

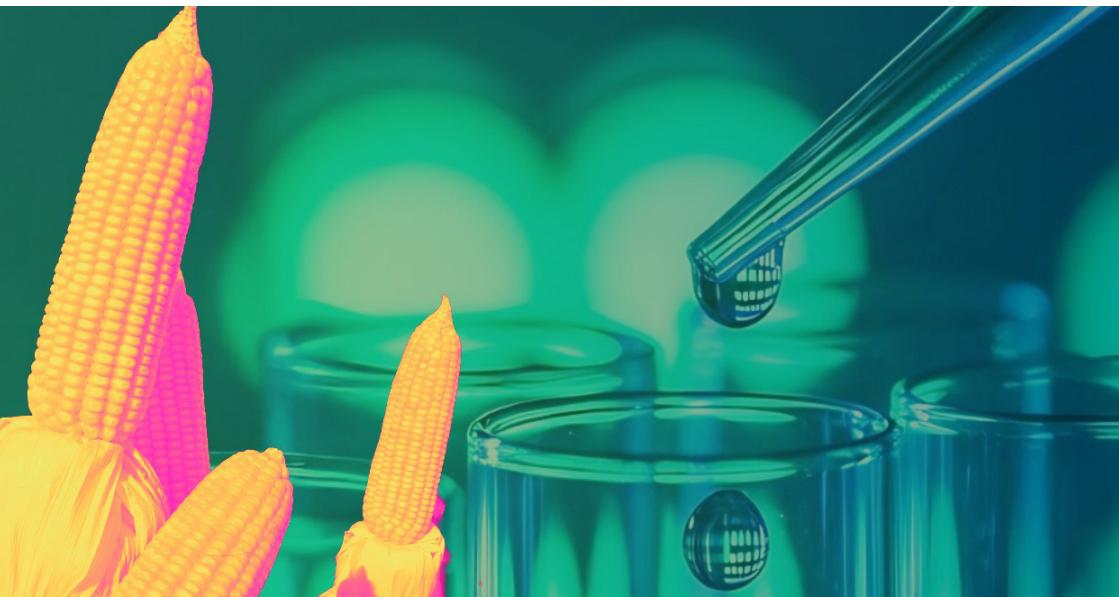
Documentos

200

Campinas, SP / Dezembro, 2025

Transformação de milho via *Agrobacterium*

Um guia para novos laboratórios



Embrapa

Agricultura Digital

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agricultura Digital
Ministério da Agricultura e Pecuária*

e-ISSN 2764-2488

Documentos 200

Dezembro, 2025

Transformação de milho via *Agrobacterium*

Um guia para novos laboratórios

*Maisa de Siqueira Pinto
Juliana Paggiaro
Maria Helena Faustinoni Bruno
Juliana Erika de Carvalho Teixeira Yassítepe*

Embrapa Agricultura Digital
Campinas, SP
2025

Embrapa Agricultura Digital	Revisão de texto <i>Graziella Galinari</i>
Av. Dr. André Tosello, 209 - Cidade Universitária Campinas, SP, 13083-886	Projeto gráfico <i>Leandro Sousa Fazio</i>
www.embrapa.br/fale-conosco/sac	Diagramação <i>Giulia Mizuno e Magda Cruciol</i>
Comitê Local de Publicações	Figura da capa <i>Magda Cruciol</i>
Presidente <i>Júlio Cesar Dalla Mora Esquerdo</i>	
Secretário-executivo <i>Sonia Ternes</i>	
Membros	
Adauto Luiz Mancini, Alan Massaru Nakai, Carla Cristiane Osawa, Geraldo Magela de Almeida Cançado, Graziella Galinari, Joice Machado Bariani, Juliana Erika de Carvalho Teixeira Yassitepe, Luiz Manoel Silva Cunha, Magda Cruciol, Paula Regina Kuser Falcão	Publicação digital: PDF

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 Agricultura Digital

Transformação de milho via Agrobacterium: um guia para novos laboratórios / Maisa de Siqueira Pinto ... [et al.]. – Campinas : Embrapa Agricultura Digital, 2025.
PDF (46 p.) : il. color. - (Documentos / Embrapa Agricultura Digital, ISSN 2764-2488 ; 200).

1. Transformação genética. 2. Zea mays. 3. Agrobacterium tumefaciens. I. Pinto, Maisa de Siqueira. II. Embrapa Agricultura Digital. III. Série.

CDD (21. ed.) 631.5233

Editor(es) técnico(s) e autores

Maisa de Siqueira Pinto

Engenheira-agrônoma, doutora em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pós-doutoranda do Centro de Pesquisa em Genômica Aplicada às Mudanças Climáticas da Unicamp, Campinas, SP

Juliana Paggiaro

Bióloga, mestre em Biotecnologia, bolsista do Centro de Pesquisa em Genômica Aplicada às Mudanças Climáticas da Unicamp, Campinas, SP

Maria Helena Faustinoni Bruno

Bióloga, mestre em Fisiologia Vegetal, doutoranda em Genética e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa em Genômica Aplicada às Mudanças Climáticas da Unicamp, Campinas, SP

Juliana Erika de Carvalho Teixeira Yassitepe

Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agricultura Digital e do Centro de Pesquisa em Genômica Aplicada às Mudanças Climáticas da Unicamp, Campinas, SP

Apresentação

Este documento foi preparado como um guia para estudantes e pesquisadores que trabalham com a transformação genética de milho no Brasil. Os protocolos de transformação genética de milho evoluíram rapidamente nos últimos anos, permitindo que mais genótipos, incluindo linhagens elite de programas de melhoramento, possam ser transformados. Isso tem despertado o interesse de laboratórios acadêmicos e da indústria, que almejam usar essa ferramenta para transgenia e edição gênica.

O Centro de Genômica Aplicada às Mudanças Climáticas (GC-CRC), parceria entre a Embrapa e a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), vem trabalhando com transformação genética de milho desde 2018 com o objetivo de testar genes para tolerância aos estresses exacerbados pelas mudanças no clima. O Centro vem testando diversos protocolos visando aumentar a frequência de transformação e grande progresso foi atingido nos últimos anos.

O uso da ferramenta de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tende a crescer significativamente nos próximos anos, trazendo mudanças importantes no desenvolvimento de novas variedades de milho. Esperamos que o conteúdo deste documento facilite novos laboratórios a usarem essa ferramenta ou ajude os laboratórios que já a utilizam a aumentar a eficiência de geração de plantas geneticamente modificadas.

Stanley Robson de Medeiros Oliveira
Chefe-geral da Embrapa Agricultura Digital

Sumário

Apresentação	5
Introdução	9
Métodos	10
Conclusão	36
Referências	37
Apêndice A	41
Materiais e equipamentos necessários para transformação	41

Introdução

O milho (*Zea mays*) é o principal cereal cultivado no mundo e tem grande importância na alimentação humana e animal (Yadava et al., 2017). É cultivado em mais países do que qualquer outra cultura e serve como importante planta modelo para estudos genéticos e biotecnológicos (Que et al., 2014; Yassitepe et al., 2021; Kang et al., 2022). A transformação genética é uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novas variedades, permitindo incorporar características de outros organismos e aumentar a variabilidade genética da espécie (Kausch, et al., 2021). O primeiro registro de transformação em milho data de 1966, em um experimento realizado por Coe e Sarkar (1996), que consistia em injetar DNA genômico no meristema apical das plantas. Nesse experimento, os pesquisadores não obtiveram sucesso e já perceberam muitas dificuldades no processo de transformação. Nas décadas seguintes, muitas tentativas foram feitas para transformar plantas de milho e os primeiros resultados com transformação estável vieram com a técnica de bombardeamento de partículas, no final da década de 1980 e início de 1990 (Fromm et al., 1986; Klein et al., 1988; Gordon-Kamm et al., 1990). No entanto, a frequência de transformação obtida com esse método era muito baixa, além de gerar plantas com alto número de cópias e inserções fragmentadas (Ishida et al., 2007).

Grandes progressos foram observados a partir dos anos 2000 com o uso da transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Esse método se tornou o mais utilizado, principalmente por produzir eventos de inserção única e não fragmentados, resultando em plantas de alta qualidade, além de ser um sistema reproduzível e não requerer equipamentos específicos (Ishida et al., 1996; Ishida et al., 2007; Yadava et al., 2017; Peterson et al., 2021; Yassitepe et al., 2021).

A transformação genética do milho é genótipo-dependente, ou seja, alguns genótipos são mais recalcitrantes que outros e apresentam diferentes taxas de frequência de transformação. A recalcitrância

é principalmente devida a dois fatores: capacidade de infecção pela *A. tumefaciens* e capacidade de regeneração. Em 2006, Frame e colaboradores (2006) conduziram um estudo com dez linhagens de milho e descobriram que as linhagens B104, B114 e Ky21 eram transformáveis com o método usando *A. tumefaciens*. Em seguida, vários outros grupos de pesquisa começaram a usar a linhagem B104, adaptada ao clima temperado, como genótipo modelo para transformação, resultando em protocolos com altas frequências de transformação. Em adição às melhorias nos protocolos de transformação, fatores que contribuíram para esse sucesso também incluem a otimização dos vetores, escolha de cepas de *A. tumefaciens*, uso de promotores adequados, utilização de genes marcadores de seleção e otimização de técnicas de cultura de tecidos (Ishida et al., 1996; Ishida et al. 2007; Kausch et al., 2021; Simmons et al., 2021; Yassitepe et al., 2021).

Neste documento, nós descrevemos um protocolo para transformação genética da linhagem de milho temperada B104 utilizando o método mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, sendo este usado pelos pesquisadores do *Genomics for Climate Change Research Center* (GCCRC), uma unidade de pesquisa mista entre a Embrapa e a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), localizada no *campus* da Unicamp em Campinas, São Paulo.

Métodos

Produção de embriões imaturos

Para a produção dos embriões imaturos, plantas de milho da linhagem temperada B104 devem ser cultivadas em casa de vegetação, em vasos individuais de 10 L com substrato comercial misturado com vermiculita (proporção 4:1) e suplementados com fertilizantes. As condições de temperatura e luminosidade ideais são: temperatura diurna entre 26 e 30 °C, temperatura noturna entre 18 e 22 °C, foto-período de 14/10 horas (dia/noite) e intensidade luminosa maior que 800 µmol/m²/s.

Ponto de atenção:

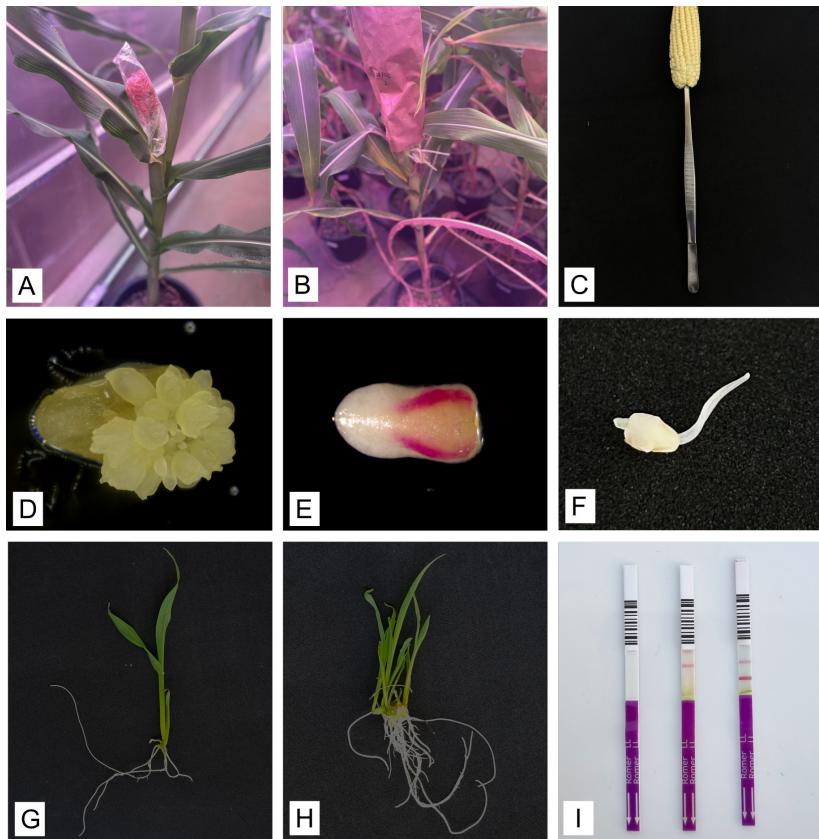
A qualidade das plantas e dos embriões imaturos produzidos para transformação é um ponto crítico do protocolo. Em geral, plantas vigorosas, cultivadas em boas condições de crescimento e fitossanidade na casa de vegetação irão dar origem a embriões de boa qualidade e a boas eficiências de transformação. Quando as condições de crescimento não são ideais, os embriões produzidos não terão boa qualidade para transformação, e as eficiências de transformação serão muito baixas ou podem até mesmo inviabilizar a transformação. Caso a eficiência de transformação esteja muito baixa, esse deve ser o primeiro ponto a ser otimizado antes de seguir o protocolo.

Polinização e coleta das espigas imaturas

A polinização das espigas deve ser feita de maneira controlada. Nas condições do GCCRC, a polinização ocorre entre 50 e 70 dias após a semeadura. Quando as espigas começarem a apontar, devem ser cobertas por sacos plásticos (Figura 1A) ou de papel encerado para evitar a polinização cruzada. Nesse momento, corte as partes verdes da espiga 1 cm acima do início do sabugo, 1-2 dias antes da polinização e coloque o saco de volta, isso facilitará uma polinização uniforme. O pendão deve surgir também por volta de 60 dias após a polinização, porém nem sempre o crescimento de espiga e pendão estarão sincronizados. Para assegurar que a polinização seja controlada, o pendão também deve ser coberto com um saco de papel pardo.

Dica

Para manter uma produção contínua de espigas e pendões, é preciso estabelecer uma rotina de semeadura do genótipo utilizado para transformação. É recomendado que a cada três dias seja feita a semeadura e o número de vasos por dia vai depender da disponibilidade de espaço e da demanda de transformação.



Fotos: Maisa Siqueira Pinto, Juliana Paggiaro e José Hernandes Lopes Filho

Figura 1. Etapas do processo de transformação genética de embriões imaturos de milho (genótipo B104): (A) espiga protegida com saco plástico antes da polinização manual; (B) espiga envolta com saco de papel pardo após a polinização manual; (C) detalhe da espiga com pinça longa inserida na base, facilitando a extração dos embriões imaturos; (D) embrião imaturo exibindo os primeiros sinais de formação de embriões somáticos na região do escutelo; (E) coloração avermelhada no escutelo de embrião zigótico imaturo, resultante da expressão do sistema repórter *RUBY*, utilizado para monitoramento da infecção por *Agrobacterium tumefaciens*; (F) embrião zigótico imaturo com crescimento evidente da região hipocotilar; (G) plântula regenerada, pronta para ser transferida para aclimatização; (H) exemplo de crescimento

de plantas em touceiras; (I) teste de imunocromatografia utilizado para detecção qualitativa da proteína PAT em tecidos vegetais transformados.

A polinização deve ser feita no início da manhã. Para coletar o pólen, sacuda o pendão de uma planta de milho madura dentro de um saco de papel pardo sem remover o pendão da planta polinizadora. Separe as anteras do pólen sacudindo o saco para frente e para trás e espalhe cuidadosamente o pólen coletado sobre os estilos-estigmas da planta de milho desejada. Após a polinização, cubra a espiga recém polinizada com um saco de papel pardo (Figura 1B). O pólen coletado de um pendão pode ser utilizado para polinizar múltiplas espigas. O ideal é utilizar pólen de espigas recém-abertas, porém, até seis dias após a abertura das anteras, o pólen continua viável. É importante certificar que todos os estilos-estigmas recebam grãos de pólen para garantir a formação uniforme dos grãos na espiga.

Dica

Para manter um rastreamento da espiga utilizada para transformação, é importante anotar as datas de semeadura, polinização e coleta da espiga.

A coleta das espigas para transformação deverá ser feita por volta de 12 a 14 dias após a polinização (dependendo da estação do ano), de forma que os embriões tenham entre 1,5 e 2 mm. O tamanho dos embriões deve ser monitorado com a espiga ainda na planta, fazendo uma pequena abertura na palha e retirando alguns embriões para checar o tamanho.

Após a coleta, as espigas podem ser armazenadas a 4 °C para serem usadas na transformação no dia seguinte. Para o armazenamento, as espigas devem ser mantidas na palha e acondicionadas em um saco plástico fechado para que os grãos não desidratem.

Ponto de atenção

A utilização de embriões imaturos no estádio correto de desenvolvimento é um ponto crítico do protocolo. Embriões muito pequenos irão morrer após a infecção e embriões muito grandes não terão uma boa taxa de infecção e regeneração. O tempo necessário para que os embriões atinjam o tamanho ideal vai depender do genótipo, da estação do ano e da disponibilidade de luz. No verão, os embriões atingem o tamanho desejado mais cedo que no inverno. Dependendo das condições de cultivo na casa de vegetação, os embriões levarão muitos dias para chegar ao tamanho desejado (até 19 dias). Nesses casos, há um desacoplamento entre tamanho e desenvolvimento do embrião e, apesar de os embriões imaturos estarem no tamanho ideal, a eficiência de transformação será consideravelmente baixa. No caso do GCCRC, observamos essa demora para atingir o tamanho ideal nos meses de maio a agosto. O aquecimento e utilização de luzes artificiais na casa de vegetação de forma extremamente controlada, não permitindo que a alteração de temperatura e luminosidade externas influenciem as condições da casa de vegetação, podem contornar esse problema de sazonalidade. Algumas facilidades em países temperados conseguem manter esse ambiente extremamente controlado durante o ano todo, permitindo a obtenção de boas eficiências de transformação em todos os meses.

Esterilização das espigas

Após a coleta das espigas, antes de dar início ao processo de esterilização, deve-se espetar uma estaca ou pinça longa na base da espiga, para segurá-la durante a esterilização e retirada dos embriões (Figura 1B). Para esterilização, pode ser utilizado um frasco de boca larga com tampa. Preparar uma solução de hipoclorito de sódio 5% diluída em água e 0,01% de Tween 20 (20 µL para 1 L) e mergulhar as espigas (já com a pinça, ou somente com o furo). O frasco deve ser grande o suficiente para que as espigas fiquem totalmente imersas na solução. Deixe as espigas imersas na solução de esterilização por 20 minutos, agitando algumas vezes com movimentos circulares. Todos os passos a partir de agora devem ser feitos em câmara de fluxo laminar para evitar a contaminação dos embriões. Após os 20

minutos, lavar as espigas com água destilada autoclavada de 4 a 5 vezes, deixando-as imersas entre 3 e 5 minutos em cada lavagem.

Isolamento dos embriões

Coloque a espiga em uma placa de Petri grande e estéril na câmara de fluxo laminar. Para isolar os embriões, enquanto segura na base da pinça, corte a parte superior dos grãos (1-2 mm) com um bisturi afiado e esterilizado (Figura 2).

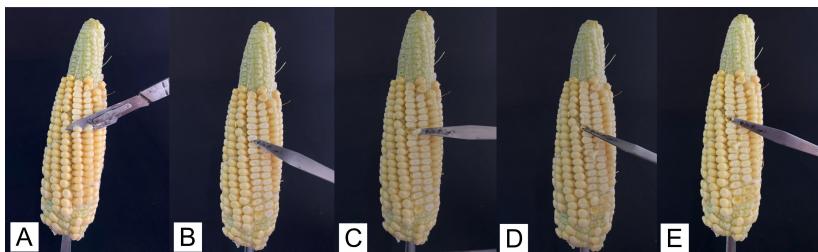


Figura 2. Etapas do processo de extração de embriões zigóticos imaturos de milho para transformação via *Agrobacterium tumefaciens*: (A) corte do ápice do grão com bisturi para facilitar o acesso ao embrião; (B) inserção da microespátula na base do grão para desprendimento do embrião; (C) remoção do grão de milho; (D) recuperação do embrião imaturo exposto; (E) embrião zigótico imaturo isolado, pronto para a etapa de infecção com *Agrobacterium*. Fotos: Juliana Paggiaro e Maria Helena Faustinoni Bruno

Insira uma pequena espátula entre o endosperma e o pericarpo na região basal do grão e faça um movimento circular para cima; isso expõe o embrião, que está preso na região apical do grão. Após os embriões (50-100) serem isolados, estes devem ser mantidos em um tubo de 2 mL contendo o meio de infecção sem a *Agrobacterium* (Tabela 1 e Figura 3). Renove periodicamente (a cada 2 horas) o meio de infecção, descartando o meio antigo e lavando os embriões com o novo meio de infecção.

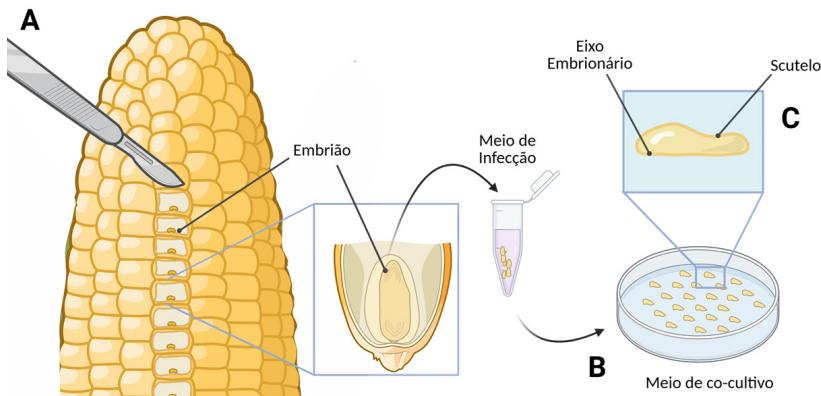


Figura 3. Etapas do isolamento e preparo de embriões imaturos de milho para transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*: (A) corte do ápice do grão para expor o embrião zigótico, com destaque para sua posição no interior do grão e tubo contendo o meio de infecção; (B) transferência dos embriões imaturos para o meio de co-cultivo; (C) posicionamento adequado do embrião no meio de cultura, com o escutelo voltado para cima e o eixo embrionário em contato direto com o meio.

Tabela 1. Preparo dos meios de cultura usados na transformação de embriões imaturos de milho B104.

Meio de Cultura	Composição	Concentração	Unidade de medida	Marca/Código
YEP base	Extrato de levedura	5	g/L	Sigma, V003293
	Peptona	10	g/L	Biolog, 200125
	Cloreto de sódio	5	g/L	Sigma, S3014
	Ajuste o pH 6,8 com NaOH (1M)			Sigma, A1296
	Ágar	15	g/L	Sigma, BCCB4543
	Autoclave por 15 minutos a 121 °C			
	Adicionar antibiótico de acordo com a construção.			
Meio de Infecção	N6 sais ⁽¹⁾	4,0	g/L	Duchefa, C0203
L-prolina	0,7	g/L	Sigma, P0380	
Sacarose	68,4	g/L	Phytotechnology, S391	
	Glicose	36	g/L	Vetec, V000221
	Caseina	1	g/L	Duchefa, C13010250
	Ajuste o pH 5,2 com KOH (1M)			
	Autoclave, resfriar até ±50 °C e adicione no fluxo:			
	Dicamba (30 mM)	3,43	mg/L	Sigma, D5417
	Acetosyringona (100 mM).	19,62	mg/L	Sigma, D134406
Co-cultivo	MS sais ⁽²⁾	4,3	g/L	Duchefa, M0221

Continua...

Continuação Tabela 1.

	Sacarose	30 g/L	Phytotechnology, S391
	Myo-inositol	0,1 g/L	Phytotechnology, I703
	Caseina	0,1 g/L	Duchefa, C13010250
Ajuste o pH com KOH (1M)			
	Gelrite	3 g/L	Duchefa, G1101.0500
Autoclave, resfriar até ±50 °C e adicione no fluxo:			
	L-prolina (200 mg/ mL)	700 mg/L	Sigma, P0380
	MS vitamina ⁽³⁾	1 mL/L	
	Acetosyringona (100 mM).	19,62 mg/L	Sigma, D134406
	L-Cisteína (100 mg/mL)	300 mg/L	Sigma, C7352
	Nitrato de prata (30 mM)	4,59 mg/L	Sigma, S7276
	Dicamba (30 mM)	3,43 mg/L	Sigma, D5417
Meio de descanso	MS sais ⁽²⁾	4,3 g/L	Duchefa, M0221
	Sacarose	30 g/L	Phytotechnology, S391
	MES	0,5 g/L	Duchefa, M1503
	Myo-inositol	0,1 g/L	Phytotechnology, I703
	Caseina	0,1 g/L	Duchefa, C13010250
Ajuste o pH 5,8 com KOH (1M)			
	Agar	8 g/L	Sigma, A1296
Autoclave, resfriar até ±50 °C e adicione no fluxo:			

Continua...

Continuação Tabela 1.

	L-prolina (200 mg/mL)	700 mg/L	Sigma, P0380
	MS vitamina ⁽³⁾	1 mL/L	
	Nitrato de prata (30 mM)	4,59 mg/L	Sigma, S7276
	Dicamba (30 mM)	3,43 mg/L	Sigma, D5417
	Cefotaxima (100 mg/mL)	100 mg/L	Duchefa, C0111
	Vancomicina (100 mg/mL)	100 mg/L	Duchefa, V01550001
Meio de seleção I	MS sais ⁽²⁾	4,3 g/L	Duchefa, M0221
	Sacarose	30 g/L	Phytotechnology, S391
	mês	0,5 g/L	Duchefa, M1503
	Myo-inositol	0,1 g/L	Phytotechnology, I703
	Caseina	0,1 g/L	Duchefa, C13010250
	Ajuste o pH 5,8 com KOH (1M)		
	Agar	8 g/L	Sigma, A1296
Autoclave, resfriar até ±50 °C e adicione no fluxo:			
	L-prolina (200 mg/mL)	700 mg/L	Sigma, P0380
	MS vitamina ⁽³⁾	1 mL/L	
	Nitrato de prata (30 mM)	4,59 mg/L	Sigma, S7276
	Dicamba (30 mM)	3,43 mg/L	Sigma, D5417
	Cefotaxima (100 mg/mL)	100 mg/L	Duchefa, C0111

Continua...

Continuação Tabela 1.

	Vancomicina (100 mg/mL)	100 mg/L	Duchefa, V01550001
Adicionar agente de seleção de acordo com a construção ⁽⁴⁾ .			
Meio de maturação	MS sais ⁽²⁾	4,3 g/L	Duchefa, M0221
	Sacarose	60 g/L	Phytotechnolo-gy, S391
	Myo-inositol	0,1 g/L	Phytotechnolo-gy, I703
	CuSO ₄ (1 mg/mL)	1,3 mg/L	Sigma, C3036
Ajuste o pH 5,8 com KOH (1M)			
	Gelrite	3 g/L	Duchefa, G1101.0500
Autoclave resfriar até ±50 °C e adicione no fluxo:			
	L-prolina (200 mg/mL)	700 mg/L	Sigma, P0380
	MS vitamina ⁽³⁾	1 mL/L	
	Nitrito de prata (30 mM)	4,59 mg/L	Sigma, S7276
	Cefotaxima (100 mg/mL)	100 mg/L	Duchefa, C0111
	Vancomicina (100 mg/mL)	100 mg/L	Duchefa, V01550001
	AIA (ácido indolacético) (1 mg/mL)	1 mgL/L	Sigma, I2886
	TDZ (Thidiazuron) (1 mg/mL)	0,1 mg/L	Sigma, T1270
	ABA (ácido abscísico) (1 mg/mL)	0,1 mg/L	Sigma, A1049
	BAP (Benzilamina Purina) (1 mg/mL)	1 mg/L	Sigma, B3408

Continua...

Continuação Tabela 1.

Zearina (0,5 mg/mL)	0,5 mg/L	Thermo, J61972
Adicionar agente de seleção de acordo com a construção ⁽⁴⁾ .		
Meio de enraizamento	MS sais ⁽²⁾	4,3 g/L Duchefa, M0221
	Sacarose	60 g/L Phytotechnology, S391
Ajuste o pH 5,8 com KOH (1M)		
	Myo-inositol	0,1 g/L Phytotechnology, I703
	CuSO ₄ (1mg/mL)	1,3 mg/L Sigma, C3036
Autoclave, resfriar até ±50 °C e adicione no fluxo:		
	L-prolina (200mg/mL)	700 mg/L Sigma, P0380
	MS vitamina ⁽³⁾	1 mL/L
	Cefotaxima (100 mg/mL)	100 mg/L Duchefa, C0111
	AIA (ácido indolacético) (1 mg/mL)	0,1 mg/L Sigma, I2886
	ABA (ácido abscísico) (1 mg/mL)	0,1 mg/L Sigma, A1049
	Zearina (0,5 mg/mL)	0,5 mg/L Thermo, J61972
Adicionar agente de seleção de acordo com a construção ⁽⁴⁾ .		

Continua...

Continuação Tabela 1.

Meio de regeneração	MS sais ⁽²⁾	4,3 g/L	Duchefa, M0221
	Sacarose	30 g/L	Phytotechnology, S391
	Myo-inositol	0,1 g/L	Phytotechnology, I703
Ajuste o pH 5,8 com KOH (1M)			
	Gelrite	3 g/L	Duchefa, G1101.0500
Autoclave resfriar até ±50 °C e adicione no fluxo:			
	MS vitamina ⁽³⁾	1 mL/L	
Adicionar agente de seleção de acordo com a construção ⁽⁴⁾			

⁽¹⁾ N6 (Chu et al., 1975).

⁽²⁾ Murashige; Skoog (1962).

⁽³⁾ Ver Tabela 2 para preparação de solução estoque.

⁽⁴⁾ Ver Tabela 3 para concentração de agente de seleção por meio de cultura.

Fonte: Aesaert et al. (2022).

Preparo da *Agrobacterium*

O primeiro passo no preparo da *Agrobacterium* é o preparo da placa-mãe, essa placa deve ser preparada pelo menos três dias antes da infecção a partir de um estoque de glicerol mantido em ultra-freezer (-80 °C), que deve ter sido preparado a partir de uma única colônia. A placa-mãe deve ser preparada com meio YEP semissólido (Tabela 1) com os antibióticos necessários para a seleção de acordo com o vetor utilizado. Com o auxílio de uma alça de inoculação estéril, risque a bactéria na placa de Petri com meio YEP e antibióticos e mantenha a 28 °C no escuro por pelo menos 48 horas. Após o período de incubação, a placa-mãe com as colônias de *Agrobacterium* pode ser armazenada a 4 °C no escuro por até 15 dias.

Um dia antes da infecção, a placa de trabalho deve ser preparada. Essa placa é feita a partir da placa-mãe, coletando por volta de dez colônias com uma alça de inoculação estéril e espalhando uniformemente em uma placa de Petri com meio YEP e antibióticos adequados. Essa placa deve ser mantida no escuro a 28 °C de 16 a 20 horas. Dependendo da quantidade de material a ser transformado, podem ser riscadas duas placas de trabalho ou mais. Deve-se utilizar placas de trabalho frescas, evitando utilizar *Agrobacterium* riscadas a mais de 24 horas.

Duas horas antes da infecção, 5 mL de meio de infecção (Tabela 1) deve ser adicionado em um tubo de 50 mL com acetoseringona na concentração final de 100 µM (Tabela 2). É importante que a adição da acetoseringona seja realizada apenas no momento do uso. A acetoseringona é uma molécula fenólica sensível à oxidação, especialmente quando exposta à luz, ao calor e ao oxigênio atmosférico; se adicionada com antecedência, pode se degradar ou oxidar, perdendo sua atividade biológica. Fazer uma raspagem na placa de trabalho com *Agrobacterium* crescida com uma alça de inoculação estéril e colocar no meio de infecção com acetoseringona. Incubar no escuro, a 28 °C sob agitação (200 rpm) por aproximadamente 2 horas. Após 2 horas de incubação, medir a densidade óptica (OD) em espectrofotômetro, a densidade deve estar entre 0,3 e 0,4.

Tabela 2. Soluções de estoque e seus preparamos para transformação de embriões imaturos de milho B104.

Solução	Composição	Peso	Unida-de de medida	Concen-tração e estoque	Modo de preparo	Arma-zena-re Temp (° C)
MS vita-mina	Tiamina	50	mg	1000x	Diluir em 100 mL de água MilliQ. Filtroesterilizar.	4
	Piridoxina	50	mg			
	Ácido Nicotínico	5	mg			
	Glicina	200	mg			
Dicamba				30 mM	Diluir em 1 mL de NaOH 1M, e completar com 15,08 mL de água MilliQ. Filtroesterilizar.	-20
		100	mg			
Nitroato de prata (AgNO_3)		850	mg	30 mM	Diluir em 50 mL água MilliQ. Filtroesterilizar.	4
Acetosyringona				100 mM	Diluir em 10 mL de DMSO ⁽¹⁾ Filtroesterilizar em filtro especial para DMSO.	-20
		196,2	mg			
Cefato-xina		1000	mg	100 mg/mL	Diluir em 10 mL de água MilliQ. Filtroesterilizar.	-20
Vancomi-cina		1000	mg	100 mg/mL	Diluir em 10 mL de água MilliQ. Filtroesterilizar.	-20
L-Cistei-na		500	mg	100 mg/mL	Diluir em 5 mL de água MilliQ. Filtroesterilizar. Prepara no uso.	

Continua...

Continuação Tabela 2.

L-prolina	1000 mg	200 mg/mL	Diluir em 5 mL de água. Filtroesterilizar. Prepara no uso.	
AIA (ácido indolacético)	10 mg	1 mg/mL	Diluir em 1 mL de NaOH 1M, e completar com água até 10 mL. Filtroesterilizar.	-20
TDZ (Thidiazuron)	10 mg	1 mg/mL	Diluir em 1 mL de NaOH 1M, e completar com água MilliQ. Filtroesterilizar.	-20
ABA (ácido abscísico)	10 mg	1 mg/mL	Diluir em 1 mL de NaOH 1M, e completar com água MilliQ até 10 mL. Filtroesterilizar.	-20
BAP (Benzilamina Purina)	10 mg	1 mg/mL	Diluir em 1 mL de NaOH 1M, e completar com água MilliQ até 10 mL. Filtroesterilizar.	-20
Zeatina	5 mg	0,5 mg/mL	Diluir em 1 mL de NaOH 1M, e completar com água até 10 mL. Filtroesterilizar.	-20
Imazapir	10 mg	1 mg/mL	Diluir em 10 mL de água. Filtroesterilizar.	-20
PPT (DL-Phosphinothricina)	100 mg	20 mg/mL	Diluir em 5 mL de água, Filtroesterilizado.	-20

Continua...

Continuação Tabela2.

Hygromicina	400 mg	40 mg/mL	Diluir em 10 mL de água, Fil-troesterilizado.	-20
Finale®	Glufosinato e Éter monometílico de propilenoglicol	2 ml	20 mg/mL Diluir em 10 mL de água, Fil-troesterilizado.	4

(¹) DMSO (Dimetilsulfóxido)

Infecção

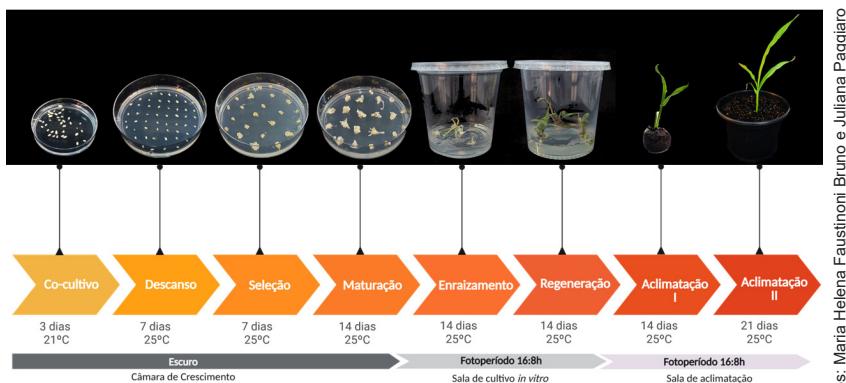
Após finalizado o processo de isolamento dos embriões, todo o volume do meio de infecção no qual os embriões foram mantidos deve ser retirado com o auxílio de uma pipeta de 1000 µL e deve-se adicionar 1 mL de meio de infecção com *Agrobacterium*. O tubo com a solução de *Agrobacterium* e os embriões imaturos deve ser misturado 20 vezes por inversão e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente no escuro (cobrir com papel alumínio). Após o período de incubação, virar o tubo com cuidado na placa com meio de co-cultivo (Tabela 1). Atentar-se à possibilidade de alguns embriões ficarem aderidos à parede do tubo.

Dica

Para monitorar a eficiência da infecção, é possível observar a expressão transiente de um gene repórter após os três dias de co-cultivo. Nesse caso, o gene repórter pode estar na mesma construção do gene de interesse ou em um vetor separado. Caso opte por usar um vetor separado, o ideal é transformar parte dos embriões (cerca de 20 embriões) de cada espiga com o vetor contendo o gene repórter, uma vez que a infecção pode variar mesmo entre espigas cultivadas lado a lado. Um dos genes repórteres mais utilizados é o gene GUS que codifica a enzima β-glucuronidase que quebra certos substratos contendo ácido glucurônico. A expressão dessa enzima pode ser facilmente detectada por reações colorimétricas, indicando que a transformação foi bem-sucedida. Uma alternativa interessante e recente aos genes repórteres clássicos é o repórter RUBY, que codifica três genes que expressam enzimas da via biossintética das betalaínas; essas enzimas convertem a tirosina naturalmente presente nas células em betalaína, um pigmento vermelho-róseo intenso (Figura 2E). A vantagem da utilização desse repórter é que ele permite a detecção visual direta sem o uso de corantes, substratos ou luz ultravioleta (He et al., 2020).

Nesse caso, retornar parte do meio de cultura da placa para o tubo de 2 mL e virar o tubo com cuidado na placa de co-cultivo novamente.

Retire o excesso de meio com Agrobacterium da placa utilizando a pipeta e deixe a placa secando por alguns minutos. Organizar os embriões para que fiquem com uma distância adequada entre eles. Com auxílio de uma lupa, arrumar os embriões para que fiquem com o escutelo para cima (Figura 2C). Incubar as placas com os embriões no escuro a 21 °C por três dias (Figura 4).



Fotos: Maria Helena Faustini Bruno e Juliana Paggiaro

Figura 4. Etapas do processo de transformação de embriões zigóticos de milho mostrando os meios de cultura, tempo de cultivo, temperatura e condições luminosas.

Fonte: Aesart et al. (2022).

Cultivo e seleção dos embriões

Após os três dias do período de incubação no meio de co-cultivo, os embriões são transferidos para o meio de descanso (Tabela 1), ainda sem agente seletivo. Colocar no máximo 26 embriões por placa para garantir o espaçamento ideal entre os embriões. Selar as placas com fita micropore e incubar de 6 a 7 dias no escuro a 25 °C. Após 7 dias no meio de descanso, os embriões vão para o meio de seleção (Tabela 1) com o agente seletivo adequado (Tabela 3) de acordo com a construção utilizada. Selar as placas com fita micropore e incubar

Tabela 3. Concentração dos agentes seletivos em cada um dos meios de cultura usados para transformação de milho B104.

Meio de cultura	Concentração do agente seletivo (mg/L)		
	Glufosinato/PPT (Phosphinotricine)	Higromicina	Imazapir
Seleção	1,5	15	0,1
Maturação	6	40	0,1
Enraizamento	6	40	0,1
Regeneração	6	20	0,05

Fonte: Aesaert et al. (2022).

por 7 dias no escuro a 25 °C. Nessa etapa, pode ser observado o crescimento de hipocótilos no embrião (Figura 2F); essas estruturas devem ser cuidadosamente retiradas com a ajuda de pinças de ponta fina.

Após a seleção, seguir com os embriões que apresentem a formação de embriões somáticos no escutelo (Figura 1D). Transfira os embriões para o meio de maturação (Tabela 1). Coloque no máximo 32 embriões por placa para garantir o espaçamento ideal entre os embriões. Selar as placas com fita micropore e incubar por 14 dias no escuro a 25 °C.

Devido à seleção, os tecidos de embriões não transgênicos ficarão oxidados (marrons) e não irão crescer. Leve adiante apenas aqueles com aspecto saudável e não oxidado. Nesse ponto, alguns deles podem até mesmo já começar a formar brotos. Transfira o material para o meio de enraizamento (Tabela 1) e incube por 14 dias a 25 °C, intensidade de luz 80-100 µmol/m²/s e fotoperíodo de 16h luz/8h escuro. Caso haja um excesso de calos associados aos brotos, eles devem ser cuidadosamente retirados com o auxílio de um bisturi. Nesse momento, plântulas que estejam crescendo juntas em touceiras (Figura 1H) devem ser separadas, se possível, para que cada uma se desenvolva independentemente.

Na última etapa de cultivo *in vitro*, transfira o material para o meio de regeneração (Tabela 1) e mantenha por 14 dias a 25 °C, intensidade de luz de 80-100 µmol/m²/s e fotoperíodo de 16h luz/8h escuro. Nesse momento, já é possível observar a formação de plântulas enraizadas. Transfira para o solo após 14 dias no meio de regeneração, plântulas com pelo menos duas raízes de 5 cm (Figura 1G). Caso ainda não haja raízes, mantenha as plântulas por mais 14 dias em um novo meio de regeneração.

Aclimatação

Antes da aclimatação, as plântulas transformadas com vetores contendo o gene *bar* podem ser testadas através do teste rápido com fitas imunocromatográficas. Plantas com genótipo desejado são identificadas e mantidas, e as demais são descartadas. Lave o excesso do meio de cultura das raízes e coloque as plântulas em um *pellet* Jiffy-7 umedecido previamente, mas sem excesso de água. Os *pellets* com as plântulas devem ser acondicionados em potes plásticos e colocados em bandejas com uma campânula umedecida, onde permanecerão por uma semana. Nos três primeiros dias, a campânula deve estar com os orifícios superiores fechados e deve ser aberta somente se for necessário umidificar a campânula, de forma rápida. No quarto dia, os orifícios devem ser semiabertos (metade da abertura total) e no sexto dia, devem ser completamente abertos (lembrando de manter sempre úmidas as paredes da campânula, principalmente após a abertura dos orifícios). Atenção para a necessidade ou não de colocar um pouco de água no *pellet*, sem excesso. Mantenha-as em sala de crescimento controlada, com intensidade de luz de 300 µmol/m²/s, fotoperíodo de 16 horas de luz a 26 °C e 8 horas de escuro a 22 °C. Remova a cobertura após sete dias e mantenha as plantas no *pellet* em potes plásticos por mais sete dias. Ao fim dos 14 dias, as plântulas nos *pellets* devem ser transferidas para vasos de 1 L com substrato comercial e vermiculita (proporção 4:1). As plântulas devem ser mantidas na sala de crescimento por mais ou menos 30 dias até que atinjam o tamanho adequado para transferência para casa de

vegetação. Dois dias após as plantas transformadas serem transferidas para a casa de vegetação, elas são transplantadas para vasos maiores (10 L) com substrato e fertilizante de liberação controlada (Osmocote, 2 kg/m³).

Genotipagem usando fitas imunocromatográficas

Caso o vetor utilizado para transformação tenha o gene *bar* conferindo resistência ao glufosinato de amônio, existe a possibilidade de utilizar testes rápidos para detecção da presença da proteína PAT nos tecidos vegetais de plantas transformadas (Figura 1I). Esses tipos de testes determinam qualitativamente a presença da proteína PAT em amostras vegetais.

O ensaio baseia-se em um sistema imunológico do tipo “sanduíche duplo”, no qual anticorpos específicos para a proteína PAT são conjugados a um reagente corante e incorporados a uma tira de fluxo lateral. Para preparar a amostra, um pedacinho do tecido vegetal é triturado em um microtubo com água com auxílio de um pistilo para liberar suas proteínas e a tira é colocada em contato com o líquido no microtubo. Se a proteína PAT estiver presente, ela será reconhecida e se ligará ao anticorpo colorido. Quando esse conjunto se move por capilaridade pela tira, ele é capturado em uma área específica chamada linha de teste, formando um “sanduíche” com a proteína entre dois anticorpos. Essa linha fica vermelha se a proteína estiver presente. Independentemente de a proteína estar presente ou não, os anticorpos marcados com corante são capturados na linha de controle por outro anticorpo que reconhece a parte constante do anticorpo marcador. A marcação da linha de controle confirma que o teste funcionou corretamente.

Esses testes oferecem uma triagem preliminar das plantas regeneradas que depois podem ser confirmadas quanto à transgenia por análises de PCR. Essa é uma forma rápida e prática para selecionar as plantas transgênicas que seguirão para a casa de vegetação.

Vetores

Um ponto importante para a transformação de embriões de milho é a escolha adequada dos vetores. Além de conterem o gene de interesse e o gene de seleção, esses vetores podem conter genes que ajudam no processo de regeneração das células, os chamados genes morfogênicos. Além disso, os vetores carregam genes de virulência que auxiliam a infecção da planta pela *Agrobacterium*. Em geral, são utilizados para transformação de plantas vetores binários, em que um deles carrega a região Ti (que será transferida para a planta) contendo o gene de interesse e resistência e outro carrega genes de virulência que auxiliam a infecção da *Agrobacterium*. Mais recentemente, têm sido usados vetores ternários que, além dos dois plasmídeos contidos nos vetores binários, possuem um terceiro plasmídeo com genes extras de virulência.

A utilização de genes morfogênicos

O uso de genes morfogênicos na transformação de milho é relativamente recente e trouxe ganhos significativos na eficiência de transformação de diversos genótipos, em especial aqueles de difícil transformação, considerados recalcitrantes à transformação (Tabela 4).

Tabela 4. Principais genes morfogênicos empregados na otimização da transformação de milho.

Genes	Referências
<i>BABY BOOM (bbm)</i>	Lowe et al. (2016)
<i>WUSCHEL (wus2)</i>	Lowe et al. (2016)
<i>WUSCHEL-LIKE HOMEobox 2a (wox-2a)</i>	McFarland et al. (2023)
<i>Quimera GRF-GIF (grf-gif)</i>	Vandeputte et al. (2024)

Fonte: Aesaert et al. (2022).

Os genes morfogênicos são fatores de transcrição que estão envolvidos no controle da embriogênese e organogênese e atuam na formação e no desenvolvimento de tecidos e órgãos vegetais. Quando esses genes estão superexpressos ou regulados de maneira controlada, aumentam a capacidade de regeneração celular e formação de estruturas embriogênicas a partir de tecidos que normalmente são difíceis de regenerar. Nos primeiros trabalhos publicados, esses genes morfogênicos foram incluídos no mesmo vetor de expressão que os genes de interesse. Porém, a superexpressão contínua ou incontrolada desses genes pode levar à regeneração de plantas com fenótipo atípico, estéril ou com baixa fertilidade e com efeitos pleiotrópicos não desejáveis.

Algumas estratégias foram desenvolvidas para evitar efeitos pleiotrópicos ou problemas de desenvolvimento nas plantas regeneradas, como o uso de promotores induzíveis ou específicos de um determinado tecido e a excisão dos genes morfogênicos após a fase de regeneração, utilizando sistemas como CRE/loxP ou FLP/FRT. As vantagens da utilização desses genes na transformação de milho são evidentes e trouxeram muitos avanços:

Aumento significativo da eficiência de transformação: frequências de transformação de 8,7 a 96% foram observadas usando estes genes (Lowe et al., 2018).

Redução do tempo para regeneração de plantas: protocolos mais rápidos e previsíveis; redução de pelo menos um mês no tempo foi observada por Lowe et al. (2018).

Expansão da aplicabilidade da transformação: permite a transformação de genótipos e explantes antes considerados inviáveis; mais de 50% de genótipos testados podem ser transformados de acordo com Lowe et al. (2018) e Hernandes-Lopes et al. (2023).

Uma estratégia utilizada com genes morfogênicos é a chamada transformação altruista. Essa estratégia consiste em usar os genes morfogênicos (*bbm* e *wus2*) para transformar não a mesma célula que carrega o gene de interesse, mas células vizinhas durante a fase de co-cultivo com *Agrobacterium*. Essas células vizinhas transformadas com os genes morfogênicos produzem quantidades suficientes de proteínas que podem ser transportadas para estimular a

regeneração nas células vizinhas transformadas com o gene-alvo. Isso permite que sejam regeneradas plantas que não carregam os genes morfogênicos.

Na prática essa transformação é feita da seguinte maneira:

1) É feita uma mistura com duas cepas de *Agrobacterium*, uma com o vetor binário contendo o gene de interesse e outra com um vetor contendo os genes morfogênicos (*bbm* e *wus2*) sem gene de seleção, ou com um gene de seleção diferente do utilizado no vetor contendo o gene de interesse.

2) Durante o co-cultivo, as células infectadas pela *Agrobacterium* contendo os genes morfogênicos produzem os fatores de transcrição que são transportados para células vizinhas. Os fatores de transcrição transportados promovem a regeneração de células vizinhas que foram transformadas apenas com o gene-alvo.

3) Como apenas o vetor com o gene de interesse possui o marcador de seleção para o antibiótico adicionado ao meio de cultura, só essas células sobrevivem na fase de seleção.

4) O resultado final é plantas livres dos genes morfogênicos, mas beneficiadas pelo estímulo que eles proporcionaram na fase inicial de regeneração.

Essa estratégia evita problemas pleiotrópicos trazidos pela utilização dos genes morfogênicos nas plantas regeneradas, como malformações e esterilidade. Essa estratégia, em teoria, dispensa a necessidade de excisão gênica pós-regeneração, mantém a eficiência elevada de transformação, mesmo em genótipos recalcitrantes, e facilita a aplicação em programas de melhoramento por evitar transgenes morfogênicos indesejáveis.

Na prática, o que observamos é que, dependendo do vetor utilizado como altruísta, algumas plantas regeneradas serão transformadas com ambos os vetores e ainda carregarão os genes morfogênicos. Essa desvantagem pode ser contornada com a otimização dos promotores dos genes morfogênicos; a utilização de promotores fortes faz com que as células transformadas com os genes morfogênicos tenham uma expressão tão forte que não permite que essas células se desenvolvam.

A utilização de vetores ternários

Tradicionalmente, na transformação de plantas são empregados vetores binários, compostos por um plasmídeo contendo a região T-DNA, responsável pela transferência do gene de interesse, e um plasmídeo cromossômico desarmado que fornece os genes de virulência (*vir genes*) necessários para o processo de transferência. Nos últimos anos, uma nova abordagem utilizando os chamados vetores ternários tem colaborado para aumentar a taxa de infecção dos explantes, aumentando assim a eficiência de transformação.

Os vetores ternários consistem em um sistema tripartido, no qual, além do plasmídeo binário contendo o T-DNA e o plasmídeo Ti desarmado na bactéria hospedeira, é introduzido um terceiro plasmídeo acessório, denominado "*helper plasmid*". Este plasmídeo adicional carrega genes de virulência suplementares ou otimizados, capazes de aumentar significativamente a eficiência de transformação, principalmente em espécies e genótipos considerados recalcitrantes.

O *helper plasmid* fornece uma cópia adicional ou versões melhoradas dos genes de virulência (*vir*), permitindo um aumento na expressão desses fatores durante o processo de infecção da planta.

O uso de vetores ternários apresenta diversas vantagens em relação aos sistemas binários convencionais:

Aumento da eficiência de transformação: a presença de genes de virulência adicionais potencializa a capacidade da *Agrobacterium* de transferir o T-DNA para as células vegetais, resultando em um maior número de eventos transformados.

Melhoria na transformação de genótipos recalcitrantes: algumas espécies ou cultivares apresentam baixa suscetibilidade à infecção por *Agrobacterium*; o sistema ternário supera essa limitação, expandindo as possibilidades de aplicação da tecnologia.

Estabilidade no processo de transformação: a separação dos elementos de virulência suplementares em um plasmídeo acessório contribui para a estabilidade genética da bactéria e do plasmídeo binário durante o cultivo e a infecção.

Para o sucesso desse sistema, é fundamental garantir a compatibilidade entre os diferentes plasmídeos presentes na bactéria hospedeira: o plasmídeo binário (que carrega o T-DNA com o gene de interesse) e o plasmídeo acessório de virulência (*helper plasmid*). A escolha correta desses componentes é essencial para manter a estabilidade dos vetores, evitar incompatibilidades e assegurar o desempenho do sistema (Tabela 5).

A compatibilidade depende principalmente de dois fatores, a origem de replicação (*ori*) dos vetores e os genes de resistência que cada um carrega. Quanto à origem de replicação, plasmídeos que compartilham a mesma origem de replicação competem pelos mesmos mecanismos de replicação na célula hospedeira, o que pode levar à instabilidade ou perda de plasmídeos. Por isso, é necessário que o plasmídeo binário e o *helper plasmid* possuam origens de replicação compatíveis e independentes.

Tabela 5. Plasmídeos *vir helper* usados em sistemas ternários para aumento da eficiência de transformação genética em milho.

Nome do plasmídeo	ORI para Agrobacterium	Resistência na bactéria	Referência	Número Addgene
pPHP71539	pVS1	Gentamicina	Anand et al. (2018)	Indisponível
pVS1-VIR1	pVS1	Espectinomicina	Zhang et al. (2019)	138192
pVS1-VIR2	pVS1	Espectinomicina	Zhang et al. (2019)	134745
pKL2299	pRK2	Gentamicina	Kang et al. (2022)	186332
pRiA4-VIR	pRiA4	Espectinomicina	Zhang et al. (2019)	138193
pKL2299A	pRK2	Gentamicina	Aliu et al. (2024)	222105

Já para a seleção eficaz de bactérias contendo ambos os plasmídeos, é imprescindível que cada vetor possua um gene de resistência a antibiótico diferente. Isso permite a seleção simultânea durante o crescimento bacteriano. Para seleção de um vetor ternário que seja compatível com seu vetor binário contendo o gene de interesse, alguns passos são recomendados:

- 1) Verificar a origem de replicação dos dois plasmídeos: é importante se certificar de que a *ori* do plasmídeo binário seja compatível com a do plasmídeo ternário; é importante que sejam origens de replicação diferentes.
- 2) Checar os genes de resistência: é importante garantir que os genes de resistência a antibióticos sejam diferentes e compatíveis com os meios de cultura utilizados.
- 3) Compatibilidade com a cepa de *Agrobacterium* utilizada: verificar se a cepa utilizada aceita a cotransformação com os plasmídeos desejados e se possui características adequadas.

Conclusão

Avanços recentes na transformação do milho foram alcançados predominantemente por meio da abordagem mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Novos meios de cultura, genes morfogênicos, vetores ternários e linhagens mutantes de *A. tumefaciens* aumentaram as frequências de transformação genética e expandiram a gama de genótipos e explantes usados na transformação. À medida que a edição genômica se torna mais prevalente no milho, prevemos que novos laboratórios começarão a explorar essa área, e a transformação genética permanece ainda como o principal método para a entrega de vetores de edição. Este documento tem como objetivo servir como um guia didático e detalhado sobre como implementar a transformação genética de milho, especialmente em laboratórios iniciantes nessa técnica.

Referências

- AESAERT, S.; IMPENS, L.; COUSSENS, G.; VAN LERBERGE, E.; VANDERHAEGHEN, R.; DESMET, L.; VANHEVEL, Y.; BOSSUYT, S.; WAMBUA, A. N.; VAN LIJSEBETTENS, M.; INZÉ, D.; DE KEYSER, E.; JACOBS, T. B.; KARIMI, M.; PAUWELS, L. Optimized transformation and gene editing of the B104 public maize inbred by improved tissue culture and use of morphogenic regulators. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 883847, Apr. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.883847>.
- ALIU, E.; JI, Q.; WLAZLO, A.; GROSIC, S.; AZANU, M. K.; WANG, K.; LEE, K. Enhancing Agrobacterium-mediated plant transformation efficiency through improved ternary vector systems and auxotrophic strains. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 1429353, July 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1429353>.
- ANAND, A.; BASS, S. H.; WU, E.; WANG, N.; MCBRIDE, K. E.; ANNALURU, N.; MILLER, M.; HUA, M.; JONES, T. J. An improved ternary vector system for Agrobacterium-mediated rapid maize transformation. **Plant Molecular Biology**, v. 97, n. 1-2, p. 187-200, May 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0732-y>.
- CHU, C. C.; WANG, C. C.; CHING SAN, S.; CHEN, H.; KWANG-CHU, Y.; CHIH-YIN, C.; FENG-YUN, B. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, v. 18, n. 5, p. 659-668, Sept./Oct. 1975. DOI: <https://doi.org/10.1360/YA1975-18-5-659>.
- COE, E. H.; SARKAR, K. R. Preparation of nucleic acids and a genetic transformation attempt in maize. **Crop Science**, v. 6, n. 5, p. 432-435, Sept./Oct. 1966. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1966.0011183X000600050012x>.
- 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, n. 10, p. 1024-1034, Oct. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0145-2>.

FROMM, M. E.; TAYLOR, L. P.; WALBOT, V. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. **Nature**, v. 319, n. 6056, p. 791-793, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1038/319791a0>.

GORDON-KAMM, W. J.; SPENCER, T. M.; MANGANO, M. L.; ADAMS, T. R.; DAINES, R. J.; START, W. G.; O'BRIEN, J. V.; CHAMBERS, S. A.; ADAMS JÚNIOR, W. R.; WILLETS, N. G.; RICE, T. B.; MACKEY, C. J.; KRUEGER, R. W.; KAUSCH, A. P.; LEMAUX, P. G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **The Plant Cell**, v. 2, n. 7, p. 603-618, July 1990. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.2.7.603>.

HE, Y.; ZHANG, T.; SUN, H.; ZHAN, H.; ZHAO, Y. A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation. **Horticulture Research**, v. 7, 152, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00390-1>.

HERNANDES-LOPES, J.; PINTO, M. S.; VIEIRA, L. R.; MONTEIRO, P. B.; GERASIMOVA, S. V.; NONATO, J. V.; BRUNO, M. H.; VIKHOREV, A.; RAUSCH-FERNANDES, F.; GERHARDT, I. R.; PAUWELS, L.; ARRUDA, P.; DANTE, R. A.; YASSITEPE, J. E. de C. T. Enabling genome editing in tropical maize lines through an improved, morphogenic regulator-assisted transformation protocol. **Frontiers in Genome Editing**, v. 5, 1241035, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgeed.2023.1241035>.

ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. Agrobacterium-mediated transformation of maize. **Nature Protocols**, v. 2, n. 7, p. 1614-1621, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.241>.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 745-750, June 1996. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt0696-745>.

KANG, M.; LEE, K.; FINLEY, T.; CHAPPELL, H.; VEENA, V.; WANG, K. An improved *Agrobacterium*-mediated transformation and genome-editing method for maize inbred B104 using a ternary vector system and immature embryos. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 860971, May 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.860971>.

KAUSCH, A. P.; WANG, K.; KAEPPLER, H. F.; GORDON-KAMM, W. Maize transformation: history, progress, and perspectives. **Molecular Breeding**, v. 41, 38, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11032-021-01225-0>.

KLEIN, T. M.; FROMM, M.; WEISSINGER, A.; TOMES, D.; SCHAAF, S.; SLETTEN, M.; SANFORD, J. C. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 12, p. 4305-4309, June 1988. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.85.12.4305>.

LOWE, K.; LA ROTA, M.; HOERSTER, G.; HASTINGS, C.; WANG, N.; CHAMBERLIN, M.; WU, E.; JONES, T.; GORDON-KAMM, W. Rapid genotype “independent” Zea mays L. (maize) transformation via direct somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 54, p. 240-252, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9905-2>.

MCFARLAND, F. L.; COLLIER, R.; WALTER, N.; MARTINELL, B.; KAEPPLER, S. M.; KAEPPLER, H. F. A key to totipotency: Wuschel-like homeobox 2a unlocks embryogenic culture response in maize (*Zea mays* L.). **Plant Biotecnologia Journal**, v. 21, n. 9, p. 1860-1872, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/pbi.14098>.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

PETERSON, D.; BARONE, P.; LENDERTS, B.; SCHWARTZ, C.; FEIGENBUTZ, L.; ST. CLAIR, G.; JONES, S.; SVITASHEV, S. Advances in *Agrobacterium* transformation and vector design result in high-frequency targeted gene insertion in maize. **Plant Biotechnology Journal**, v. 19, n. 10, p. 2000–2010, Oct. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/pbi.13613>

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, 379, Aug. 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00379>.

SIMMONS, C. R.; LAFITTE, H. R.; REIMANN, K. S.; BRUGIÈRE, N.; ROESLER, K.; ALBERTSEN, M. C.; GREENE, T. W.; HABBEN, J. E. Successes and insights of an industry biotech program to enhance maize agronomic traits. **Plant Science**, v. 307, 110899, June 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.110899>.

VANDEPUTTE, W.; COUSSENS, G.; AESAERT, S.; HAEGHEBAERT, J.; IMPENS, L.; KARIMI, M.; DEBERNARDI, J. M.; PAUWELS, L. Use of GRF-GIF chimeras and a ternary vector system to improve maize (*Zea mays* L.) transformation frequency. **The Plant Journal**, v. 119, n. 4, p. 1665-2143, Aug. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/tpj.16880>.

YADAVA, P.; ABHISHEK, A.; SINGH, R.; SINGH, I.; KAUL, T.; PATTANAYAK, A.; AGRAWAL, P. K. Advances in maize transformation technologies and development of transgenic maize. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 1949, Jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01949>.

YASSITEPE, J. E. de C. T.; SILVA, V. C. H. da; HERNANDES-LOPES, J.; DANTE, R. A.; GERHARDT, I. R.; FERNANDES, F. R.; SILVA, P. A. da; VIEIRA, L. R.; BONATTI, V.; ARRUDA, P. Maize transformation: from plant material to the release of genetically modified and edited varieties. **Frontiers in Plant Science**, V. 12, 766702, Oct. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.766702>.

ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; LU, M. H.; CHAI, Y. P.; JIANG, Y. Y.; ZHOU, Y.; WANG, X. C.; CHEN, Q. J. A novel ternary vector system united with morphogenic genes enhances CRISPR/Cas delivery in maize. **Plant Physiology**, v. 181, n. 4, p. 1441-1448, Dec. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.19.00767>.

Apêndice A

Materiais e equipamentos necessários para transformação

1. Material vegetal, construções e cepas de *Agrobacterium tumefaciens*

Sementes de milho linhagem B104: obtidas na coleção de germoplasma da Embrapa Agricultura Digital.

Vetor Binário: Sistema de plasmídeo utilizado na transformação genética de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, no qual o plasmídeo Ti foi dividido em um plasmídeo auxiliar (*vir helper*), contendo os genes *vir*, e um vetor binário que carrega a sequência de interesse. O vetor binário contém, na região de T-DNA, um marcador de seleção e uma origem de replicação (*origin of replication*, ORI), que são essenciais para proporcionar a replicação e manutenção do plasmídeo tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium*. O plasmídeo auxiliar carrega os genes de virulência (genes *vir*), responsáveis por mediar o processo de transferência genética.

Vetor Ternário (*Ternary Helper Vector*): Vetor binário convencional contendo o T-DNA e um plasmídeo *helper* compatível que carrega cópias adicionais dos genes de virulência (*vir*) da *Agrobacterium* e favorece a entrega eficiente do T-DNA. Nesse sistema, os genes *vir* são fornecidos por dois plasmídeos distintos: o plasmídeo Ti (auxiliar) e o plasmídeo *helper*. Para que o vetor ternário funcione adequadamente em conjunto com um vetor binário, é essencial que ambos possuam origens de replicação compatíveis, garantindo sua manutenção simultânea em *Agrobacterium tumefaciens*.

Cepas de *Agrobacterium tumefaciens* - As cepas de *Agrobacterium tumefaciens* mais comumente utilizadas na transformação de milho são:

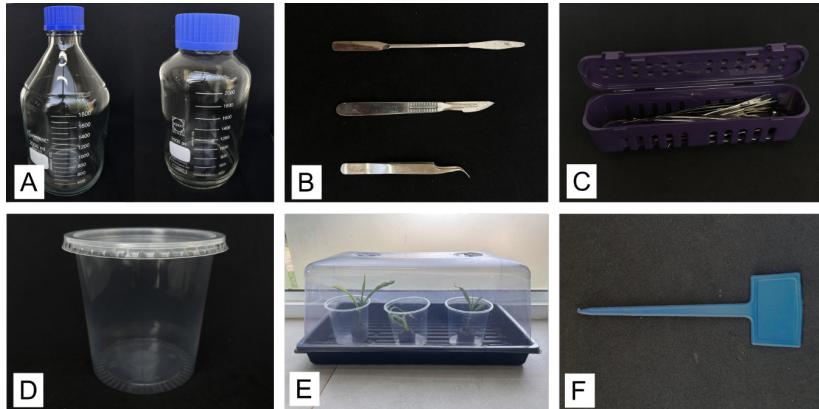
EHA101 - Cepa de *Agrobacterium tumefaciens* desenvolvida para aplicações em transformação genética de plantas. Derivada da cepa hipervirulenta A281, ela carrega o plasmídeo tumorigênico pTiBo542, conhecido por sua alta atividade dos genes de virulência (*vir*). Na construção da EHA101, a região oncogênica do T-DNA do plasmídeo pTiBo542 foi removida e substituída por um gene de resistência à canamicina, resultando em um plasmídeo Ti desarmado ou seja, incapaz de induzir tumores, mas ainda funcional para mediar a transferência do T-DNA. Apresenta resistência à rifampicina (de origem cromossômica) e à canamicina (conferida pelo plasmídeo Ti modificado), o que permite sua seleção eficiente em meios de cultura seletivos. A EHA101 é amplamente reconhecida por sua alta virulência, o que a torna muito eficiente na transformação de diversas espécies vegetais.

EHA105 - É uma cepa intimamente relacionada à EHA101, também derivada da cepa hipervirulenta A281 e portadora do plasmídeo pTiBo542 desarmado. A principal diferença em relação à EHA101 é que, na EHA105, não há inserção de gene de resistência à canamicina no plasmídeo Ti, o que a torna sensível à canamicina. Essa característica amplia sua compatibilidade com vetores binários que utilizam canamicina como marcador de seleção. Assim como a EHA101, a EHA105 é resistente à rifampicina (resistência cromossômica) e apresenta elevada eficiência de transformação.

LBA4404 - É uma cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* derivada da cepa Ach5. Ela carrega o plasmídeo Ti desarmado pAL4404, que é uma versão modificada do pTiAch5, na qual a região do T-DNA oncogênico foi completamente removida. A cepa apresenta resistência à rifampicina (resistência cromossômica), mas não possui resistência à canamicina no plasmídeo Ti, o que a torna compatível com vetores binários ou ternários que utilizam canamicina como marcador de seleção. A principal diferença entre a cepa LBA4404 e as cepas EHA101 e EHA105 está na origem do plasmídeo Ti desarmado e na virulência. A cepa LBA4404 possui virulência moderada comparada às cepas EHA101 e EHA105, o que a torna especialmente adequada para a transformação de espécies mais sensíveis.

2. Materiais e equipamentos usados na fase de

- Hipoclorito de sódio 4% - para desinfestação das espigas, pode ser adquirido em concentrações mais altas e diluído para a concentração de trabalho no momento do uso.
- Autoclave - para esterilização de meios de cultura, pinças e vidrarias.
- Medidor de pH - para ajuste do pH dos meios de cultura.
- *Tween* 20 - detergente não iônico usado para reduzir a tensão superficial durante a desinfestação das espigas.
- Filtros de Seringa 0,22 µm - para filtragem de soluções que não podem ser autoclavadas, como antibióticos e alguns fitorreguladores de crescimento.
- Seringas de 10 mL e 20 mL - para filtragem de soluções que não podem ser autoclavadas, como antibióticos e alguns fitorreguladores de crescimento.
- Frasco de boca larga tipo SCHOTT de 2 L - para desinfestação das espigas (Figura A1A).
- Frasco tipo SCHOTT de 5 L - para autoclavar água destilada (Figura A1A).
- Béquer de plástico de 2 L - para auxiliar a lavagem das espigas.
- Pinça longa (25 cm) - suporte para as espigas durante a retirada dos embriões imaturos.
- Microespátula de ponta plana arredondada (*flat rounded end*) - para retirar embriões imaturos da espiga (Figura 1B).
- Bisturi e lâmina - para retirar embriões imaturos da espiga (Figura A1B).
- Estojo para esterilização de instrumentos em plástico ou resina que permita a esterilização em autoclave - para armazenamento e esterilização das pinças (Figura A1C).
- Placa de Petri de vidro grande 150 mm x 15 mm - para apoiar as espigas durante a retirada dos embriões.
- Tubo de microcentrifuga de 2 mL com tampa - para manutenção dos embriões durante a retirada.
- Tubo Falcon de 50 mL - para preparo da solução com *Agrobacterium*.
- Placa de Petri de plástico estéril 60 mm x 15 mm e 100 mm x 25 mm - para cultivo de explantes.



Fotos: Maisa Siqueira Pinto e Juliana Paggiaro

Figura A1. Materiais utilizados no protocolo de transformação genética de milho: (A) frascos de vidro com boca larga utilizados para autoclarvar água e preparar solução de hipoclorito de sódio destinada à desinfestação das espigas; (B) microespátula com extremidade arredondada, bisturi e pinça utilizados para a extração de embriões imaturos das espigas e para sua adequada disposição sobre o meio de cultura; (C) estojo de plástico autoclavável para esterilização de instrumentos como espátulas, pinças e bisturis. (D) recipiente plástico descartável utilizado para o armazenamento dos meios de cultura; (E) bandeja plástica com cúpula transparente para manutenção da umidade durante a aclimatização das plântulas; (F) placa de identificação vegetal tipo E16 (5 cm × 16 cm), utilizada para marcação dos vasos com plantas regeneradas.

3. Materiais usados na fase de aclimatação

- Substrato vegetal peletizado a base de turfa e fibras de coco - proporcionam excelente relação ar-água para o enraizamento e desenvolvimento de raízes e evita necessidade de transplantio, podendo ser diretamente transferido para os vasos. É utilizado na primeira etapa de aclimatização. *Jiffy7 Horticulture Peat Pellet 42 mm x 43 mm and 6 mm Indent*, Marca: *Jiffy Growing Solutions*.

- Bandeja e cúpula de umidade (Figura A1E) - bandeja e cúpula com controlador de vento e umidade, contendo: 1 cúpula com tampa transparente com regulagem de vento e umidade em dois pontos (material ideal

para captação de luminosidade) e 1 bandeja com pequenas canaletas para a água. Dimensões: cúpula de 54 cm de comprimento x 28 cm de largura x 20 cm de altura; bandeja de 54 cm comprimento x 28 cm de largura x 6 cm de altura; Marca: *GrowPlant*.

- Inseticida: Formilix Fipronil Quimiagri repelente de insetos 500 ml. Marca: Quimiagri.

- Vaso: modelo vaso pote 14 de 900 mL. Dimensões: altura 10,3 cm x comprimento 13,8 cm; diâmetro boca 14 mm; diâmetro fundo 9,7 mm; Marca: Valmagi Vasos.

- Substrato: substrato vegetal *Biogrow Vaso Composto/Turfa Standard*; pH 5,7; CE 0,6; CRA 173,5%; densidade de matéria seca 280,8 kg/m²; umidade 45%; Marca: Agrolink.

- Meio de cultura vegetal *Murashige e Skoog* com metade da concentração dos sais (MS ½) para suplemento nutricional durante a fase de aclimatação.

- Solução de Nitrato de Cálcio (0,9 g/L) e Sulfato de Magnésio (0,5 g/L): preparar duas soluções estoques – 720 g/L de nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) e 370 g/L de sulfato de magnésio (MgSO_4). Para solução final, adicionar 5 mL de cada uma das soluções estoque em 3,8 litros de água.

- Placa de Identificação de Plantas E16 (5 cm x 16 cm) - para identificação dos eventos nos vasos (Figura A1F).

- LL Strip Test – AgraStrip - para detecção da proteína PAT em amostras vegetais.

4. Materiais usados na fase de casa de vegetação

- Vaso: vaso plástico para plantas, capacidade 10 L.
- Substrato: substrato vegetal *Biogrow Vaso Composto/Turfa Standard*; pH 5,7; CE 0,6; CRA 173,5%; densidade de matéria seca 280,8 kg/m²; umidade 45%; Marca: Agrolink.

- Fertilizante NPK [10-10-10] Heringer: usar no plantio 250 g de fertilizante para 60 kg (um saco) de substrato.

- Fertilizante Forth Plantio [12% fósforo (P_2O_5 total): 2% fósforo (P_2O_5 CNA+ sol. água), 2% fósforo (P_2O_5 sol. água), 4% fósforo (P_2O_5 ácido cítrico); 22% cálcio (Ca total); 6,7% magnésio (Mg total); 3% enxofre (S

total); 0,11% boro (B total); 0,07% cobre (Cu total); 0,20% ferro (Fe total); 0,10% manganês (Mn total); 0,005% molibdênio (Mo total); 0,18% zinco (Zn total); 1% silício (Si total)]: usar no plantio – 50 g/vaso

- Fertilizantes Forth Cote 14-14-14 [N-P-K]: usado no plantio – 25 g/vaso

- Fertilizante Forth Hortaliças [9% nitrogênio (N total); 15% fósforo (P₂O₅ total); 13% fósforo (P₂O₅ sol. água), 15% fósforo (P₂O₅ CNA+ sol. água); 10% potássio (K₂O sol. água); 2,5% cálcio (Ca total); 2,5% magnésio (Mg total); 9% enxofre (S total); 0,06% boro (B total); 0,05% cobre (Cu total); 0,22% ferro (Fe total); 0,10% manganês (Mn total); 0,005% molibdênio (Mo total); 0,20% zinco (Zn total)]: adubação de cobertura - 30 e 45 dias depois do plantio, ou se houver necessidade aplicar antes, 30-50 g/vaso (dosagem depende da necessidade).

5. Materiais usados na polinização

- Saco plástico 23 cm comprimento x 6 cm largura - para cobrir as espigas antes da polinização.

- Sacos de polinização (envelope saco kraft 350 mm x 170 mm, cor natural) - para cobrir as espigas após a polinização.

- Tesouras - para auxiliar na polinização.

- Álcool 70% em borrifador - para esterilizar as tesouras.

- Grampeador - para fixar os sacos de papel ao cobrir as espigas.

- Caneta permanente (à prova de água e resistente à luz solar) - para identificação das espigas polinizadas.

6. Iluminação

- Sala de cultivo *in vitro*: lâmpadas Philips GreenPower TLED DR/W 18 W MB 220-240V 50/60 Hz.

-Sala de aclimatação: lâmpadas GE *Lighting Horticulture Linear LED Fixture* 100-277 V, 50-60 Hz, 36 W.

- Casa de vegetação: lâmpadas para suplementação de luz, OSRAM *HL300 Grow*.

CGPE 19420

