

# Transformação Genética de Embriões Zigóticos da Linhagem de Milho Tropical L3 Mediada por *Agrobacterium Tumefaciens*

## Introdução

O milho é um cereal cuja cultura vem crescendo extensamente no mundo. O Brasil planta atualmente 14.443.334 hectares e está entre os cinco maiores produtores, com 59.011.703 toneladas colhidas na safra de 2008 (IBGE, 2009). Originário do México, o milho evoluiu de uma gramínea selvagem (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) para uma espécie domesticada e altamente produtiva devido à intervenção humana. Entre os anos de 1976 e 2010, a produtividade do milho no Brasil aumentou mais de 200%, sendo que a área utilizada para o plantio cresceu apenas 18% (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2009). Esses resultados foram devidos, em grande parte, a rigorosos programas de seleção e melhoramento de cultivares.

Enquanto os programas convencionais de genética continuam exercendo um papel fundamental na melhoria das características agrônômicas do milho, tecnologias recentes, geradas em função dos enormes progressos alcançados pelas biológicas molecular e celular nos últimos anos, permitem que novas ferramentas sejam agregadas aos programas de melhoramento convencional para a criação e o desenvolvimento de novas cultivares com maiores rendimentos agrícolas, constituição nutricional diferenciada e tolerantes a diferentes estresses bióticos e abióticos.

A biotecnologia moderna está gerando um grande número de genes passíveis de serem utilizados para a melhoria genética do milho e as técnicas de transformação genética de plantas podem ser empregadas para alterar a funcionalidade *in vivo* desses genes via complementação, superexpressão ou silenciamento. Progressos expressivos foram conseguidos no desenvolvimento da tecnologia de transformação genética de milho na última década. A transformação genética do milho, considerada por algum tempo recalcitrante, tornou-se, atualmente, um procedimento de rotina para vários genótipos na maioria dos laboratórios públicos e privados trabalhando com a cultura.

Por não ser um hospedeiro natural da *Agrobacterium*, os primeiros eventos transgênicos de milho foram conseguidos pela transformação via biobalística. Esse cenário vem mudando nos últimos anos e pesquisas desenvolvidas em diferentes laboratórios ao redor do mundo têm mostrado que a *Agrobacterium* é capaz de, *in vitro*, infectar e transferir genes para diferentes cultivares de milho. Nesta circular técnica, será descrita a metodologia desenvolvida pela Embrapa Milho e Sorgo para a transformação genética de milho tropical da linhagem L3 mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Serão abordados diversos fatores, tais como elementos essenciais em uma construção gênica, seleção e regeneração das plantas transgênicas.

Sete Lagoas, MG  
Dezembro, 2009

### AUTORES

Andréa Almeida Carneiro –  
Bióloga - Ph.D  
Embrapa Milho e Sorgo –  
andreaac@cnpmis.embrapa.br

Gracielle Teodora da Costa Pinto  
Coelho – Bióloga - Doutora -  
Faculdade São  
Camilo / Belo Horizonte -  
gracielle.costa@gmail.com

Kátia Ferreira Pôssa –  
Universidade Federal de Lavras  
UFLA - Biotecnóloga  
Mestranda em Biotecnologia  
Vegetal / Lavras -  
katiapossa@hotmail.com

Maira de Freitas Pereira -  
Mestranda em Microbiologia  
Agrícola /  
Universidade Federal de Viçosa –  
UFV / Viçosa  
mairabiotech@yahoo.com.br

Maria José Villaça Vasconcelos –  
Farmacêutica - Ph.D.  
Embrapa Milho e Sorgo  
mjose@cnpmis.embrapa.br

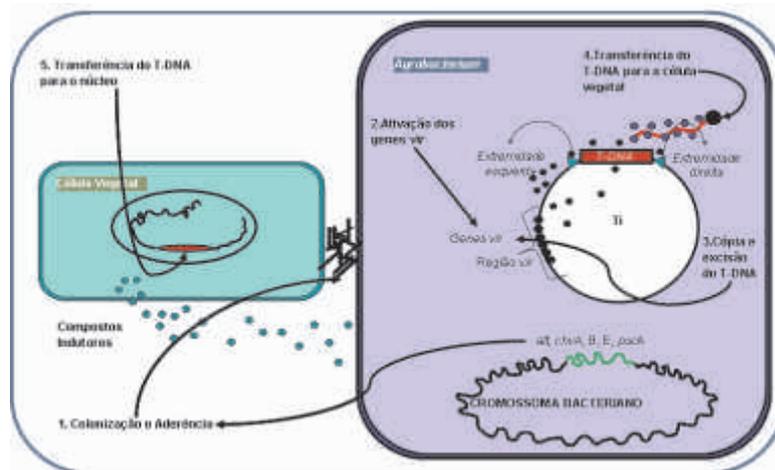
Newton Portilho Carneiro –  
Biólogo - Ph.D.  
Embrapa Milho e Sorgo –  
newtonc@cnpmis.embrapa.br

## Transformação de milho mediada por *Agrobacterium*

Durante vários anos, a transformação de monocotiledôneas via *Agrobacterium* tinha uma eficiência muito baixa. Entretanto, recentemente esse cenário está mudando e a metodologia de transferência gênica tem se tornado o método de escolha para esse grupo de plantas. Esse método de transformação utiliza um sistema natural de transferência de genes desenvolvido pela *Agrobacterium*, uma bactéria de solo capaz de causar tumores vegetais na região da infecção. Esses tumores resultam da presença do plasmídeo Ti ou plasmídeo indutor de tumor na célula bacteriana. O plasmídeo Ti é uma molécula circular grande (200 a 800 kb) de DNA fita dupla que pode se replicar independentemente do genoma de *Agrobacterium tumefaciens* (GELVIN, 2003). Localizadas no plasmídeo Ti, se encontram duas regiões importantes para a transferência de genes da bactéria para a planta: a região do T-DNA e a região vir. As regiões dos T-DNAs de plasmídeos selvagens contêm genes que comandam a produção de opinas e hormônios, tais como auxina e citocinina, pela célula vegetal. As opinas são aminoácidos utilizados apenas pela *Agrobacterium* como fonte de carbono e nitrogênio, enquanto os hormônios são responsáveis pela indução de tumores vegetais. O T-DNA tem, aproximadamente, entre

10 e 30 Kb e suas extremidades são delimitadas por duas sequências de 25 pb altamente homólogas, denominadas extremidades direita e esquerda. *Agrobacterium* selvagem transfere o seu T-DNA através das membranas das células vegetais e o incorpora no DNA genômico da planta. O processamento do T-DNA e sua transferência para a célula vegetal são devidos, em grande parte, à atividade de virulência das proteínas codificadas na região vir (GELVIN, 2003).

Resumidamente, o processo de transformação inicia-se com a ligação da *Agrobacterium* à célula da planta, seguida de indução da expressão da região vir devido a sinais específicos emitidos pela planta hospedeira, tais como monossacarídeos e compostos fenólicos. Como resultado da ativação dos genes vir, uma fita simples da molécula de T-DNA é produzida pela ação combinada das proteínas VirD1 e proteínas VirD2. O complexo, juntamente com várias outras proteínas Vir, é exportado para a célula hospedeira da planta por um sistema de secreção tipo IV formado pelas proteínas VirB/D4. Uma vez dentro do hospedeiro no citoplasma das células, o T-DNA é revestido com numerosas moléculas VirE2, que conferem ao T-DNA proteção necessária para a sua viagem até o núcleo da célula vegetal. O T-DNA é transportado até o núcleo e integrado ao genoma da planta, com o auxílio de proteínas produzidas pelo hospedeiro (GELVIN, 2003; TZFIRA; CITOVSKY, 2006) (Figura 01).



**Figura 1:** Transformação genética de plantas mediada por *Agrobacterium*. O processo de transferência de genes da *Agrobacterium* para as plantas compreende os estádios de: (1) colonização e aderência; (2) ativação dos genes vir; (3) cópia e excisão do T-DNA; (4) transferência do T-DNA para a célula vegetal; e (5) transferência do T-DNA para o núcleo. Adaptado de Tzfira e Citovsky (2006)

*Agrobacterium tumefaciens* constitui um excelente sistema de introdução de genes em células vegetais, uma vez que: (1) o DNA pode ser introduzido em todos os tecidos da planta, o que elimina a necessidade da produção de protoplastos; (2) a integração do T-DNA é um processo relativamente preciso. A região do DNA a ser transferida está definida pelas sequências flanqueadoras, extremidades direita e esquerda. Ocasionalmente, se produzem reordenações, mas na maioria das vezes a região é inserida intacta no genoma da planta. Normalmente, os T-DNAs integrados mostram mapas genéticos consistentes e segregação adequada. Ademais, os caracteres introduzidos por essa via têm se mostrado estáveis durante muitas gerações de cruzamentos. Essa estabilidade é crítica quando se pretende comercializar as plantas transgênicas geradas (HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996).

O primeiro protocolo de transformação de milho mediada por *Agrobacterium* com alta eficiência foi relatado em 1996 por um grupo de pesquisadores da Japan Tobacco Inc. (ISHIDA et al., 1996). Eles foram capazes de infectar embriões imaturos de milho A188 utilizando vetores superbinários (pSB131 ou pTOK233) (ISHIDA et al., 1996). O plasmídeo superbinário desenvolvido por Komari (1990) contém uma cópia extra dos genes de virulência *virB*, *virC* e *virG*. Trabalhos subsequentes mostraram que a transformação de milho mediada por *Agrobacterium* também era possível com a utilização de vetores binários padrões (FRAME et al., 2002). Para o milho, foi relatado que a técnica de *Agrobacterium* resulta em alta eficiência, com alto número de eventos contendo apenas uma ou um baixo número de cópias do transgene no genoma quando comparado com a biobalística (HUANG; WEI, 2005; ISHIDA et al., 1996, 2007; FRAME et al., 2002; GORDON-KAMM et al., 2002; ZHAO et al., 2001).

## Construções gênicas

### Genes de interesse e genes marcadores de seleção

Para viabilizar a utilização da *Agrobacterium* em processos biotecnológicos de transferência de genes para plantas, é necessário que os genes endógenos do T-DNA causadores de tumor sejam inativados e que os genes exógenos sejam inseridos entre suas extremidades direita e esquerda. O plasmídeo recombinante resultante é novamente colocado na *Agrobacterium* para ser transferido para células vegetais (GELVIN, 2003). Tecidos ou células transformados podem ser utilizados para regeneração de plantas transgênicas (SCHAFER et al., 1987; HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996).

Os dois componentes principais para o sucesso da transformação de milho mediada por *Agrobacterium* são a região do T-DNA e a região vir, presentes nos plasmídeos Ti. Essas regiões podem ser funcionais, mesmo estando em plasmídeos separados dentro da *Agrobacterium* (HOEKEMA et al., 1983). Nesse fato, baseiam-se os vetores binários utilizados atualmente para transformação de plantas mediada por *Agrobacterium*. Esses vetores são menores, mais fáceis de serem manipulados em laboratório do que o plasmídeo Ti, capazes de multiplicar tanto em *Agrobacterium* como em *E. coli* e possuem um T-DNA artificial, no qual diferentes transgenes podem ser inseridos. Os vetores binários são introduzidos em *Agrobacterium* desarmadas, ou seja, em *Agrobacterium* que carregam plasmídeos Ti que tiveram a região oncogênica original do T-DNA removida. As funções da região vir continuam sendo fornecidas pelo plasmídeo Ti desarmado residente na *Agrobacterium*. Proteínas codificadas pelos genes vir podem atuar sobre o T-DNA em trans, isto é, à distância, para mediar seu processamento e exporte para a célula da planta. As características que diferenciam os vetores binários dos demais utilizados em clonagem gênica incluem: (1) o T-DNA flanqueado por 25 pb, extremidades direita e esquerda, altamente conservadas entre os diferentes plasmídeos Ti, as quais são reconhecidas pelas endonucleases VirD1/VirD2 durante o processamento do T-DNA; (2) um “polylinker” contendo vários sítios de ação para

enzimas de restrição para a clonagem do GDI; (3) origens de replicação para permitir sua manutenção em *E. coli* e *Agrobacterium*; (4) genes de resistência a antibióticos para a seleção do vetor binário em *E. coli* e *Agrobacterium* (BEVAN, 1984; HELLENS et al., 2000; LEE; GELVIN, 2008).

Os genes que são inseridos no T-DNA, constituídos basicamente da região codificadora do gene de interesse (GDI) ou do gene marcador de seleção (GMS) e de sequências reguladoras da expressão gênica (Figura 02).

O GDI codifica uma determinada proteína que, quando expressa, define uma característica de interesse, como resistência a pragas e doenças, tolerância a fatores abióticos, melhoria da qualidade nutricional etc..

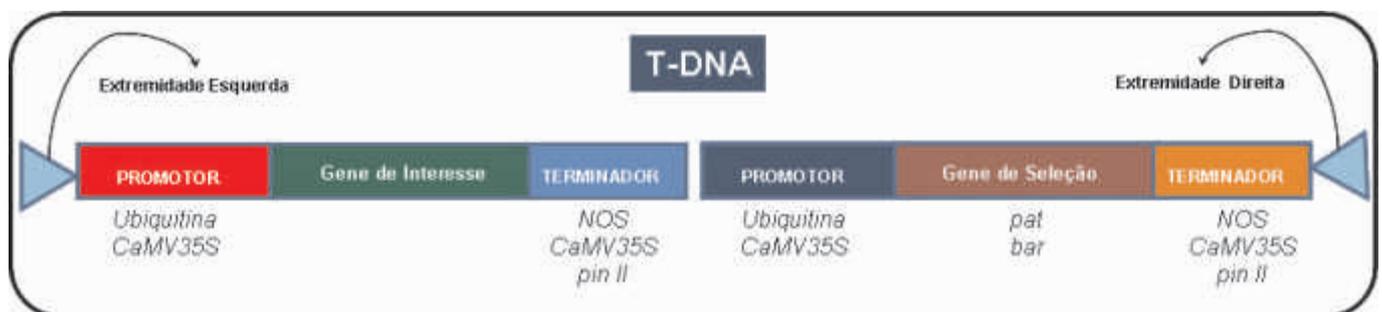
O GMS é uma sequência de codificação de uma determinada proteína que, quando expressa nas células transgênicas, confere uma vantagem adaptativa. O GMS serve para identificar e selecionar as células que tenham o DNA heterólogo integrado no genoma. GMSs são fundamentais para o desenvolvimento de tecnologias de transformação de plantas, pois o processo de transferência de um transgene para uma célula receptora e sua integração no genoma é muito ineficiente na maioria dos experimentos, sendo que as chances de recuperação de linhas transgênicas sem seleção são geralmente muito baixas.

Atualmente, os GMSs mais utilizados para a

produção de milho transgênico são aqueles que conferem tolerância a herbicidas. Dentre esses, os genes *bar*, isolado de *Streptomyces hygroscopicus*, e o *pat*, isolado de *Streptomyces viridochromogenes*, ambos codificando a enzima fosfotricina acetiltransferase (PAT) (DE BLOCK et al., 1989), são frequentemente citados (GORDON-KAMM et al., 1990; HUANG; WEI, 2005; ISHIDA et al., 2007; ZHAO et al., 2001).

Tanto a sequência de nucleotídeos que codifica para a proteína de interesse quanto aquela que codifica para a proteína utilizada na seleção dos calos transgênicos são acompanhados por sequências regulatórias, tais como promotores e terminadores, os quais são responsáveis pelo controle da expressão gênica.

Promotores são sequências de DNA, normalmente presentes nas extremidades 5' de uma região codificadora, usadas pela RNA polimerase e fatores de transcrição para iniciar o processo de transcrição gênica (BUCHANAN et al., 2000). Dependendo da capacidade de controlar a expressão gênica, os promotores são classificados como fortes ou fracos, estando essa força relacionada com a afinidade de ligação dos fatores de transcrição com a sequência promotora (BROWNING; BUSBY, 2004). Promotores fortes ou fracos podem ser ainda classificados como constitutivos, tecidos e/ou órgãos específicos e induzíveis. Um promotor constitutivo direciona a expressão de um gene em todos os tecidos de uma planta durante os vários estádios de desenvolvimento.



**Figura 2:** T-DNA artificial contendo o gene de interesse e o gene marcador de seleção com suas regiões reguladoras

O promotor mais utilizado para direcionar a expressão de uma proteína constitutivamente em milho é, atualmente, o promotor isolado do gene da ubiquitina de milho Ubi1 (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996). Normalmente, os promotores responsáveis pela regulação da expressão dos GMSs são fortes e constitutivos, uma vez que esses genes devem funcionar em diferentes tipos de células e durante vários estádios de desenvolvimento da planta. Um promotor tecido específico direciona a expressão do gene apenas em determinado tecido, podendo ou não ser ativado durante todos os estádios de desenvolvimento. Um promotor induzível inicia a expressão gênica em resposta a estímulos químicos, físicos ou estresses bióticos e abióticos (LIU, 2009). Semelhantes aos promotores específicos, os induzíveis evitam um consumo desnecessário de nutrientes e energia, uma vez que a proteína só será produzida quando houver o estímulo correto. Essas características dos promotores permitem que a expressão da proteína transgênica seja controlada de acordo com os objetivos do projeto.

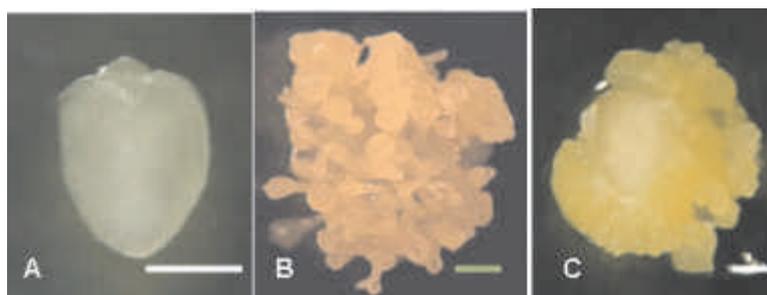
Outro elemento regulatório que deve estar presente em uma construção gênica controlando a expressão da proteína de interesse são as regiões não traduzidas ou UTRs (untranslated regions). As regiões 3' UTRs, também conhecidas como regiões terminadoras, são utilizadas para conferir maior estabilidade ao mRNA e para sinalizar o término da transcrição (LESSARD et al., 2002), impedindo que ocorra a produção de moléculas quiméricas de RNA e, conseqüentemente, a formação de novas proteínas, se o complexo da polimerase continuar transcrevendo além do seu sinal de término. As seqüências 3' UTRs mais utilizadas

em construções gênicas para transformação de milho incluem nos do gene nopaline sintase de *Agrobacterium* (DEPICKER et al., 1982), a região 3' do CaMV35S (FRAME et al., 2002) e a do gene inibidor de proteinase pinII de batata (AN et al., 1989).

### Cultura de tecidos de milho da linhagem L3 visando à produção de plantas transgênicas

O estabelecimento de sistemas de regeneração de plantas a partir de células somáticas constitui-se em um requisito de fundamental importância para a produção de plantas transgênicas de milho. A metodologia mais estudada para regeneração do milho *in vitro* é a embriogênese somática, a qual tem a vantagem de produzir uma estrutura bipolar que pode, teoricamente, ser germinada e regenerada em um só passo.

Embriões zigóticos imaturos de milho são as estruturas vegetais preferidas para a geração de culturas embriogênicas (GREEN; PHILLIPS, 1975; PRIOLI, 1989; PHILLIPS et al., 1988; WANG; FRAME, 2004). Calos embriogênicos são classificados fenotipicamente em calo do Tipo I e calo do Tipo II (ARMSTRONG; GREEN, 1985) (Figura 03). Os calos do Tipo I são duros, compactos, amarelos ou brancos e, normalmente, capazes de regenerar plantas; já aqueles descritos como do Tipo II são macios, friáveis e altamente embriogênicos (ARMSTRONG; GREEN, 1985; TOMES; SMITH, 1985). As culturas formadoras de calos do Tipo II crescem rapidamente, podem ser mantidas por um longo período de tempo e formam um grande número de embriões somáticos facilmente regeneráveis (VASIL, 1987).



**Figura 3:** Calos embriogênicos de milho. (A) Embrião zigótico de milho. (B) Calo com embriões somáticos do Tipo II. (C) Calo com embriões somáticos do Tipo I. Barra = 1 mm

Embora calos do Tipo II sejam os mais eficientes na produção de plantas transgênicas de milho, calos do Tipo I podem também ser utilizados. A ocorrência de calos embriogênicos friáveis do Tipo II não é tão comum, apenas um número limitado de genótipos de milho são capazes de expressar esse fenótipo eficientemente em meio de cultivo, notadamente a linhagem A188 (ARMSTRONG; GREEN, 1985) e o híbrido Hill (ARMSTRONG et al., 1991).

Apesar da maioria dos genótipos de milho capazes de regenerar plantas ser de adaptação a clima temperado, genótipos de adaptação tropical capazes de regeneração têm também sido identificados (CARVALHO et al., 1994; BOHOROVA et al., 1995; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2000; PETRILLO et al., 2008), o que indica a possibilidade de se manipular genótipos elite tropicais via transformação genética.

A linhagem elite L3 (PARENTONI; SOUZA JÚNIOR, 2008), pertencente à Embrapa Milho e Sorgo, é um dos genótipos capazes de produzir eficientemente, in vitro, calos embriogênicos dos Tipos I e II. Para tanto, embriões imaturos dessa linhagem entre 1 e 1,5 mm são coletados e cultivados com o eixo embrionário em contato com o meio de iniciação de calos - IC 3.7 (Tabela I). Calos embriogênicos são visíveis a partir da segunda semana de cultivo, sendo necessário subcultivá-los a cada duas semanas. Para regeneração, os calos são cultivados, inicialmente, em meio de maturação por 2 a 4 semanas (Tabela I). Calos maduros têm uma aparência opaca, em contraste com os calos imaturos que, normalmente, são translúcidos e brilhantes (Fig. 04). Calos maduros são transferidos para meio de germinação GE (Tabela I) para o desenvolvimento das raízes e das folhas. Quando plântulas atingem o tamanho de 5 cm são aclimatadas em casa de vegetação.

**Tabela I.** Composição dos meios de cultivo usados na transformação genética de milho L3 via *Agrobacterium*

REAGENTES	MEIO INFECÇÃO 1L	MEIO CO- CULTIVO <sup>(17)</sup> 1L	MEIO DE REPOUSO 1L	MEIO SE (SELEÇÃO) 1L	MEIO RM (MATURAÇÃO) 1L	MEIO GE (GERMINAÇÃO) 1L
N6 sais <sup>(1)</sup>	3,98 g	3,98 g	3,98 g	3,98 g	0	0
MS sais <sup>(2)</sup>	0	0	0	0	4,3 g	4,3 g
MS vitaminas (1000X) <sup>(3)</sup>	0	0	0	0	1 mL	1 mL
2,4-D <sup>(4)</sup> (1 mg/mL)	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL	0	0
ANA <sup>(5)</sup> (1 mg/mL)	0	0	0	0	100 µL	0
Myo-Inositol <sup>(6)</sup>	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg
Prolina <sup>(7)</sup>	2,9 g	2,9 g	2,9 g	2,9 g	0	0
Caseína <sup>(8)</sup>	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	0	0
Sacarose <sup>(9)</sup>	68,4 g	30 g	30 g	30 g	60 g	30 g
Glicose <sup>(10)</sup>	36 g	0	0	0		
MES	0	0	0,5 g	0,5 g		
pH	5,2	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
Phytigel <sup>(11)</sup>	0	3,0 g	3,0 g	3,0 g	3,0 g	3,0 g
Esterilização	Autoclavar 121 °C/ 30 min/1 atm	Autoclavar 121 °C/ 30 min/1 atm	Autoclavar 121 °C/ 30 min/1 atm	Autoclavar 121 °C/ 30 min/1atm	Autoclavar 121 °C/ 30 min/1atm	Autoclavar 121 °C/ 30 min/1 atm
<b>ACRESCENTAR APÓS AUTOCLAVAR O MEIO</b>						
N6 vitaminas (1000X) <sup>(12)</sup>	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	0	0
Acetosyringone <sup>(13)</sup>	100µM	100µM	0	0		
Cisteína <sup>(14)</sup>	0	300 mg	0	0		
Nitrato de Prata <sup>(15)</sup> (estoque 8,5 mg/mL ou 50mM)	[Fina] =25 µM 500 µL/L	[Fina] =25 µM 500 µL/L	Fina] =25 µM 500 µL/L	[Fina] =5 µM 100 µL/L	0	0
Vancomicina	0	0	100 mg	100 mg	100 mg	0
Cefotaxime	0	0	100 mg	100 mg	100 mg	0
PPT <sup>(16)</sup> (10mg/mL)	0	0	0	1,5 ou 3 mg	3 mg	3 mg

<sup>1</sup> Mistura basal de sais com macro e micronutrientes (Sigma C-1416)

<sup>2</sup> Mistura basal de sais com macro e micronutrientes (Sigma M-5524)

<sup>3</sup> Vitaminas MS (adicionar 1 mL para cada litro de meio) – Estoque 1000X

Ácido nicotínico	25 mg
Piridoxina HCl	25 mg
Tiamina	50 mg
Glicina	100 mg

Dissolver os reagentes em 30 mL de água miliQ e completar o volume para 50 mL. Utilizar o balão volumétrico. Essa solução não precisa ser filtrada, pois é adicionada ao meio antes deste ser autoclavado

<sup>4</sup> 2,4 D (Sigma D-84072) / 2,4-dichlorophenoxyacetic acid /

Solução 2,4-D (1mg/mL): Dissolva 0,125 g de 2,4-D em 4 mL 1N KOH. Aqueça gentilmente, sob agitação (não ferva), até dissolver completamente. Adicione 121 mL de ddH<sub>2</sub>O. Proteja o frasco da luz (cubra com papel alumínio) e estoque a 4 °C

<sup>5</sup> ANA (Sigma N0640) / -Naphthaleneacetic acid free acid /

Solução de ANA (1mg/mL): Dissolva 10 mg de ANA em 1 mL de 1N NaOH. Complete o volume para 10 mL com ddH<sub>2</sub>O. Utilize balão volumétrico. Estoque a 4 °C

<sup>6</sup> Myo-Inositol (Sigma I-7508)

<sup>7</sup> Prolina (Sigma P-8449)

<sup>8</sup> Caseína hidrolisado – (Sigma C-7290)

<sup>9</sup> Sacarose

<sup>10</sup> Glicose

<sup>11</sup> Phytigel (Sigma P-8169)

<sup>12</sup> N6 vitaminas (1000X):

Tiamina HCl	1000 mg
Piridoxina HCl	500 mg
Ácido Nicotínico	500 mg
Glicina	2000 mg

Complete o volume para 1000 mL e estoque em frasco escuro a 4 °C. Utilizar o balão volumétrico. Esterilizar por filtração (0,22 µm)

<sup>13</sup> Acetosyringone – Aldrich Chem. Co

<sup>14</sup> Solução de L-Cisteína – (Sigma C8152) (100 mg/mL)

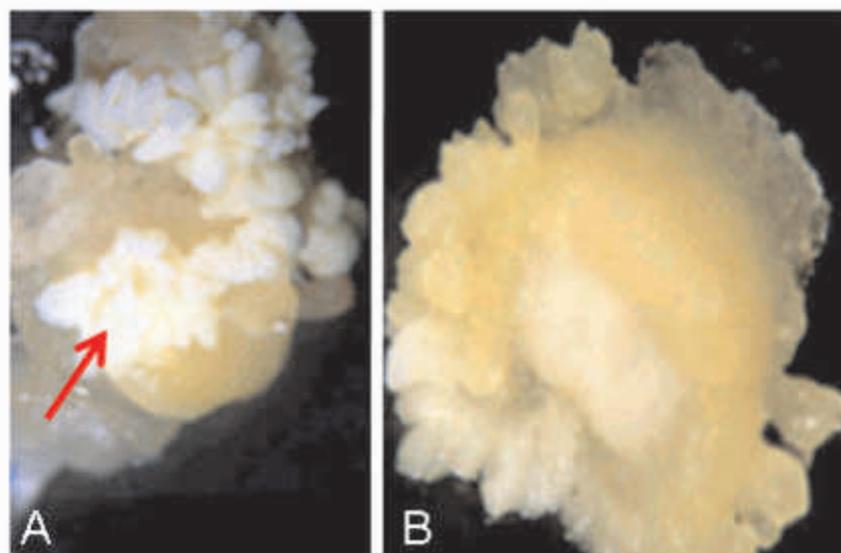
Dissolver 500 mg de L-cisteína em 5 mL de água bi-destilada. Esterilizar por filtração. Usar no mesmo dia e o restante descartar. Usar 3 mL para cada 1L de meio

<sup>15</sup> Solução AgNO<sub>3</sub> (100mM): Pese 169,9 mg de AgNO<sub>3</sub> e complete o volume para 10 mL utilizando um balão volumétrico.

Esterilize por filtração e estoque em recipiente protegido de luz a 4 °C

<sup>16</sup> Como fonte de PPT, utilizamos o herbicida comercial FINALE® Agrevo

<sup>17</sup> Estocar o meio pronto a 4 °C e utilizar no máximo até 8 dias após o preparo



**Figura 4:** Maturação de calos embriogênicos. (A) Calo maturado e pronto para germinação, região opaca indicada pela seta. (B) Calo não maturado

#### **Transformação de embriões zigóticos de milho da linhagem elite L3 com *Agrobacterium tumefaciens***

O processo de transformação da linhagem de milho tropical L3 via *Agrobacterium tumefaciens* foi baseado no protocolo desenvolvido por Frame et al. (2002) para embriões zigóticos do híbrido de milho temperado Hill.

#### **Obtenção de embriões zigóticos imaturos -**

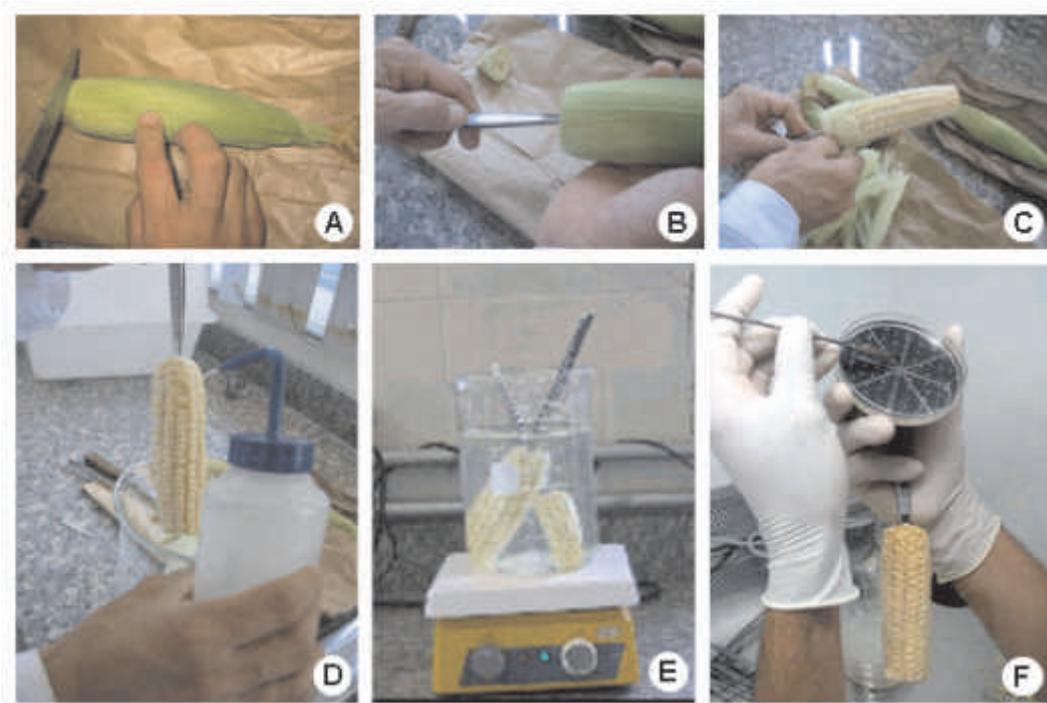
Coletar espigas da linhagem L3 quando os embriões imaturos estiverem com 1 a 1,5 mm de comprimento (10 a 16 dias após a polinização). Comece a observar as espigas nove dias após a polinização – puxe a palha, corte o topo de alguns grãos localizados no meio da espiga, com a ajuda de uma espátula separe o embrião do endosperma. Use uma régua para medir o comprimento. Remova a espiga se o tamanho estiver correto e leve para o laboratório para dissecação. Se o embrião ainda estiver pequeno, cubra a espiga novamente com a

palha e observe o tamanho no dia seguinte.

Para a esterilização da espiga, remova a palha e o silk, insira uma pinça na base da espiga para servir de sustentação. Mergulhe as espigas em uma solução de 1:1 de água sanitária comercial: H<sub>2</sub>O destilada com 1-2 gotas de Tween 20, misture bem, mantenha em capela estéril. Esterilize por 20 min, agitando a cada 5 min. Lave com água destilada estéril por 5 min, agitando a cada 2 min. Repita a lavagem duas vezes e deixe as espigas na última água.

Remova uma espiga da água estéril, retire o embrião imaturo inicialmente cortando o topo dos grãos. Em seguida, insira uma escápula arredondada entre o endosperma e o pericarpo no lado basal do grão (base da espiga) e, gentilmente, faça um pequeno círculo no sentido anti-horário. Isso removerá o endosperma e o embrião estará localizado na base do grão (Figura 05).

Colete o embrião em meio de infecção suplementado com 100  $\mu$ M AS (Tabela I).



**Figura 05:** Cultivo de embriões zigóticos imaturos. (A) Remoção das extremidades de uma espiga de milho, coletada aproximadamente 2 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 utilizado para um enxague 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.

**Preparo da *Agrobacterium* e infecção dos embriões zigóticos de milho** – A *Agrobacterium* utilizada para transformar os embriões zigóticos de milho L3 é a estirpe EHA101, que possui resistência natural ao antibiótico canamicina. Essa bactéria é mantida em meio YEP (5 g/L extrato de levedura, 10 g/L peptona, 5 g/L NaCl, 15 g/L Bacto-agar, pH 6.8), contendo 100 mg/L de espectinomicina (seleção para o vetor) e 50 mg/L de canamicina (para selecionar EHA101) por até 4 semanas na geladeira a 4 °C. Culturas estoque de longa duração são mantidas a -80 °C em solução de glicerol.

Três dias antes da transformação do milho, culturas de *Agrobacterium* mantidas a 4 °C devem ser estriadas para crescer a 19 °C em meio YEP suplementado com 100 mg/L de espectinomicina e 50 mg/L de canamicina.

No dia da transformação, distribuir 5 mL de meio de infecção suplementado com 100 µM AS em tubos de centrífuga de 50 mL (Tabela I). Em seguida, inocular esse meio com *Agrobacterium*

até uma O.D550 0,1 a 0,2 (aproximadamente um círculo de 3 mm da alça de platina). Fixar o tubo horizontalmente em um shaker e incubar a temperatura ambiente, a 75 rpm, por 4 a 5 h até atingir uma O.D550 0,3 a 0,4.

Para a infecção, 20 a 100 embriões zigóticos imaturos entre 1 e 1,5 mm são coletados em 2 mL (usar tubos de microcentrífuga) de meio de infecção suplementado com 100 µM AS, inicialmente sem *Agrobacterium*, e lavados por duas vezes nesse mesmo meio. Após retirar o meio da última lavagem, adicionar 1 mL da suspensão de *Agrobacterium* preparada anteriormente. Inverter o tubo gentilmente durante 20 vezes e incubar por 5 min no escuro; todos os embriões devem estar submersos. Não vortexar os embriões durante o procedimento de infecção.

**Co-cultivo de embriões zigóticos com *Agrobacterium*** – Após a infecção, os embriões

zigóticos são transferidos para a superfície do meio de co-cultivo (Tabela I) e o excesso de *Agrobacterium* é retirado com uma pipeta ou um papel de filtro. Durante esse período, a *Agrobacterium* irá transferir o T-DNA contendo os genes de interesse para o genoma da planta. Embriões são orientados com o eixo embrionário em contato com o meio de cultivo. Essa orientação retarda a germinação do embrião e induz a proliferação de células do escutelo, as quais formam o calo (GREEN; PHILLIPS, 1975). As placas são fechadas com tape cirúrgico e incubadas no escuro a 20 °C durante três dias.

**Repouso** – Uma vez transferido o T-DNA, a *Agrobacterium* torna-se indesejável no meio de cultivo e precisa ser removida. Para tanto, os embriões zigóticos são transferidos para o meio de repouso, suplementado com os antibióticos cefotaxime e vancomicina (Tabela I) a 28 °C no escuro por 7 dias.

**Seleção dos eventos transgênicos** – A seleção é iniciada 7 dias após a transferência para o meio de repouso, quando todos os embriões (35 embriões por placa) são transferidos para o meio de seleção (Tabela I) suplementado com 3 mg/L de fosfinotricin durante 6 semanas com subcultivo a cada 2 semanas.

**Regeneração dos eventos transgênicos** – A regeneração das plantas R0 compreende duas etapas: a maturação dos calos selecionados, seguida da germinação. Para a maturação, os calos que se desenvolveram em meio de seleção suplementado com 3 mg/L de fosfinotricin são transferidos para o meio RM suplementado com 3mg/L de fosfinotricin (Tabela I). A maturação dos calos é um processo que pode durar entre 2 e 4 semanas. Para a germinação, os calos maturados são transferidos para meio GE suplementado com 3 mg/L de fosfinotricin, durante 4 semanas, entre 25 e 28 °C com um fotoperíodo 16h luz / 8 h escuro. Plantas entre 3 e 5 cm de altura que se desenvolveram são transferidas para solo em casa de vegetação. Durante os três primeiros

dias de aclimação, as plantas são mantidas sob uma cobertura plástica para manutenção da umidade. Nos dias seguintes, sucessivos furos são feitos no plástico até a exposição total das plantas ao ambiente.

Análises de Southern blot do DNA genômico isolado das plantas regeneradas são feitas para confirmar a transgenia.

### 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 de 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 6 pares de bases. As mais comuns são a EcoRI, a BamHI e

a 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 incluído, 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 h. 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, alcafos etc.), para possibilitar sua detecção ao final do processo. Na Embrapa Milho e Sorgo, as sondas são marcadas a frio utilizando a digoxigenina pelo método desenvolvido por McCreery e Helentjaris (1994a,b). Em seguida, descrevemos

os protocolos para extração de DNA e Southern blot utilizados em nossos laboratórios.

### Isolamento de DNA genômico

Baseado no método de Saghai-Marroof et al. (1984), com modificações.

1. Pesar 700 mg tecido liofilizado ou 5 g de tecido verde. Moer com N2 líquido.
2. Adicionar 10 mL tampão CTAB a 65 °C.
3. Incubar a 65 °C por 90 min; a cada 15 min, homogeneizar.
4. Resfriar à temperatura ambiente por 5 min, adicionar 5mL de clorofórmio/octanol (24:1), misturar gentilmente por 10 min.
5. Centrifugar a 3000 rpm por 10 min.
6. Remover sobrenadante e adicionar novamente 5 mL de clorofórmio/octanol (24:1), misturar gentilmente por 10 min.
7. Repetir item 5.
8. Retirar a parte superior para tubo de vidro.
9. Precipitar o DNA, adicionando 6 mL de isopropanol (-20 °C).
10. Remover o precipitado com anzol de vidro, transferir para 1 mL de TE pH 8.0 + 2 I de RNase 10 mg/mL.
11. Incubar a 37 ° C por 1 h.
12. Correr em gel de agarose 0.8% para quantificação.
13. Pode-se ainda, para quantificar o DNA, utilizar o espectrofotômetro (Abs 260 e 280 nm).

### Soluções:

#### Tampão CTAB 2%:

ESTOQUES	100 mL
H <sub>2</sub> 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
-MERCAPTOETANOL	2 mL

**Obs.:** a) Fazer a solução na hora do uso e manter a 65 °C.

b) Colocar o -Mercaptoetanol, usando uma capela de exaustão.

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

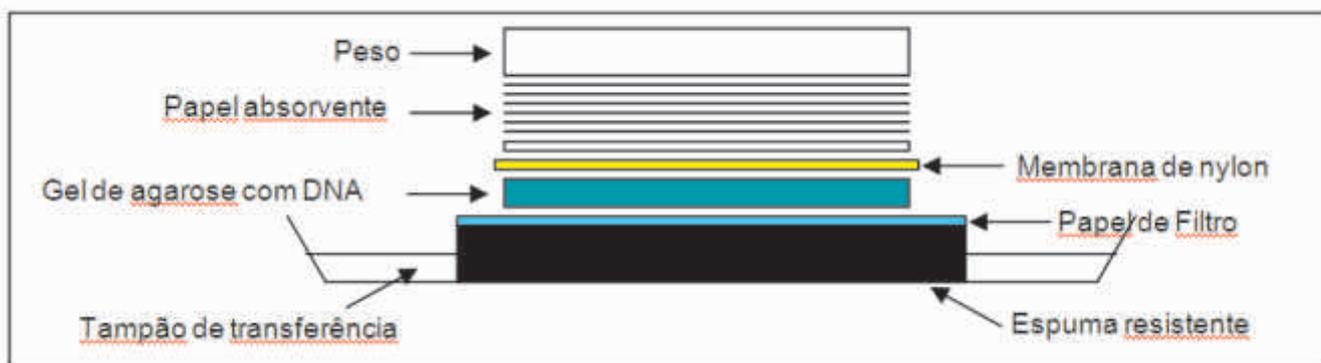
(Transferência DNA do gel para membrana)

1. Desnaturar o gel por 1 h em 0.4M NaOH e 0.6M NaCl. (1 L).

2. Neutralizar o gel por 1 h em 0.5M TRIS pH 7.5 e NaCl 1.5M (1 L).

3. Hidratar a membrana de NYLON MSI em 200mL H<sub>2</sub>O destilada, transferir para SSC 2X por 2 min.

Montar o "SOUTHERN BLOT" como segue:



5. Deixar transferindo por 24 h.

6. Visualizar a transferência do DNA na membrana com lâmpada UV.

7. Lavar a membrana em SSC 2X por 5 min.

8. Imobilizar o DNA na membrana.

10. Hibridar ou armazenar a 4 °C entre folhas de

papel de filtro e dentro de saco plástico.

Soluções para a transferência do DNA para membrana

#### Desnaturação (0.4M NaOH, 0.5M NaCl):

ESTOQUES	1000 mL
NaOH	16.00g
NaCl	35.04g

#### Neutralização (0.5M TRIS pH 7.5, 1.5M NaCl):

ESTOQUES	1000 mL
TRIS	60.50g
NaCl	87.60g
HCl	25.00mL

**SSC 20X (3M NaCl, 0.3M citrato de sódio):**

<b>ESTOQUES</b>	<b>1000 mL</b>
NaCl	175.30g
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O	88.20g

Obs.: Ajustar pH para 7.0

**Tampão de transferência (1M ac. amônio, 20mM NaOH):**

<b>ESTOQUES</b>	<b>1000 mL</b>
Acetato de amônio	77.08g
Hidróxido de sódio	0.80g

**SSPE 5X:**

<b>ESTOQUES</b>	<b>1000 mL</b>
NaCl	43.50g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	6.90g
EDTA	1.85g

Obs.: Ajustar pH para 7.4

## Conclusão

O protocolo de transformação genética de milho, apresentado nesta circular técnica, foi desenvolvido na Embrapa Milho e Sorgo e tem sido utilizado com sucesso para a transformação genética da linhagem elite de milho tropical L3.

## Referências

- AN, G.; MITRA, A.; HONG, K. C.; COSTA, M. A.; AN, K.; THORNBURG, R. W.; RYAN, C. A. Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. **Plant Cell**, Rockville, v. 1, p. 115-122, 1989.
- ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, New York, v. 164, n. 2, p. 207-214, 1985.
- ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. L. Development and availability of germplasm with high type II culture formation response. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v. 65, p. 92-93, 1991.
- BEVAN, M. W. Binary *Agrobacterium tumefaciens* Vectors for plant transformation. **Nucleic Acids Research**, London, v. 12, p. 8711-8721, 1984.
- BOHOROVA, N. E.; LUNA, B.; BRITO, R. M.; HUERTA, L. D.; HOISINGTON, D. A. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude, and highland maize inbreds. **Maydica**, Bergamo, v. 40, p. 275-281, 1995.
- BROWNING, D. F.; BUSBY, S. J. The regulation of bacterial transcription initiation. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 57-65, 2004.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.
- CARVALHO, C. H. S.; BOHOROVA, N. E.; BORDALL, P. N.; ABREU, L. L.; VALICENTE, F. H.; BRESSAN, W.; PAIVA, E. Type-II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, p. 73-76, 1994.
- CHRISTENSEN, A. H.; QUAIL, P. H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. **Transgenic Research**, Philadelphia, v. 5, n. 3, p. 213-218, 1996.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Milho total: 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> safra: Brasil: série histórica de produtividade**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/MilhoTotalSerieHist.xls>>. Acesso em: 17 nov. 2009.
- DE BLOCK, M.; DE BROUWER, D. Two T-DNA's co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium tumefaciens* infection are mainly integrated at the same locus. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 82, p. 257-263, 1991.
- DE BLOCK, M.; DE BROUWER, D.; TENNING, P. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 91, p. 694-701, 1989.
- DEPICKER, A.; STACHEL, S.; DHAESE, P.; ZAMBRYSHI, P.; GOODMAN, H. M. Nopaline synthase, transcript mapping and DNA sequence. **Journal of Molecular and Applied Genetics**, v. 1, p. 561-573, 1982.
- FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R. K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T. M.; PEGG, E. K.; LI, B.; NETTLETON, D. S.; PEI, D.; WANG, K. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 129, p. 13-22, 2002.
- GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 1, p. 16-37, 2003.
- GORDON-KAMM, W.; DILKES, B. P.; LOWE, K.; HOESTER, G.; SUN, X.; ROSS, M.; CHURCH, L.; BUNDE, C.; FARREL, J.; HILL, P.; MADDOCK, S.; SNYDER, J.; SYKES, L.; LI, Z.;

- WOO, Y.; BIDNEY, D.; LARKINS, B. A. Stimulation of the cell cycle and maize transformation by disruption of the plant retinoblastoma pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 18, p. 11975-11980, 2002.
- 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 JR, W. R.; WILLETTS, N. G.; RICHE, T. B.; MACKEY, C. J.; KRUEGER, R. W.; KAUSCH, A. P.; LEMAUX, P. G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 2, p. 603-618, 1990.
- GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. L. Plant regeneration from tissue cultures of maize. **Crop Science**, Madison, v. 15, p. 417-421, 1975.
- HELLENS, R.; MULLINEAUX, P.; KLEE, H. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, n. 10, p. 446-451, 2000.
- HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHO, T. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of boundaries of the T-DNA. **Plant Journal**, Oxford, v. 6, p. 271-282, 1994.
- HOEKEMA, A.; HIRSCH, P. R.; HOOYKAAS, P. J. J.; SCHILPEROORT, R. A. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, London, v. 303, p. 179-180, 1983.
- HUANG, X.; WEI, Z. Successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of maize elite inbred lines. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 83, n. 2, p. 187-200, 2005.
- IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 10 nov. 2009.
- ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1614-1621, 2007.
- ISHIDA, V.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 6, p. 745-750, 1996.
- KOMARI, T. Transformation of callus cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. **Plant Cell Reports**, New York, v. 9, p. 303-306, 1990.
- LEE, L. Y.; GELVIN, S. B. T-DNA binary vectors and systems. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 146, p. 325-332, 2008.
- LESSARD, P. A.; KULAVEERASINGAM, H.; YORK, G. M.; STRONG, A.; SINSKEY, A. J. Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. **Metabolic Engineering**, v. 4, p. 67-79, 2002.
- LIU, D. Design of gene constructs for transgenic maize. In: SCOTT, M. P. (Ed.). **Methods in molecular biology: transgenic maize**. Totowa: Humana Press, 2009. v. 526, p. 3-20.
- McCREERY, T.; HELENTJARIS, T. Production of hybridization probes by the PCR utilizing digoxigenin-modified nucleotides. In: ISSAC, P. (Ed.). **Protocols for nucleic acid analysis by nonradiocative techniques**. Totowa: Humana Press, 1994a. p. 107-112.
- McCREERY, T.; HELENTJARIS, T. Hybridization of digoxigenin labeled probes to Southern blots and detection by chemiluminescence. In: ISSAC, P. (Ed.). **Protocols for nucleic acid analysis by nonradiocative techniques**. Totowa: Humana Press, 1994b. p. 112-117.
- PARENTONI, S. N.; SOUZA JÚNIOR, C. L. de. Phosphorus acquisition and internal utilization efficiency in tropical maize genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 893-901, 2008.
- PETRILLO, C. P.; CARNEIRO, N. P.; PURCINO, A. A. C.; CARVALHO, C. H. S.; ALVES, J. D.;

CARNEIRO, A. A. Otimização dos parâmetros de bombardeamento de partículas para a transformação genética de linhagens brasileiras de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 3, p. 371-378, 2008.

PHILLIPS, R. L.; SOMERS, D. A.; HIBBERD, K. A. Cell/tissue culture and *in vitro* manipulation. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. (Ed.). **Corn and corn improvement**. 3. ed. Madison: American Society Agronomy: Crop Science Society of America: Soil Science Society of America, 1988. p. 345-387. (Monograph, 18).

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

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Genótipos de milho com alta capacidade para embriogênese somática e regeneração de plantas obtidos a partir de calos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 717-722, 2000.

SCHAFFER, W.; GORZ, A.; GUNTER, K. T-DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, v. 327, p. 529-532, 1987.

TOMES, D. T.; SMITH, O. S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 70, p. 505-509, 1985.

TZIFIRA, T.; CITOVSKEY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, p. 147-154, 2006.

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

WANG, K.; FRAME, B. Maize transformation. In: CURTIS, I. S. (Ed.). **Transgenic crops of world: essential protocols**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 45-62.

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

### Circular Técnica, 132



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
Embrapa Milho e Sorgo  
Endereço: Rod. MG 424 Km 45 Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
Fone: (31) 3027 1100  
Fax: (31) 3027 1188  
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

1a edição  
1a impressão (2009): 200 exemplares

### Comitê de Publicações

Presidente: Antônio Álvaro Corsetti Purcino  
Secretário-Executivo: Flávia Cristina dos Santos  
Membros: Elena Charlotte Landau, Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana e Clenio Araujo

### Expediente

Revisão de texto: Clenio Araujo  
Normalização Bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro  
Editoração eletrônica: Comuniquê Comunicação