

Transformação Genética de Plantas pelo Método Floral Dip



A



B



C



D



E



F

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

Documentos 219

Transformação Genética de Plantas pelo Método Floral Dip

Maria José Vilaça de Vasconcelos
José Edson Fontes Figueiredo

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2017

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

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, Roberto dos Santos Trindade, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro, 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: Autores

1ª edição

Formato digital (2017)

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

Vasconcelos, Maria José Vilaça de.

Transformação genética de plantas pelo método Floral Dip /
Maria José Vilaça de Vasconcelos, José Edson Fontes Figueiredo.
-- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2017.

22 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 219).

1. Melhoramento genético vegetal. 2. Planta transgênica. 3. Método de melhoramento. I. Vasconcelos, Maria Jose Vilaça de. II. Figueiredo, José Edson Fontes. III. Título. IV. Série.

CDD 631.52 (21. ed.)

© Embrapa 2017

Autores

Maria José Vilaça de Vasconcelos

Farmacêutica/Bioquímica, Ph.D, Pesquisadora na Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, mariajose.vasconcelos@embrapa.br

José Edson Fontes Figueiredo

Biólogo/Bioquímico, Ph.D, Pesquisador na Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, jose.edson@embrapa.br

Apresentação

Os métodos clássicos de transformação de plantas tais como a biobalística e o emprego de *Agrobacterium tumefaciens* são complexos, demorados e exigem mão de obra e laboratório especializados para sua execução. Apesar de serem amplamente utilizados para produção de plantas transgênicas em culturas agrícolas importantes, esses métodos geram muitas modificações indesejadas no DNA.

O método Floral Dip de transformação de plantas permite vislumbrar novas oportunidades para obtenção de plantas transgênicas, principalmente para as espécies recalcitrantes ao cultivo celular *in vitro*. A execução dessa técnica é muito simples e consiste na imersão de um conjunto de inflorescências em uma solução contendo agrobactéria previamente transformada com um gene de interesse. Essa abordagem apresenta muitas vantagens em relação aos métodos tradicionais, destacando-se a eliminação da necessidade de cultivo de calos em diferentes meios de cultura, o que reduz o trabalho a ser executado, previne a ocorrência de variantes somaclonais e possibilita a obtenção de um grande número de plantas transgênicas dentro de um curto espaço de tempo. O sucesso e a popularidade desse método de transformação podem ser comprovados pelo alto índice de citações desde sua descrição, no início da década de 1990.

Antonio Alvaro Corsetti Purcino
Chefe-Geral
Embrapa Milho e Sorgo

Sumário

Introdução	6
Descrição da Técnica de Floral Dip	9
Exemplos de Plantas Transformadas Geneticamente Utilizando Floral Dip	11
Uso de Floral Dip no Melhoramento de Cereais	13
Conclusões	16
Referências	17

Transformação Genética de Plantas pelo Método Floral Dip

Maria José Vilaça de Vasconcelos¹

José Edson Fontes Figueiredo²

Introdução

A transformação vegetal é um processo de manipulação genética pelo qual genes exógenos são introduzidos no genoma das plantas, produzindo plantas transgênicas. Os métodos de transformação tradicionais com *Agrobacterium tumefaciens* ou biobalística incluem diferentes etapas, tais como a preparação do material genético e construções gênicas, transformação das células ou tecidos, seleção e regeneração das plantas com o gene de interesse. Esses métodos de transformação têm sido amplamente utilizados para produzir plantas transgênicas em muitas culturas agrícolas importantes, como soja, milho e algodão. Contudo, esta abordagem é muito demorada e também requer mão de obra e laboratório especializados para sua execução. Além disso, modificações indesejadas no DNA, denominadas mutações de ponto, deleções e rearranjos cromossômicos, geram variações somáticas e instabilidade genômica, e alterações de natureza epigenética, modificando o padrão bioquímico celular, são frequentes durante o desenvolvimento das plantas em razão dos estresses químicos

impostos pelas condições inerentes à cultura de tecidos (KAEPLER et al., 2000; LABRA et al., 2004; MOHAN, 2001).

O desenvolvimento de um método de transformação de plantas que exclui o uso do cultivo de tecidos e a regeneração de plantas *in vitro* reduziria consideravelmente o tempo necessário para produzir plantas transgênicas e também a ocorrência de variação somaclonal. Nesse documento, descreveremos o método para transformação de plantas proposto por Feldmann e Marks (1987), que excluiu a necessidade de cultura de tecidos e regeneração de plantas e sua aplicação em diferentes espécies vegetais. Feldmann e Marks cocultivaram plântulas de *Arabidopsis thaliana* com *Agrobacterium tumefaciens* contendo um plasmídeo Ti desarmado e um vetor binário, e surpreendentemente obtiveram linhas transgênicas estáveis, embora com baixas taxas de transformação (FELDMANN; MARKS, 1987). Em 1993, Bechtold e colaboradores infiltraram flores de *Arabidopsis* com *Agrobacterium* e conseguiram aumentar drasticamente a eficiência de transformação, sendo essa nova abordagem referida como “método de infiltração a vácuo de *Agrobacterium*” (BECHTOLD et al., 1993). Esses procedimentos de transformação genética foram mais tarde simplificados e substancialmente melhorados (CLOUGH; BENT, 1998). Em uma das versões modificadas, a infiltração de inflorescências a vácuo (BECHTOLD et al., 1993) foi substituída pela utilização de um composto tensoativo (Silwet L-77), que era utilizado na formulação de alguns pesticidas para melhorar a absorção desses químicos pelos tecidos vegetais. Nessa abordagem, os botões florais de *Arabidopsis* foram imersos em solução contendo *Agrobacterium*, 5% de sacarose (peso/volume) e 0,01-0,05% de Silwet L-77 (v/v) para facilitar a absorção da bactéria pelos gametas femininos da planta

(DESFEUX et al., 2000; BECHTOLD et al., 2003). Este método simplificado foi popularmente chamado de método do Floral Dip.

Em comparação com os métodos tradicionais de transformação dependentes do cultivo de tecidos e regeneração de plantas, a transformação por imersão floral oferece várias vantagens e abriu novas oportunidades para obtenção de plantas transgênicas, principalmente naquelas espécies recalcitrantes às técnicas de cultura de tecidos, como é o caso do sorgo. Outras vantagens evidentes de Floral Dip consistem do fato de requerer o mínimo de trabalho no manuseio do material biológico, uso de equipamentos relativamente simples, e exigência de poucos reagentes, podendo ser executado com sucesso mesmo por pessoas não especializadas. Apesar da baixa frequência de transformação quando se utiliza o método Floral Dip, o grande número de sementes produzidas por uma planta da *Arabidopsis* aumenta a probabilidade de recuperação de eventos transgênicos (CHUNG et al., 2000). Uma planta da *Arabidopsis* produz milhares de sementes por autopolinização, e as sementes podem ser germinadas em placas de Petri, facilitando o escrutínio para seleção das plântulas transformadas (CHUNG et al., 2000). Floral Dip pode ser usado para introduzir construções genéticas específicas em *Arabidopsis*, e também em projetos de transformação em larga escala com o objetivo de gerar bibliotecas de linhas enriquecidas ou de linhas mutantes marcadas por T-DNA. Finalmente, o método de Floral Dip mantém a estabilidade genômica e fisiológica em plantas transgênicas de *A. thaliana*, ao contrário do que é observado em plantas obtidas por métodos de transformação baseados em cultura de tecidos (LABRA et al., 2004). Esse conjunto de vantagens permitiu

acelerar os estudos de função e expressão gênica em *Arabidopsis*, que é a planta modelo para estudos de genética vegetal e cujos resultados podem muitas vezes ser extrapolado para outras espécies de plantas.

A possibilidade de obtenção de plantas transgênicas sem a necessidade de uso da cultura de tecidos provocou uma verdadeira corrida para reprodução dos resultados obtidos com *Arabidopsis*, para outras espécies vegetais que apresentam sérias limitações quanto ao cultivo de tecidos e regeneração de plantas *in vitro* (TRIEU et al., 2000). Apesar de ser ainda pouco explorada para transformação de cereais, a metodologia Floral Dip é particularmente relevante para a transformação de espécies economicamente importantes, como milho, trigo e sorgo, entre outras. O sucesso e a popularidade desse método de transformação são refletidos no alto índice de citação desde sua descrição (BASTAKI; CULLIS, 2014; JAN et al., 2016; MARTINS et al., 2015; MOISEEVA et al., 2014; MU et al., 2012; NASERI et al., 2012; NIAZIAN et al., 2017; ZALE et al., 2009).

Descrição da Técnica de Floral Dip

Nas últimas décadas, os esforços de vários laboratórios resultaram no desenvolvimento de métodos para a transformação de *A. thaliana* mediada por *A. tumefaciens*. Entre estes, o método do Floral Dip é o protocolo mais fácil e amplamente utilizado para a produção de plantas transgênicas de *Arabidopsis*. Neste método, a transformação genética é realizada simplesmente mergulhando as inflorescências de *Arabidopsis* durante alguns segundos em solução de suspensão de células contendo *Agrobacterium* portadora dos genes a serem transferidos. As plantas tratadas podem produzir

sementes geneticamente transformadas rotineiramente em aproximadamente três meses (ZHANG et al., 2006).

Resumidamente, em *Arabidopsis*, a técnica de Floral Dip envolve a germinação de sementes em pequenos vasos cobertos com uma tela para evitar a perda de solo ao inverter a planta no momento da infiltração; o desenvolvimento da planta até a floração; a infiltração das plantas utilizando uma suspensão de células de *Agrobacterium*; o amadurecimento da planta até colheita das sementes algumas semanas depois; e pesquisa de transformantes primários em meio contendo agente seletivo apropriado, normalmente um antibiótico ou um herbicida (Figura 1).

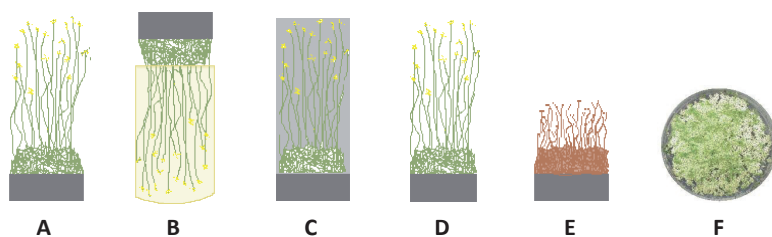


Figura 1. Representação esquemática do método de transformação Floral Dip. A - Planta no estágio de florescimento; B - Inversão da planta em recipiente contendo *Agrobacterium tumefaciens*, 5% sacarose e surfactante Silwet L-77 (500 μ L/L); C - Cobertura da planta com sacola plástica para manter a umidade; D - Desenvolvimento da planta em estufa; E - Amadurecimento da planta para coleta de sementes; F - Seleção primária das plantas transgênicas.

O uso de surfactante e sacarose é imprescindível para o sucesso do procedimento (CLOUGH; BENT, 1998; DEHESTANI et al., 2010), e a cobertura das plantas, por 24 horas após o

tratamento, mantém a umidade e aumenta em duas vezes o número de transformantes. A repetição do tratamento com *Agrobactéria* também aumenta o número de plantas transformadas.

Exemplos de Plantas Transformadas Geneticamente Utilizando Floral Dip

Nos últimos anos, a transformação genética tornou-se uma ferramenta importante para estudos dos padrões de herança genética, identificação de genes e suas funções, e melhoramento de microrganismos e plantas (MARTIN, 1998; RAMACHANDRAN; SUNDARESAN, 2001; BENNETZEN, 2002). Contudo, esse método não se mostrou eficiente para várias espécies vegetais, muitas delas de grande importância econômica, em decorrência de vários fatores tais como as limitações dos métodos disponíveis para a transformações (*Agrobactéria*, biobalística e eletroporação, entre outros), e as dificuldades para estabelecimento de protocolos eficientes para o cultivo de células e regeneração das plantas *in vitro*.

A partir de 1987, com o desenvolvimento do método Floral Dip para transformação genética que dispensa a necessidade da cultura de tecidos e a regeneração de plantas (FELDMANN; MARKS, 1987), e as modificações posteriores que aumentaram a eficiência do procedimento (BECHTOLD et al., 1993), essa metodologia se estabeleceu como o método preferido para transformação de *Arabidopsis* (BENT, 2006) e também como a única alternativa para as espécies que se mostram recalcitrantes ao cultivo de tecidos *in vitro*. Utilizando protocolo semelhante, Curtis e Nam (2001) relataram a produção de

rabanete transgênico (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) com ótima eficiência de transformação. Além disso, o método de transformação Floral Dip, incluindo a infiltração *in situ*, foi utilizado com sucesso para produzir plantas transgênicas de couve chinesa, *Brassica rapa* (CAO et al., 2000), *Arabidopsis lasiocarpa* (TAGUE, 2001) e canola, *Brassica napus* (WANG et al., 2003). Esses resultados confirmaram a utilidade desse método para além da espécie *Arabidopsis thaliana*, embora atualmente ela ainda seja mais utilizada na família Brassicaceae (HERRERA-ESTRELLA et al., 2005).

Em 2000, Trieu e colaboradores descreveram resultados muito promissores sobre o emprego do método de infiltração Floral Dip em *Medicago truncatula*, uma leguminosa da família Fabaceae (TRIEU et al., 2000). Após o sucesso de transformação com dicotiledôneas essa metodologia começou a se expandir para outras espécies como monocotiledôneas. Bastaki e Cullis (2014) relataram a transformação de linho (*Linum usitatissimum*, família Linaceae) por Floral Dip. A maior taxa de transformação com Floral Dip, comparado com os métodos disponíveis de transformação genética de linho, possibilitou acelerar a geração de plantas transgênicas incorporando características comerciais desejáveis nessa espécie.

Utilizando-se das tecnologias das meganucleases como a “Zinc Finger Nucleases” (ZFNs), em que enzimas de restrição artificiais são projetadas para induzir quebras em locais específicos da cadeia dupla do DNA e promoverem religações dessas fitas, resultando em mutagênese no local ou recombinação homóloga, plantas de *Arabidopsis* foram transformadas geneticamente por imersão superficial mediada por *Agrobacterium*, com a integração do transgene de forma

estável no genoma e na herança mendeliana do caráter nos descendentes (PATER et al., 2009). Esses resultados demonstraram que a técnica de Floral Dip associada com engenharia de precisão, como ZFNs, TALENS e CRISp-Cas9, pode ser usada eficientemente em *Arabidopsis*, bem como em outras espécies vegetais.

Uso de Floral Dip no Melhoramento de Cereais

Em 2006, Chumakov e colaboradores empregaram o método Floral Dip para transformação de milho por imersão dos pistilos em uma suspensão de *Agrobacterium* carregando o gene *vir* ativado (CHUMAKOV et al., 2006). O tratamento foi realizado em condições de campo, durante a fase de florescimento, seguido de polinização com pólen de plantas da mesma cultivar. A análise por PCR das plântulas resistentes à canamicina mostrou que 60,3% das plantas eram positivas para o gene *vir*, o que correspondeu a 6,8% de todas as plântulas geradas no experimento.

Em 2009, foram publicados os resultados do uso de Floral Dip em trigo (ZALE et al., 2009). As plantas transformadas apresentaram baixo número de cópias dos transgenes, e segregação mendeliana em T2. A transmissão estável dos transgenes por várias gerações ficou demonstrada por Southern blot, e a expressão dos transgenes em gerações avançadas foi verificada por transcrição reversa e ELISA para expressão da proteína NPTII (neomycin phosphotransferase II).

Em 2012, Mu e colaboradores relataram a transformação, no campo, de linhagens-elite de milho utilizando inflorescência

feminina. Nesse estudo, plantas transgênicas expressando GFP foram obtidas utilizando a inflorescência feminina de 5-10 cm (MU et al., 2012). O sucesso da utilização de Floral Dip em milho com alta eficiência de transformação genética poderá acelerar os trabalhos de pesquisas em estudos de função gênica e também para o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas para uso comercial. Outro exemplo de uso dessa tecnologia foi apresentado por Rod-in et al. (2014), para a transformação genética de arroz (*Oryza sativa* L.). Os autores utilizaram *A. tumefaciens* contendo o vetor binário PCAMBIA1304 com o gene *gusA* para infectar as inflorescências. As pontas das inflorescências de arroz foram cocultivadas com suspensão de *Agrobacterium*, e os resultados mostraram uma eficiência de transformação de 12,73% (ROD-IN et al., 2014). Esses resultados mostraram que Floral Dip consiste em poderosa ferramenta para obtenção de plantas transformadas de arroz sem a necessidade de cultura de tecidos.

Em 2012, Peng e colaboradores empregaram Floral Dip para transformar 22 linhagens-elite de sorgo visando obter plantas resistentes à podridão-do-colmo, doença causada por diferentes espécies da ordem Lepdoptera (*Busseola fusca*, *Chilo partellus*, *Chilo orichalcociliellus* e *Sesamia calamistis*) (PENG et al., 2012). Panículas no estágio inicial de florescimento foram imersas em suspensão de *Agrobacterium* (linhagem AG10) carregando o vetor binário pCAMBIA1300 contendo o gene marcador *bar* e o gene *Cry1Ac*. Um total de 2.125 sementes foram obtidas e, após a germinação, as plântulas foram tratadas com o herbicida Basta na concentração de 0,05-0,1% (v/v) para selecionar possíveis eventos de transformação. Duas plantas foram selecionadas, correspondendo a uma frequência

de transformação igual a 0,094% (número de transformantes / número de plântulas T_1). Embora a eficiência de transformação tenha sido baixa, essa metodologia representa um grande avanço para obtenção de plantas de sorgo transformadas, pois não requer o emprego de técnicas de cultura de tecidos. Além disso, o emprego de Floral Dip para obtenção de transgênicos reduz o tempo e os recursos gastos para transformação de sorgo por métodos convencionais de transformação, como a biobalística ou *Agrobacterium*.

O método Floral Dip de transformação por imersão de inflorescências de milho em suspensão de *Agrobacterium* foi empregado por Mu et al. (2012). Os autores observaram que as condições ideais para transformação do milho consistiam em pistilos cujos tamanhos variavam entre 5-10 cm e concentração de *Agrobacterium* $DO_{600} = 1.0$. Grande número de pontos verdes correspondendo à expressão de gene *GFP* (Green Fluorescent Protein) foram observados nas sementes da geração T_0 , indicando que a construção T-DNA-*gfp* havia sido integrada e expressa no genoma da planta hospedeira. A seleção por higromicina e PCR para identificação do gene *hpt exógeno* mostrou que 3,3% das plântulas produzidas eram positivas para a transformação (MU et al., 2012).

Moiseeva et al. (2014) também empregaram Floral Dip para transformação direta de pistilos jovens de milho. Os autores conseguiram transferir um fragmento antisense do primeiro exon do gene da prolina desidrogenase (ASPG) de *Arabidopsis thaliana* L. para o genoma do milho utilizando *Agrobacterium tumefaciens* (linhagem LBA4404-pBi2E), carregando o vetor binário pBi2E engenheirado contendo o gene marcador (*nptII*, *gus*) e a construção ASPG. A análise

por PCR do DNA total de 409 plantas diploides da geração F1 resistentes à canamicina confirmou a inserção do T-DNA no genoma de 30 plantas (1,2% de 2409 plântulas examinadas), e a análise da supressão da expressão de ASPG, feita por métodos colorimétricos, revelou um aumento de 4,5 vezes na concentração de prolina livre nos tecidos da folhas das plantas transformadas, quando comparadas com o controle não transformado.

Conclusão

O desenvolvimento de tecnologias que permitem a introdução e a expressão de genes exógenos em células vegetais tem se multiplicado nas últimas décadas. A produção de plantas transgênicas com resistência a insetos e doenças, tolerância a herbicidas, sementes e frutos com melhor qualidade nutricional e plantas melhores adaptadas a condições ambientais adversas tornou-se realidade. Vacinas contra doenças humanas e outros produtos importantes também foram desenvolvidas usando plantas transgênicas. Contudo, muitas características agrônômicas e de qualidade projetadas em laboratórios acadêmicos e industriais tiveram suas aplicações limitadas pela falta de processos mais eficientes de transformação genética de plantas. Floral Dip é uma técnica simples e efetiva que pode ter destaque na produção e comercialização de culturas transgênicas, mas ainda muito pouco explorada em cereais. Não obstante, o método Floral Dip mediado por agrobactéria mostrou-se efetivo para transformação de cereais e deveria ser adotado como método de rotina para transformação do milho e do sorgo, juntamente com os métodos tradicionais usando agrobactéria e biobalística. Particularmente no caso do sorgo, que entre os cereais é considerada a espécie mais recalcitrante

para respostas *in vitro*, maior atenção deveria ser direcionada ao uso de Floral Dip para transformação dessa espécie.

Referências

BASTAKI, N. K.; CULLIS, C. A. Floral-Dip transformation of flax (*Linum usitatissimum*) to generate transgenic progenies with a high transformation rate. **Journal of Visualized Experiments**, v. 94, p. e52189, 2014.

BECHTOLD, N.; ELLIS, J.; PELLETIER, G. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. **Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3. Sciences de la Vie**, Montrouge, v. 316, p. 1194-1199, 1993.

BECHTOLD, N.; JOLIVET, S.; VOISIN, R.; PELLETIER, G. The endosperm and the embryo of *Arabidopsis thaliana* are independently transformed through infiltration by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, London, v. 12, n. 4, p. 509-517, 2003.

BENT, A. *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 343, p. 87-103, 2006.

BENNETZEN, J. Opening the door to comparative plant biology. **Science**, Washington, v. 296, p. 60-63, 2002.

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

CHUMAKOV, M. I.; ROZHOK, N. A.; VELIKOV, V. A.; TYRNOV, V. S.; VOLOKHINA, I. V. *Agrobacterium*-mediated in-plant transformation of maize via pistil filaments. **Russian Journal of Genetics**, New York, v. 42, n. 8, p. 893-897, 2006.

CHUNG, M. H.; CHEN, M. K.; PAN, S. M. Floral spray transformation can efficiently generate Arabidopsis transgenic plants. **Transgenic Research**, London, v. 9, p. 471-476, 2000.

CURTIS, I. S.; NAM, H. G. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral-dip method-plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency. **Transgenic Research**, London, v. 10, p. 363-371, 2001.

CAO, M. Q.; FAN, L.; LEI, Y.; BOUCHEZ, D.; TOURNEUR, C.; YAN, L.; ROBAGLIA, C. Transformation of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 6, n. 1, p. 67-72, 2000. DEHESTANI, G.; AHMADIAN, G.; SALMANIAN, A. H.; JELODAR, N. B.; KAZEMITABAR, K. Transformation efficiency enhancement of Arabidopsis vacuum infiltration by surfactant application and apical inflorescence removal. **Trakia Journal of Sciences**, v. 8, n. 1, p. 19-26, 2010.

DESFEUX, C.; CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the Arabidopsis floral-dip method. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 123, p. 895-904, 2000.

FELDMANN, K. A.; MARKS, M. D. *Agrobacterium* mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a

non-tissue culture approach. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 208, p. 1-9, 1987.

HERRERA-ESTRELLA, L.; SIMPSON, J.; MARTINEZ-TRUJILLO, M. Transgenic plants: an historical perspective. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 286, p. 3-32, 2005.

JAN, S. A.; SHINWARI, Z. K.; SHAH, S. H.; SHAHZAD, A.; ZIA, M. A.; AHMAD, N. In-planta transformation: recent advances. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 21, n. 1, p. 11085-11091, 2016.

KAEPLER, S. M.; KAEPLER, H. F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, p. 179-188, 2000.

LABRA, M.; VANNINI, C.; GRASSI, F.; BRACALE, M.; BALSEMIN, M.; BASSO, B.; SALA, F. Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, p. 1512-1518, 2004.

MARTIN, G. B. Gene discovery for crop improvement. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 9, n. 2, p. 220-226, 1998.

MARTINS, P. K.; NAKAYAMA, T. J.; RIBEIRO, A. P.; CUNHA, B. A. D. B.; NEPOMUCENO, A. L.; HARMON, F. G.; KOBAYASHI, A. K.; MOLINARI, H. B. C. *Setaria viridis* floral-dip: a simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation method. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 61-63, 2015.

MOHAN, J. S. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, Wageningen, v. 118, p. 153-166, 2001.

MOISEEVA, Y. A.; VELIKOV, V. A.; VOLOKHINA, I. V.; GUSEV, Y. S.; YAKOVLEVA, O. S.; CHUMAKO, M. I. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize with antisense suppression of the proline dehydrogenase gene by an in-planta method. **British Biotechnology Journal**, v. 4, n. 2, p. 116-125, 2014.

MU, G.; CHANG, N.; XIANG, K.; SHENG, Y.; ZHANG, Z.; PAN, G. Genetic transformation of maize female inflorescence following floral dip method mediated by *Agrobacterium*. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 11, n. 3, p. 178-183, 2012.

NASERI, G.; SOHANI, M. M.; POURMASSALEHGOU, A.; ALLAHI, S. In planta transformation of rice (*Oryza sativa*) using thaumatin-like protein gene for enhancing resistance to sheath blight. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 31, p. 7885-7893, 2012.

NIAZIAN, M.; SADATNOORI, S. A.; GALUSZKA, P.; MAHDI, S. M.; MORTAZAVIAN, M. Tissue culture-based *Agrobacterium*-mediated and in planta transformation methods. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 53, n. 4, p. 1-11, 2017.

PATER, S.; NEUTEBOOM, L. W.; PINAS, J. E.; HOOYKAAS, P. J.; VAN DER ZAAL, B. J. ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in *Arabidopsis* through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 7, p. 821-835, 2009.

PENG, L.; SHENGLIN, H.; DU, R.; LI, S.; JI, G. **Floral dip transformation of sorghum**. Shijiazhuang: [s.n.], 2012. Disponível em: <<http://wap.cnki.net/huiyi-CSSC201210001012.html>>. Acesso em: 13 nov. 2017.

RAMACHANDRAN, S.; SUNDARESAN, V. Transposons as tools for functional genomics. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 39, n. 3/4, p. 243-252, 2001.

ROD-IN, W.; SUJIPULI, K.; RATANASUT, K. The floral-dip method for rice (*Oryza sativa*) transformation. **Journal of Agricultural Technology**, v. 10, n. 2, p. 467-474, 2014.

TAGUE, B. W. Germ-line transformation of *Arabidopsis lasiocarpa*. **Transgenic Research**, London, v. 10, n. 3, p. 259-267, 2001.

TRIEU, A. T.; BURLEIGH, S. H.; KARDAILSKY, I. V.; MALDONADO-MENDOZA, I. E.; VERSAW, W. K.; BLAYLOCK, L. A.; SHIN, H.; CHIOU, T. J.; KATAGI, H.; DEWBRE, G. R.; WEIGEL, D.; HARRISON, M. J. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. **Plant Journal**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 531-541, 2000.

WANG, W. C.; MENON, G.; HANSEN, G. Development of a novel *Agrobacterium* mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 22, n. 4, p. 274-281, 2003.

ZALE, J. M.; AGARWAL, S.; LOAR, S.; STEBER, C. M.
Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in
Agrobacterium tumefaciens. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, n.
6, p. 903-913, 2009.

ZHANG, X.; HENRIQUES, R.; LIN, S. S.; NIU, Q. W.; CHUA, N.
H. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis*
thaliana using the floral dip method. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2,
p. 641-646, 2006.

