

ISSN 1678-9644
Setembro, 2014

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Arroz e Feijão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 300

Transformação genética de arroz (*Oryza sativa* L.) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*: conceitos básicos e protocolo

Rosângela Bevitori

Embrapa Arroz e Feijão
Santo Antônio de Goiás, GO
2014

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão

Rod. GO 462, Km 12, Zona Rural
Caixa Postal 179
75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO
Fone: (62) 3533-2110
Fax: (62) 3533-2100
www.embrapa.br/arroz-e-feijao

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Pedro Marques da Silveira*
Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*
Membros: *Camilla Souza de Oliveira*
Luciene Frões Camarano de Oliveira
Flávia Rabelo Barbosa Moreira
Ana Lúcia Delalibera de Faria
Heloisa Célis Breseghello
Márcia Gonzaga de Castro Oliveira
Fábio Fernandes Nolêto

Supervisão editorial: *Luiz Roberto Rocha da Silva*
Revisão de texto: *Camilla Souza de Oliveira*
Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*
Tratamento de ilustrações: *Fabiano Severino*
Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1ª edição

Versão online (2014)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Arroz e Feijão

Bevitori, Rosângela.

Transformação genética de arroz (*Oryza sativa* L.) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* : conceitos básicos e protocolo / Rosângela Bevitori. - Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2014.

40 p. - (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 ; 300)

1. Arroz –Engenharia genética. 2. Arroz – Planta transgênica. I. Título. II. Embrapa Arroz e Feijão. III. Série.

CDD 633.18233 (21. ed.)

© Embrapa 2014

Autores

Rosângela Bevitori

Engenheira-agrônoma, Ph.D. em Agronomia,
pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão,
Santo Antônio de Goiás, GO,
rosangela.bevitori@embrapa.br

Apresentação

Com este trabalho, objetiva-se apresentar noções e conceitos gerais da transformação genética do arroz mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Na elaboração deste documento, procurou-se condensar de forma simples as bases teóricas e os princípios técnicos da transformação de plantas e aplicação prática da metodologia no desenvolvimento de arroz transgênico. Espera-se proporcionar ao leitor o entendimento sobre esse assunto e motivar a pesquisa genética nesta planta que é, ao mesmo tempo, uma importante cultura agrícola e um modelo biológico para as gramíneas.

Flávio Breseghello

Chefe-Geral da Embrapa Arroz e Feijão

Sumário

Introdução	9
Transformação genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> no ambiente natural.....	10
Transformação genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>in vitro</i>	14
Principais etapas envolvidas no desenvolvimento de culturas (GM)	15
Interpretação do mapa de um vetor	16
Protocolo de transformação de arroz.....	21
Identificação das linhagens transgênicas	28
Arroz transgênico comercial	30
Apêndices	30
Apêndice 1. Composição do meio de cultura AB para crescimento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
Apêndice 2. Composição dos meios de cultura para transformação genética.....	31
Apêndice 3. Componentes das soluções estoques do meio R2-Básico	32
Apêndice 4. Outras soluções estoques.....	32
Apêndice 5. Resolução de problemas.....	33
Referências	34

Transformação genética de arroz (*Oryza sativa* L.) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*: conceitos básicos e protocolo

Rosângela Bevitori

Introdução

O arroz, além de sua importância econômica no Brasil e no mundo, destaca-se também por ser planta modelo para estudos moleculares da família Poaceae (DEVOS; GALE, 2000), devido ao pequeno tamanho de seu genoma de 430 Mpb (ARUMUGANATHAN; EARLE, 1991), facilidade na manipulação genética e molecular, similaridade genômica com outras monocotiledôneas, ampla disponibilidade de ESTs (Expressed Sequence Tags), disponibilidade de acesso a sequências genômicas e mapa molecular saturado (GALE; DEVOS, 1998).

O início dos anos 80 foi marcado pela obtenção de plantas geneticamente modificadas (GM) utilizando um veículo natural – a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. Essa bactéria, que causa a doença galhada-coroa em diversas dicotiledôneas, é capaz de transferir um pequeno fragmento de DNA (T-DNA) de seu plasmídeo Ti (*tumor inducing*) para as células vegetais provocando proliferações anormais destas células.

Nos anos 90, a transformação de arroz via *A. tumefaciens* alcançou importante sucesso quando Chan et al. (1993) obtiveram as primeiras plantas transgênicas de arroz, porém foi Hiei et al. (1994) que estabeleceram o primeiro método confiável e reproduzível de transformação mediada por *A. tumefaciens* a partir de sementes

maduras da cultivar Nipponbare, considerada cultivar modelo de arroz japônica. Desde então, um grande progresso tem sido feito na área de transformação de arroz mediada por *A. tumefaciens*. A partir de Hiei et al. (1994) diversos protocolos foram modificados para diferentes genótipos e subespécies de arroz em vários laboratórios do mundo, utilizando principalmente sementes maduras e imaturas (HIEI; KOMARI, 2008; HIEI et al., 1997; RASHID et al., 1996; SEIICHI et al., 2006).

No entanto, a aplicação da transgenia é altamente dependente de um protocolo de cultura de tecidos eficiente para induzir calos embriogênicos em meios de cultivo, além de genótipos com alta capacidade de indução de calos e de regeneração das plantas. Assim, é amplamente relevante conduzir estudos para aperfeiçoar esses fatores de forma que um sistema eficiente de cultura *in vitro* de arroz seja estabelecido antes de sua utilização como uma ferramenta da transformação genética e estudo de função de genes, que são processos mais complexos.

Transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* no ambiente natural

A bactéria de solo *A. tumefaciens* tem a habilidade natural de transferir DNA para uma planta hospedeira através de um ferimento. No ambiente natural, ao integrar o seu DNA no genoma da planta, inicia-se um processo de proliferação anormal de células no hospedeiro, causando assim um tumor, conhecido como galha-da-coroa. A bactéria em questão tem a capacidade de fazer com que a planta hospedeira sintetize substâncias que não são necessárias a ela, mas que são fundamentais para o crescimento da bactéria. Esse mecanismo, aparentemente simples, envolve complexas reações moleculares tais como sinalização molecular, transporte de DNA entre células e integração de DNA da bactéria na célula do hospedeiro.

A *A. tumefaciens* selvagem contém um plasmídeo (DNA extracromossomal circular) denominado indutor de tumor (Ti) (Figura 1), que carrega dois componentes genéticos que estão envolvidos diretamente no processo de indução tumoral: regiões T-DNA e *vir* (virulência) (GELVIN, 2003; ZUPAN et al., 2000).

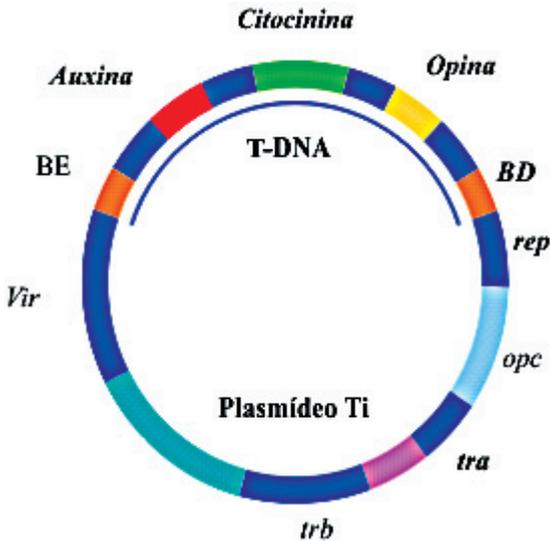


Figura 1. Representação esquemática da organização de um plasmídeo Ti. *vir*: região de virulência contendo os genes que codificam para a expressão de produtos responsáveis pelo processo de exportação do T-DNA; *rep*: região de replicação do plasmídeo; *opc*: genes que codificam a síntese e catabolismo de opinas; BE: borda esquerda; BD: borda direita; T-DNA: região de transferência contendo os genes que codificam auxina e citocinina; *tra* e *trb*: originam produtos que mediam a transferência conjugacional do plasmídeo Ti para outras espécies compatíveis de *Agrobacterium*.

Fonte: adaptado de Zhu et al. (2000).

A organização estrutural do plasmídeo Ti ocorre da seguinte forma:

T-DNA: corresponde ao segmento de DNA transferido para a célula vegetal que carrega os genes envolvidos na produção dos reguladores de crescimento vegetais auxina e citocinina, denominados oncogenes. O T-DNA carrega também os genes que codificam para a síntese de enzimas e os envolvidos na biossíntese de opinas, que são aminoácidos ou carboidratos modificados que a *Agrobacterium* utiliza como fonte de nutrientes, mas não tem a capacidade de produzi-los. Após a inserção do T-DNA, as opinas passam a ser sintetizadas pela planta e utilizadas pelas bactérias.

Outra característica do T-DNA é que ele é delimitado por sequências repetidas de 25 pares de base (pb), conhecidas como extremidades direita e esquerda que são transferidas para a célula da planta. O T-DNA é integrado no genoma e é replicado pelo sistema de transcrição da planta (GELVIN, 2003). A expressão dos genes envolvidos na síntese de auxina e citocinina na planta hospedeira é que interfere no balanço hormonal das células transformadas, resultando na multiplicação celular descontrolada, levando à formação da galha ou tumor, nos pontos infetados da planta (TZFIRA et al., 2004; ZUPAN et al., 2000). Quanto mais as células se dividem, mais elas produzem opinas que vão sendo utilizadas pela *Agrobacterium* (BINNS et al., 1992; HOOYKAAS; BEIJERSBERGEN, 1994).

Região *vir* ou região de virulência: contém de 30-40 genes envolvidos na síntese de proteínas responsáveis pelo processo de transferência do T-DNA (STACHEL; NESTER, 1986). Essa região é necessária para o desencadeamento do processo de transferência da região-T para a célula da planta. Quando um ferimento ocorre, as células das plantas hospedeiras secretam moléculas de baixo peso molecular tais como os compostos fenólicos acetosiringona e hidroxí-acetosiringona, e açúcares envolvidos na síntese da parede celular. Estes são reconhecidos pela *Agrobacterium* e estimulam e ativam os vários genes *vir*.

Além das regiões T-DNA e *vir* é necessário também a atuação de genes de virulência *chv* presentes no cromossomo da *Agrobacterium* para ocorrer a transferência do T-DNA. Estes genes estão envolvidos na colonização das células vegetais e incluem *chvA*, *chvB*, *pscA* (ou *exoC*), *att*, *chvD*, *chvE*, *miaA*, *ros*, *chvG*, *chvI* e *acvB*.

O reconhecimento e a infecção da planta hospedeira pela *A. tumefaciens* é um processo molecular complexo e acontece em várias etapas. Resumidamente, e de forma bem simplificada, tudo começa quando a planta hospedeira da *Agrobacterium* apresenta um corte. A ferida das plantas hospedeiras exsuda metabólitos (fenólicos, aminoácidos e monossacarídeos) que são detectados pela *Agrobacterium* por quimiotactismo.

As bactérias são então atraídas ao local de infecção e se ligam à célula da planta, e logo após, a expressão de duas proteínas da região *vir*, VirA (proteína sensora) e VirG (ativador transcricional para outros genes *vir*), são induzidas em resposta aos estímulos químicos, iniciando assim o processo de transferência da região T-DNA.

Uma vez que outros genes *vir* são ativados por VirG, os complexos protéicos VirD1 e VirD2 se ligam às bordas direita e esquerda e cortam uma fita simples do T-DNA do plasmídeo (DAFNY-YELIN et al., 2008; TZFIRA et al., 2004). Por sua vez, a proteína VirE2 muda sua conformação de modo a se ligar e revestir a fita simples, protegendo-a contra nucleases da planta.

O T-DNA é transportado da célula bacteriana para dentro da célula da planta por um mecanismo denominado Sistema Secretório Tipo IV, no qual várias proteínas Vir parecem formar uma estrutura semelhante a um poro que permite a passagem da fita simples através das células dos diferentes organismos. Assim, a fita simples de DNA, ainda associada a proteínas, é direcionada para o núcleo e integrada, de forma estável, ao genoma da planta (GELVIN, 2003).

Uma vez no interior do genoma do hospedeiro, a fita simples de DNA é replicada como qualquer outro gene na célula hospedeira (GELVIN, 2003). A fita simples de DNA inserida no genoma da planta contém os genes que codificam para a biossíntese de auxinas e de citocininas, que estimulam contínuas divisões celulares, originando o tumor.

Existem outras três regiões presentes no plasmídeo Ti (Figura 1), porém essas não estão envolvidas diretamente no processo de indução do tumor: (1) região de replicação (região *rep*), que contém a origem de replicação e funções ligadas à manutenção do plasmídeo Ti dentro da *Agrobacterium* (estabilidade), controle do número de cópias e incompatibilidade entre bactérias; (2) região de absorção e catabolismo de opinas (região *opc*), envolvida na síntese de enzimas específicas responsáveis pela absorção das opinas para dentro da célula e posterior catabolismo das mesmas pela bactéria; e (3) região de transferência

conjugativa (regiões *tra* e *trb*), responsável pela transferência conjugativa do plasmídeo Ti entre linhagens de *Agrobacterium* spp. ou para outras bactérias gram-negativas. Existem outros genes e funções no plasmídeo Ti não envolvidas diretamente no processo do desenvolvimento do tumor, porém não serão objeto de discussão nesta publicação.

Uma revisão detalhada sobre o reconhecimento e o método de infecção da *A. tumefaciens* pode ser encontrada em Andrade et al. (2003).

Transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* in vitro

A transferência da informação genética entre a célula de *A. tumefaciens* e a de uma planta, com subsequente integração e expressão no genoma hospedeiro é uma situação única na natureza. Este sistema foi muito pesquisado e ficou demonstrado que qualquer sequência de DNA inserida na região do T-DNA pode ser transferida para uma célula vegetal, tornando este método o mais comumente utilizado para a transformação de plantas. As vantagens gerais desse sobre os outros métodos de transformação são a redução do número de cópias e integração intacta e estável do transgene no genoma da planta (JONES et al., 2005).

Para a utilização deste sistema foi necessário a remoção de parte ou todo T-DNA da *Agrobacterium* para que os oncogenes não causassem tumor nas plantas a serem transformadas. A *Agrobacterium* modificada é denominada desarmada (Figura 2) e seu desenvolvimento foi obtido por recombinação homóloga e por vetores derivados do plasmídeo Ti. A partir daí foram desenvolvidos dois sistemas de vetores para transformação de plantas: cointegrado e binário. No sistema cointegrado, o gene de interesse é clonado em um vetor de expressão, chamado de vetor intermediário. Este vetor não é capaz de se replicar em *Agrobacterium* e é introduzido, por recombinação homóloga obrigatória no T-DNA, tornando-se parte integrante do plasmídeo Ti ou Ri desarmado (BRASILEIRO, 1993). O segundo sistema estabelecido, o

vetor binário, utiliza dois plasmídeos independentes: um vetor contém as extremidades do T-DNA, entre as quais os genes de interesse são clonados. Este vetor é transferido para uma *Agrobacterium* desarmada que contém o plasmídeo Ti, cujos oncogenes foram retirados e a região *vir* mantida. Neste sistema, a *Agrobacterium* carrega os dois vetores independentemente um do outro. Esse sistema é o mais frequentemente utilizado por ser menor e mais fácil de manipular do que o cointegrado.

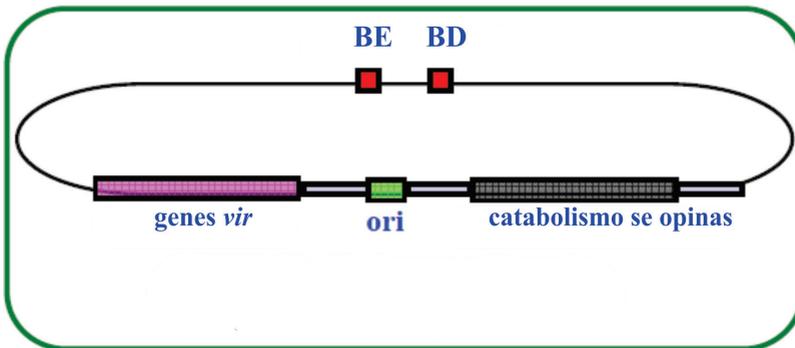


Figura 2. Plasmídeo desarmado com oncogenes removidos. BE: borda esquerda; BD: borda direita; Genes *vir*: genes de virulência; *ori* (ou *rep*): origem de replicação.

Fonte: adaptado de Song e Douches (2009).

Principais etapas envolvidas no desenvolvimento de culturas (GM)

O processo de transformação mediada por *A. tumefaciens* envolve uma série de eventos: (a) o isolamento dos genes de interesse a partir do organismo fonte. O gene é responsável pela característica desejada, por exemplo, tolerância à seca ou resistência a insetos; (b) o desenvolvimento de uma construção gênica funcional, incluindo o gene de interesse e suas sequências regulatórias, e de genes marcadores para facilitar o rastreamento dos genes introduzidos na planta hospedeira e também a seleção das células transformadas; (c) a inserção da construção gênica no plasmídeo vetor; (d) introdução do plasmídeo vetor em *A. tumefaciens*; (e) cultivo da *A. tumefaciens* contendo o vetor com células da planta para permitir a transferência

de T-DNA no cromossoma da planta; (f) a regeneração das células transformadas; e (g) teste para avaliar o desempenho ou expressão do transgene em laboratório, casa de vegetação e campo.

Portanto, os vetores de expressão são muito importantes na engenharia genética, uma vez que vão expressar o produto de um gene. Conhecer o significado e entender as características dos elementos componentes de um vetor é de grande importância para escolher o mais apropriado para ser utilizado nos experimentos de transformação, de forma a otimizar o processo de obtenção de plantas transformadas.

Interpretação do mapa de um vetor

Os vetores, além de terem uma origem de replicação e marcas genéticas de seleção, possuem outras características que lhe conferem a especialização. No caso do vetor para expressão numa célula de planta, deve apresentar elementos genéticos adequados para tal finalidade. Um exemplo é o plasmídeo pCambia (Figura 3), que carrega dois genes de resistência a antibióticos: um fora da região do T-DNA, com um promotor bacteriano para permitir a seleção de bactérias que contêm o plasmídeo; e outro inserido dentro da região T-DNA, controlado por um promotor de planta para permitir a seleção de células vegetais transformadas. Esse vetor ainda contém outros elementos genéticos, que são:

1- ori (ou *rep*): é uma sequência de DNA no plasmídeo que indica a localização para o início da replicação de DNA na célula hospedeira (processo pelo qual novas cópias de DNA são produzidas permitindo que o plasmídeo seja repassado para a próxima geração durante a divisão celular).

pBR322 ori – é a sequência da origem de replicação originária do plasmídeo pBR322 e permite a replicação em *Escherichia coli*, com baixo número de cópias.

pVS1 rep – origem de replicação funcional em *Agrobacterium*, originário do plasmídeo pVS1 de *Pseudomonas aeruginosa*.

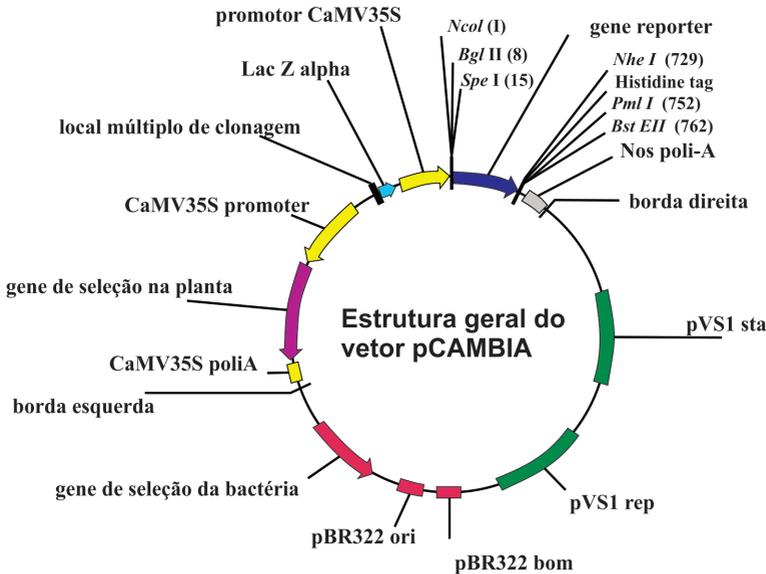


Figura 3. Mapa do vetor pCambia com as principais estruturas.

Fonte: Cambia (2014).

2- Genes marcadores de seleção: codificam uma proteína com atividade enzimática, ou um produto que confere às células transformadas da planta resistência a determinado agente de seleção. Os mais utilizados são os antibióticos e herbicidas. No processo de transformação genética de arroz, eles são adicionados aos meios de cultura para selecionar as células transformadas. As que expressam o gene marcador são capazes de sobreviver e regenerar em meio contendo o agente seletivo.

Os genes marcadores mais utilizados em arroz são:

***npt II*:** também conhecido como *kan* e *neo*, codifica a enzima neomicina fosfotransferase II (NPT II) (BEVAN et al., 1983). Confere resistência a antibióticos aminoglicosídeos, tais como a neomicina, canamicina e gentamicina.

***hpt*:** codifica a enzima higromicina fosfotransferase (HPT) (WALDRON et al., 1985) e confere resistência ao antibiótico higromicina B.

Bar (bialaphos): codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT) (THOMPSON et al., 1987), que elimina a atividade do herbicida glufosinato, permitindo que as células das plantas cresçam em meio de cultivo contendo o herbicida.

3- Genes repórteres: são genes que codificam uma proteína, geralmente com atividade enzimática, que pode ser detectada utilizando-se um ensaio quantitativo. Tais marcadores são usados com uma variedade de finalidades, tal como confirmar a transformação e determinar a sua eficiência.

Em arroz, os genes repórteres mais utilizados são:

uidA ou **gus**: isolado de *E. coli*, este gene codifica a proteína β -glucuronidase (GUS). A presença ou ausência de GUS pode ser detectada utilizando métodos histoquímicos, adicionando-se o substrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indol glucuronídeo) às células transformadas, o qual, na presença da enzima, forma um precipitado azul. Este é o método mais frequentemente usado em plantas, porém o material vegetal é destruído.

gfp: isolado da água-viva *Aequorea victoria* codifica a "green fluorescent protein" (GFP). Esta proteína tem a propriedade de fluorescer quando é excitada por luz azul de comprimento curto ou luz ultravioleta. Permite monitorar a expressão *in vivo*.

4- Local de clonagem múltipla (*multiple cloning site* (MCS) ou *polylinker*): é a região do plasmídeo onde estão as sequências de nucleotídeos que são reconhecidas por diversas enzimas de restrição. Cada enzima tem um único local de corte que gera extremidades compatíveis com o fragmento de DNA a ser inserido na planta, possibilitando a ligação entre as duas moléculas e dando origem ao DNA recombinante a ser utilizado nas transformações genéticas.

5- Promotor: atua como regulador do nível de expressão gênica, ou seja, quando, onde e quanto do produto do gene (proteína) é produzido. Pode interagir com outras sequências regulatórias (*enhancers*) e fatores

de transcrição para determinar a expressão do gene. O sucesso da transformação do arroz depende muitas vezes do promotor (VASIL, 1994). Para expressar o transgene nas células das plantas, sequências apropriadas do promotor tem que ser introduzidas à jusante do gene para assegurar transcrição eficiente do mRNA (FINCH, 1994). Vários promotores para a transformação do arroz foram isolados de monocotiledôneas para uso específico em espécies de cereais, o que aumenta a eficiência da expressão dos transgenes. Na engenharia genética, existem três tipos principais de promotores utilizados, dependendo do nível de expressão gênica e especificidade exigidos.

Promotores constitutivos: são utilizados para expressar o gene em todos os tecidos, independentemente do ambiente circundante e estágio de desenvolvimento do organismo. Tais promotores podem ativar o gene em cada célula viva do organismo, o tempo todo, ao longo da vida do organismo. Exemplos de promotores constitutivos que são comumente utilizados para arroz incluem:

CaMV 35S e seus derivados: são amplamente utilizados desde os anos 90 (CHRISTOU et al., 1991; DONG et al., 1996; HIEI et al., 1994; RASHID et al., 1996). O 35S é um forte promotor constitutivo, tendo um nível de expressão variável entre as diferentes espécies e partes da planta (NILSSON et al., 1996), gerando os mais altos níveis de expressão em plantas dicotiledôneas (VASIL, 1994). No entanto, é menos eficaz em monocotiledôneas (HAUPTMANN et al., 1988).

Actina1: originado do arroz (McELROY et al., 1990), sua utilização tem produzido os mais altos níveis de expressão em monocotiledôneas.

Ubiquitina-1: originado do milho, tem sido amplamente utilizado em cereais (CHRISTENSEN et al., 1992) e, assim como a Actina 1 de arroz, tem produzido altos níveis de expressão em monocotiledôneas.

Promotores tecido-específicos ou estágio específicos de desenvolvimento: são promotores que permitem a expressão do gene somente em determinados tecidos, como por exemplo, na raiz, nas

sementes, ou durante uma determinada etapa do desenvolvimento da planta, tal como no florescimento. Um exemplo de um promotor tecido específico é o fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP), que induz a expressão de genes somente em células que estão ativamente envolvidas na fotossíntese. Ele é utilizado quando se pretende expressar o gene de interesse nas folhas ou parte aérea.

Promotores induzíveis: são ativados por fatores externos como, por exemplo, fatores abióticos (seca, calor, salinidade) ou bióticos (infecção por microrganismos ou ataque de pragas).

Uma vez definidos a construção contendo o gene de interesse, o genótipo e o tipo de explante faz-se necessário escolher a cepa de *A. tumefaciens* adequada para arroz e vetores binários a serem utilizados. A habilidade de uma cepa específica de *Agrobacterium* em transformar as células de uma planta reside nos seus genomas cromossomal e plasmidial, que contêm a maquinária necessária para ligação entre as células de ambos os organismos e a transferência do DNA.

Com respeito à estirpe da *Agrobacterium*, a escolha é baseada na sua resistência cromossomal a antibióticos, nas características apresentadas pelo plasmídeo Ti (Tabela 1) e na capacidade de transformação genética da bactéria. As estirpes mais utilizadas com sucesso na transformação do arroz são a LBA4404, EHA101, EHA105 e AGL1. Parece que a LBA4404 causa menos danos no tecido do que a EH101, enquanto que a eficiência de transformação é a mesma entre as duas estirpes (HOEKEMA et al., 1983; HOOD et al., 1986).

Tabela 1. Estirpes de *A. tumefaciens* com respectivas resistências a antibióticos.

<i>Linhagem</i>	<i>pTi/pRi desarmado</i>	<i>Resistência cromossômica (concentração no meio)</i>	<i>Agente seletivo do plasmídeo Ti</i>
LBA4404	pAL4404	Rifampicina (100 mg/l)	Estreptomicina (300 mg/l)
EHA101	pEHA101	Rifampicina (100 mg/l)	Canamicina (100 mg/l)
EHA105	pEHA105	Rifampicina (100 mg/l)/ ácido nalidixico	Canamicina (100 mg/l) (300 mg/l)
AGL1	pTiBo542ΔT	Rifampicina (100 mg/l) Carbenicilina (100 mg/l)/ácido nalidixico	-

pTi: tumor de indução de *A. tumefaciens*; pRi: tumor de indução de *Agrobacterium rhizogenes*.
Fonte: adaptado de Lacorte e Romano (1998).

Protocolo de transformação de arroz

O processo de infecção por *A. tumefaciens* é dividido em duas fases: em primeiro lugar, um período curto, normalmente de alguns minutos de inoculação através da imersão total dos calos de arroz em uma suspensão de *A. tumefaciens*. Após o descarte da suspensão, os calos são cocultivados durante o período de um a três dias. No processo de cocultivo, os calos de arroz são cultivados simultaneamente com a *A. tumefaciens*, contendo o vetor com o gene a ser introduzido na planta. Nesta fase ocorre a indução dos genes da região *vir* e a transferência do T-DNA para o genoma da planta. Na segunda fase, após o cocultivo, os calos são transferidos para um meio de cultura apropriado contendo um ou mais antibióticos para eliminar a *Agrobacterium*. O meio é também suplementado com um agente de seleção, que identifica as células transformadas, compondo o meio de seleção. Dessa maneira, os calos resistentes ao agente de seleção, seja ele um antibiótico ou herbicida, iniciam o processo de regeneração e são posteriormente transferidos. Uma vez enraizados, as plântulas potencialmente transformadas são aclimatadas e transferidas para casa de vegetação. A análise molecular dessas plantas é necessária para comprovar a integração e a expressão do transgene no genoma da planta, como também para determinar o número de cópias inseridas.

No protocolo de transformação descrito neste documento, são detalhadas as etapas de transformação de arroz. As condições e o tempo de cultivo para atingir as diferentes etapas da obtenção de plantas de arroz transgênicas, a partir da indução de calos (BEVITORI, 2013; SALLAUD et al., 2003) estão ilustrados na Figura 4, e dura entre 142-196 dias. O protocolo utilizado é baseado no trabalho de Sallaud et al. (2003) e tem sido utilizado para transformar as cultivares de arroz Nipponbare (SALLAUD et al., 2003) e BRS Primavera (BEVITORI, 2013; BEVITORI et al., 2014). Os procedimentos, meios de cultivo para indução de calos a partir de sementes maduras de arroz, produção e proliferação de unidades embriogênicas estão descritos também nesta publicação.

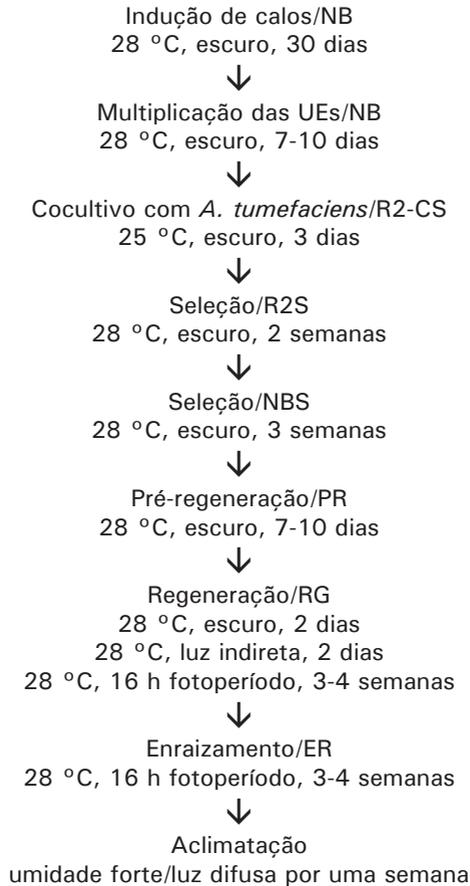


Figura 4. Etapas do processo de transformação de arroz em seus respectivos meios.

Material necessário

Equipamentos de laboratório

- Espectrofotômetro;
- Câmara de fluxo laminar;
- Incubadora com controle de temperatura e agitação orbital;
- Agitador do tipo Vortex.

Material biológico

- Sementes das cultivares de arroz selecionadas, livres de bactérias, fungos e manchas; totalmente desenvolvidas e com embrião intacto (descartar sementes pequenas e murchas);
- Linhagem desarmada de *A. tumefaciens* contendo em seu vetor o gene de interesse.

Meios e outras soluções

Todos os meios são autoclavados. Os antibióticos e hormônios são esterilizados por filtração e adicionados ao meio após a autoclavagem e resfriamento do meio a 50 °C.

Todos os meios são vertidos em placa de Petri 100x15 mm, com exceção dos meios de indução e de regeneração, que são preparados em placas de 100 mm x 20 mm.

- Meio de cultura AB para crescimento de *A. tumefaciens* (Apêndice 1, Tabelas 2 e 3);
- Meios de cultivo para a transformação genética do arroz (Apêndice 2, Tabela 4): NB (indução), NBS (proliferação com seleção), PR (pré-regeneração), RN (regeneração), EN (enraizamento), R2-CL (cocultivo), R2-CS (cocultivo sólido), R2S (seleção);
- Soluções estoques dos meios de cultivo para transformação genética do arroz (Apêndice 3, Tabelas 5-9);
- Soluções estoques: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); 6-benzilaminopurina (BAP), ácido abscísico (ABA), ácido-naftaleno acético (ANA) (1 mg/ml), acetosiringona a 100 mM (Apêndice 4);
- Soluções estoques dos antibióticos e dos agentes seletivos apropriados.

Outros materiais

- Placas de Petri de 100x20 mm e 100x15 mm;
- Filme plástico do tipo Parafilm® M;
- Papel de filtro esterilizado em placas de Petri;
- Pinças e alça de platina;
- Tubos para micro centrífuga de 1,5 mL;
- Tubos cônicos para centrífuga (tipo Falcon) de 50 mL;
- Mistura solo: vermiculita (1:1) esterilizada;
- Filtro de esterilização 0,02 micra;
- Seringas de 5 ou 10 ml;
- Espátulas.

Metodologia

a) Preparação das unidades embriogênicas (UEs)

Descascar e desinfestar sementes maduras da cultivar selecionada (BEVITORI, 2013). Com a ajuda de uma pinça estéril, transferir as sementes para placas de Petri contendo o meio NB suplementado com 2,4-D. Após 30 dias no escuro a 28 °C, as UEs derivadas do embrião imaturo são utilizadas para a transformação genética.

Notas:

1- Depois de 30 dias, vários tipos de UEs são formadas. As UEs que não forem friáveis e não embriogênicas são descartadas. Um calo embriogênico é reconhecido pela superfície homogênea da epiderme e uma morfologia não compacta, o que faz com que sejam soltos facilmente com a ajuda de uma pinça. Estas UEs podem ser subcultivadas para gerar mais calos, porém calos com mais de quatro meses são considerados velhos e tem reduzida capacidade de regeneração. Recomenda-se fazer apenas um subcultivo.

2- As UEs devem ser selecionadas para o cocultivo com base nos critérios que garantam aos explantes um estado fisiológico ótimo para a transformação, como o tamanho entre 3-5 mm, o formato esférico, a cor creme, sendo ainda compactos, firmes e resistentes à pressão da pinça (Figura 5A). Esta seleção deve ser realizada antes da preparação da suspensão de *Agrobacterium*, ou seja, no dia do cocultivo. Duzentas unidades embriogênicas por construção gênica são suficientes.

b) Preparação das células de *A. tumefaciens* para inoculação

Iniciar a preparação das células da linhagem de *A. tumefaciens* a ser utilizada quatro dias antes do cocultivo. Para isto, adicionar 1 ml da linhagem estocada a -80 °C a 50 ml de LB contendo os antibióticos apropriados e incubar a 28 °C por aproximadamente 12-16 h, a uma frequência de agitação entre 120-150 rpm. Posteriormente, colocar 200 μ l desta suspensão numa placa de Petri contendo meio AB e espalhar com seis a oito esferas de metal estéreis para formar uma pasta viscosa por toda superfície do meio. Incubar a 28 °C por três dias (recomenda-se fazer duas placas por construção a ser utilizada). Toda esta pasta será necessária para fazer a suspensão a ser utilizada no cocultivo da *A. tumefaciens* com os calos.

c) Cocultivo das UEs com *A. tumefaciens*

A pasta viscosa formada no item **b** é coletada com uma espátula autoclavada e transferida para um tubo cônico tipo Falcon contendo 30 ml de **R2-CL**. A suspensão bacteriana deve ser agitada em agitador tipo Vortex e uma alíquota de 1 ml deve ser coletada para determinar a absorbância a 600 nm, que deve ser ajustada para uma A_{600} de 0,8.

Em seguida, deve-se transferir 25 ml da suspensão diluída para placa de Petri (100x15 mm). As UEs são imersas nessa suspensão por 15 minutos, sob agitação manual. Paralelamente, 50 UEs controle deverão ser cocultivadas em meio **R2-CC** sem *Agrobacterium* (controles de regeneração e de transformação).

Depois deve-se transferir as UEs para papel de filtro autoclavado e rolá-las gentilmente para retirar o excesso da suspensão bacteriana. Inocular 10 UEs em meio **R2-CC** em placas de Petri de 100x15 mm, selar com Parafilm® e incubar por três dias no escuro, a 25 °C.

Notas:

1- A transferência do T-DNA da *Agrobacterium* para as células das plantas ocorre na etapa de cocultivo.

2- A secagem das UEs é um ponto crítico para evitar o redesenvolvimento da *Agrobacterium*. Condensação e umidade excessivas no interior da placa devem também ser evitadas durante o cocultivo.

3- A acetosiringona não é produzida pelas monocotiledôneas e por isto deve ser adicionada ao meio. Para não haver degradação da acetosiringona pelo calor, adicionar a mesma quando o meio, após a autoclavagem, atingir 50 °C. O pH baixo também favorece a infecção da *Agrobacterium* na planta.

d) Seleção de calos embriogênicos potencialmente transgênicos

Transferir 10 UEs para meio de seleção **R2S** em placas de Petri (100x20 mm), contendo antibióticos para inibir o crescimento da *Agrobacterium* e o agente de seleção apropriado. As UEs contaminadas devem ser descartadas e as não-contaminadas devem ser transferidas para meio fresco **R2S**. Selar as placas com Parafilm® e incubar no escuro a 27-28 °C, por duas semanas.

Notas:

1- Depois do cocultivo, o crescimento da *Agrobacterium* tem que ser inibido para permitir o crescimento dos calos transformados. Para isto, o meio é suplementado com os antibióticos apropriados para este fim.

2- É muito importante flambar as pinças após pegar cada calo para evitar contaminação entre calos. Depois de duas semanas, alguns calos irão ficar necrosados e outros estarão contaminados com *A. tumefaciens*. Estes calos devem ser eliminados e os calos não necrosados e não contaminados devem ser transferidos para meio fresco **R2S**.

Posteriormente, transferir as UEs para meio **NBS** contendo os antibióticos e o agente de seleção apropriados, e cultivá-las no escuro, a 27-28 °C. Uma a duas semanas depois, várias UEs deverão necrosar, enquanto outras formarão pequenas unidades globulares e esbranquiçadas que proliferarão ao redor das UEs (Figura 5B). Estas unidades são consideradas potencialmente transgênicas.

Após esse período, retirar os calos proliferados ao redor de cada UE e transferi-los para novo meio **NBS** contendo os antibióticos e o agente de seleção apropriados. As unidades globulares provenientes da mesma UE devem ser mantidas próximas à UE de origem, potencialmente oriundas de um mesmo evento de transformação. Incubar as unidades globulares no escuro, a 27-28 °C, por sete dias.

e) Maturação dos calos selecionados

Selecionar as unidades globulares embriogênicas, obtidas no meio **NBS**, e transferi-las para meio **PR** contendo os antibióticos e o agente de seleção apropriados, em placa de 100x20 mm. Incubar no escuro, a 27-28 °C, por uma semana.

f) Regeneração de desenvolvimento das plântulas

Selecionar as unidades globulares embriogênicas potencialmente transgênicas do meio **PR** e transferir para o meio **RG** contendo os antibióticos e o agente de seleção apropriado, com uma densidade de quatro a cinco unidades por placa de 100x20 mm. Incubar as placas por dois dias no escuro a 27-28 °C, posteriormente por mais dois dias à luz ambiente. Finalmente transferir para luz direta por três a quatro semanas, quando as unidades embriogênicas tornam-se verdes e se diferenciam em brotos (Figura 5C).

Nota: Após a transferência para meio RG, a manutenção da pressão seletiva do antibiótico é opcional e dependente do genótipo de arroz. No caso das cultivares Nipponbare e BRS Primavera, a pressão seletiva deve ser mantida.

g) Enraizamento e aclimação das plântulas transgênicas

Após atingirem aproximadamente 2 cm de altura, separar cuidadosamente os brotos do tecido original e transferi-los para tubo de ensaio contendo 25 ml de meio MS, suplementado com sacarose 5% (p/v) e Phytigel™ 0,3% (p/v). Cultivar as plântulas (Figura 5D) por três a quatro semanas em fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27-28 °C. Após esse período, as plântulas estarão enraizadas e devem ser transferidas para copos plásticos furados, contendo a mistura de solo e vermiculita (1:1). Manter em casa de vegetação em condições de alta umidade e baixa intensidade de luz por duas semanas. Após este período, retirar as plantas do sistema de aclimação e transferir para vasos grandes com solo.

Na Tabela 10 são apresentados os problemas mais comuns que podem ocorrer durante o procedimento de transformação e regeneração das plantas de arroz, com as possíveis razões e soluções dos problemas.

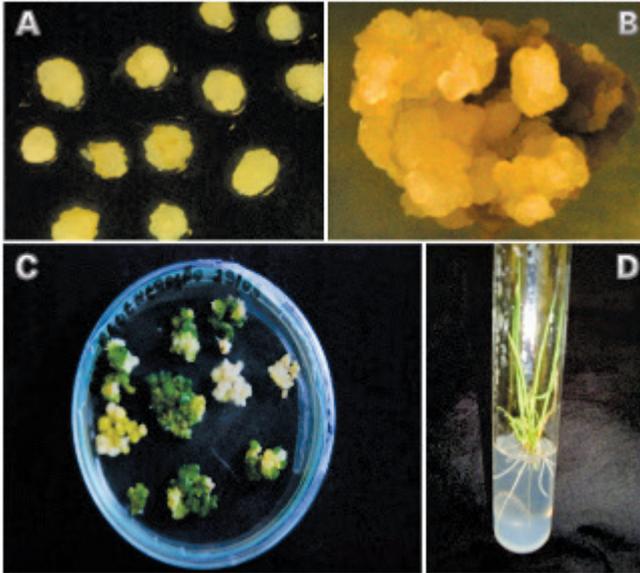


Figura 5. Passos da transformação genética de arroz. **A:** UEs provenientes de calos derivados de sementes maduras da cultivar BRS Primavera, com tamanho e forma adequados para transformação com *A. tumefaciens*; **B:** desenvolvimento de calos resistentes ao agente de seleção higromicina; **C:** regeneração e **D:** enraizamento de plântulas provenientes dos calos resistentes ao agente de seleção.

Identificação das linhagens transgênicas

Após a obtenção das plantas geneticamente modificadas (GM), a caracterização molecular é uma etapa importante para a identificação das linhagens transgênicas, que poderão servir como linhagem parental nos programas de melhoramento. Na avaliação molecular, são conduzidos ensaios de caracterização da construção gênica introduzida na espécie receptora, com respeito à sequência do gene introduzido e presença de genes marcadores.

Estas análises podem ser realizadas para detectar DNA, RNA mensageiro (mRNA), proteína ou metabólito utilizando metodologias como a PCR convencional (*Polymerase Chain Reaction*) para detecção do transgene no genoma da planta, ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para ensaios imunológicos ou bioensaio com herbicidas, que permite a caracterização fenotípica, dentre outros.

a) Identificação de plantas geneticamente modificadas por PCR

A PCR é um método de amplificação de uma sequência específica de DNA. Este método baseia-se na amplificação de um fragmento de DNA específico do transgene, seja da região promotora, da região terminadora, do gene marcador ou algum segmento de DNA exógeno a ele associado (SAIKI et al., 1988). Nenhuma amplificação ocorre se o DNA alvo (transgene) não estiver presente. Portanto, as plantas positivas são aquelas que apresentam a banda com número de pares de base esperado (relativo ao tamanho da sequência específica amplificada).

A análise da integração do transgene no genoma da planta potencialmente transgênica, utilizando a PCR, é qualitativa, ou seja, não dá informação sobre a quantidade do alvo que está sendo amplificado.

b) Número de cópias do transgene inserido no genoma da planta

O número de cópias do transgene inserido no genoma é um critério importante para determinar a qualidade de eventos transgênicos. É desejável que as plantas transgênicas tenham apenas uma única cópia integrada ao genoma para que a expressão do gene inserido seja estável, além de facilitar o acompanhamento do transgene em programas de melhoramento. Plantas GM que apresentam múltiplas cópias integradas ao seu genoma podem ter o gene silenciado por mecanismos de silenciamento gênico pós transcricional (VAUCHERET et al., 1998) ou apresentarem maiores dificuldades no desenvolvimento de variedades comerciais geneticamente estáveis.

A quantificação do número de cópias do transgene no genoma da planta transformada pode ser realizada utilizando as metodologias de *Southern blotting* ou PCR em Tempo Real (RT-qPCR). Atualmente, o RT-qPCR é a metodologia mais utilizada. Embora seja uma técnica de custo elevado, seus resultados são mais precisos (ARTICO et al., 2010; BUSTIN et al., 2005, 2009). A RT-qPCR combina a metodologia de PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência.

c) Análise da expressão do transgene

Existem diversas metodologias para a análise da expressão gênica: *Northern blot*, ensaio de proteção de ribonuclease (RPA - *Ribonuclease Protection Assay*), microarranjos de DNA, *differential display* e RT'qPCR.

Arroz transgênico comercial

O arroz vem sendo modificado geneticamente com vários objetivos, como para adquirir resistência a insetos, aumentar o valor nutricional, e tolerância à seca. Com respeito à resistência a insetos, destaca-se o arroz Bt, que foi modificado para expressar o gene *cry1A(b)* da bactéria *Bacillus thuringiensis* que confere resistência a vários insetos inclusive à broca-do-arroz (CHENG et al., 1998; TU et al., 2000). O Irã foi o primeiro país a aprovar comercialmente o plantio de arroz Bt, tendo plantado quatro milhões de hectares no ano de 2005 (http://www.gmo-compass.org/eng/agri_biotechnology/gmo_planting/194.docu.html). A China, em 2009, autorizou a comercialização do arroz Bt, e testes de campo iniciados em 2010 (WALTZ, 2010) ainda estão em andamento (JAMES, 2011).

Quanto ao valor nutricional, o arroz foi modificado para aumentar o teor de vitamina A. O "Golden Rice", ou arroz dourado, foi desenvolvido pelo Dr. Ingo Potrykus e seu grupo (YE et al., 2000). Atualmente a companhia Syngenta mantém os direitos de distribuição comercial do arroz dourado. Espera-se aprovação de seu cultivo comercial nas Filipinas em 2013/2014 (JAMES, 2011). Países como China, Vietnam e Bangladesh estão avaliando o produto com vista à implementação comercial desde 2011 (JAMES, 2012).

Apêndices

Apêndice 1. Composição do meio de cultura AB para crescimento de *Agrobacterium tumefaciens*

Para preparar um litro de meio AB, adicionar a 900 ml de água bidestilada 5 g de glicose, 15 g de agar, 50 ml do tampão AB (Tabela 3) e 50 ml dos sais AB (Tabela 4). Após autoclavar, adicionar os antibióticos apropriados quando o meio estiver a 50°C. Verter em placas de Petri.

Tabela 2. Estoque do Tampão AB (20X).

Componentes	Concentração
K ₂ HPO ₄	60 g/l
NaH ₂ PO ₄	20 g/l

Autoclavar.

Tabela 3. Estoque dos sais AB (20X).

Componentes	Concentração
NH ₄ Cl	20 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O)	6 g/l
KCl	3 g/l
CaCl ₂	0,2 g/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	50 mg/l

Autoclavar.

Apêndice 2. Composição dos meios de cultura para transformação genética

O meio NB Básico é componente dos meios NBS, PR, e RN, descritos na Tabela 4.

O meio R2-Básico é componente dos meios R2-CL, R2-CS e R2S.

Tabela 4. Composição dos meios utilizados para transformação genética por *Agrobacterium*.

Meio NB básico*: 50 ml N6 macronutrientes, 10 ml FeNaEDTA, 10 ml vitaminas B5, 10 ml micronutrientes B5, 500 mg/l prolina, 500 mg/l glutamina, 300 mg/l caseína hidrolisada, 30 g sacarose

Meio de indução NB: NB Básico + 2,5 mg/l 2,4-D, 2.6 g/l Phytigel. pH 5,8

Meio R2 básico: 100 mg/l R2 Macro I, 100 mg/l R2 Macro II, 10 ml/l R2 FeNaEDTA, 1 ml/l R2 Micro, 25 ml/l R2 Vitaminas

R2-CL: R2 Básico + 10 g/l glucose, 2,5 mg/l 2,4-D, 100 μM acetosiringone. pH 5,2

R2-CS: R2- CL + 7 g/l agarose tipo, Adicionar os antibióticos (para eliminar a *Agrobacterium*). pH 5,2

R2S: R2 Básico, 30 g/l sacarose, 2,5 mg/l 2,4-D, 7 g/l agarose tipo 1. Adicionar os antibióticos (para eliminar a *Agrobacterium*). pH 6,0

NBS: NB Básico + 2.5 mg/l 2,4-D, 7 g/l agarose. Adicionar os antibióticos (para eliminar a *Agrobacterium*) e o agente de seleção apropriado. pH 6.0

PR: NB Básico + 2 mg/l BAP, 1 mg/l ANA, 5 mg/l ABA, 7 g/l agarose. Adicionar os antibióticos (para eliminar a *Agrobacterium*) e o agente de seleção apropriado. pH 5.8

RN: NB Básico + 3 mg/l BAP, 0.5 mg/l ANA, 30 g/l sacarose, 4.5 g/l Phytigel. Adicionar o agente de seleção apropriado. pH 5.8

EN**: 100 ml macronutrientes MS (Murashige and Skoog 1962), 20 ml micronutrientes MS, 20 ml FeEDTA, 2,5 ml vitaminas MS, 50 g/l sucrose, 2.6 g/l Phytigel, pH 5.8

* Os componentes da solução estoque do meio NB Básico (N6 macronutrientes, FeNaEDTA, B5 vitaminas e B5 micronutrientes estão descritos em Bevitore (2013) e Sallaud et al. (2003).

** Os componentes de Macro MS, Micro MS, MS-FeEDTA e Vitaminas MS também estão descritos nas mesmas referências acima.

Apêndice 3. Componentes das soluções estoques do meio R2-Básico

Tabela 5. Componentes do R2 Macro I.

<i>Componentes</i>	<i>Concentração (mg/l)</i>
KNO_3	4000
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	330
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	312
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246

Tabela 6. Componentes do R2 Macro II.

<i>Componentes</i>	<i>Concentração (mg/l)</i>
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	146

Tabela 7. Componentes do R2 Micro II.

<i>Componentes</i>	<i>Concentração (mg/l)</i>
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,6
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,2
H_3BO_3	2,83
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,125

Tabela 8. Componentes do R2 FeNaEDTA.

<i>Componentes</i>	<i>Concentração (mg/l)</i>
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	12,5
Na_2EDTA	1,8

Tabela 9. Componentes do R2 Vitaminas.

<i>Componentes</i>	<i>Concentração (mg/l)</i>
Tiamina HCL	1

Apêndice 4. Outras soluções estoques

Acetosiringona (100 mM): adicionar 19,62 mg de acetosiringona a 1 ml de DMSO. Proteger da luz.

2,4-D - ácido 2,4 diclorofenoxiacético - (1 mg/ml): pesar 100 mg de 2,4-D e dissolver em 25 ml de álcool absoluto. Ajustar o volume para 100 ml com água bidestilada. Conservar a 4 °C.

ABA- ácido abscísico (5 mg/ml): pesar 100 mg de ABA, adicionar 2 gotas de KOH 1 N até dissolver o pó, depois ajustar o volume de 20 ml com água bidestilada. Esterilizar por filtração. Proteger da luz.

ANA- ácido naftaleno acético (1 mg/ml): dissolver 100 mg de ANA em 1 ml de etanol absoluto, adicione 3 ml de KOH 1 N e ajustar o volume a 100 ml com água bidestilada.

BAP - 6-benzilaminopurina (1 mg/ml): pesar 100 mg e adicionar 2 gotas de 1 N KOH até a completa dissolução do pó. Depois, ajustar o volume para 100 ml com água bidestilada.

Apêndice 5. Resolução de problemas

Tabela 10. Resolução de possíveis problemas que podem ocorrer durante as diversas etapas do processo de transformação genética.

<i>Etapa</i>	<i>Problema</i>	<i>Possível razão</i>	<i>Solução</i>
Indução de calos	Muitas sementes contaminadas por microrganismos.	Desinfestação inadequada das sementes.	Utilizar sementes sem manchas ou rachaduras. Verificar a concentração de hipoclorito de sódio e álcool utilizada (2% e 70%, respectivamente).
Indução de calos	Contaminação generalizada por microrganismos no meio.	Práticas não estéreis ao verter o meio.	Verter o meio com mãos limpas em álcool. Não deixar as placas abertas por muito tempo após verter o meio.
Indução de calos	Formação de folhas em vez de calos.	Falta de 2,4-D no meio.	Adicionar 2,4-D na concentração 2,5 mg/l.
Indução de calos	Não formação de calos.	Sementes velhas ou dormentes. Desinfestação em álcool ou hipoclorito de sódio por tempo maior que o recomendado.	Utilizar sementes saudáveis de outro lote. Quebrar a dormência das sementes. Verificar a concentração de álcool (70%) e hipoclorito de sódio (2%) e o tempo de imersão das sementes nestas soluções. Enxaguar as sementes por oito vezes com água estéril após a desinfestação das sementes.
Seleção dos calos	Recrescimento de <i>Agrobacterium</i> sob a superfície de muitos calos.	Concentração inadequada de antibióticos que eliminam a <i>Agrobacterium</i> . Incubação prolongada dos calos durante o cocultivo. Adição dos antibióticos que eliminam a <i>Agrobacterium</i> no meio ainda quente.	Verificar a concentração do antibiótico. Lavar os calos após o cocultivo com solução contendo os antibióticos apropriados. Manter os calos em cocultivo por 2-3 dias. Adicionar os antibióticos quando o meio estiver morno (em torno 48-50 °C).
Seleção dos calos	Não proliferação de calos.	Construção gênica incorreta. Falha na infecção por <i>Agrobacterium</i> Agente de seleção inadequado.	Confirmar a construção por sequenciamento. Confirmar se a <i>Agrobacterium</i> contém o plasmídeo. Verificar o agente de seleção e sua concentração. Verificar a composição das soluções estoques utilizadas para preparar o meio.
Regeneração dos calos	Pouca ou nenhuma regeneração.	Composição incorreta do meio. Formação de água dentro das placas.	Verificar a distribuição da temperatura na câmara de crescimento.

Referências

ANDRADE, G. M. de; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n. 5, p. 465-476, set./out. 2003.

ARTICO, S.; NARDELI, S. M.; BRILHANTE, O.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; FERREIRA, M. A. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 49, Mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2923523/pdf/1471-2229-10-49.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 9, n. 3, p. 208-218, Aug. 1991.

BEVAN, M. W.; FLAVELL, R. B.; CHILTON, M. D. A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. **Nature**, London, v. 304, n. 5922, p. 184-187, July 1983.

BEVITORI, R. **Cultivo in vitro do arroz (*Oryza sativa* L.): conceitos básicos e protocolo**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013. 68 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 285).

BEVITORI, R.; POPIELARSKA-KONIECZNA, M.; SANTOS, E. M. dos; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; PETROFEZA, S. Morpho-anatomical characterization of mature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.) suitable for transformation. **Protoplasma**, New York, v. 251, n. 3, p. 545-554, May 2014.

BINNS, A. N.; JOERGER, R. D.; WARD, J. E. *Agrobacterium* and plant cell transformation. In: LEDERBERG, J. (Ed.) **Encyclopedia of microbiology**. San Diego: Academic Press, 1992. p. 37-51.

BRASILEIRO, A. C. M. Biologia de *Agrobacterium* sp. **ABCTP Notícias**, Brasília, DF, n. 20, p. 2-6, 1993.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, B. T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 34, n. 3, p. 597–601, June 2005.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 611–622, Apr. 2009.

CAMBIA. **pCambia vectors**. Disponível em: <http://www.cambia.org/daisy/cambia/585#dsy585_Description>. Acesso em: 15 abr. 2014.

CHAN, M. T.; CHANG, H. H.; HO, S. L.; TONG, W. F.; YU, S. M. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter/beta-glucuronidase gene. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 22, n. 3, p. 491–506, June 1993.

CHENG, X. Y.; SARDANA, R.; KAPLAN, H.; ALTOSAAR, I. *Agrobacterium* transformed rice plants expressing synthetic cryIA(b) and cryIA(c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 6, p. 2767–2772, Mar. 1998.

CHRISTENSEN, A. H.; SHARROCK, R. A.; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 18, n. 4, p. 675–689, Feb. 1992.

CHRISTOU, P.; FORD, T. L.; KOFRON, M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. **Bio-Technology**, New York, v. 9, n. 10, p. 957–962, Oct. 1991.

DAFNY-YELIN, M.; LEVY, A.; TZFIRA, T. The ongoing saga of *Agrobacterium*-host interactions. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 102-105, Mar. 2008.

DEVOS, K. M.; GALE, M. D. Genome relationships: the grass model in current research. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 5, p. 637-646, May 2000.

DONG, J.; TENG, W.; BUCHHOLZ, W. G.; HALL, T. C. *Agrobacterium*-mediated transformation of Javanica rice. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, n. 3, p. 267-276, 1996.

FINCH, R. P. An introduction to molecular technology. In: MARSHALL, G.; WALTERS, D. (Ed.). **Molecular biology in crop protection**. Dordrecht: Chapman and Hall, 1994. p. 1-37.

GALE, M. D.; DEVOS, K. M. Comparative genetics in the grasses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 5, p. 1971-1974, Mar. 1998.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 67, n. 1, p. 16-37, Mar. 2003.

HAUPTMANN, R. M.; ASHRAF, M.; VASIL, V.; HANNAH, L. C.; VASIL, I. K.; FERL, R. J. Promoter strength comparisons of maize shrunken-1, alcohol dehydrogenase-1, and alcohol dehydrogenase-2 promoters in mono- and di-cotyledonous species. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 88, n. 4, p. 1063-1066, Dec. 1988.

HIEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. **Nature Protocols**, London, v. 3, n. 5, p. 824-834, 2008.

HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUBO, T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, n. 1/2, p. 205-218, Sept. 1997.

HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 271-282, Aug. 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, n. 5913, p. 179-180, May 1983.

HOOD, E. E.; HELMER, G. L.; FRALEY, R. T.; CHILTON, M.-D. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 168, n. 3, p. 1291-1301, Dec. 1986.

HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 157-179, 1994.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops: 2011**. Ithaca: ISAAA, 2011. 30 p. (ISAAA. Brief, 43).

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM Crops: 2012**. Ithaca: ISAAA, 2012. 11 p. (ISAAA. Brief, 44).

JONES D. H.; DOHERTY, A.; WU, H. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. **Plant Methods**, v. 1, n. 5, Sept. 2005. Disponível em: <<http://www.plantmethods.com/content/pdf/1746-4811-1-5.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2014.

LACORTE, L.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1998. p. 93-109.

McELROY, D.; ZHANG, W.; CAO, J.; WU, R. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. **Plant Cell**, Rockville, v. 2, n. 2, p. 163-171, Feb. 1990.

NILSSON, O.; LITTLE, C.; SANDBERG, G.; OLSSON, O. Expression of two heterologous promoters, *Agrobacterium rhizogenes* rolC and cauliflower mosaic virus 35S, in the stem of transgenic hybrid aspen plants during the annual cycle of growth and dormancy. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 31, n. 4, p. 887–895, July 1996.

RASHID, H.; YOKOI, S.; TORIYAMA, K.; HINATA, K. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, n. 10, p. 727-730, June 1996.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, n. 4839, p. 487-491, Jan. 1988.

SALLAUD, C.; MEYNARD, D.; VAN BOXTEL, J.; GAY, C.; BES, M.; BRIZARD, J. P.; LARMANDE, P.; ORTEGA, D.; RAYNAL, M.; PORTEFAIX, M.; OUWERKERK, P. B. F.; RUEB, S.; DELSENY, M.; GUIDERDONI, E. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 8, p. 1396–1408, May 2003.

SEIICHI, T.; NAHO, H.; KAZUKO, O.; HARUKO, O.; AKEMI, T.; SEIBI, O.; HIROSHI, T. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. **The Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 6, p. 969-976, Sept. 2006.

STACHEL, S. E.; NESTER, E. W. The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 5, n. 7, p. 1445-1454, July 1986.

SONG, G.-Q.; DOUCHES, D. ***Agrobacterium*-mediated transformation**. Michigan State University. [2009]. Disponível em: <<https://www.msu.edu/course/css/451/Lecture/WK2-PT-Agro%282009%29.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2013.

THOMPSON, C. J.; MOVVA, N. R.; TIZARD, R.; CRAMERI, R.; DAVIES, J. E.; LAUWEREYS, M.; BOTTERMAN, J. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 2519-2523, Sept. 1987.

TU, J.; ZHANG, G. A.; DATTA, K.; XU, C. G.; HE, Y. Q.; ZHANG, Q. F.; KHUSH, G. S.; DATTA, S. K. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, n. 10, p. 1101-1103, Oct. 2000.

TZFIRA, T.; LI, J.; LACROIX, B.; CITOVSKEY, V. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 20, n. 8, p. 375-383, Aug. 2004.

VASIL, I. K. Molecular improvement of cereals. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 25, n. 6, p. 925-937, Sept. 1994.

VAUCHERET, H.; BECLIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J. B.; MOURRAIN, P.; PALAUQUI, J. C.; VERNHETTES, S. Transgene-induced gene silencing in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 651-659, Dec. 1998.

WALDRON, C.; MURPHY, E. B.; ROBERTS, J. L.; GUSTAFSON, G. D.; ARMOUR, S. L.; MALCOLM, S. K. Resistance to hygromycin B - a new marker for plant transformation studies. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 5, n. 2, p. 103-108, Mar. 1985.

WALTZ, E. China's GM rice first. **Nature Biotechnology**, New York, v. 28, n. 1, p. 8, Jan. 2010.

YE, X.; AL-BABILI, S.; KLOTI, A.; ZHANG, J.; LUCCA, P.; BEYER, P.; POTRYKUS, I. Engineering the provitamin A (β -Carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. **Science**, Washington, v. 287, n. 5451, p. 303-305, Jan. 2000.

ZHU, J.; OGER, P. M.; SCHRAMMEIJER, B.; HOOYKAAS, P. J. J.; FARRAND, S. K.; WINANS, S. C. The bases of crown gall tumorigenesis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 14, p. 3885-3895, July 2000.

ZUPAN, J.; MUTH, T. R.; DRAPER, O.; ZAMBRYSKI, P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. **The Plant Journal**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 11-28, July 2000.