão 20 vezes e incubados por 5 min.

Cocultivo: Após a infecção, os embriões foram transferidos para a superfície do meio de cocultivo (N6 sais e vitaminas, 1,5 mL/L 2,4-D, 0,7 g prolina, 30,0 g sacarose, 100 mg myoinositol, 5 μ M AgNO₃, 100 μ M acetoseringona, 300 mg L-cysteína pH 5.8) e o excesso de *Agrobacterium* foi retirado com uma micropipeta. Embriões foram plaqueados com o escutelo voltado para cima. As placas foram fechadas com fita cirúrgica (micropore) e incubadas a 20 °C por 5 dias. Após o período de cocultivo, os embriões infectados foram utilizados para a detecção da expressão transiente do gene repórter *gus*.

Parâmetros Testados Visando a Implantação do Protocolo de Transformação Genética de Milho Hill na Embrapa Milho e Sorgo

Todos os tratamentos foram realizados com três repetições de 30 embriões cada, e as transformações foram finalizadas após o período de cocultivo.

Período de Estocagem das Espigas

Para verificar a possibilidade de utilização de embriões imaturos após armazenamento de espigas em câmara fria, nove espigas foram coletadas 12 dias após a polinização e os embriões

imaturos entre 1,8 e 2,0 mm foram coletados e infectados com *Agrobacterium* no mesmo dia, 24 ou 48 horas após a coleta. Espigas foram armazenadas em câmara fria a 8 °C e umidade relativa de 22%.

Tempo de Permanência dos Embriões Imaturos em Meio de Infecção sem *Agrobacterium*

Para verificar se o tempo em que os embriões ficam imersos em meio de infecção antes da transformação exerce influência no processo de infecção, foram testados dois tempos de imersão: 30 ou 120 min. Dois grupos de embriões, provenientes de uma mesma espiga, foram coletados, e o primeiro grupo foi infectado depois de 30 min de permanência em meio de infecção e o segundo grupo, depois de 120 min. Após o processo de infecção com *Agrobacterium*, embriões de ambos os grupos foram transferidos para meio de cocultivo por três dias a 20 °C e, em seguida, a expressão transiente do gene repórter *gus* foi analisada.

- Tempo de permanência de embriões infectados em placa aberta: Após o período de infecção, os embriões foram plaqueados em meio de cocultivo. As placas contendo o meio e os embriões ficaram abertas em capela de fluxo laminar por 0, 15, 30 e 45 minutos antes de serem fechadas com fita micropore e incubadas a 20 °C.
- Utilização da cavitação acústica ou sonicação no momento da infecção: 30 embriões imaturos de milho foram transferidos para tubos plásticos de 50 mL com 5 mL de meio de infecção contendo *A. tumefaciens*. Os tubos foram sonicados por 0, 15 e 30 segundos usando um aparelho

Brason 3210 (Bransonic Ultrasonic Corporation/Connecticut – EUA).

- Utilização da pressão de vácuo durante a infecção: Tubos de plástico do tipo Falcon de 10 mL estéreis contendo 30 embriões imaturos de milho imersos em 1 mL de inóculo foram colocados em um dessecador, e o vácuo foi aplicado a 27 in Hg (Trivac D4A/Leybold Vaccum Products Inc./EUA) no momento da infecção por 0, 5, 10 e 15 min. Em seguida, o inóculo foi removido e os explantes, plaqueados em meio de cocultivo. O cocultivo foi realizado no escuro a 20 °C por três dias.
- Tempo de cocultivo do explante com *Agrobacterium tumefaciens*: Foram testados os tempos de 3, 5 e 7 dias de permanência da *A. tumefaciens* EHA101 com os embriões imaturos de Hill.

Análise da Expressão Transiente do Gene Repórter *Gus*

Para avaliar qualitativamente a expressão da enzima β -glucuronidase (GUS), foram realizados ensaios histoquímicos, de acordo com a metodologia descrita por Jefferson et al. (1987). Embriões imaturos infectados com *Agrobacterium* foram coletados após o período de co-cultivo e imediatamente imersos em solução contendo 50mM tampão fosfato de sódio (pH 7.0) e 1 mM ácido 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucurônico. A reação foi incubada por 24 horas a 37 °C. A expressão do gene repórter GUS foi observada com o auxílio de microscópios estereoscópicos Axio Zoom e SV 11 –Stemie (Zeiss).

Resultados e Discussão

Período de Estocagem das Espigas a 4 °C antes da Transformação Genética

O procedimento de infecção de embriões de milho com *Agrobacterium* é realizado duas ou três vezes por semana no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas da Embrapa Milho e Sorgo. Embriões zigóticos imaturos, utilizados como explantes no processo de transformação eventualmente atingem o tamanho ideal para coleta em dias diferentes dos programados para os experimentos de transformação, portanto foram realizados testes para verificar o efeito da estocagem das espigas a 4 °C durante 24 e 48 horas antes da transformação genética. Nove espigas foram coletadas na mesma data, embriões imaturos de três espigas foram infectados com *Agrobacterium* no mesmo dia da coleta. As demais espigas foram estocadas em câmara fria por 24 e 48 horas sendo as transformações dos embriões realizadas após cada período de estocagem de acordo com o protocolo descrito anteriormente. A expressão transiente do gene repórter *gus* foi analisada nos embriões infectados após três dias de cocultivo com *Agrobacterium*. Os resultados mostraram que os embriões estocados em câmara fria responderam de maneira semelhante aos embriões utilizados frescos (Figura 2), portanto espigas que atingem o desenvolvimento ideal para o processo de transformação podem ser estocadas em câmara fria a 8 °C durante 24 ou 48 horas sem prejuízo do processo de transferência do T-DNA.

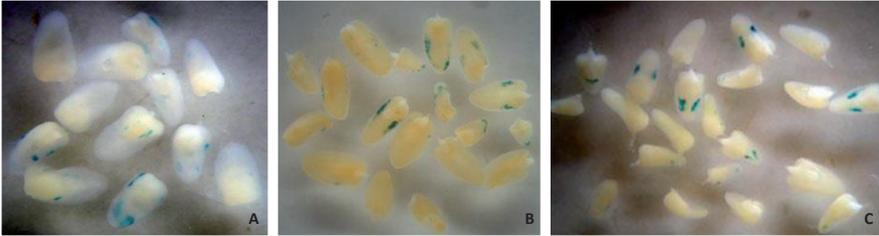


Figura 2. Expressão transitória do gene repórter *gus* em embriões infectados por *A. tumefaciens* EHA101 carregando o vetor binário pTF102, coletados a partir de espigas estocadas a 4 °C antes da transformação por *A. tumefaciens*. (A) Embriões infectados no mesmo dia; (B) 24 e (C) 48 h após a coleta.

Tempo de Permanência dos Embriões Imaturos de Hill em Meio de Infecção sem *Agrobacterium*

Durante o processo de transformação, embriões imaturos são inicialmente coletados em meio de infecção sem a *Agrobacterium* e o tempo de permanência neste meio pode variar dependendo da quantidade de espigas que serão utilizadas. Para verificar qual seria o procedimento mais adequado de infecção: (i) Repetir o processo de infecção várias vezes com pequenas quantidades de embriões, assim embriões permaneceriam em meio de infecção durante um curto período de tempo, ou (ii) Realizar apenas uma infecção após todos os embriões serem coletados, o que implicaria uma permanência mais longa dos embriões em meio de infecção; diferentes tempos de permanência de embriões em meio de infecção foram testados. Os resultados mostraram que uma longa permanência (120 min) em meio de infecção tem uma influência negativa para o processo de transferência do T-DNA (Figura 3) quando comparado com 30 minutos de infecção. Portanto, no protocolo utilizado atualmente embriões imaturos

são coletados em grupos de 50 e, logo em seguida, infectados com a *Agrobacterium*.

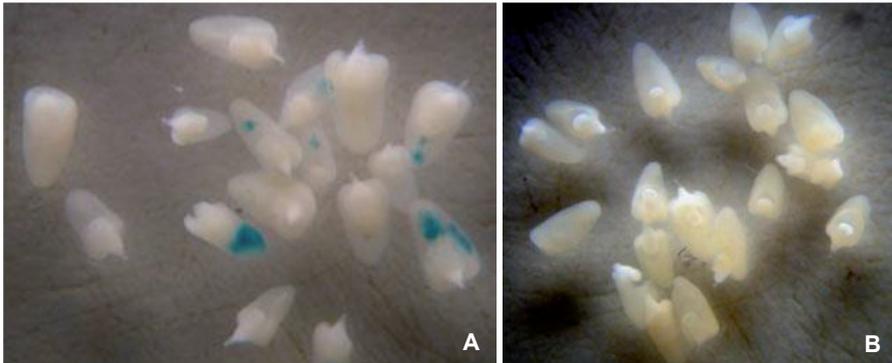


Figura 3. Expressão transitória do gene repórter *gus* em embriões infectados por *A. tumefaciens* EHA101 carregando o vetor binário pTF102 após terem sido mantidos em meio de infecção sem *Agrobacterium* por: (A) 30 min; (B) 120 min.

Tempo de Permanência de Embriões Infectados em Placa Aberta

Uma vez infectados, os embriões são transferidos para meio de cocultivo onde permanecem por três dias. Para avaliar se uma dessecação inicial antes do período de cocultivo seria benéfica para o processo de transferência do T-DNA, as placas contendo os embriões já infectados por *Agrobacterium* foram deixadas abertas dentro de capela de fluxo laminar durante 0, 15, 30 e 45 min. A melhor expressão do gene repórter *gus* foi obtida quando a placa foi fechada imediatamente após os embriões terem sido colocados sobre o meio de cultivo, indicando que uma dessecação inicial não foi positiva para o processo de infecção (Figura 4).



Figura 4. Expressão transitória do gene repórter *gus* em embriões infectados por *A. tumefaciens* EHA101 carregando o vetor binário pTF102, após a placa de Petri ter sido mantida aberta por: (A) 0; (B) 15; (C) 30 e (D) 45 min.

Utilização da Cavitação Acústica ou Sonicação no Momento da Infecção por *Agrobacterium tumefaciens*

Tem sido mostrado que a cavitação acústica pode aumentar a eficiência da transformação genética via *A. tumefaciens* (TRICK; FINER, 1997). Para verificar os efeitos da sonicação na transferência do T-DNA, embriões imaturos foram submetidos a diferentes tempos de sonicação durante o processo de infecção. Em seguida, os embriões foram plaqueados em

meio de cocultivo a 20 °C por três dias. Ao final do período de cocultivo, a expressão transiente de *gus* foi analisada pelo método histoquímico. Os resultados mostraram que não houve um aumento significativo de expressão quando comparada a infecção com ou sem o tratamento de cavitação acústica (Figura 5).

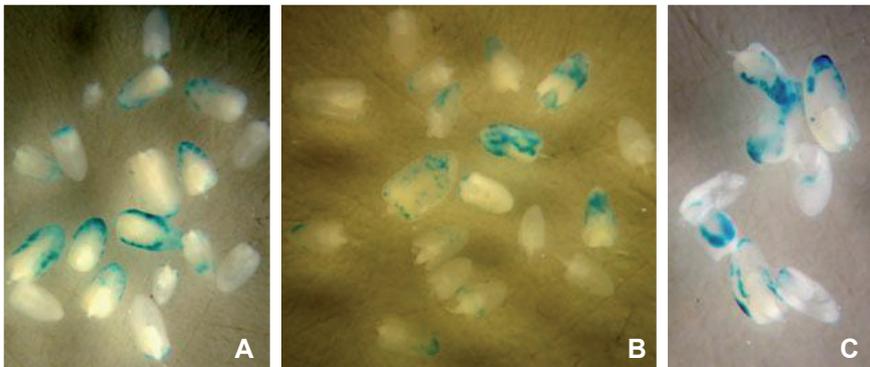


Figura 5. Expressão transiente do gene repórter *gus* em embriões submetidos à cavitação acústica ou sonicação no momento da infecção por *A. tumefaciens* EHA101 carregando o vetor binário pTF102. (A) 0; (B) 15; (C) 30 s.

Utilização da Pressão de Vácuo Durante a Infecção com *Agrobacterium tumefaciens*

A pressão de vácuo tem sido utilizada para auxiliar no processo de infecção dos explantes por *Agrobacterium* em *Arabidopsis* (CLOUGH; BENT, 1998), em inflorescência de trigo (AMOAHA et al., 2001) e em outras espécies de plantas. Experimentos foram desenhados para investigar os efeitos da aplicação de uma pressão de vácuo na transferência do T-DNA pela *Agrobacterium* para células de embriões imaturos de milho. Os resultados mostraram que não houve um aumento da expressão do gene

repórter *gus* com a aplicação da pressão de vácuo. Tanto na presença como na ausência do vácuo a expressão transiente de GUS foi semelhante (Figura 6).

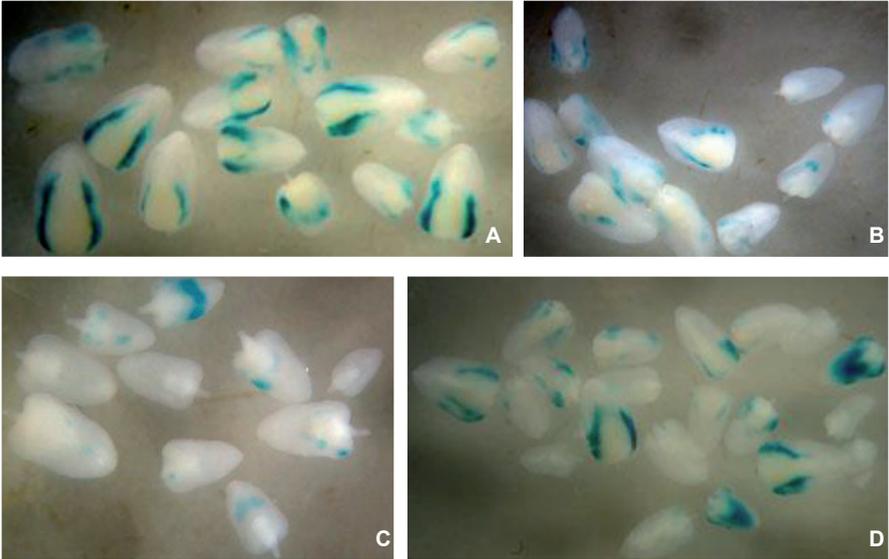


Figura 6. Expressão transiente do gene repórter *gus* em embriões submetidos à pressão de 27 inHg no momento da infecção por *A. tumefaciens* EHA101 carregando o vetor binário pTF102. (A) 0; (B) 5; (C) 10; (D) 15 min.

Tempo de Cocultivo do Explante com *Agrobacterium tumefaciens*

Para verificar a influência do tempo de contato entre a *Agrobacterium* e os embriões imaturos de milho no processo de transferência gênica, os embriões infectados foram cultivados em meio de cocultivo a 20 °C por 3, 5 e 7 dias. Os resultados mostraram que cinco dias são adequados para o cocultivo, pois a expressão do gene repórter *gus* foi

intensificada quando comparada com três dias de cocultivo e a contaminação dos explantes em subcultivos sequentes foi facilmente controlada quando comparado com sete dias de cocultivo (Figura 7).

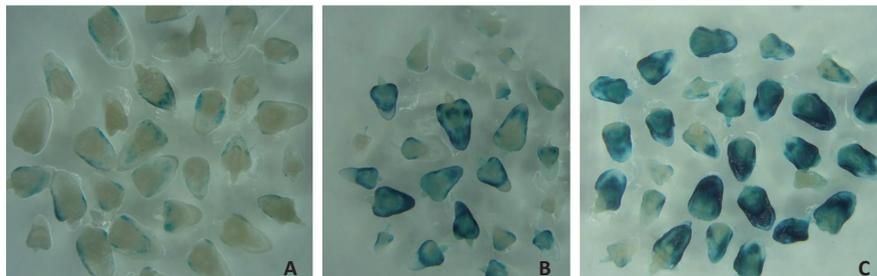


Figura 7. Expressão transitória do gene repórter *gus* em embriões infectados por *A. tumefaciens* EHA101 carregando o vetor binário pTF102 após diferentes tempos de cocultivo: (A) 3; (B) 5; (C) 7 dias.

Após a otimização dos fatores descritos, a transformação genética do milho Hill foi implementada no Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos da Embrapa Milho e Sorgo com uma eficiência média de 5% (número de eventos transgênicos gerados X 100 / número de embriões infectados).

Referências

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

ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Developmental and availability of germplasm with high Type II culture formation

response. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v. 65, p. 92-93, 1991.

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

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.

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.

GUIDARELLI, M.; BARALDI, E. Transient transformation meets gene function discovery: the strawberry fruit case. **Frontiers of Plant Science**, New Haven, v. 6, n. 444, p. 1-8, 2015.

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.

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.; KOMARIT. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. **Nature Protocols**, v. 2, n. 7, p. 1614-1621, 2007.

JANSSEN, B. J.; GARDNER, R. C. Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 14, p. 61-72, 1990.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAUGH, T. A.; BEVAN, M. W. Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 6, p. 3001-3907, 1987.

KĚNEK, P.; ŠAMAJOVÁ, O.; LUPTOVČIAK, I.; DOSKOČILOVÁ, A.; KOMIS, G.; ŠAMAJ, J. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: principles, methods and applications. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 1024-1042, 2015.

KLEIN, T. M.; ARENTZEN, R.; LEWIS, P.; FITZPATRICK-MCELLIGOT, S. Transformation of microbes, plants, and animals by particle bombardment, **Bio/Technology**, New York, v. 10, p. 286-291, 1992.

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.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissue using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.

TRICK, H. N.; FINER, J. J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. **Transgenic Research**, London, v. 6, p. 3296, 1997.

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.

