

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

ISSN 1518-4277

Dezembro, 2004

Documentos 32

Transformação Genética de Milho Utilizando o Bombardeamento de Partículas

Andréa Almeida Carneiro
Newton Portilho Carneiro
Edilson Paiva

Sete Lagoas, MG
2004



Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

*Embrapa Milho e Sorgo
Rodovia MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Telefone: (31) 3779 1000
Fax: (31) 3779 1088
Home page: www.cnpms.embrapa.br
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br*

Comitê de Publicações da Embrapa Milho e Sorgo

Presidente: *Jamilton Pereira dos Santos*
Secretário-Executivo: *Paulo César Magalhães*
Membros: *Camilo de Lélis Teixeira de Andrade, Claudia Teixeira Guimarães, Carlos Roberto Casela, José Carlos Cruz e Márcio Antônio Resende Monteiro*
Revisão: *Dilermando Lúcio de Oliveira*
Editoração eletrônica: *Tânia Mara Assunção Barbosa*
Normalização bibliográfica: *Maria Tereza Rocha Ferreira*
Arte Final da Capa: *Tânia Mara Assunção Barbosa e Newton França*

1ª edição

1ª impressão (2004): 2.000 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei Nº 9.160).

CIP. Brasil. Catalogação-na-publicação.

Embrapa Milho e Sorgo

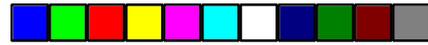
Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas / Andréa Almeida Carneiro ...[et al]. – Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004.

44 p. (Embrapa Milho e Sorgo.Documentos, 32)
ISSN 1518-4277

1. Milho – BT. 2. Biobalística. 3. Calo embriogênico. 4. Transgênico. 5. Lagarta-do-cartucho. I. Carneiro, Andréa Almeida. II. Carneiro, Newton Portilho. III. Paiva, Edilson.

CDD- 633.15

© Embrapa 2004



Autores

Andréa Almeida Carneiro

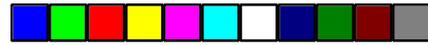
Ph.D Biologia Molecular. Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG.
andreac@cnpms.embrapa.br

Newton Portilho Carneiro

Ph.D Biologia Molecular. Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG.
newtonc@cnpms.embrapa.br

Edilson Paiva

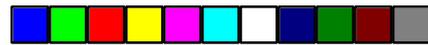
Ph.D Biologia Molecular. Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG.
edilson@cnpms.embrapa.br



Apresentação

Esta obra foi preparada para atender a crescente demanda de estudantes e pesquisadores que desenvolvem pesquisas na área de transformação genética de milho no Brasil. A pesquisa utilizando plantas geneticamente modificadas vem ganhando a cada dia maior importância, não apenas a nível acadêmico, mas também a nível comercial. A Embrapa Milho e Sorgo é pioneira na produção de milho transgênico no Brasil e, tem colaborado com diferentes grupos de pesquisa brasileiros na transferência de genes de interesse para o milho.

Neste documento, apresentamos a metodologia desenvolvida pelos pesquisadores deste centro para a produção de milho transgênico através do processo de bombardeamento de partículas ou biobalística. Os tópicos abordados compreendem desde a escolha da espiga para coleta de embriões imaturos, os quais serão utilizados como explantes para transformação, até a seleção e regeneração de plantas transgênicas. Todo o processo de precipitação de DNA sobre as partículas metálicas, bem como a utilização do canhão gênico está relatado e documentado com diversas fotos.

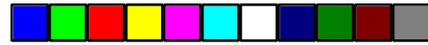


Esperamos que o conteúdo desta obra, que reúne conhecimentos práticos adquiridos durante a última década de pesquisa, incentive outros grupos a desenvolverem pesquisa na área de transformação genética de milho, a qual acreditamos, terá um grande impacto no agronegócio do milho no Brasil e no Mundo.



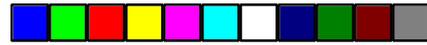
Ivan Cruz
Chefe Geral





Sumário

Introdução	09
Bombardamento de Partículas ou Biobalística	12
Fatores que afetam a Transformação Genética Mediada pelo Bombardamento de Partículas	15
Construção Gênica	15
Parâmetros Físicos Relacionados ao Aparelho a Ser Utilizado	20
Parâmetros Relacionados aos Microprojéteis	21
Parâmetros Biológicos	21
Exemplo de um Protocolo Experimental de Biobalística	25
Transformação Genética de Milho Via Biobalística	25
Transformação de Calos Embriogênicos de Milho Utilizando a Biobalística	31
Precipitação do DNA sob as micropartículas	32
Seleção de Plantas Transgênicas de Milho Após o Bombardamento.	34
Identificação de Plantas Transgênicas	36
Anexo I	42
Referências	43



Transformação Genética de Milho Utilizando o Bombardeamento de Partículas

Andréa Almeida Carneiro

Newton Portilho Carneiro

Edilson Paiva

Introdução

A revolução biotecnológica ocorrida na última década possibilitou aos melhoristas de plantas o acesso a novas fontes de variabilidade genética para o desenvolvimento de cultivares superiores. Com o conhecimento dos mecanismos moleculares que regulam características agronômicas importantes, tem sido possível definir estratégias adicionais para o melhoramento de plantas por meio da introdução e integração estável de genes heterólogos nas células vegetais. A manipulação genética dos vegetais, além de valorizar e aprimorar a qualidade nutricional dos alimentos, permite que os cultivos sejam adaptados a diferentes tipos de estresses ambientais, sejam eles bióticos ou abióticos.

Atualmente, a produção de plantas geneticamente modificadas ocupa um lugar de destaque tanto na pesquisa vegetal básica quanto na aplicada. A área plantada com cultivares transgênicos aumentou de 1,7 para 67,7 milhões de hectares entre 1996 e 2003.

Culturas geneticamente modificadas são geradas através de um processo conhecido como engenharia genética. Genes de interesse comercial são transferidos de um organismo para outro. Os métodos mais utilizados atualmente para a introdução de transgenes no genoma de plantas são a *Agrobacterium* e a biobalística. O primeiro envolve uma bactéria na transferência do DNA para a planta, a *Agrobacterium*. Cientistas aproveitaram a habilidade natural da *Agrobacterium* de transferir alguns de seus genes para células de plantas, causando a doença conhecida como galha da coroa, e substituíram esses genes por outros que carregam características de interesse agrônomicos. Assim, a *Agrobacterium* passou a ser um instrumento para transferir genes de interesse agrônomico para plantas (Figura 1). Entretanto, a *Agrobacterium* não é capaz de infectar todas as plantas; em consequência disso, novos sistemas de transferência direta de genes para plantas, tentando substituir o uso da *Agrobacterium*, surgiram. A biobalística é um sistema de transferência direta de genes que envolve um instrumento conhecido como "gene gun" ou canhão gênico. O DNA a ser introduzido nas células vegetais é fisicamente aderido a pequenas partículas metálicas. Essas partículas são projetadas contra as células vegetais, utilizando o canhão gênico. Parte do DNA que consegue penetrar nas células é integrado ao genoma da planta (Figura 2).

Nesta circular técnica, é descrito o método de produção de plantas transgênicas de milho, via biobalística, utilizado pela Embrapa Milho e Sorgo. Os temas abordados incluem todas as etapas, que vão da preparação do tecido vegetal para o bombardeamento de partículas à detecção do DNA heterólogo integrado na planta transgênica.

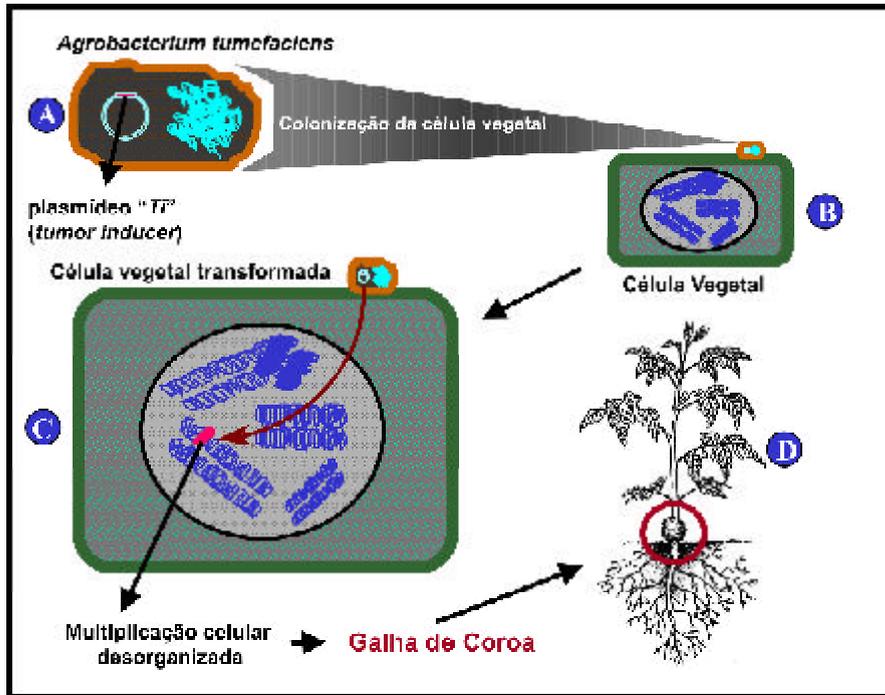


Figura 1. Transformação genética de plantas mediada por *Agrobacterium*. Durante o processo de indução de tumor por *Agrobacterium*, o T-DNA é introduzido na célula vegetal e integra-se ao cromossoma da planta. A) *Agrobacterium tumefaciens* e seu plasmídeo Ti; B) *A. tumefaciens* infecta células vegetais; C) A agrobacteria transfere o T-DNA presente no seu plasmídeo Ti para a célula vegetal; D) Multiplicação desordenada das células transformadas e formação do tumor conhecido como "galha da coroa".

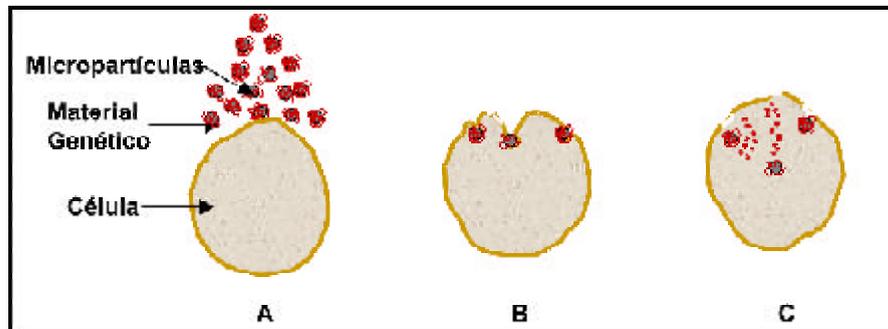


Figura 2. Teoria da Biobalística. A) Célula vegetal antes do impacto das micropartículas revestidas com o DNA de "interesse"; B) Durante o impacto; C) Liberação do DNA das micropartículas dentro das células bombardeadas.

Bombardeamento de Partículas ou Biobalística

O bombardeamento de partículas é uma técnica através da qual micropartículas ou microprojéteis de metal são cobertos com DNA e acelerados a velocidades suficientes para penetrar no interior de células. As micropartículas são bastante pequenas (0,5 – 5 μ m) para entrar na célula da planta, sem causar muito dano, carregando uma quantidade apropriada de DNA. Dessa maneira, o DNA de interesse pode ser transportado para o interior das células, onde ele se desprende da micropartícula, podendo integrar-se ao genoma.

O canhão gênico utiliza uma membrana macrocarreadora, a qual suporta ou carrega as micropartículas cobertas com DNA. O complexo membrana macrocarreadora e as micropartículas é acelerado em direção ao tecido alvo. A membrana macrocarreadora é retida por uma tela antes que ela colida com o alvo; entretanto as micropartículas continuam acelera-

das em direção aos explantes vegetais. O processo de aceleração das partículas e o bombardeamento dos tecidos vegetais ocorre dentro de uma câmara de vácuo, que reduz o arraste das micropartículas pelo ar. Parâmetros como a intensidade da explosão, distância que as partículas precisam percorrer, o uso de diferentes partículas e a intensidade do vácuo são avaliados, para garantir uma penetração ótima das micropartículas no tecido alvo (Figuras 3 e 4).

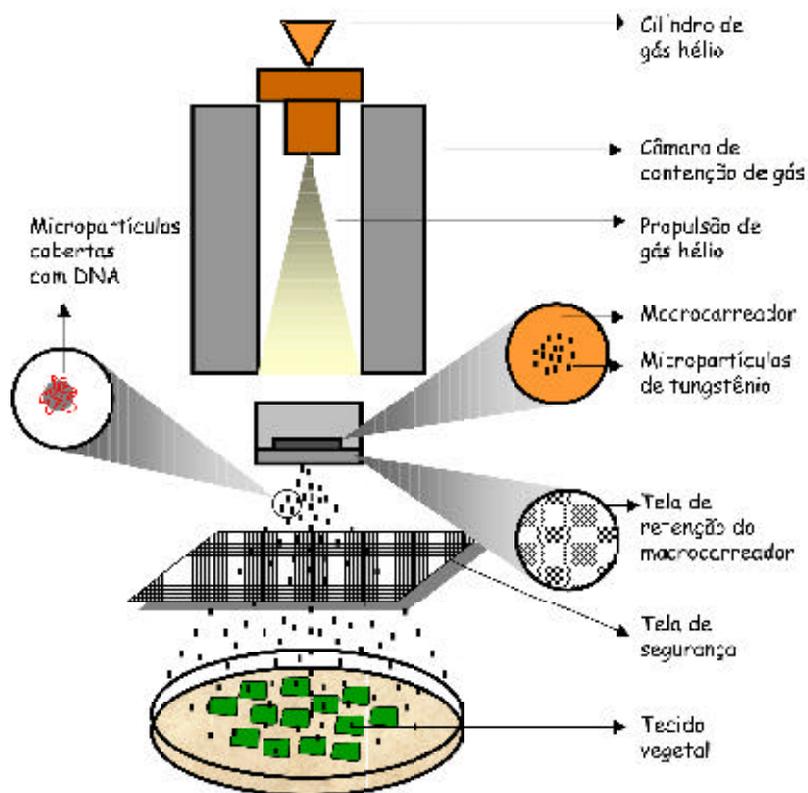


Figura 3. Esquema do processo de transferência direta de genes através da biobalística.

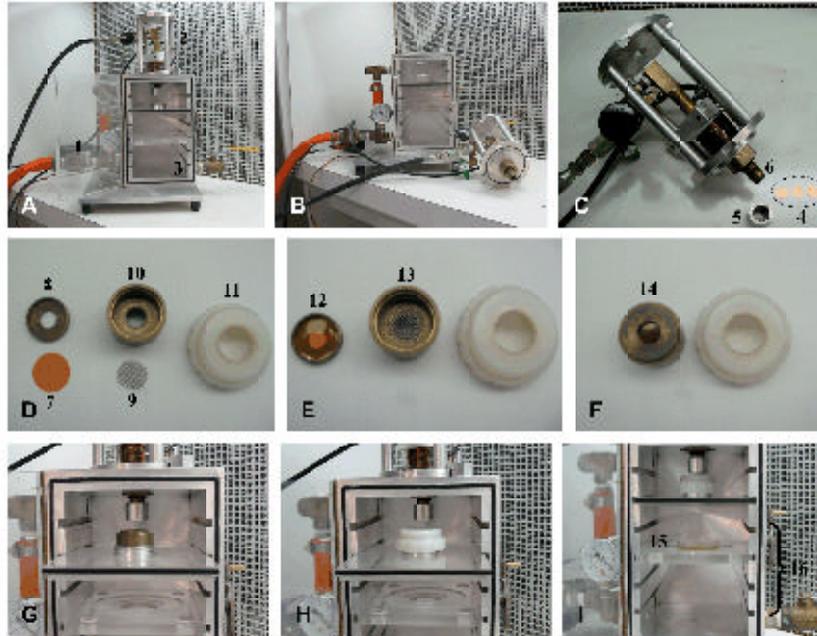


Figura 4. Gene gun utilizado para a transferência direta de genes (equipamento construído na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia). **A:** vista geral do aparelho de bombardeamento de partículas - 1) controles do vácuo; 2) câmara para contenção de gás hélio e controles para sua liberação; 3) câmara de vácuo; **B:** vista geral da câmara de contenção do gás hélio e da câmara de vácuo; **C:** detalhamento da câmara de contenção do gás hélio - 4) membranas de ruptura; 5) suporte das membranas de ruptura; 6) encaixe do suporte das membranas de ruptura dentro da câmara de gás hélio; **D:** detalhe do suporte das micropartículas - 7) membrana macrocarreadora; 8) suporte para a membrana macrocarreadora; 9) tela de retenção da membrana macrocarreadora; 10) suporte da tela de retenção; 11) dispositivo que mantém todo o conjunto unido dentro da câmara de vácuo; **E, F, G e H:** montagem das peças mostradas em D, dentro da câmara de vácuo; **I:** colocação dos explantes dentro da câmara de vácuo para o bombardeamento de partículas; 15) explantes dentro de uma placa de Petri; 16) Diferentes distâncias que os explantes podem ser posicionados relativos à posição das micropartículas cobertas com DNA.

Na maioria dos equipamentos, a fonte primária de energia para a propulsão das partículas é um gás de rápida expansão, como, por exemplo, o hélio. A pressão de hélio é continuamente mantida dentro de um reservatório e liberada usando "discos de ruptura", que são membranas fabricadas para romperem a pressões pré-determinadas. A liberação do hélio produz uma onda de choque em direção à membrana macrocarreadora que está segurando as micropartículas cobertas com DNA.

Fatores que afetam a Transformação Genética Mediada pelo Bombardeamento de Partículas

O processo de biobalística requer o desenvolvimento e a otimização de numerosas variáveis. As etapas básicas ou parâmetros que precisam ser consideradas durante a aplicação dessa técnica são: 1) construção gênica; 2) parâmetros físicos relacionados ao aparelho a ser utilizado; 3) parâmetros relacionados aos microprojéteis; 4) requerimentos biológicos da cultura de tecidos.

1. Construção Gênica

O material genético que será utilizado no bombardeamento necessita ser clonado em um vetor, amplificado e purificado de maneira cuidadosa, para render DNA concentrado de alta qualidade. Na construção gênica, é necessário ter um gene "de interesse" (resistência a estresses bióticos, abióticos, qualidade nutricional, etc.), acoplado a um promotor que controle sua expressão temporal e espacial. Além do gene "de interesse", os vetores plasmidiais podem ter genes repórteres e genes de seleção (Figura 5).

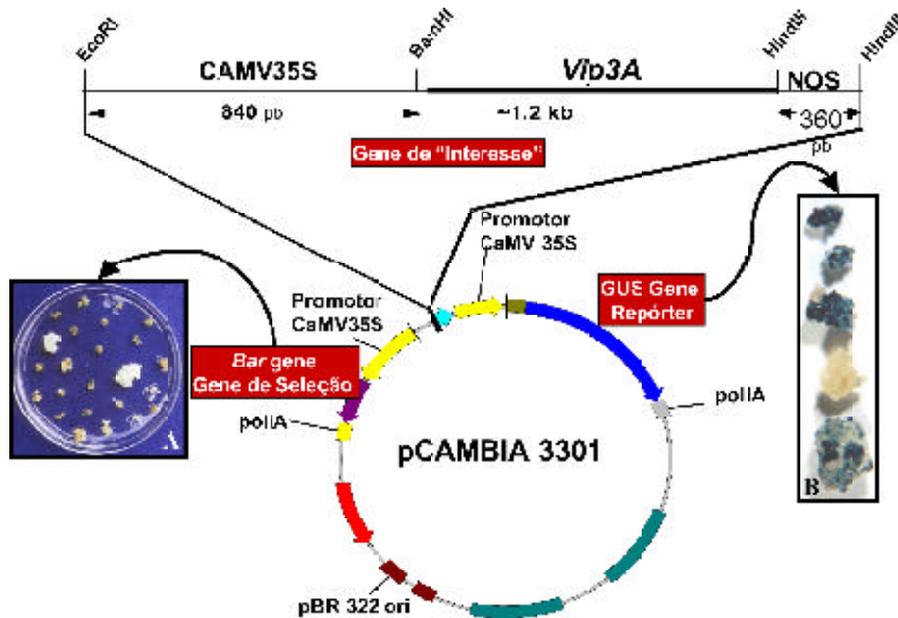


Figura 5. Vetor pCAMBIA 3301. Exemplo de DNA plasmidial utilizado para transformação vegetal por biobalística. O gene de "Interesse" é representado aqui pelo *Vip3A*, capaz de controlar a *Spodoptera frugiperda* em plantas de milho transgênicas. Note-se a presença do promotor *CaMV35S* direcionando a síntese do gene e o terminador *NOS*. O gene de seleção utilizado foi a fosfinotricina acetiltransferase (*bar*), o qual confere resistência ao herbicida fosfinotricina (ingrediente ativo do herbicida FINALE - Agrevo); o gene repórter presente nesse cassete gênico é o *GUS* (b-glucuronidase). Esse gene é utilizado na otimização dos protocolos de transformação genética de plantas. Na foto podem ser vistos calos com coloração azul, expressando o gene repórter *GUS*. A) calos bombardeados e subcultivados em meio de cultura contendo o herbicida FINALE; observe-se a presença de dois calos se desenvolvendo, enquanto que os demais estão mortos. B) calos bombardeados expressando a enzima b-glucuronidase, a qual confere coloração azul ao tecido transgênico. *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*: enzimas de restrição.

Genes repórteres são aqueles que codificam para proteínas não tóxicas, as quais são facilmente detectáveis em tecidos vegetais transgênicos e que não são produzidas normalmente nas plantas (Tabela 1). Na presença de genes repórteres, uma rápida avaliação de protocolos de transformação pode ser conduzida. Entre 24 e 48 horas depois da introdução do gene repórter na célula, sua expressão pode ser avaliada. Esse tipo de expressão é conhecido como transiente ao contrário de integração estável (Figura 6). Os genes repórteres são muito utilizados em estudos de regulação e função gênica.

Tabela 1. Genes repórteres utilizados em transformação genética de plantas.

Genes Repórteres	Proteína	Comentários
CAT	chloramphenicol acetil transferase	<ul style="list-style-type: none">• um dos primeiros repórteres• análise difícil e envolve radioatividade
GUS	β -glucuronidase	<ul style="list-style-type: none">• avaliação rápida e fácil por métodos histoquímicos e fluorométricos
LUC	luciferase	<ul style="list-style-type: none">• um dos métodos mais sensíveis para medir a atividade de um gene• uso limitado, por causa do preço do equipamento utilizado para medir quantitativamente
R gene	antocianina	<ul style="list-style-type: none">• não requer substratos externos
GFP	proteína verde fluorescente	<ul style="list-style-type: none">• permite a avaliação in vivo do transgene

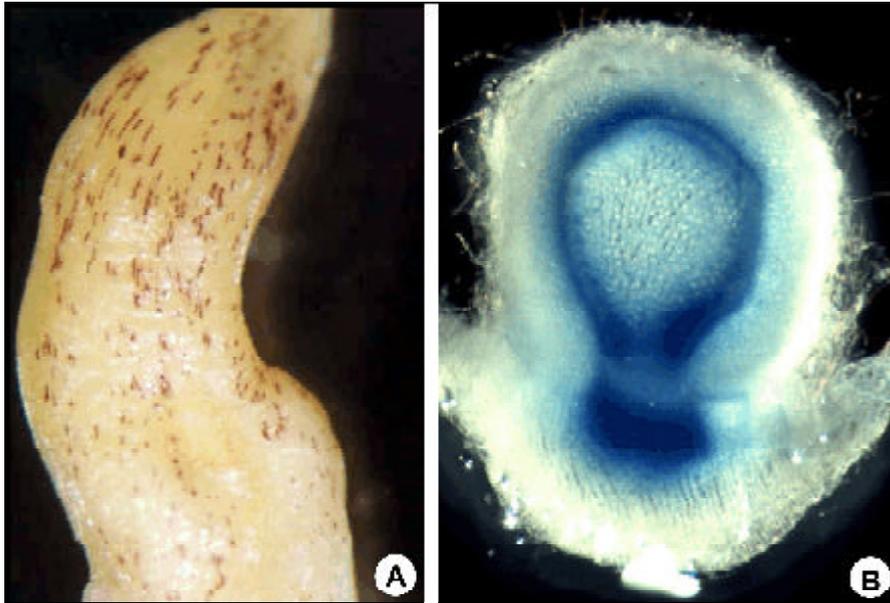


Figura 6. Genes repórteres. A) cotilédone de milho expressando, transientemente, o gene repórter da antocianina sob o controle do promotor constitutivo da ubiquitina (pequenos traços vermelhos); B) caule de tabaco expressando, de maneira estável, o gene repórter GUS (coloração azul) sob o controle do promotor PP2, específico de floema.

Os genes de seleção permitem o crescimento das células transformadas em presença do agente seletivo. Depois da transformação, as células transgênicas estão em número muito reduzido, quando comparadas com as não transgênicas, sendo necessária uma metodologia de seleção para proporcionar o crescimento preferencial das células transformadas. Normalmente, genes de seleção codificam para proteínas que conferem às células transformadas resistência a um determinado substrato (herbicidas, antibióticos, etc.) (Tabela 2).

Tabela 2. Genes de seleção utilizados na transformação genética de plantas.

Gene de Resistência	Proteína / Origem	Local de ação	Agente de seleção	Mecanismo de resistência
cpbA	Neomicina fosfotransferase / Transposon T-DNA de <i>C. coli</i>	Síntese citoplásmica	Carbamicinas Neomicina / Gentamicina	Fosforilação do agente seletivo
hpt	Hipromicina fosfotransferase / <i>E. coli</i>	Síntese citoplásmica	Hipromicina	Fosforilação do agente seletivo
sur1-Hra sur1 ⁺	Forma mutante da acetiltransferase (AAS) ou do do acetiltransferase (AAS) / Genes foram isolados de: sur1-Hra – tabaco sur1 ⁺ – <i>Arabidopsis</i>	Síntese de aminoácidos	Herbicidas sulfonilamidas como, por exemplo, o chlorsulfuron	Modificação da enzima alvo
pro1	Forma mutante da enzima 6-aminocaproil-β-glucosidase (PAC) / <i>Salmonella typhimurium</i>	Síntese de aminoácidos	Herbicida glifosato, roundup	Modificação ou amplificação da enzima alvo
bar ⁺	Fosforotransferase acetil (PAT) / <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Síntese de aminoácidos	Herbicida fosiflotion (PPT) xisto	Acetilação do agente seletivo
psbA	Qn / Atrazina resistente <i>Amaranthus hybridus</i>	foliar síntese	Herbicida atrazina	Modificação da enzima alvo
lpx	Mutase / <i>Klebsiella pneumoniae</i>	foliar síntese	Herbicida bifenoximil	Degradação do agente seletivo
dhfr	Dihidrofolato redutase (DHFR) / etc.	Elas síntese de nucleotídeos	Metilglaxato	Modificação da enzima alvo
manA	fosforomannose isomerase / <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Elas síntese de carboidratos	Mentose	Transformação da manose, carboidrato não utilizável pela planta, em fucose, carboidrato utilizável.

2. Parâmetros Físicos Relacionados ao Aparelho a Ser Utilizado

Para uma penetração celular bem sucedida, o complexo micropartícula/DNA precisa ser transportado para dentro do tecido-alvo sem causar injúrias excessivas ou estresses às células-alvo. O grau de penetração requerido depende do tipo de tecido vegetal que será transformado. Variações na pressão de hélio, o nível do vácuo gerado, o tamanho e o tipo das partículas utilizadas e a posição do tecido-alvo abaixo da tela de retenção dentro da câmara de bombardeamento irão determinar o poder de penetração com o qual o microprojétil atingirá o tecido-alvo. Os parâmetros físicos estudados durante a otimização de um protocolo de bombardeamento de partículas são:

- I. Vácuo – A quantidade de ar na câmara de bombardeamento precisa ser reduzida. O nível de vácuo deve ser otimizado para cada sistema, de modo que não ocorram danos às células que serão bombardeadas. Ar residual presente na câmara de bombardeamento desacelera os microprojéteis rapidamente.
- II. Membranas tipo peneiras – Quando colocadas sobre as placas contendo o material vegetal a ser bombardeado, essas membranas ajudam a minimizar o choque causado pela movimentação do gás hélio dentro da câmara de bombardeamento, durante a aceleração das partículas.
- III. Velocidade – A velocidade de propulsão das micropartículas cobertas com DNA pode ser afetada pela: a) pressão do gás hélio; b) distância da fonte de energia até o macrocarreador; c) distância percorrida pelo macrocarreador; d) distância do local de lançamento dos microprojéteis até o alvo biológico ou explantes.

Esses fatores interagem entre si e experimentos devem ser conduzidos para testar as melhores combinações entre eles que resultem em índices ótimos de transformação.

3. Parâmetros Relacionados aos Microprojéteis

O tipo e o tamanho da micropartícula são características importantes, uma vez que determinarão a sua profundidade de penetração e aceleração. As micropartículas mais utilizadas em bombardeamento são de tungstênio ou de ouro. Ambas possuem vantagens e desvantagens de utilização.

As micropartículas de tungstênio podem ser obtidas de vários tamanhos (0,5 a 2,0 mm) e são extremamente irregulares. O tungstênio é um material barato e mais fácil de ser coberto com DNA. Entretanto, o tungstênio pode ser tóxico para algumas células, sua superfície é sujeita a reações de oxidação, o que pode degradar o DNA com o tempo.

As partículas de ouro são mais redondas e uniformes do que as de tungstênio. Uma grande vantagem dessa partícula é que ela é biologicamente inerte, não é tóxica para nenhuma célula, não destruindo o DNA com o tempo. O alto preço das micropartículas de ouro e a maior dificuldade de precipitação do DNA sobre elas são suas desvantagens.

4. Parâmetros Biológicos

- I. Tecido vegetal - A escolha do tecido vegetal que será utilizado para a geração de plantas transgênicas pode ter um efeito significativo na frequência e no sucesso dos eventos de transformação e especialmente no número de plantas recuperadas. Explantes utilizados para o bombardeamento de partículas e recuperação de plantas transgênicas devem ser capazes de receber e

integrar o DNA, passar por um processo de seleção para recuperação de células transgênicas e regenerar plantas férteis e fenotipicamente normais. Por causa da baixa frequência de células transformadas após o bombardeamento de partículas (~ 0,01%), a eficiência do processo de regeneração do tecido-alvo precisa ser alta, para a obtenção de plantas transgênicas. Uma grande variedade de tecidos de vegetais tem sido utilizadas como alvo para o bombardeamento de partículas. Tecidos embriogênicos e meristemáticos são os mais empregados na produção e recuperação de plantas transgênicas. Tais culturas consistem de tecidos que estão rapidamente proliferando onde uma grande quantidade de células totipotentes estão disponíveis para serem bombardeadas. As condições exatas requeridas na cultura de tecidos para gerar tecidos embriogênicos e meristemáticos de alta qualidade variam entre espécies e até mesmo entre genótipos dentro de uma mesma espécie e precisam ser empiricamente determinadas. Enquanto algumas cultivares dentro de uma espécie respondem muito bem às técnicas de cultura de tecidos e produzem tecidos de alta qualidade para a integração do transgene, a maioria permanece difícil de manipular. A escolha do tecido-alvo apropriado e o estado fisiológico do material vegetal, antes e após o bombardeamento, são críticos para a regeneração de transformantes estáveis. Portanto, o desenvolvimento de protocolos para a obtenção de tecidos totipotentes, através de cultura de tecidos, é um dos componentes centrais dos programas de transformação genética de plantas (Figura 7).

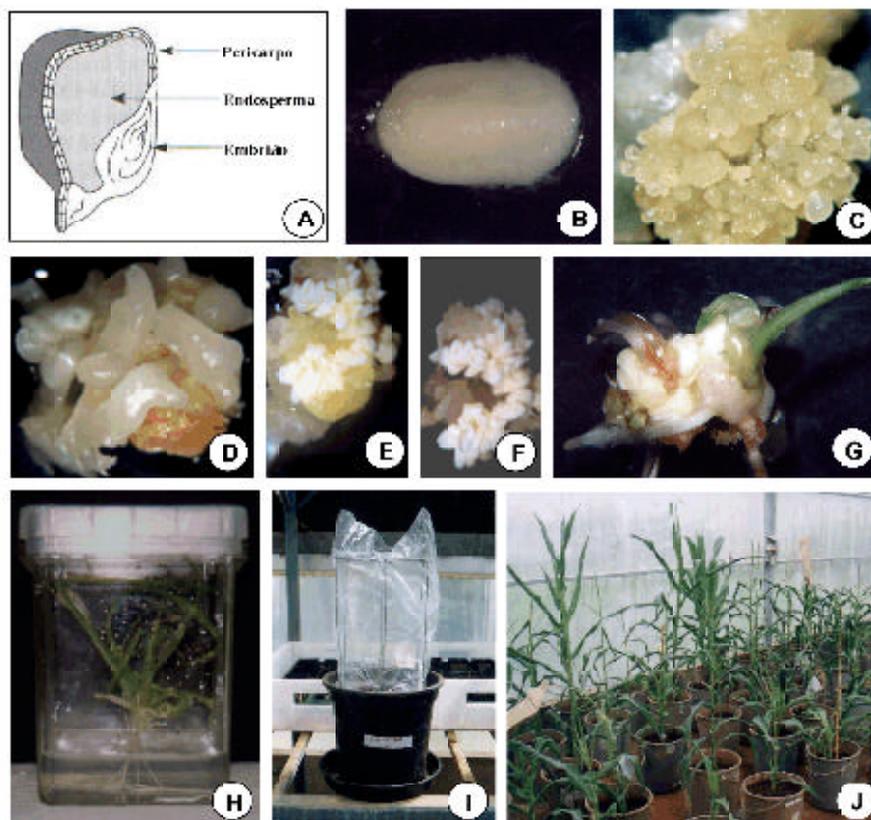


Figura 7. Formação de calos embriogênicos e regeneração de plantas de milho em cultura de tecido. A) grão do Milho; B) embrião imaturo de milho com 2 mm; (C e D) embriões imaturos após três semanas em meio de cultura CI; (E e F) calos embriogênicos maduros, regiões branco-opacas; G) germinação de embriões transgênicos; H) regeneração de plantas em frascos magentas; I) plantas sendo aclimatadas; J) plantas em casa-de-vegetação.

- II. Concentração osmótica – Um tratamento que influencia a expressão de genes introduzidos é o condicionamento osmótico, que pode ser feito antes e após o bombardeamento do material vegetal. A adição de um agente que aumente a osmolaridade do meio de cultivo durante o bombardeamento pode aumentar as taxas de transformação. O aumento da concentração osmótica atua causando plasmólise das células, o que diminui a perda de protoplasma em células que são penetradas pelas partículas. Tem-se utilizado manitol, sorbitol, rafinose e sacarose (~ 0,4 M) para o aumento da concentração osmótica do meio. Alguns autores utilizam a secagem parcial dos tecidos vegetais em capela de fluxo laminar antes do bombardeamento (Figura 8).



Figura 8. Tratamento osmótico dos explantes antes do bombardeamento. Linha superior: embriões imaturos de milho foram subcultivados, durante quatro horas, antes do bombardeamento, em meio osmótico contendo 12% de sacarose; Linha inferior: embriões imaturos bombardeados sem serem cultivados em meio osmótico. As marcas azuis representam a expressão transiente do gene repórter GUS.

Exemplo de um Protocolo Experimental de Biobalística

Durante a otimização do processo de biobalística, cada sistema celular requer condições especiais. Para diferentes plantas, os parâmetros para o bombardeamento de partículas são testados utilizando genes repórteres presentes nas construções plasmidiais. Uma vez que alguns parâmetros interagem entre si (ex: quantidade de partículas, distância percorrida pelo micro e macrocarreadores, etc.), é aconselhável utilizar experimentos fatoriais. A Figura 9 mostra um fluxograma das etapas gerais que devem ser seguidas para a otimização de um protocolo de transformação genética de plantas.

Transformação Genética de Milho Via Biobalística

Como exemplo da tecnologia da biobalística, a seguir é apresentado o protocolo de transformação genética da linhagem de milho A188, utilizado no laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos da Embrapa Milho e Sorgo. Iniciamos com a produção dos calos embriogênicos de milho que serão bombardeados, seguida da precipitação do DNA sobre as micropartículas de tungstênio, e continuamos até o processo de seleção e caracterização inicial das plantas transgênicas.

Cultura de Tecido de Milho – Produção de calos embriogênicos de milho A188 e regeneração de plantas

Apesar da regeneração de plantas de milho poder ser realizada, teoricamente, em qualquer genótipo, bastando para isso ajustar as condições de cultivo, alguns tipos de cultura, como, por exemplo, a de calos do Tipo II, são bastante dependentes do genótipo. Um genótipo que apresenta excelente performance em cultura de tecidos é a linhagem de clima temperado A188.

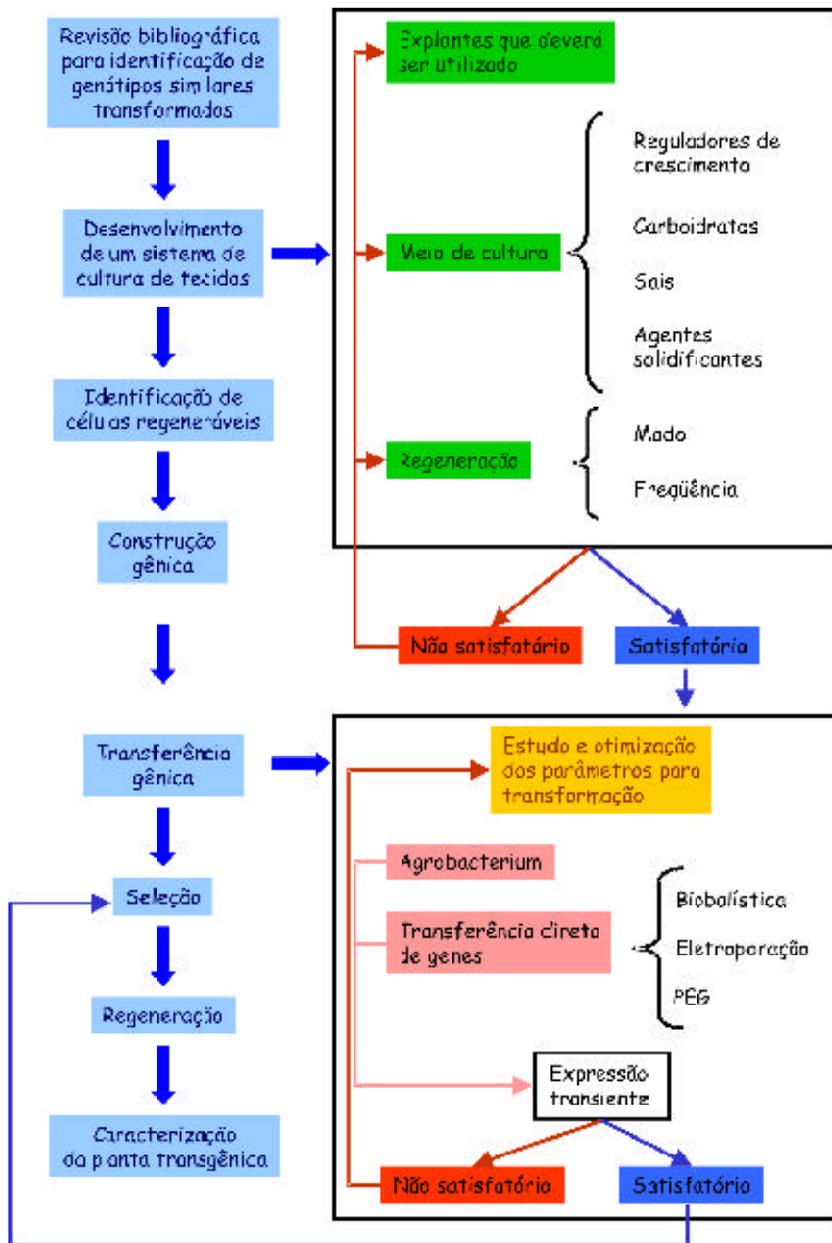
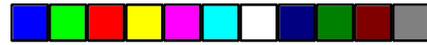


Figura 9. Etapas que precisam ser consideradas durante o desenvolvimento de um protocolo de transformação genética de plantas.



O desenvolvimento de plantas de milho em cultura de tecido é muito dependente das condições de cultivo da planta doadora. Plantas mais vigorosas produzem explantes com melhor resposta *in vitro*. Na Embrapa Milho e Sorgo, utilizam-se como explante embriões imaturos, os quais são coletados entre 1,0 e 1,5 mm de comprimento, o que normalmente ocorre entre 10 e 12 dias após a polinização, podendo chegar a 20 dias durante períodos mais frios.

Para a esterilização, as espigas despalhadas são colocadas em um béquer dentro de uma câmara de fluxo laminar e imersas por 25 minutos em uma solução contendo 50% de hipoclorito de sódio comercial (água sanitária 5,47%) e, 0,01% de Tween 20. Após a esterilização, as espigas são lavadas quatro vezes por cinco minutos cada, com água destilada e autoclavada.

Para a coleta e plaqueamento dos embriões imaturos, uma pinça ou espátula é inserida na base da espiga, facilitando o seu manuseio (Figura 10). A espiga é colocada sobre uma placa de Petri e, com o auxílio de um bisturi, uma camada de 1 a 2 mm das pontas de algumas fileiras de grãos é cortada, para expor o endosperma e facilitar a retirada do embrião. Os embriões são retirados com uma espátula de ponta fina e cultivados com o eixo embrionário em contato com o meio de cultura. São colocados de 25 a 30 embriões em cada placa contendo meio de cultivo CI (Tabela 3) e as placas são seladas com parafilm ou filme de PVC, incubadas em câmara de crescimento, no escuro, a 26-28°C, por duas semanas. Os calos devem ser subcultivados, para placas com meio fresco, a cada 15 dias, por dois a três meses. A cada subcultivo, são selecionados apenas os setores com a aparência de calos embriogênicos do Tipo II (altamente friáveis, e de crescimento rápido) (Figura 11). A percentagem de calos do Tipo II formados varia de genótipo para genótipo. Para o bombardeamento

de partículas, são utilizados calos com sete dias após o subcultivo.

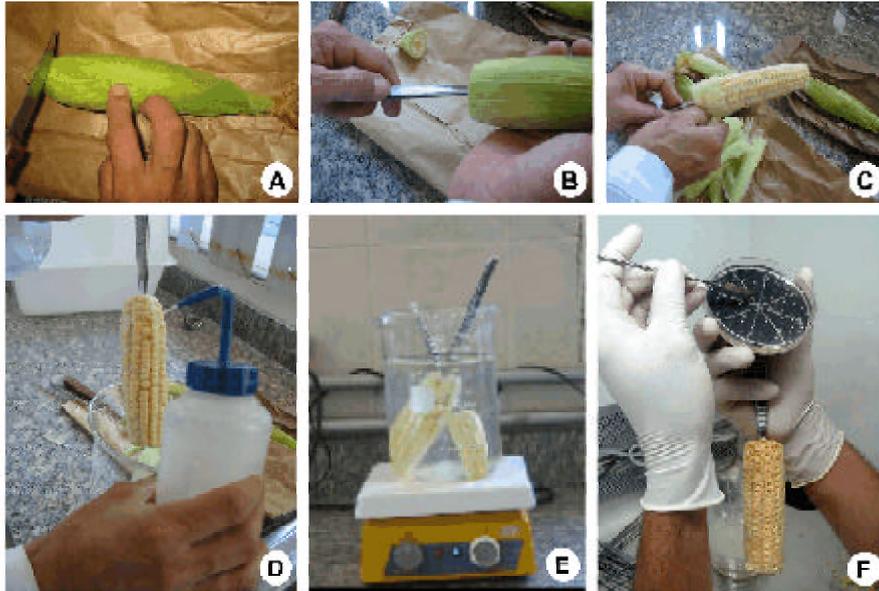


Figura 10. Plaqueamento de embriões imaturos em meio de cultivo. A) Remoção das extremidades de uma espiga de milho, coletada aproximadamente duas semanas após a polinização; B) inserção de uma pinça na extremidade posterior da espiga para facilitar o manejo; C) espiga de milho sendo despalhada; D) etanol 70% é utilizada para um enxágüe inicial; E) espigas são imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial 50%, sob agitação constante; F) embriões imaturos são coletados, em ambiente estéril, e plaqueados em meio de cultivo.

Tabela 3. Composição dos meios de cultivo usados para a cultura de tecido de milho

Composição	Constituinte mg/l	Meio CI mg/l	Meio SM mg/l	Meio RM mg/l	Meio ½ MS mg/l
Sais	¹ N6	4 000	4 000	0	0
	² MS	0	0	4 300	2 150
Regulador de Crescimento	³ 2,4 D	2	2	0	0
	⁴ ANA	0	0	0,25	0
Vitaminas	Myo-Inositol	100	100	100	100
	Ácido nicotínico	0,5	0,5	0,5	1,0
	Piridoxina HCl	0,5	0,5	0,5	10,0
	Liamina HCl	1	1	0,1	1
Suplementos	Glicina	2	2	2	0
	Prolina	2 900	0	0	0
	Sacarose	30 000	30 000	30 000	15 000
	Caseína	100	0	0	0
	⁵ Phylagel	2 500	2 500	2 500	2 500
	AgNO ₃	1,7	0,85	0	0

¹Mistura basal de sais com macro e micronutrientes, de acordo com Chu (1975 e 78). Sigma C1416.

²Mistura basal de sais com macro e micronutrientes, de acordo com Murashige and Skoog, (1962). Sigma M5524.

³Ácido 2,4 diclorofenoxiacético Sigma D84072.

⁴Ácido naftalenoacético. Sigma N0640.

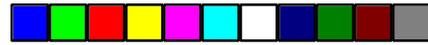
⁵Agente geleificante. Sigma



Figura 11. Calo embriogênico friável da linhagem de milho A188.

Para a regeneração dos calos embriogênicos, estes são subcultivados em meio RM e incubados a 25° C, no escuro. O objetivo do meio RM é forçar o amadurecimento dos embriões somáticos, através da redução da temperatura de cultivo (de 28 para 25° C) e do aumento do potencial osmótico do meio (60 g/l de sacarose e 0,3% de Gelrite) (Figura 7 E e F).

Após duas a três semanas, os embriões somáticos maduros, de coloração branca opaca, devem ser subcultivados em meio MS e colocados em presença de luz, a 25° C, para germinação. Quando as raízes estiverem bem desenvolvidas, as plântulas são transplantadas para vasos contendo uma mistura de solo e matéria orgânica. Na Embrapa Milho e Sorgo, utiliza-se uma mistura de solo e matéria orgânica (TDP 30/15) produzida pela Terra do Paraíso, (Holambra, São Paulo). Cada vaso deve ser



coberto com uma sacola de plástico transparente e, em seguida, transferido para casa-de-vegetação. Os vasos devem ser irrigados abundantemente antes do transplante e, durante os dois primeiros dias, é conveniente que o prato abaixo do vaso esteja cheio de água, a fim de aumentar a umidade relativa do ambiente e garantir o fornecimento de água para a planta. Nos dias seguintes, devem ser feitos pequenos furos nas extremidades da sacola, para reduzir a umidade. Esses furos devem ser aumentados gradativamente para que, ao final de uma semana, a sacola possa ser retirada. A irrigação deve ser feita individualmente, de acordo com a necessidade de cada vaso, tomando-se o cuidado de só voltar a irrigar quando realmente houver necessidade, de modo a favorecer o crescimento das raízes e evitar a proliferação de fungos.

Transformação de Calos Embriogênicos de Milho Utilizando a Biobalística

DNA purificado é precipitado sobre as micropartículas pela adição de etanol e CaCl_2 . Por ser um processo que ocorre muito rapidamente, a precipitação do DNA sobre as micropartículas é uma das etapas mais críticas do bombardeamento, portanto, uma fonte de grande variação da eficiência de transformação. O padrão de precipitação do DNA sobre as partículas é diferente a cada experimento, devido à dificuldade de manter o tungstênio em suspensão. Pequenas variações podem ocorrer entre os diferentes protocolos para precipitação do DNA nas micropartículas de tungstênio. O protocolo de preparação das micropartículas, descrito a seguir, é para ser utilizado com o aparelho mostrado na Figura 4.

Precipitação do DNA sob as micropartículas

1. Pesar, dentro de um microtubo, 60 mg de micropartículas de tungstênio M10 e acrescentar 1,0 ml de etanol 70%. Misturar vigorosamente e manter em agitador vortex (agitação lenta) durante 20 minutos.
2. Centrifugar a 14.000 rpm durante cinco minutos.
3. Remover e descartar o sobrenadante, com o auxílio de uma micropipeta de 1000 µl., tendo o cuidado de evitar o distúrbio do sedimento de micropartículas.
4. Adicionar 1,0 ml de água milli-Q estéril, misturar vigorosamente em agitador e centrifugar a 14.000 rpm durante cinco minutos. Descartar o sobrenadante e repetir a operação de lavagem mais duas vezes.
5. Após a última lavagem, descartar o sobrenadante e ressuspender as micropartículas em 1,0 ml de glicerol estéril 50% (v/v).
6. Aliquotar, sob agitação constante, 50 µmL das partículas em microtubos Eppendorf. Armazenar a - 20°C e utilizar dentro de três a quatro semanas.
7. Aproximadamente quatro horas antes do bombardeamento, colocar os explantes a serem bombardeados no centro (circunferência de 30 mm de diâmetro) de placas de 60 x 15 mm, contendo meio de cultura com alto potencial osmótico. Para o genótipo de milho A188, usa-se o meio CI osmótico contendo 12% de sacarose.
 - Antes de começar a precipitação, é recomendável colocar os suportes de metal das membranas para secar sobre papel toalha autoclavado.
 - Cada microtubo de precipitação é suficiente para seis tiros.

- Recomenda-se ligar o ar condicionado da sala de bombardeamento pelo menos duas horas antes do início da precipitação, para que a umidade relativa do ar seja reduzida.
8. Transferir uma alíquota de 50 μ ml da suspensão de micropartículas para um tubo de microcentrifuga. Antes de retirar a alíquota, homogeneizar bem o microtubo contendo as micropartículas. A partir desse ponto, durante todo o processo de precipitação do DNA sobre as micropartículas, usar sempre o vortex (agitação lenta). Todo o processo precisa ser conduzido sob condições assépticas.
 9. Adicionar 5 μ ml de DNA plasmidial purificado (estoque 1mg / ml). Para purificar o DNA plasmidial, utiliza-se uma precipitação em gradiente de CsCl (Sambrook et al., 1998).
 10. Acrescentar 50 μ ml de CaCl_2 2,5 M.
 11. Acrescentar 20 μ ml de espermidina 0,1 M (Descartar os tubos de espermidina após o uso).
 12. Lavar o pellet com 150 μ ml de ethanol 70%, tendo o cuidado de não ressuspender o pellet. Repetir a lavagem com ethanol absoluto duas vezes.
 13. Incubar à temperatura ambiente, sob constante agitação, durante três minutos.
 14. Incubar à temperatura ambiente, sem agitação, por mais três minutos.
 15. Centrifugar durante cinco segundos a 5.000 rpm. Evitar uma centrifugação mais drástica, para não aglomerar excessivamente as micropartículas; isto prejudica a ressuspensão do pellet no final da precipitação. Remover o sobrenadante cuidadosamente.

16. Acrescentar 60 μ ml de etanol absoluto. Homogeneizar vigorosamente até ressuspender o precipitado. Esta etapa não deve passar de 30 a 60 segundos, se a precipitação do DNA foi bem sucedida.
17. Distribuir alíquotas de 7 μ ml na região central de cada membrana.
18. Bombardear os explantes de interesse dentro de duas horas, de acordo com as instruções do aparelho de biobalística disponível no seu laboratório.

Seleção de Plantas Transgênicas de Milho Após o Bombardeamento

- 1) Durante o processo de otimização da transformação genética, são utilizados vetores que, além do "gene de interesse", tenham um gene marcador de seleção e um gene repórter (GUS). Como regra geral para avaliação do experimento, 24 a 72 horas após o bombardeamento, alguns explantes podem ser retirados aleatoriamente, para serem analisados através do ensaio histoquímico do gene repórter GUS (Anexo I).
- 2) Após o bombardeamento, os explantes são transferidos do meio CI osmótico para o meio CI, por 14 dias, em câmara escura, a 27°C.
- 3) A seleção inicia-se na terceira semana, quando os explantes são transferidos para meio SM suplementado com 3 mg/L de glufosinato de amônia (herbicida Finale). O meio de seleção não contém prolina e casaminoácidos, pois esses ingredientes interferem com o processo de seleção por glifosinato de amônio. Os explantes são, então, mantidos em câmara escura a 27°C.

- 4) Durante a quinta semana, os explantes são transferidos para SM suplementado com 9 mg/L de glufosinato de amônia e mantidos por mais duas semanas em câmara escura, a 27°C.
- 5) Entre a oitava e a décima semana, os calos que sobreviveram ao processo de seleção são transferidos para o meio de maturação RM, suplementado com 6 mg/L de glufosinato de amônia, e mantidos por duas a três semanas em câmara escura, a 25°C.
- 6) Durante esse período, embriões somáticos, que normalmente apresentam aspecto brilhante e translúcido, passam a apresentar aspecto opaco e coloração branco-leitosa (Figura 7 E e F). O aparecimento dessas estruturas opacas é um indicativo de que os embriões estão prontos para a germinação. Os calos são, então, transferidos para magentas contendo $\frac{1}{2}$ da concentração do meio MS suplementado com 3 mg/L de glufosinato de amônia e mantidos em luz, a 27°C, para germinação.
- 7) Plantas entre 3 e 5 cm de altura, que se desenvolveram, são transferidas para o solo, em casa de vegetação. Durante os três primeiros dias de aclimação, as plantas são mantidas sob uma cobertura de plástico, para manutenção da umidade. Nos dias seguintes, sucessivos furos são feitos no plástico, até a exposição total das plantas ao ambiente.
- 8) Southern blot análises do DNA isolado das plantas são feitas, para confirmar a transformação (Figura 12).

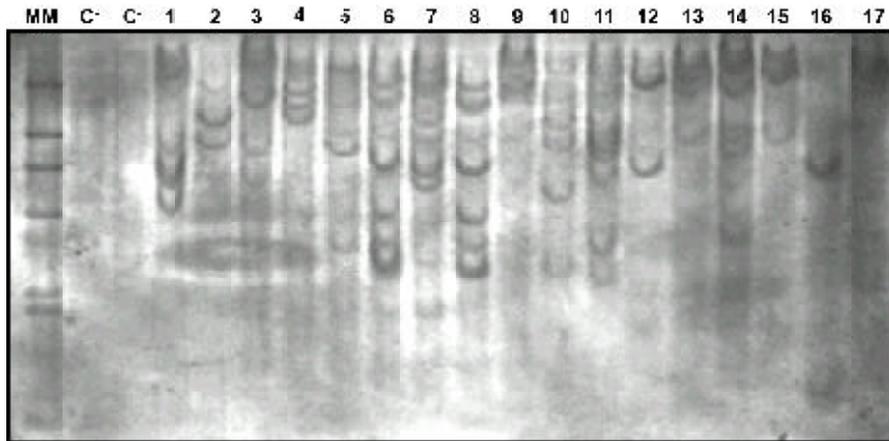
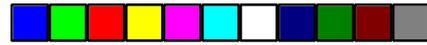


Figura 12. Southern Blot do DNA genômico de plantas de milho transgênicas. MM: marcador de peso molecular; C: plantas de milho regeneradas em cultura de tecido, mas não transformadas (controle negativo); canaletas de 1 a 17: plantas transgênicas de milho. Utilizou-se como sonda o promotor CaMV35S. Observe-se a ausência da sonda nas plantas-controle e a presença de diferentes bandas nas plantas transgênicas.

Identificação de Plantas Transgênicas

A confirmação da transgenia é feita através de análises de inserção do gene heterólogo no genoma e também pelo estudo da expressão da proteína heteróloga na planta gerada. A metodologia mais aceita atualmente para a confirmação da inserção do gene é a análise de southern blot. Já a expressão do gene pode ser feita por northern blot e a presença da proteína pode ser detectada pelo western blot.



O método de southern blot se baseia na extração do DNA, sua clivagem com enzimas de restrição, fracionamento do DNA clivado em gel de agarose, transferência do DNA para uma membrana de náilon e hibridação dessa membrana com um sonda capaz de detectar o DNA transgênico.

A extração do DNA pode ser feita de qualquer tecido ou órgão da planta. Recomenda-se que, durante o processo de extração do DNA, componentes que possam interferir na sua posterior clivagem com enzimas de restrição, tais como compostos fenólicos e carboidratos, sejam eliminados. Um dos processos mais usados para a extração do DNA de plantas é o do CTAB, desenvolvido por Saghai-Marroof et al. (1984).

Após a extração do DNA total das plantas, o próximo passo é sua clivagem com enzimas de restrição. As enzimas de restrição são utilizadas para os estudos da integração do DNA heterólogo, bem como para uma análise do número de cópias do gene que estão presentes nas plantas transgênicas. As enzimas a serem utilizadas são, preferencialmente, aquelas de baixo custo e com reconhecimento de seis pares de bases. As mais comuns são a *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*. Os sítios de restrição ou os locais de reconhecimento e ação das enzimas podem estar dentro ou fora da construção gênica.

Uma vez clivado, o DNA é submetido a eletroforese, em um gel de agarose 0,8%, utilizando uma voltagem baixa, 25-50 volts, para permitir uma melhor separação dos fragmentos. Dependendo do tamanho do gel e da voltagem utilizada, recomenda-se que a eletroforese seja feita durante toda a noite. No gel, deve ser incluída, como controle negativo, uma ou mais amostras de DNA, da mesma espécie das plantas em estudos, não-transgênica. Essa amostra servirá para confirmar que a sonda utilizada reconhece somente o DNA heterólogo e nenhum DNA da planta não-transgênica. Após a separação

dos fragmentos do DNA no gel de agarose, esse é corado com brometo de etídio, para verificar sua qualidade. O brometo de etídio é uma molécula que intercala nas hélices do DNA, tornando-o visível na presença de luz ultravioleta. Por sua ação mutagênica, o brometo de etídio deve ser utilizado com bastante cautela.

Depois da eletroforese, o DNA é transferido para uma membrana de náilon, utilizando a técnica de southern blot. Geralmente, essa transferência é realizada durante, aproximadamente, 20 horas. A membrana de náilon contendo o DNA é posteriormente submetida a hibridação, com uma sonda específica para a detecção do DNA transgênico. A sonda utilizada deve ser marcada a quente (com isótopos radioativos) ou a frio (como é o caso de digoxigenina, alcalfos, etc), para possibilitar sua detecção ao final do processo. No Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, as sondas são marcadas a frio, utilizando a digoxigenina, pelo método desenvolvido por McCreery e Helentjaris (1994a, b). A seguir, são descritos os protocolos para extração de DNA e Southern blot utilizados nos laboratórios da Embrapa Milho e Sorgo.

Isolamento de DNA Genômico

Baseado no método de Saghai-Marooft et al. (1984), páginas 81:8014-8018, com modificações.

1. Pesar 700mg de tecido liofilizado, ou cinco gramas de tecido verde. Moer com N_2 líquido.
2. Adicionar 10 mL tampão CTAB, a 65°C.
3. Incubar a 65°C, por 90 minutos; a cada 15 minutos, homogeneizar.

4. Resfriar à temperatura ambiente, por cinco minutos, adicionar 5mL de clorofórmio/octanol (24:1), misturar gentilmente por 10min.
5. Centrifugar a 3000 rpm, por 10 min.
6. Remover sobrenadante e adicionar novamente 5 mL de clorofórmio/octanol (24:1), misturar gentilmente por 10min.
7. Repetir item 5
8. Retirar a parte superior, para tubo de vidro.
9. Precipitar o DNA, adicionando 6mL de isopropanol (-20° C).
10. Remover o precipitado com anzol de vidro, transferir para 1mL de TE pH 8.0 + 2 ml de RNase 10 mg/mL.
11. Incubar a 37° C, por uma hora.
12. Correr em gel de agarose 0,8%, para quantificação.
13. Pode-se, ainda, utilizar o espectrofotômetro (Abs 260 e 280 nm).

SOLUÇÕES

• TAMPÃO CTAB 2%:

ESTOQUES	100mL
H ₂ O	46 mL
TRIS HCl 1M pH 7.5	20 mL
NaCl 5M	28 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	4 mL
CTAB	2 g
β-MERCAPTOETANOL	2 mL

- Obs.:** a) Fazer a solução na hora do uso e manter a 65°C.
b) Colocar o β-Mercaptoetanol usando uma capela de exaustão.

v TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA):

10 mL de Tris-HCl 1M , pH 8.0

2 mL de EDTA 0,5 M, pH 8.0

q.s.p. 1000 mL

SOUTHERN BLOT

(Transferência DNA do gel para membrana)

1. Desnaturar o gel por uma hora, em 0,4M NaOH e 0,6M NaCl. (1 L)
2. Neutralizar o gel por uma hora, em 0,5M TRIS pH 7.5 e NaCl 1.5M (1 L)
3. Hidratar a membrana de NYLON MSI em 200mL H₂O destilada, transferir para SSC 2X por dois minutos.
4. Montar o "Southern Blot" como segue:



5. Deixar transferindo por 24 horas.
6. Visualizar a transferência do DNA, na membrana com lâmpada UV.
7. Lavar a membrana em SSC 2X, por cinco minutos.
8. Imobilizar o DNA na membrana.
10. Hibridar ou armazenar, a 4°C, entre folhas de papel de filtro e dentro de saco de plástico.

SOLUÇÕES PARA A TRANSFERÊNCIA DO DNA PARA MEMBRANA

DESNATURAÇÃO (0,4M NaOH, 0,5M NaCl):

ESTOQUES	1000mL
NaOH	16,00g
NaCl	35,04g

NEUTRALIZAÇÃO (0,5M TRIS pH 7,5, 1,5M NaCl):

ESTOQUES	1000mL
TRIS	60,50g
NaCl	87,60g
HCl	25,00mL

SSC 20X (3M NaCl, 0,3M citrato de sódio):

ESTOQUES	1000mL
NaCl	175,30g
$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	88,20g

Obs.: Ajustar pH para 7,0.

TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA (1M ac. amônio, 20mM NaOH):

ESTOQUES	1000mL
Acetato de amônio	77,08g
Hidróxido de sódio	0,80g

SSPE 5X:

ESTOQUES	1000mL
NaCl	43,50g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	6,90g
EDTA	1,85g

Obs.: Ajustar pH para 7,4.

ANEXO I

Ensaio para detecção da Atividade da enzima b-glucuronidase (GUS)

Solução Estoque	Concentração do Estoque	Concentração Final	Quantidade para 10 mL
Tampão Fosfato pH 6,8	0,1 M	50 mM	5,0 mL
Álcool metílico	100%	20%	2,0 mL
Triton X-100	1%	1%	1,0 mL
X-G_LUC	20 mM	1 mM	0,5 mL
Água Milli-Q Biotodiviana	----	---	1,5 mL

Preparo da solução estoque de X-GLUC:

Dissolver 10,46 mg de X-Gluc (PM 521,80) em 1 mL de DMSO (dimetilsufóxido). Armazenar a -20°C .

Preparo do tampão fosfato pH 6.8:

Preparar 46,3 mL de Na HPO_4 1M e 53,7 mL de NaHPO_4 1M. Diluir as soluções combinadas para 1000 mL com água Milli-Q. Conferir o pH.

Procedimento:

Incubar o tecido no tampão de reação, em um volume suficiente para cobrir a amostra durante uma a 24 horas. Dependendo da atividade da GUS na amostra, a reação poderá levar de alguns minutos até 24 horas. Após decorrido o tempo de reação, transferir a amostra para etanol 70%. O etanol vai retirar a clorofila de tecidos verdes e permitir uma melhor visualização da coloração azul.

Referências

ARMSTRONG, C. L. Regeneration of plants from somatic cells cultures: applications for in vitro genetic manipulation. In: FREELING, M.; WALBOT, V. (Ed.). **The maize handbook**. New York: Springer, 1994. Falta pagina inicial e final do capitulo.

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

BLOCK, D. M. The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implications for the plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 72, p. 1-14, 1993.

CHRISTOU, P. Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. **Plant Journal**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 275-281, 1992.

FINER, J. J.; FINER, K. R.; PONAPPA T. Particle bombardment mediated transformation. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 240, p. 59-80, 1999.

FURTH, P. A. Gene transfer by biolistic process. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 7, p. 139-145, 1997.

McCREERY, T., HELENTJARIS, T. 1994a. Production of hybridization probes by the PCR utilizing digoxigenin-modified nucleotides. In: ISAAC, P. (Ed). **Protocols for nucleic acid analysis by nonradiocative techniques**. Totowa: Humana Press, 1994a. p. 107-112.

MCCREERY, T.; HELENTJARIS, T. 1994b. Hybridization of digoxigenin labeled probes to Southern blots and detection by chemiluminescence. In: ISAAC, P. (Ed). **Protocols for nucleic acid analysis by nonradiocative techniques**. Totowa: Humana Press, 1994b. p. 1-112-117 Verificar a pagina inicial e final do capitulo

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Data e 1989 e nao 1998. Tem que mudar no texto Falta o numero do volume e numero de paginas

SANFORD, J. C. The biolistic process. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 6, p. 299-302, 1988.

TAYLOR, N.J.; FAUQUET, C. M. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. **DNA and Cell Biology**, New York, v. 21, n. 12, p. 963-977, 2002.

TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. **Trends in Cell Biology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 121-128, 2002.

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

WRIGHT, M.; DAWSON, J.; DUNDER, E.; SUTTIE, J.; REED, J.; KRAMER, C.; CHANG, Y.; NOVITZKY, R., WANG, H.; ARTIM-MOORE, L. Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. **Plant Cell Reports**, New York, v. 20, p. 429-436, 2001