

ELOISE HELENA FERNANDES

**O EFEITO DO GENÓTIPO DO MILHO NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A
PARTIR DE EMBRIÕES IMATUROS**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ELOISE HELENA FERNANDES

**O EFEITO DO GENÓTIPO DO MILHO NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A
PARTIR DE EMBRIÕES IMATUROS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2006**

ELOISE HELENA FERNANDES

**O EFEITO DO GENÓTIPO DO MILHO NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A
PARTIR DE EMBRIÕES IMATUROS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de fevereiro de 2006.

Prof. Dr. **Alberto José Prioli**

Prof. Dr. **Ivan Schuster**

Prof. Dr. **Carlos Alberto Scapim**
(Orientador)

Aos meus pais, Eliseu Fernandes e Juvenília Ruiz Fernandes, meus verdadeiros heróis, por todo amor e carinho e por sempre procurarem o melhor para seus filhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e presença em minha vida.

Aos meus pais, pelo grande amor a mim dedicado e pelos sábios conselhos.

Aos meus queridos irmãos, Déberli e Gabriel por todo carinho.

Ao meu amor Fabrício, por tornar a minha vida tão especial.

À Universidade Estadual de Maringá juntamente com a Coodetec – que me disponibilizaram infra-estrutura para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão de bolsas de estudos.

Ao Professor Dr. Alberto José Prioli, pela confiança depositada em mim e por suas valiosas sugestões.

Ao Professor Dr. Ivan Schuster, pelos seus ensinamentos que contribuíram significativamente para a realização deste trabalho.

À Dra. Laudénir M. Prioli, pela sua importante contribuição.

Ao meu orientador Dr. Carlos Alberto Scapim pelo apoio e colaboração.

Aos funcionários da Secretaria da Pós – Graduação em Agronomia, pela ajuda sempre que solicitada.

Às amigas Leandra Regina Texeira e Carla Cristina Jarentchuk, que dividiram comigo não só o teto, mas também os momentos de alegrias e dificuldades desta jornada.

Aos colegas do setor de Biotecnologia da COODETEC pela importante colaboração.

A todos que contribuíram e torceram pelo sucesso deste trabalho.

MUITO OBRIGADA

BIOGRAFIA

Eloise Helena Fernandes, filha de Eliseu Fernandes e Juvenília Ruiz Fernandes, nasceu em Altônia-PR no dia 10 de março de 1982.

Diplomou-se em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia, habilitações Licenciatura e Bacharelado, no ano de 2004 pela Universidade Paranaense.

Em março de 2004, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal, junto ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Cultura do milho	3
2.2 Transformação genética de plantas	4
2.3 Cultura de tecidos vegetais	6
2.4 Embriogênese somática	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Material vegetal	20
3.2 Indução e manutenção de calos	21
3.3 Meios de cultivo	21
3.4 Regeneração	22
3.5 Análise dos dados	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5 CONCLUSÕES	34
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMO

FERNANDES, Eloise Helena, M.S., Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2006. **O Efeito do genótipo do milho na embriogênese somática a partir de embriões imaturos.** Professor Orientador: Dr. Carlos Alberto Scapim; Professores Conselheiros: Dr. Alberto José Prioli, Dr. Ivan Schuster, Dr. Ronald José Barth Pinto.

Cultivado em todo o Brasil, o milho é utilizado de forma *in natura* na dieta humana e de animais e também tem valor industrial para produção de bebidas, tintas, medicamentos, etc. A demanda de consumo e de mercado vem crescendo fortemente, tanto em nível nacional, como mundial, em parte, devido ao aumento no consumo de aves e suínos, cuja produção utiliza o milho como principal componente das rações. A necessidade de aumento da produção requer a incorporação de novas tecnologias ao processo produtivo. A engenharia genética, através do processo de transformação de plantas, potencialmente pode possibilitar a obtenção de genótipos mais produtivos e adaptados aos diversos sistemas de cultivo. Para que um programa de transformação de plantas seja eficiente, é necessário que haja uma forma adequada de introdução do gene na espécie, e uma forma eficiente de regeneração das células transformadas, até a obtenção de uma planta completa. Os objetivos deste trabalho foram introduzir um protocolo de regeneração de plantas de milho a partir de embriogênese somática e identificar os genótipos que apresentam maior capacidade de produção de embriões somáticos e regeneração de plantas. Foram investigadas sete linhagens elite e quatro híbridos de milho do germoplasma da Coodetec – Cascavel/PR. As culturas foram obtidas a partir de embriões imaturos, inoculados em meio N6 suplementado com 690mg/L de Prolina e 10uM de 2,4-D, com subcultivos quinzenais. A frequência de calos embriogênicos foi bastante variável entre os genótipos. O efeito do genótipo demonstrou estar relacionado com o sucesso de indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas. Calos do tipo II, friáveis e embriogênicos, foram observados nos genótipos LD82025, CD 308 e CML314. Esses genótipos foram submetidos ao

processo de regeneração, destacando-se a linhagem LD82025. Os genótipos CD 307, CD 304, OC 705, 105-B e o GU 04328, nessas condições de cultivo, não apresentaram respostas positivas para indução de calos embriogênicos. Os resultados indicam que a linhagem LD 82025 é a mais promissora para utilização em um programa de transformação genética de plantas.

Palavras-chave: milho, embriões somáticos, regeneração.

ABSTRACT

FERNANDES, Eloise Helena, M.S., State University of Maringá, February, 2006. **The Effect of corn genotype in the somatic embryogenesis from immature embryos.** Major Professor: Dr. Carlos Alberto Scapim; Advisors: Dr. Alberto José Prioli, Dr. Ivan Schuster, Dr. Ronald José Barth Pinto.

Cultivated throughout Brazil, corn is used *in natura* in the human diet and animal feed and it also has industrial value in the production of drinks, paints, medicines and others. The demand for consumption and market is steadily increasing in a national level, as well as around the world, partly, due to the increase in the consumption of poultry and pork, whose production uses the corn as main component of the feed. The need of an increase in the production requests the incorporation of new technologies to the productive process. The genetic engineering, through the process of transformation of plants, can potentially allow the obtaining of genotypes more productive and better adapted to the several crop systems. For a program of transformation of plants to be efficient, it is necessary an appropriate form of introduction of the gene in the species, and an efficient form of regeneration of the transformed cells, until obtaining a complete plant. The objectives of this work were to introduce a protocol of regeneration of corn plants starting from somatic embryogenesis, and to identify the genotypes that present larger capacity of production of somatic embryos and regeneration of plants. Seven elite lineages and four hybrids of the germ plasma from Coodetec - Cascavel/PR were investigated. The cultures were obtained from immature embryos, inoculated in N6 medium supplemented with 690mg/L of Proline and 10 μ M of 2.4-D, with biweekly sub-crops. The frequency of embryogenic calluses was variable among the genotypes. The effect of the genotype showed to be related with the success of induction of embryogenic calluses and of regeneration of plants. Friable and embryogenic type II calluses were observed in the genotypes LD82025, CD 308 and CML314. Those genotypes were submitted to the regeneration process. The LD82025 lineage presented an outstanding performance. The genotypes CD 307, CD 304, OC 705, 105-B and GU 04328, in those cultivation conditions,

did not present positive results for induction of embryogenic calluses. The results indicate that the LD 82025 lineage is the most promising to be used in a program of genetic transformation of plants.

Keywords: corn, somatic embryos, regeneration.

1 INTRODUÇÃO

O milho é uma planta da família Poaceae e da espécie *Zea mays* que vem sendo utilizado em larga escala e sob as mais diversas formas em várias partes do mundo. Na alimentação humana, o milho é comumente empregado na forma de subprodutos como, pão, farinha e massa. Estima-se que hoje existam cerca de 600 produtos em que o milho participa como matéria-prima. O milho constitui ainda um dos principais insumos para o segmento produtivo, utilizado com destaque na alimentação animal, tanto na forma *in natura* como na forma de farelo, de ração ou de silagem.

A demanda de consumo e de mercado do milho sofre contínuo aumento, tanto em nível nacional como mundial. A própria elevação do consumo de derivados de aves e suínos exige, indiretamente, aumento na disponibilidade de milho, devido à sua incorporação nas rações de crescimento. Para atender a este aumento de produção é necessária a incorporação de novas tecnologias ao processo de produção para aumentar a produtividade e qualidade dos grãos. A aplicação de técnicas de biotecnologia, como por exemplo, a transformação de plantas, deverá ter papel fundamental no futuro da agricultura uma vez que possibilitam ao melhorista o acesso a novas combinações gênicas. Com o auxílio destas técnicas, podem-se obter combinações de genes que não poderiam ser obtidas no melhoramento de plantas convencional, ou que necessitariam de muitas combinações para serem obtidas.

A transformação genética de plantas poderá contribuir significativamente para redução das perdas na agricultura e conseqüentemente aumento da produção de grãos. O desenvolvimento da metodologia de propagação e cultura de tecidos, via embriogênese somática ou organogênese, é o primeiro passo para o estabelecimento de um protocolo eficiente de transformação genética. As técnicas de cultura de tecidos permitem a obtenção de clones com os genes para tolerância a diversos tipos de patógenos e estresses, que podem ser introduzidos nas células vegetais pela transformação genética.

Os objetivos deste trabalho foram introduzir um protocolo de obtenção de plantas de milho a partir da embriogênese somática e identificar linhagens ou híbridos elite de milho, do banco de germoplasma da Coodetec, que apresentem maior capacidade de produção de embriões somáticos e maior capacidade de regeneração de plantas a partir da embriogênese somática, que visam o estabelecimento futuro de um protocolo de transformação genética.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura do milho

O milho é uma planta da família Poaceae e da espécie *Zea mays*. Comumente, o termo se refere à sua semente, um cereal de altas qualidades nutritivas. É originário do México onde foi domesticado pelos índios há milhões de anos. Seu nome, de origem indígena caribenha, significa sustento da vida. Alimentação básica de várias civilizações importantes ao longo dos séculos, os Maias, Astecas e Incas reverenciavam o cereal. Grande parte de suas atividades diárias eram ligadas ao seu cultivo (PESSOA, 2004).

O milho vem sendo utilizado com destaque na alimentação animal tanto na forma *in natura* como na forma de farelo, ração ou de silagem e na alimentação humana na forma de subprodutos, como pão farinha e massa (VIEGAS, 1989).

O milho é largamente cultivado em diversas regiões do mundo. De acordo com Cruz (2004), os Estados Unidos respondem por quase 50% da produção mundial. Outros grandes produtores são a China, a Índia, o Brasil, a França, a Indonésia e a África do Sul. A produção mundial foi de 600 milhões de toneladas em 2003 (CONAB, 2005).

No Brasil, o milho é cultivado em todo o território. Ao lado da soja a cultura do milho é uma das mais importantes da agricultura brasileira, e uma das responsáveis pelo rápido crescimento na produção brasileira de grãos. A produção da safra 2004/2005 foi de 35,7 milhões de toneladas, com produtividade de 2.962 Kg/ha em 12.025,7 mil/ha de área plantada (CONAB, 2005).

A produção nacional de milho não é suficiente para atender as demandas do mercado interno que gera problemas de abastecimento para a indústria nacional. Segundo Loguércio et al. (2002), a solução para esse problema seria a expansão da área plantada e o aumento da produtividade das áreas atualmente cultivadas.

Frente a esse cenário e a importância dessa cultura, o uso de técnicas novas, **que reduzam as perdas na agricultura e aumentem a produtividade, (não ficou claro!!! Pode deletar?)** deverá ter papel fundamental no futuro da agricultura. Neste contexto, as plantas transformadas geneticamente se mostram como grande opção de otimização de produção na agricultura. No dizer de Carneiro et al. (2005), o milho transgênico traz um aumento médio de 8% na produtividade, e esse aumento está relacionado a eventos que contribuem com o aumento da resistência a insetos, herbicidas e às condições adversas.

Nos Estados Unidos, mais de 70% do milho plantado é transgênico (LOGUÈRCIO et al., 2002). Os principais eventos de milho transgênico são de tolerância a herbicidas e tolerância a insetos. Com a utilização das técnicas de engenharia genética, é possível obter híbridos de milho de características novas para a espécie, tais como, tolerância à seca, ao calor, ao frio, melhor qualidade nutricional dos grãos, entre outras.

2.2 Transformação genética de plantas

Transformação genética de plantas é o processo de introdução, integração e expressão estável de genes exógenos ou modificados, que podem alterar características morfológicas e ou bioquímicas da planta recipiente e de seus descendentes (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998). O desenvolvimento da transformação genética tem possibilitado a quebra de barreiras como a incompatibilidade sexual existente entre os indivíduos, possibilitando a transferência de genes entre organismos geneticamente distantes. Esta técnica amplia, consideravelmente, a formação de novas combinações, que pelo método natural são impossíveis de ocorrer (ANDRADE, 2001).

Diferentes técnicas de transformação genética de plantas foram estabelecidas recentemente, com o desenvolvimento de culturas de tecidos e da engenharia genética (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998). Uma delas é a transferência indireta de genes via *Agrobacterium tumefaciens*. Este microrganismo é naturalmente capaz de infectar determinados tecidos de algumas dicotiledôneas e transferir para as células dessas plantas o seu T-DNA, uma região de seu plasmídeo Ti. Nessas condições, o material genético

transferido é incorporado de maneira estável no genoma vegetal e expresso, de tal forma que o produto estimula a proliferação descontrolada destas células (LIPP, 1993), que passam a sintetizar e liberar moléculas (opinas) que são utilizadas como fonte de carbono e nitrogênio pelas bactérias (VAN et al., 1992; KYUNG-HWAN et al., 2004). Esse processo resulta no desenvolvimento de um tumor na planta, e representa um mecanismo de engenharia genética natural, de transferência de genes entre reinos diferentes (COSTA, 2000). Assim, para o processo de transformação, são utilizados vetores, ou seja, plasmídeos desarmados, em que, as seqüências não imprescindíveis para a infecção e transferência do T-DNA são eliminadas e, no seu lugar, é inserido o DNA que se deseja incorporar às células vegetais (BARBOSA, 2002). Estas construções de plasmídeos possuem promotores de plantas e genes bacterianos que conferem resistência a drogas ou antibióticos, fazendo com que estes marcadores sejam eficientes para a seleção de células ou plantas transformadas.

Em dicotiledôneas, o método de transformação, via *A. tumefaciens*, tem sido utilizado com rotina em várias espécies (GUIDOLIN, 2003). Apesar das dificuldades de se transformar gramíneas (monocotiledôneas), por estas não serem hospedeiras naturais das bactérias, alguns trabalhos descrevem a transformação de monocotiledôneas, via *A. tumefaciens*, através de linhagens de bactérias mais virulentas, co-cultivo e uso de sistemas seletivos adequados. (FRAME et al., 2002).

A eletroporação de protoplastos também tem sido apontada como um método promissor para transformação genética tanto em células animais como vegetais (intactas ou nuas). Protoplastos são células desprovidas de parede celular e que teoricamente podem ser isoladas de qualquer tecido vegetal. A técnica consiste no emprego de pulsos elétricos que modificam temporariamente a estrutura da membrana plasmática que induz a formação de aberturas semelhantes a poros ao longo de sua superfície que aumenta a sua permeabilidade aos ácidos nucléicos. O emprego desta técnica tem sido direcionado para a introdução de macromoléculas em plantas, para influenciar o comportamento de células e tecidos e também para extração de metabólitos secundários (HALLUIN et al., 1992).

Uma das técnicas mais bem sucedidas para a transferência direta de genes para células vegetais é a biobalística (GONZÁLEZ, 2002). Esta técnica consiste na aceleração de microprojéteis, geralmente de ouro ou tungstênio de 1 a 4 μm de diâmetro, a uma velocidade de 300 a 600 m/s, o suficiente para penetrar as paredes e membranas celulares. Estes projéteis carregam moléculas de DNA precipitadas na sua superfície que são liberadas, sendo que algumas atingem o núcleo da célula vegetal e outras, em baixa frequência, conseguem integrar-se de forma aleatória no genoma (TORRES et al., 1999).

Existem ainda outros diversos sistemas de transformação como, micro injeção mecânica, inflorescências imaturas, polietileno glicol (PEG), abscisão direta, fusão de esferoplastos, entre outras.

Entretanto, para a aplicação destas técnicas de transformação na agricultura, é necessário um sistema de transferência gênica que permita a integração do transgene no maior número de células possíveis associado a um sistema de seleção que permita diferenciar as células transformadas. Para isso, é imprescindível que células de tecidos transformados regenerem plantas que expressem os genes introduzidos. A transformação genética requer um sistema de regeneração *in vitro* que permita dispor do maior número de células com capacidade de regeneração (TORRES et al., 1999). Assim, a identificação de genótipos e métodos de regeneração de plantas, através da cultura de tecidos, que regenerem plantas com grande eficiência, é a primeira etapa para o estabelecimento de um programa de transformação genética.

2.3 Cultura de tecidos vegetais

Segundo Guerra et al. (1999), a teoria da totipotencialidade formulada por Schleiden e Schwann, em 1838, constitui um dos primeiros fundamentos da cultura *in vitro*, embora seus formuladores nem tenham imaginado uma metodologia como essa. A teoria afirma que a célula é autônoma, portanto, contém o potencial necessário para originar um organismo completo, nesse caso, uma planta completa. É claro que essa capacidade deve manifestar-se sob especiais condições de estímulo. Em decorrência desta teoria, células com diferentes fenótipos dentro da planta têm genótipos idênticos. Haberland, um fisiólogo vegetal, por volta de 1902, imbuído dessa teoria, foi o primeiro a

manipular um sistema de cultura *in vitro* de plantas. Por limitações técnicas da época, seus esforços falharam. Contudo, alguns anos mais tarde, a partir de alguns trabalhos como o de Robbins (1922) e White (1934) em ponta de raízes, estabeleceram-se as bases do sistema de cultivo de tecidos *in vitro*, que ao longo de todo o século XX foram complementadas com mais descobertas e aplicações.

Dentro do campo da biologia de plantas, a cultura de tecidos talvez seja uma das técnicas mais polivalentes. Assim, através da cultura de protoplastos, podem-se hibridizar variedades diferentes vencendo barreiras genéticas. Através da cultura de anteras, obtêm-se plantas haplóides, que após a diploidização, tornam-se duplo-haplóides homozigotos (VIERTEL; HESS, 1996). Com a cultura de células em meio líquido, podem-se obter mutantes, ou seja, genótipos que ganharam ou perderam alguma característica específica (TORRES et al., 1999). Com a cultura de embriões e meristemas, podem-se fazer trabalhos de criopreservação para conservar materiais em bancos de germoplasma, com economia de espaço e dinheiro, especialmente em plantas de reprodução assexuada. Com a cultura de meristemas apicais, podem-se obter plantas livres de vírus e com a cultura de gemas axilares, propagarem milhares de plantas, com genótipos superiores (TSUTOMU, 1995). Além disso, a cultura de tecidos dá suporte técnico para trabalhos de transformação e à obtenção de plantas transgênicas.

No campo da aplicação básica, a cultura de tecidos auxilia à bioquímica em estudos de rotas metabólicas, à fisiologia para estudos de crescimento e desenvolvimento, à fitopatologia para estudos de toxinas e à citogenética para estudos de aberrações cromossômicas (KERBAUY, 2004).

Na agricultura, as técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas. Em geral, essas técnicas são utilizadas em uma ou outra etapa do melhoramento, não, necessariamente, no desenvolvimento direto de novas cultivares. Mas, podem oferecer novas alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases e, muitas vezes, oferecerem soluções únicas. Isso acontece, por exemplo, com o emprego da cultura de embriões que visa introgressão gênica por meio de cruzamentos entre indivíduos de espécies distantes. Da mesma forma, a incorporação de genes, via

transformação, depende da cultura de células, tecidos ou órgãos para regeneração de plantas *in vitro*. Nesse contexto, Torres et al. (1999) ressaltam que o primeiro grupo de cultivares transgênicas comercializado em diversas partes do mundo, apresentando, por exemplo, resistência a herbicidas, insetos e patógenos, foi desenvolvida mediante o uso de cultura de tecidos em combinação com métodos de biologia molecular. Assim, a contribuição das técnicas de cultura de tecidos e células, nos programas de melhoramento, pode se dar em maior ou menor escala, de acordo com os objetivos do melhoramento e com as características da espécie-alvo.

De acordo com Tsutomu (1995), hoje, existem diferentes técnicas de manipulação de plantas *in vitro*, bem como uma diversidade de explantes, que podem ser utilizados para obtenção de uma variedade de espécies, protocolos e meio nutritivos bem estabelecidos. As principais técnicas serão descritas em seguida.

Cultura de protoplastos: protoplastos são células vegetais desprovidas de paredes celulares e podem, teoricamente, ser isoladas de qualquer tecido vegetal. Em condições bem estabelecidas de cultura de tecidos, os protoplastos reconstituem suas paredes, dividem-se, formam colônias, calos e regeneram plantas, por embriogênese ou organogênese (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998). A cultura de protoplastos tem como objetivo a transformação da cultura.

As principais técnicas de cultura de protoplastos são: cultura em meio líquido, feita em placas de Petri que contém uma camada fina de meio para facilitar as trocas gasosas; cultura em gotas suspensas, que consiste em manter suspensas na tampa da placa de Petri, gotas de 40 a 100 µL de meio contendo os protoplastos; combinação do meio líquido e sólido, em que o meio sólido contém os protoplastos que é cortado em fatias e são colocadas em um volume maior de meio líquido e; utilização de cultura nutritiva, cuja divisão de células derivadas de protoplastos pode ser favorecida pelo contato com uma cultura de células saudáveis em crescimento (cultura nutritiva) (TORRES et al., 1999).

Prioli e Sondahl (1989) afirmam que o sucesso da cultura de protoplastos de milho depende de muitas variáveis, incluindo o genótipo, o estágio fisiológico das células doadoras e meio de cultura.

Cultura de ápices caulinares: considera-se meristema apical caulinar o tecido que se encontra distal ao mais novo primórdio foliar, tendo o aspecto de uma cúpula proeminente ou plataforma achatada, estando, algumas vezes, embutido numa depressão. As células desse tecido têm a propriedade única de permanecerem na condição embrionária e, por meio de atividades morfogênicas complexas podem originar os demais órgãos vegetais (TORRES et al., 1999).

Segundo Gommers et al. (2004), o ápice caulinar consiste do meristema apical com primórdios foliares subjacentes e em algumas situações, incluem as folhas emergentes. O tamanho destas estruturas varia de 0,3 a 20 mm ou mais.

Essa técnica é utilizada para a propagação de plantas *in vitro*, recuperação de plantas livres de vírus, conservação e intercâmbio de germoplasma e transformação. Uma das vantagens deste sistema é, na maioria dos casos, a manutenção da identidade do genótipo regenerado, em virtude das células do meristema manter mais uniformemente a sua estabilidade genética (GROUT, 1990).

Cultura de células em meio líquido: a cultura de células em meio líquido, ou suspensão celular, destina-se à obtenção e proliferação de células em meio líquido, sob condição de agitação contínua, para evitar possíveis gradientes nutricionais e gasosos no meio de cultura. Independentemente da espécie a ser utilizada, é essencial que as células da suspensão se dividam e se multipliquem ativamente (PERES, 2002).

A vantagem da cultura de células, em meio líquido, é a taxa de multiplicação. Entretanto, dois aspectos precisam ser considerados: a formação de agregados celulares (FOWLER, 1986) e a existência de mosaicismo ou mixoploidia, isto é, coexistência de diferentes populações celulares com bases genéticas distintas.

A suspensão celular também tem aplicabilidade nas áreas da bioquímica que facilita o estudo e isolamento de enzimas; na fisiologia vegetal, para estudos de fatores de crescimento, resistência ao frio, senescência celular (BALAGUE et al., 1982) e embriogênese somática (GUPTA; DURZAN, 1986).

Na fitopatologia, a suspensão celular tem sido útil no estudo de resistência a fungos. Na área de genética, tem sido utilizada, por exemplo, nos

estudos de poliploidia celular (HEINZ et al., 1969) e transformação genética de plantas (ZHENG et al., 1996).

Atualmente, a suspensão celular é também empregada em trabalhos com biorreatores que visam à produção de metabólitos secundários ou material clonal em escala comercial.

Cultura de anteras: esta técnica está baseada na capacidade do gameta sexual masculino em regenerar indivíduos haplóides. Um indivíduo haplóide regenerado desse cultivo possui metade do número de cromossomos característicos da espécie e é submetido a tratamento com colchicina para duplicação do complemento de cromossomos, formando o dihaplóide (100% homozigoto) (TORRES et al., 1999).

A plântula induzida é formada totalmente com genoma masculino. Após o tratamento com colchicina, ou às vezes espontaneamente, o genoma se duplica e retorna ao estado diplóide, obtendo completa homozigose com restauração da fertilidade em apenas uma geração (CARVALHO et al., 2003).

Cultura de embriões: a terminologia “cultura de embriões” tem sido empregada para descrever os processos de crescimento e desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro*, independente da idade, tamanho, estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado (GOMMES et al., 2004). Deve-se ressaltar que, no estudo da embriogênese *in vitro* ou *in vivo*, devem-se incluir os embriões de origem não-zigótica como os originários das células somáticas (nucelos ou calos); embriões originários do pólen, via androgênese; e aqueles originários da oosfera não-fertilizada ou outras células do saco embrionário Hu e Ferreira (1989) citados por Torres et al. (1999).

Em embriões zigóticos, podem-se diferenciar embriões imaturos e maduros. O embrião imaturo parece ser um consenso como explante mais adequado para a promoção de calogênese e embriogênese somática de cereais (MILACH et al., 1991).

Em trigo, o explante inicial deve ser o embrião imaturo de sementes coletadas quando apresentam aspecto de “Grão leitoso” (aproximadamente 14-18 dias após a antese em período normal de cultivo) e o tamanho pode variar de 0.5 a 2 mm de diâmetro (OZIAS-AKINS, 1993). Os autores comentam que se menores que 0.5 mm, não há produção de calo, se maiores que 2 mm, o embrião pode germinar. Modificações grosseiras na morfologia de calos

indicam que a diferenciação celular começa aos 12-14 dias após o início da cultura. Resultados similares foram encontrados em outras culturas como milho e arroz (MACHII et al., 1998).

Outro aspecto da cultura de embriões é a necessidade da presença do 2,4- D (ácido diclofenoxiacético) para a indução e formação dos calos. Além disso, de acordo com Machii et al. (1998), o genótipo da planta doadora do embrião parece ser fundamental para a obtenção de calos.

O uso de embrião imaturo é vantajoso quando se tem como objetivo a aplicação subsequente de técnicas para a transformação genética. Alguns autores descrevem o uso da cultura de calos provenientes de embriões imaturos para a infecção por *Agrobacterium* (MOONEY et al., 1991).

A diferenciação entre embrião imaturo e maduro ocorre apenas pelo desenvolvimento completo do embrião, o que caracteriza o último. Obtém-se esta fase com aproximadamente 45-70 dias de ciclo de culturas como o milho e trigo, o que corresponde ao estágio de desenvolvimento “cera mole”.

Delporte et al. (2001) testaram a utilização de embriões maduros, como uma nova metodologia para a obtenção de plantas inteiras. Os autores observaram que a segmentação do embrião em 2, 4 ou 6 micro pedaços (500 µm de diâmetro), aumentou a taxa de embriogênese somática e impediu que o embrião zigótico pudesse germinar. Com o uso desta técnica, os autores obtiveram taxas de regeneração de trigo em torno de 25-30%, bem maiores comparados com os 17-18% com embriões imaturos (MACHII et al., 1998).

Ozgen et al. (1996), ao testarem sete diferentes genótipos de trigo e utilizando embriões maduros, observaram que o número de calos obtidos foi maior que com embriões imaturos. Foi demonstrado que embriões imaturos teriam uma capacidade de indução para calos maior, mas embriões maduros teriam uma capacidade de regeneração maior. Estas capacidades variaram de acordo com o genótipo da planta-mãe utilizada.

Dentre as vantagens do uso de embriões maduros para cultura de tecidos está a facilidade de obter material, inclusive, podendo estocá-los (como sementes), para uso futuro. Ozgen et al. (1998) observaram que os calos obtidos de embriões maduros tiveram um vigor maior que os dos embriões imaturos.

O sucesso de qualquer modalidade de cultura de tecidos depende muito de alguns fatores que podem influenciar no desenvolvimento dessas técnicas como, a assepsia, o explante, o meio nutritivo e os fatores ambientais, tais como: luz, temperatura, oxigênio e gás carbônico.

2.3.1 Assepsia

Assepsia é conjunto de procedimentos para tornar um explante livre de microrganismos. Os antissépticos utilizados podem ser bacteriostáticos ou germicidas, e incluem os antibióticos ou compostos de outra natureza como: álcoois, halogênios (hipoclorito de sódio) ou fungicidas orgânicos. A vidraria e os meios de cultura devem ser esterilizados para eliminar todos os microrganismos, por calor seco ou úmido (autoclave). Pinça, bisturis e demais utensílios metálicos para a manipulação do tecido podem ser esterilizados por flambagem direta através de lamparinas ou bico de Bunsen, na câmara de fluxo laminar, que deve ser livre de germes (PERES, 2002).

2.3.2 Explante

De acordo com Luz (1990), e dentro da terminologia da cultura de tecidos, em geral, explante é qualquer segmento de tecido oriundo de uma planta para iniciar uma cultura *in vitro*, geralmente com vistas a estabelecer um protocolo de plantas de genótipo superior. Assim, o explante pode ser um ápice radicular ou caulinar, uma gema axilar, um segmento de folha jovem, uma antera, um ovário, um embrião zigótico etc. Esses explantes poderão vir de plantas diretamente ou passar por uma etapa intermediária de calo, antes de a planta ser obtida. Um calo é uma massa de células não diferenciadas do ponto de vista organogênico, que está em contínua proliferação celular, podendo ser compactos, friáveis, esbranquiçados ou amarelados (DONATO, 2002).

A indução de plântulas pode ser feita a partir de um calo, com hormônios vegetais ou reguladores de crescimentos, que induzem os calos a produzir brotos. A base molecular do fenômeno na célula, ainda não é especificamente conhecida, por isso existe dificuldade de extrapolar protocolos

de micropropagação de uma espécie para outra ou de uma variedade para outra (ALMEIDA et al., 2001).

2.3.3 Meio nutritivo

a) Sais minerais

Os estudos da nutrição da planta provenientes do âmbito da fisiologia vegetal informam que os elementos que compõem o meio nutritivo da cultura *in vitro* devem pertencer à categoria dos essenciais, isto é, a planta não se desenvolve na ausência deles. Existem dois grupos deles: os macronutrientes e os micronutrientes. Entre os primeiros, podem-se citar: fósforo, magnésio, nitrogênio etc., entre os segundos: boro, manganês, cobre, etc.

Meios com alta concentração salina têm sido usados pelos efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento de embriões somáticos (TORRES et al., 1999).

b) Componentes orgânicos

Um meio nutritivo também possui componentes orgânicos. Os mais utilizados são a sacarose, alguns tipos de vitaminas e inositol.

A sacarose é importante como fonte de carbono para alimentar a glicólise e o ciclo de krebs, devido a que, inicialmente, o tecido (explante) não é suficientemente autotrófico (RAVEN et al., 2001). De um outro ponto de vista, a sacarose, quando em presença de auxinas pode contribuir para a diferenciação do câmbio em benefício de novas formações de xilema e floema. Sua concentração, normalmente, varia entre 1% e 3%, mas por efeito da autoclavagem e do pH, sua concentração no meio pode variar, já que é hidrolisada em glicose e frutose, sendo que esses limites não são claros e esse problema pode tornar-se limitante para o explante ou para a planta (TSUTOMU, 1995).

As vitaminas também são requeridas na cultura de tecidos; são importantes fatores catalíticos de rotas metabólicas na célula. Nos trabalhos pioneiros em cultura de tecidos, os requerimentos de vitaminas foram

satisfeitos mediante suplemento de composição pouco conhecidos, como extrato de leveduras, leite de coco, hidrolisado de proteínas, etc (BARROS, 2002). Hoje, apesar dessas tendências não terem desaparecido, o mais freqüente, é que os meios nutritivos incorporem vitaminas específicas como B1 (tiamina), B6 (piridoxina), ácido pantotênico, ácido nicotínico e ácido ascórbico.

Uma vez que as plantas são capazes de sintetizar suas próprias vitaminas, existem dúvidas em relação à necessidade de incorporação no meio. Contudo, no caso de drenos, como as raízes, por exemplo, a suposição de que nem todos os seus requerimentos nutricionais orgânicos sejam sintetizados, ficou evidenciada em 1930, por Bonner e Robbin, citados por Peres (2002). Estes pesquisadores observaram que, na presença de algumas vitaminas, o crescimento de algumas raízes melhorava sensivelmente.

O composto mio-inositol, isômero do inositol, apresenta importância biológica, já que participa da internalização de estímulos externos a partir de receptores de membranas (SWEDLUND; LOCY, 1993). Na área de cultura de tecidos vegetais, muitos o consideram uma fonte complementar de carboidratos, mais que um composto vitamínico, e que desempenha um papel importante na formação de pectina e hemicelulose na parede celular. Swedlund e Locy (1993) relatam que os requerimentos desse composto variam segundo as plantas, sendo que, no meio de culturas, as monocotiledôneas são muito sensíveis à sua falta. No meio MS, o meio mais universalmente utilizado, sua prescrição é de 100 mg/L.

c) Agentes gelificantes

Os agentes gelificantes são muito importantes nos meios nutritivos, já que o explante e as plantas obtidas devem ficar sobre um suporte. Em geral, os meios sólidos são preferidos aos de cultura líquida, sendo que esses últimos são de custo mais elevado pelo fato de exigirem um agitador para evitar o afogamento ou a hipoxia do explante (TSUTOMU, 1995).

O agar-ágar é um tipo de agente solidificante de natureza polissacarídica produzido por algas, sendo que sua composição em polissacarídeo pode variar de 50% a 90%. Por isso, a procedência do mesmo é importante. Por outro lado, a autoclavagem pode hidrolisá-lo se o pH do meio

está ácido, fazendo com que perca a firmeza e, dependendo da origem, o agente solidificante pode apresentar impurezas, como bário, cloro sulfato, etc, que podem afetar o crescimento dos explantes.

d) Hormônios

Os hormônios constituem os principais componentes da cultura de tecidos, porque são eles que direcionam o processo morfogênético. Agrupam-se tradicionalmente em cinco grupos: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico, sendo os três primeiros mais usados na micropropagação.

Existem ainda, os reguladores de crescimento, que são substâncias de ação similar aos hormônios, como por exemplo: o Picloran, uma auxina sintética muito utilizada na cultura de tecidos (BONNER; GALSTON, 1973).

Em geral, tanto os hormônios como os reguladores de crescimento são usados na ordem de 5 μM até 40 μM . Em doses maiores, produzem efeitos tóxicos ou teratológicos ou ainda inibem a fotossíntese, como é o caso da auxina sintética 2,4-D (RAVEN et al., 2001). No caso de seu uso em quantidades pequenas, é aconselhável obtê-los de soluções estoques que devem ser mantidas em freezer ou refrigerador.

2.3.4 Fatores ambientais

Luz e temperatura são dois fatores importantes na sala de cultura, que devem ser controlados para que as plantas ali mantidas se desenvolvam adequadamente.

A luz é importante para a planta sob três pontos de vista. Do ponto de vista da fotossíntese, da fotomorfogênese e do fototropismo, por isso, a sua inclusão numa sala de cultura, onde, a luz deve seguir um determinado fotoperíodo, por exemplo, 16 h de luz e 8 de escuro. Embora nessas salas seja usada luz branca fluorescente, segundo Barrueto et al. (1999), a composição espectral pode variar conforme as marcas oferecidas. Algumas podem apresentar mais irradiação na região azul/violeta, outras na região do laranja/vermelho. Essas variações podem representar impactos diferentes na cultura *in vitro*. Assim, em alguns casos, uma luz mais rica em vermelho que

azul pode, por exemplo, estimular melhor a produção de raízes adventícias. Já em outros casos, uma luz azul pode estimular mais a brotação de calos.

Segundo Barrueto et al. (1999), pode-se contornar o problema em obter maiores e menores irradiância com o número de lâmpadas por prateleira ou determinando que altura deva ter a prateleira. Irradiâncias maiores na sala de cultura obviamente contribuirão para aumentar a temperatura dos frascos e placas que, em geral, nas salas de cultura, varia de 24 °C a 27 °C.

De acordo com Tsutomu (1995), o controle dos gases O₂ e CO₂ também é muito relevante para a respiração do explante ou para a fotossíntese da planta.

É muito importante que todos esses fatores estejam muito bem ajustados, para que se possa ter sucesso no cultivo de plantas *in vitro*. O estabelecimento de um protocolo de regeneração *in vitro* de qualquer espécie vegetal é essencial para que novas metodologias, como a transformação genética, venham incrementar a obtenção de genótipos superiores. Nesse contexto, protocolos que contemplam embriogênese somática vêm dando suporte às técnicas de transformação, podendo através dessa técnica, fornecer grandes quantidades de plântulas que podem servir de base para plantios de campo, não só na área agrônômica, mas também na florestal e hortigranjeira.

2.4 Embriogênese somática

Embriogênese somática é o processo pelo qual células e tecidos somáticos (não-sexuais) se desenvolvem até a formação completa de uma planta através de diferentes estágios embriogênicos, sem que ocorra a fusão de gametas. Este processo constitui um exemplo da totipotencialidade das células das plantas e foi postulado por Haberlandt (1903) citado por Guerra (1999). Esta teoria afirma que a célula é autônoma, portanto, contém o potencial necessário para originar um organismo completo.

Entre os processos de regeneração, a embriogênese somática é teoricamente uma das melhores opções para a propagação *in vitro* de plantas por apresentar algumas vantagens como: 1) alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação; 2) escalonamento da produção pela manutenção da cultura em meio líquido, o que elimina a

dependência de períodos específicos de disponibilidade de material propagativo, permitindo estabelecer o período desejado para as obtenções; 3) plantio direto da muda obtida, via embriogênese somática, sem necessidade de enxertia, com menor custo de produção; 4) possibilita a transferência de genes, razão pela qual tem sido utilizada como ferramenta de estudos de desenvolvimento das plantas e melhoramento pela transformação genética (MILACH et al., 1991).

A embriogênese somática *in vitro* foi descrita pela primeira vez, independentemente, por Steward et al. (1958) e Reinert (1958) citados por Camb et al. (2002), em cenoura. O padrão de desenvolvimento de embriões somáticos apresenta muitas características morfológicas semelhantes as do embrião zigótico. As principais diferenças entre esses embriões relacionam-se ao fato de os embriões somáticos se desenvolverem livres de correlações físicas, fisiológicas e genéticas que ocorrem durante o desenvolvimento de um embrião zigótico (GUERRA et al., 1999).

Dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática são comumente observados *in vitro* (BREGITZER et al., 1989). O primeiro corresponde ao modelo direto em que os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estágios intermediários de calos. O segundo padrão corresponde ao modelo indireto, no qual os embriões somáticos se formam a partir de um tecido intermediário chamado calo, que apresenta células em diferentes estágios de diferenciação e, conseqüentemente com diferentes graus de determinação (CUMMINGS, 1976). Estas células podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos.

A embriogênese somática *in vitro* é um método importante para propagação massal clonal de genótipos superiores (BERED et al., 1998). Além disto, é uma técnica de grande aplicabilidade para estudos básicos relacionados com a fisiologia, genética e bioquímica do desenvolvimento embrionário. Atualmente, este sistema vem sendo utilizado para obtenção de plantas transgênicas.

De acordo com Milach et al. (1991), a capacidade de produzir embriões somáticos a partir de cultivo *in vitro* varia expressivamente com o genótipo,

meio de cultura e tipo de explante, o que torna necessária a adequação desses fatores para o meio a ser utilizado.

Estudos histológicos demonstram que a embriogênese somática é a etapa mais comum de regeneração de plantas, pela proliferação de tecidos compactos provenientes de embriões imaturos de milho (PRIOLI; SILVA, 1989).

A embriogênese somática pode ser natural e *in vitro* (induzida). No primeiro caso, células dos tecidos embrionários podem ser direcionadas para esta rota de desenvolvimento morfogenético, como é o caso do sistema da embriogenia adventícia ou nucelar em *Citrus* sp, onde embriões apomíticos originam-se por gemação a partir de células do nucelo que representam o genoma materno (TORRES et al., 1999). Estes embriões apomíticos são geneticamente idênticos à planta-mãe e a consequência deste fenômeno é a perpetuação de populações clonais através da semente. No segundo caso, células haplóides ou diplóides (somáticas) em diferentes estágios de diferenciação podem ser adequadamente induzidas, por estímulos ambientais ou químicos, reprogramadas e adquirirem novas competências morfogenéticas (ROCA; MROGISNSK, 1991).

Donato (2002) acredita que, dentro de um explante, certas células estão pré-condicionadas para os eventos morfogenéticos que levam a esta embriogênese. Por essa razão, a presença de reguladores exógenos de crescimento, usualmente o 2,4-D, não somente inicia o desenvolvimento dos embriões somáticos, como também estimula a multiplicação clonal das células pré-determinadas.

Prioli e Silva (1989) afirmam que é necessária a presença de uma auxina para a iniciação de um calo embriogênico. Usualmente, a auxina empregada é o 2,4-D, o qual aparentemente inicia a indução da embriogênese somática no calo. No entanto, a maturação dos embriões e a germinação não ocorrem na presença do 2,4-D, em consequência disso, nesta fase deve-se remover a auxina ou utilizá-la em concentrações bem reduzidas.

Alguns fatores podem interferir no processo de embriogênese. De acordo com Mirato et al. (1971), citado por Roca e Mrogisnsk (1991), concentrações altas de sacarose estimulam a formação de calos embriogênicos e reduzem a frequência de anormalidades no desenvolvimento

dos calos e também inibem a germinação precoce. A intensidade luminosa também pode interferir no processo de obtenção de calos embriogênicos de milho, e é necessária a ausência de luz para o desenvolvimento e maturação normal dos embriões (PRIOLI et al., 1984).

Prioli & Silva (1989) afirmam que diversos fatores podem afetar a capacidade de regeneração *in vitro* do milho, tais como: o tamanho do embrião, o genótipo e o regulador de crescimento no meio de cultura. Em relação à influência do genótipo, algumas cultivares podem regenerar facilmente em um meio específico, enquanto outras cultivares não respondem no mesmo meio.

A indução *in vitro* de embriões somáticos em milho dá-se a partir de embriões imaturos, com a resposta sendo genótipo dependente, ou seja, varia com a variedade utilizada (PRIOLI; SONDAHL, 1989). Zimmermann (1993) afirma que o desenvolvimento normal de embriões, a partir de células somáticas, comprova que o programa genético para a embriogênese está totalmente contido na célula.

Segundo Prioli et al. (1984), a regeneração de plantas de milho foi descrita pela primeira vez em 1975. Mais tarde, em 1982, houve relatos iniciais de embriogênese somática em milho e, então, a regeneração de plantas, via calo derivado de embrião, foi estendida para várias outras espécies.

De acordo com Teixeira e Marbach (2005), o desenvolvimento da metodologia de propagação, via embriogênese somática, é essencial para o estabelecimento do processo de transformação genética, que permitirá a obtenção de clones com genes para tolerância a diversos tipos de patógenos e estresses.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Foram utilizadas 11 linhagens/híbridos do programa de melhoramento de milho da Coodetec, sendo sete linhagens elite (GU04328, OC-705, 105-B, LD82025, CML314, 202-C, XE23041-B), um híbrido simples (CD 307), um híbrido duplo (CD 308) e dois híbridos triplos (CD 304 e CD 306). Foram cultivados, em casa-de-vegetação (Figura 1), três vasos de cada genótipo, com o objetivo de obter os embriões imaturos necessários para a instalação do ensaio. Todas as plantas foram autopolinizadas, e 14 a 18 dias após a autopolinização (dependendo do ciclo do material), as espigas foram colhidas para a retirada dos embriões imaturos. Nesta fase, os grãos estavam no estado leitoso. Foram utilizados apenas embriões com menos de 2mm de comprimento.



Figura 1 – A) Vista externa da casa-de-vegetação. B) Plantas de milho cultivadas no interior da casa-de-vegetação.

3.2 Indução e manutenção de calos

As espigas utilizadas para a dissecação dos embriões imaturos foram inicialmente desinfetadas, mergulhando-as por 20 min em uma solução 1/1 de hipoclorito de sódio (2,5%) e água com duas gotas por litro de Tweem 20. Em seguida, as espigas foram lavadas duas vezes em água destilada autoclavada. Para retirar o excesso de água, as espigas foram deixadas sobre papel de filtro, também autoclavado.

Para a dissecação dos embriões, as espigas foram fixadas em uma placa de petri, e colocadas sob uma lupa. Para retirada dos embriões imaturos do interior dos grãos, realizou-se um corte longitudinal no topo dos grãos, com cuidado para não cortar os embriões, e com o uso de agulhas histológicas, os embriões foram retirados dos grãos.

Embriões imaturos (1,0-2,0 mm de comprimento) foram incubados sobre o meio de cultura (em placa de Petri) com a parte mais achatada (eixo embrionário) para baixo. Foram colocados 10 embriões de um mesmo genótipo em cada placa e foram feitas 8 repetições para cada genótipo. Cada placa foi considerada uma repetição. Esta estrutura de repetição foi mantida durante todos os repiques, ou seja, todos os calos obtidos em uma repetição constituíram uma repetição no plaqueamento seguinte.

Após o plaqueamento, as placas foram mantidas no escuro. Para isso, foram providenciados caixotes de madeira com tampas revestidas em tecido preto para facilitar a ventilação. As placas foram mantidas dentro destes caixotes, até que os calos estivessem prontos para regeneração, em uma câmara de crescimento com temperatura variando de 24°C a 27°C e umidade relativa de 50%. As placas, cujos embriões não responderam bem à indução de calos, foram descartadas.

3.3 Meios de cultivo

O meio de indução foi o CM1, cuja composição é sais e vitaminas N6 suplementado com glicina (2 mg/L), Mio inositol (100 mg/L), L-prolina (690 mg/L), Caseína hidrolisada (100 mg/L), Nitrato de prata (10 mg/L), Cloreto de magnésio (650 mg/L), 2,4-D (10 µM), Sacarose (20 g/L) e Phytigel (3 g/L). O

pH foi ajustado com KOH para 5,8. Quando os embriões imaturos começaram a emitir pró-embriões somáticos e atingiram o estágio de calo (com tendência a ser friáveis), eles foram transferidos para o meio de manutenção de calos. A manutenção dos calos foi realizada em meio CM2 contendo sais N6, Glicina (2 mg/L), 2,4-D (10 µM), Cloreto de magnésio (10 mg/L), Sacarose (2 g/L), Inositol (550 µM), Phytigel (2,3 g/L) em pH 5,8. O intervalo de plaqueamento (repique) tanto para o meio CM1 como para o meio CM2 foi de, no máximo, 15 dias. Os calos permaneceram no meio CM2 até que foram considerados prontos para a regeneração, ou seja, que se portaram como calos friáveis (propícios para regeneração). Em seguida, foram transferidos para o meio de regeneração, RM-1, que consiste no mesmo meio CM2, porém, sem adição de hormônio, (a auxina 2,4D), para não impedir a regeneração.

3.4 Regeneração

Nesta etapa, foram selecionados 10 calos de cada material, dos genótipos que apresentaram calos friáveis (embriogênicos), e colocados no meio de regeneração RM1, na presença de luz, e observou-se o potencial de regeneração de cada material.

Estes calos, transferidos para o meio RM-1, começam a emitir pontinhos verdes (que darão origem a uma planta). Foram cuidadosamente repicados e quando começaram a emitir os primeiros primórdios foliares, foram transferidos para caixas magenta, contendo o meio RM2, que corresponde à meia força do meio RM1. Quando esta plântula começou a emitir raízes (em torno de duas semanas) elas foram transferidas para bandejas com substrato orgânico e vermiculita em casa de vegetação, com temperatura e umidade controladas, onde passaram por um processo de aclimação.

O processo de aclimação consistiu em cobrir completamente as plantas com um pequeno becker por aproximadamente uma semana e em seguida, esse mesmo becker fora retirado lentamente. Após, aproximadamente, 15 dias nesta bandeja, as plantas foram retiradas, juntamente com o torrão do substrato (para evitar agressão à raiz), e transferidas para vasos maiores, contendo terra e adubo orgânico.

3.5 Análise dos dados

A análise dos dados foi feita por meio da estatística descritiva. Foram avaliadas as médias e os desvios-padrão de produção de calo de cada repique para cada genótipo e o número de plantas regeneradas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo contempla a primeira parte de um programa de genética de milho da Coodetec, que visa à seleção de genótipos elite com potencial para a aplicação de técnicas de transformação genética de plantas. Nessa fase, foram investigadas duas características que são essenciais para que um genótipo de milho possa integrar um programa de transformação genética: embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embriões somáticos. Para que seja considerado apropriado para transformação, o genótipo deve produzir calos embriogênicos capazes de regenerar plantas (TORRES et al., 1999). A capacidade de formação de calos embriogênicos, a partir de embriões imaturos, e a capacidade de regeneração de plantas foram avaliadas nos híbridos CD 304, CD 306, CD 307 e CD 308 e nas linhagens CML314, OC-705, 105-B, 202-C, GU 04328, LD 82025 e XE 23041, do banco de germoplasma de milho da Coodetec.

Na avaliação quanto à capacidade de formação de calos embriogênicos, foram constatadas diferenças de comportamento entre os 11 genótipos estudados. Os calos produzidos pelos híbridos CD 306 e CD 308 e pelas linhagens CML 314, 202 C, LD 82025 e XE 23041 B mantiveram a capacidade de proliferação até o oitavo repique (Tabela 1). Os calos do híbrido CD 304 e da linhagem 105 B extinguiram-se após o primeiro repique. Além disso, os calos da linhagem GU 04328 não proliferaram depois do segundo repique. Da mesma forma, o híbrido CD 307 e a linhagem OC 705 produziram calos que suportaram somente até o terceiro repique.

Em três dos genótipos analisados, foi registrada a formação de pró-embriões sobre a superfície dos calos duas semanas após a inoculação. Calos do tipo II, friáveis e embriogênicos (Figura 2-A), semelhantes aos descritos por Prioli e Silva (1989), foram produzidos pelos genótipos LD 82025, CML314 e CD 308. Por outro lado, os genótipos CD 307, CD 304, OC705, 105-B, e o GU 04328, geraram calos de aparência mais compacta e não-embriogênico (Figura 2-B). Calos com consistência aquosa foram observados nos genótipos CD 306, 202-C e XE 23041-B (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias e desvios-padrão do número de calos por placa, em cada repique, produzidos a partir de 10 embriões imaturos por placa de quatro híbridos e sete linhagens de milho.

GENÓTIPO	Tipo de Calo		1º repique	2º repique	3º repique	4º repique	5º repique	6º repique	7º repique	8º repique
	predominante									
Híbridos	CD 306	Aquoso	7,0 ± 2,64	7,3 ± 6,65	18,0 ± 18,52	12 ± 15,13	11,3 ± 12,66	8,3 ± 15,03	5,3 ± 9,23	5,3 ± 6,65
	CD 307	Compacto	6,1 ± 2,23	4,5 ± 4	1,0 ± 1,85	0	0	0	0	0
	CD 308	Friável Embriogênico	15,1 ± 4,64	27,2 ± 5,92	33,8 ± 29,43	33 ± 30,43	8,7 ± 10,70	7,3 ± 8,38	6,1 ± 8,14	12,6 ± 20,37
Linhagens	CD 304	Compacto	5,0 ± 1,00	0	0	0	0	0	0	0
	CML 314	Friável Embriogênico	10,1 ± 2,47	15,7 ± 5,28	27,2 ± 22,44	13,5 ± 12,37	15,8 ± 14,78	24,3 ± 25,44	20,8 ± 25,02	30,3 ± 4,03
	OC 705	Compacto	11,2 ± 2,60	3,12 ± 4,99	2,1 ± 3,94	0	0	0	0	0
	105 B	Compacto	11,7 ± 3,65	0	0	0	0	0	0	0
	202 C	Aquoso	7,2 ± 3,65	6,0 ± 6,59	4,0 ± 6,02	1,75 ± 4,94	2,5 ± 7,07	2,7 ± 7,77	2,7 ± 7,77	2,7 ± 7,77
	GU 04328	Compacto	6,0 ± 4,24	1,0 ± 0,35	0	0	0	0	0	0
	LD 82025	Friável Embriogênico	17,6 ± 8,95	34,6 ± 8,84	44,8 ± 16,26	41,4 ± 23,42	26,6 ± 35,11	30,4 ± 48,69	52,4 ± 95,34	70,4 ± 156,30
XE 23041 B	Aquoso	9,1 ± 1,88	18,7 ± 5,09	20,7 ± 16,98	6,1 ± 6,46	1,5 ± 4,24	1,0 ± 2,82	2,2 ± 6,36	2,2 ± 6,36	

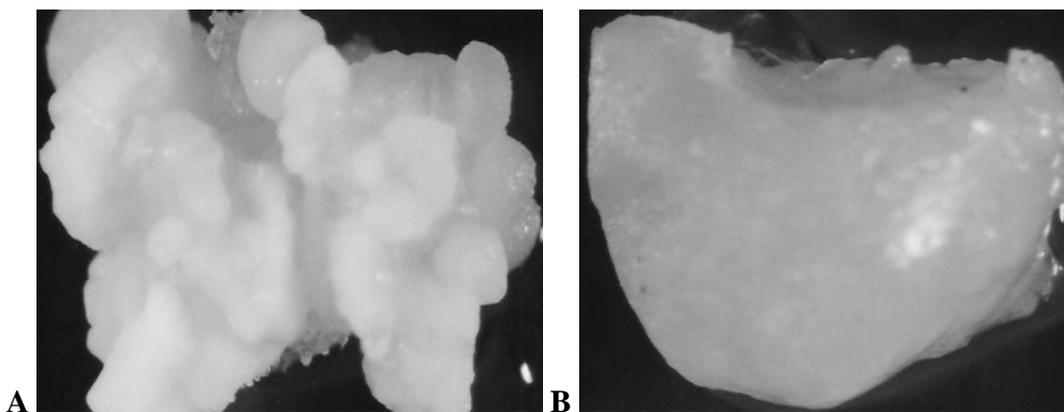


Figura 2 – Calos com 28 dias de cultivo em meio de indução CM1. **A)** Calo com aspecto friável, tipo II. **B)** Calo compacto Tipo I.

Dos genótipos avaliados, alguns se mostraram promissores nos primeiros repiques, mas logo se observou uma redução na capacidade desses genótipos de induzir calos embriogênicos. O genótipo OC 705, por exemplo, apresentou uma média de 11,25 calos por placa no primeiro repique e no segundo repique essa média caiu para 3,12 calos por placa (Tabela 1). Os calos dos genótipos que perderam a capacidade de proliferação antes do oitavo repique apresentaram comportamento comum, ou seja, após os primeiros repiques foram tornando-se aquosos ou compactos demais. Já, em outros genótipos, como é o caso do genótipo 105-B, não se observou indução de calo embriogênico em nenhum momento, ao invés disso, os embriões geraram somente calos compactos.

A redução no número de calos, após algumas repicagens, também foi relatada por Smith e Street (1974). O autor salienta que, após um período prolongado de cultivo o potencial embriogênico do calo declina, e esse fenômeno pode variar de acordo com o genótipo, visto que, alguns materiais suportam quantidades maiores ou menores de repiques.

Também foi observada resposta diferencial quanto ao número de calos produzidos, mesmo entre os genótipos, cujos calos mantiveram a proliferação ao longo dos oito repiques. Nota-se que apenas os calos das linhagens LD 82025 e CML 314 chegaram ao oitavo repique com número médio de calos por placa superior ao obtido após o primeiro repique (Tabela 1 e Figura 3). O híbrido CD 308 também produziu calos embriogênicos e que se mantiveram até

o oitavo repique. Até o quarto repique, o número de calos deste híbrido aumentou, e a partir do quinto repique, diminuiu. No oitavo repique, o número de calos foi equivalente ao primeiro repique (Tabela 1 e Figura 3).

O alto valor médio do número de calos, no oitavo repique da linhagem LD 82025, expressivamente superior ao obtido para outros genótipos, deve-se a uma das repetições com comportamento contrastante, como se pode verificar pelo valor alto do seu desvio padrão (Tabela 1). Na Figura 3 observa-se o comportamento desta linhagem em cada repetição, ao longo de todos os repiques. Como todos os calos obtidos em uma repetição constituíram uma repetição no plaqueamento seguinte, a repetição que produziu mais calos em uma fase, iniciou a fase seguinte com um número maior de calos plaqueados. Isso possibilitou que continuasse a produzir ainda mais calos. Esta estratégia foi adotada, pois o objetivo foi identificar os genótipos que, a partir de um mesmo número de embriões imaturos plaqueados, no início da fase de indução de calos, fossem capazes de produzir um elevado número de calos embriogênicos na fase de manutenção. Desta forma, todos os embriões obtidos precisaram ser utilizados.

A linhagem CML 314 apresentou média do número de calos no oitavo repique com aproximadamente a metade do valor encontrado para LD 82025. No entanto, a variabilidade entre as repetições utilizadas para esta linhagem foi menor (Tabela 1 e Figura 3). Isso demonstra que a linhagem CML 314 apresenta maior estabilidade de resposta à embriogênese somática, quando comparada à linhagem LD 82025.

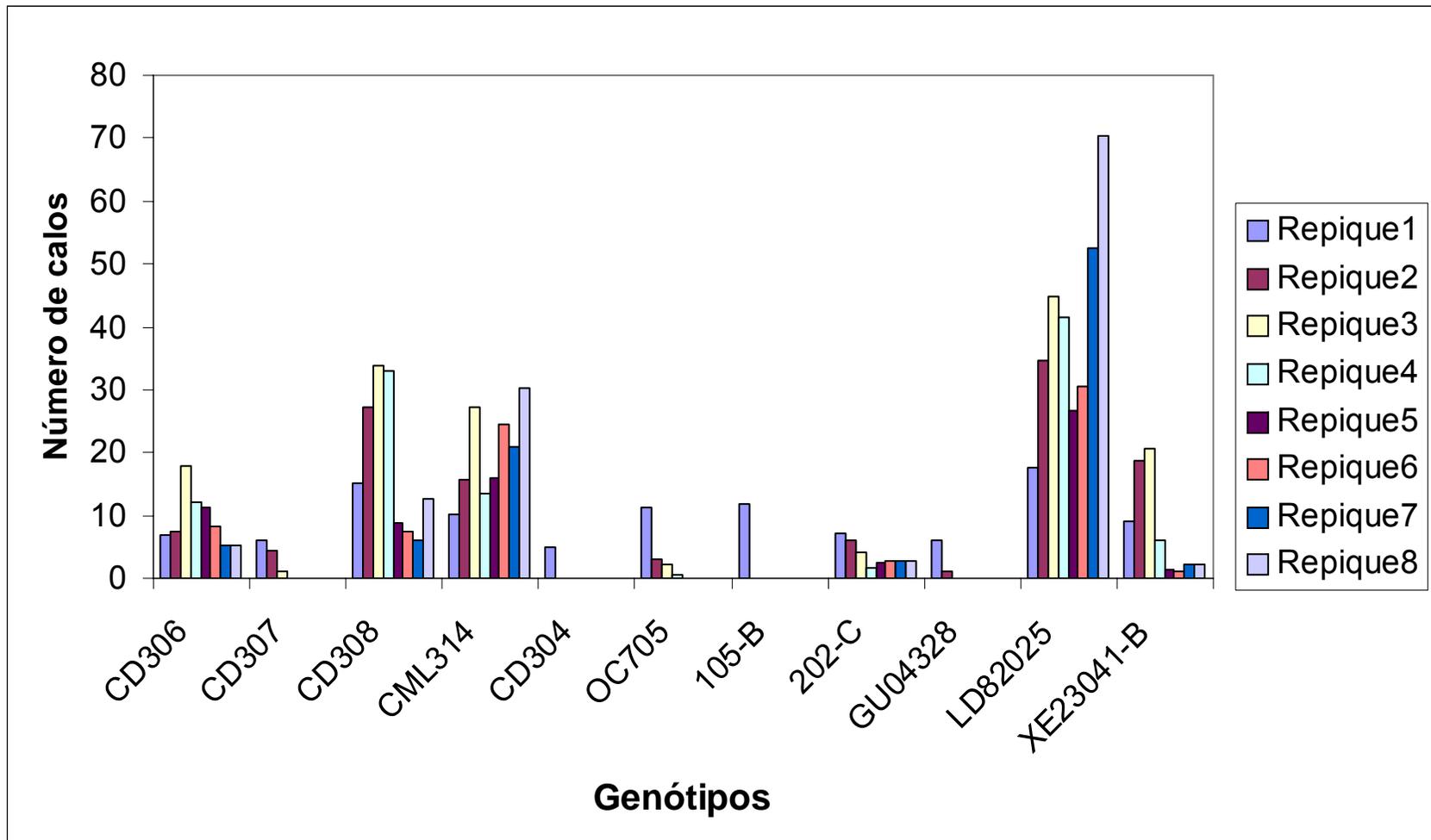


Figura 3 – Médias do número de calos obtidos a partir de 10 embriões imaturos de milho durante oito repiques. Todos os calos obtidos em uma fase foram plaqueados no repique seguinte.

Verifica-se pela Figura 4 o comportamento dos genótipos LD 82025, CML314 e CD 308 em cada repetição, ao longo dos oito repiques. Pode-se notar que o comportamento das repetições dentro do mesmo genótipo não variou muito, com exceção de uma única repetição do genótipo LD 82025. Nesta linhagem, uma das repetições teve uma média muito superior em relação às outras. Como discutido acima, este comportamento se refletiu na média final do número de embriões obtidos por esta linhagem. Esse fenômeno é bastante difícil de ser explicado, uma vez que, o plaqueamento foi realizado na mesma data, com o mesmo meio nutritivo, com embriões de tamanhos aproximados e de mesma idade, já que foram autopolinizados no mesmo dia. No entanto, experimentos com cultura de tecidos estão sujeitos a muitos fatores que podem provocar variação, e que não podem ser controlados, tais como: o vigor dos embriões, pequenas variações no conteúdo de umidade das placas, na uniformidade do meio de cultura, na temperatura, pela incidência mais ou menos direta de iluminação, entre outros. Pode-se observar pela Tabela 1, que os desvios-padrão obtidos em algumas avaliações foram elevados. Este fenômeno é recorrente na literatura, e por este motivo, as análises em geral são descritivas, e não são submetidas a testes estatísticos.

Os resultados obtidos demonstram que, no milho, existe associação entre genótipos e a capacidade de produção de calos embriogênicos. Essa dependência da resposta embriogênica ao genótipo, em culturas de calos iniciadas a partir de embriões imaturos, tem sido bem documentada (GREEN; PHILLIPS, 1975; VASIL et al., 1986). De acordo com Ozgen et al. (1996) e Machi (1998), o genótipo da planta doadora do embrião parece ser fundamental para o sucesso na obtenção de calos embriogênicos.

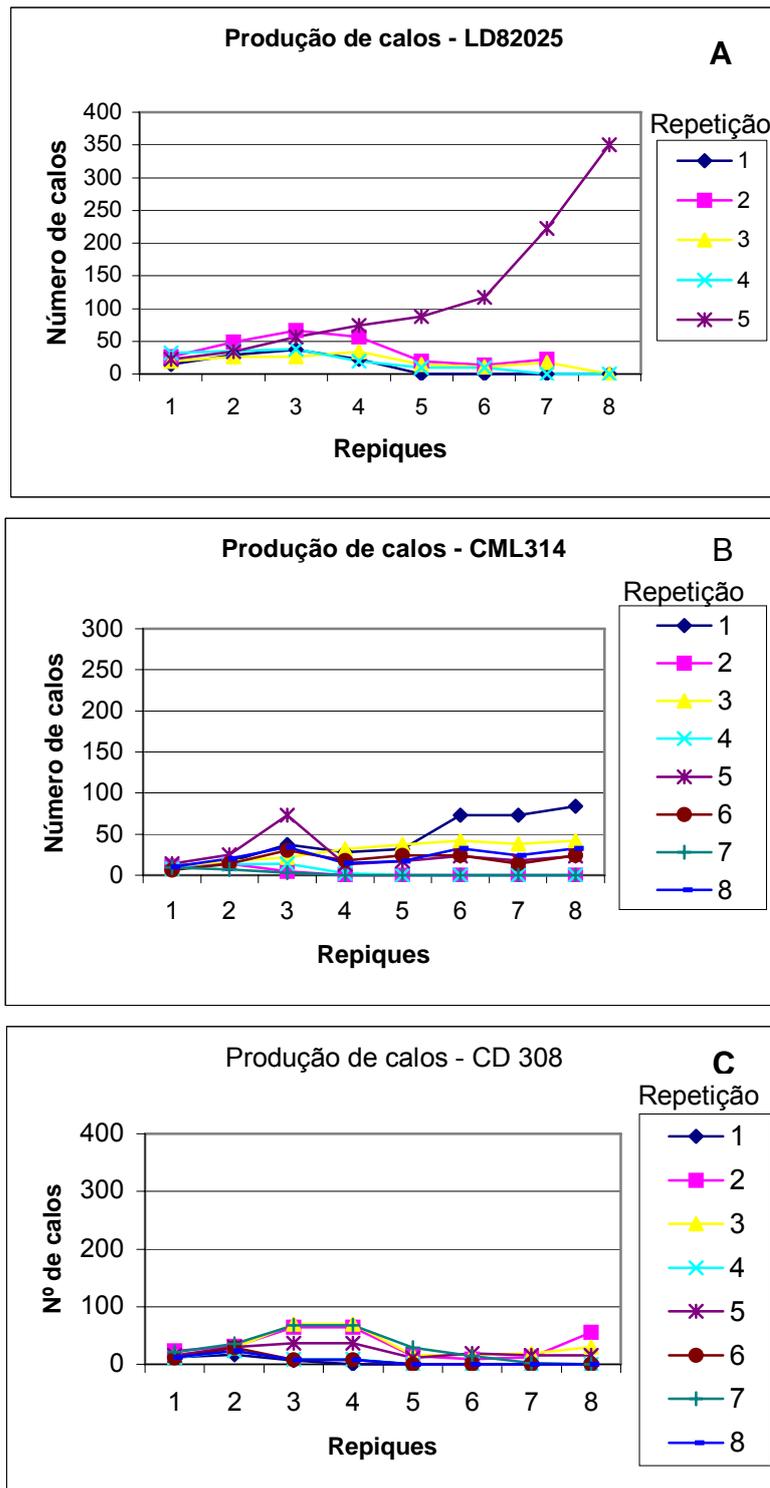


Figura 4 – Número de calos produzidos em cada repetição pelas linhagens LD82025 (A), CML 314 (B) e pelo híbrido duplo CD 308 (C).

Na fase de regeneração, foram avaliados números de pontos verdes obtidos em cada placa, número de plântulas transplantadas para caixa magenta e número de plantas transplantadas para vaso com vermiculita, as

quais resistiram ao processo de aclimação. Na Figura 5, estão representadas as fases do processo de regeneração de plantas.

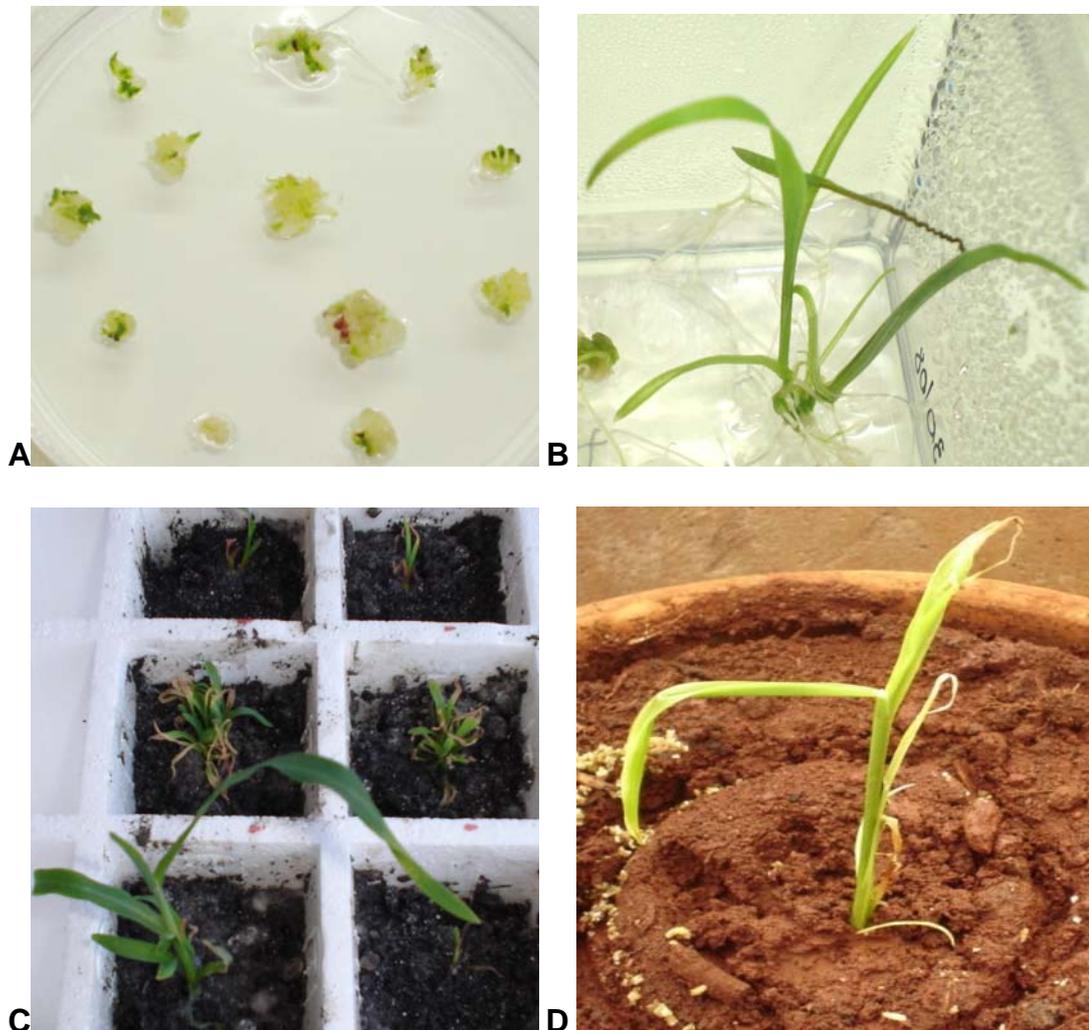


Figura 5 – Fases do processo de regeneração de plantas. **A)** Calos em meio de regeneração (RM1) com aproximadamente 5 dias de cultivo apresentando pontos verdes. **B)** Plântula em meio de regeneração RM2 (caixa magenta). **C)** Plântulas aclimatadas em bandeja com substrato orgânico. **D)** Planta transplantada para vasos contendo solo e vermiculita em casa-de-vegetação.

Foram avaliados três genótipos quanto à capacidade de regeneração: LD 82025, CD 308 e CML314. Estes foram os genótipos que apresentaram a melhor resposta à indução de calos embriogênicos a partir de embriões

imatuross. Foram incubados dez calos em cada placa. A linhagem LD 82025 foi a que apresentou as maiores médias em cada uma das fases (regeneração e aclimação). O híbrido CD 308 e a linhagem CML 314, embora tivessem apresentado um bom desempenho na fase de indução de calos embriogênicos, não repetiram o mesmo comportamento na fase de regeneração. Para estes dois genótipos, as médias obtidas na fase de regeneração foram baixas (Figura 6).

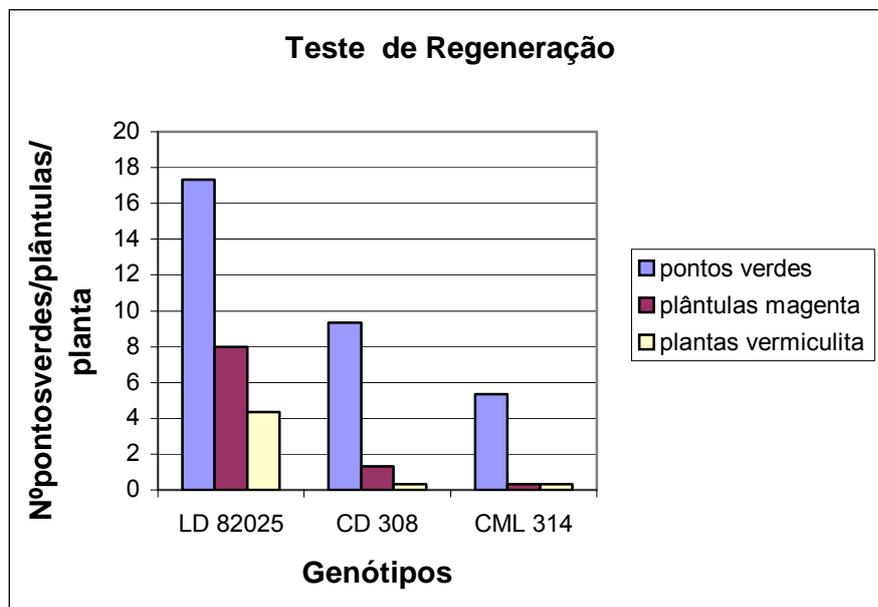


Figura 6 – Desempenho dos genótipos LD82025, CD 308 e CML 314 quanto à produção de pontos verdes, número de plântulas que resistiram transplante para caixa magenta e número de plantas em vermiculita que resistiram ao processo de aclimação.

Na Figura 6, verifica-se que para os três genótipos, o número de pontos verdes foi mais alto em relação ao das plantas em caixa magenta e vermiculita. Esse fato provavelmente pode ter ocorrido devido ao processo de aclimação. Segundo Serejo e Perecin (2000), a aclimação é uma etapa de grande influência no processo de regeneração de plantas, sendo que o grau de umidade, temperatura, época do ano e intensidade de luz são pontos que ainda devem ser melhorados para obtenção de um maior rendimento de regenerantes.

Neste trabalho, foram avaliados 11 genótipos de milho quanto à capacidade de formação de calos embriogênicos. As linhagens LD 82025 e CML 314 e o híbrido CD 308 apresentaram as melhores respostas à indução de calos embriogênicos. Destas, a linhagem LD 82025 apresentou a melhor resposta quanto à regeneração de plantas a partir de embriões somáticos.

Tomes e Smith (1985) afirmam que poucos genótipos de milho são capazes de formar calos tipo II (embriogênico), o que sugere a ocorrência de um controle genético na determinação do tipo de resposta ao cultivo *in vitro*. Entretanto, na literatura existem poucos relatos sobre os genes envolvidos na embriogênese somática e regeneração de plantas de milho. Alguns autores demonstram que períodos de estresse durante o cultivo *in vitro* podem promover aumentos nas taxas de indução, maturação e germinação de embriões somáticos (LEE et al., 2001; DRONNE et al., 1997).

É provável que cada um dos genótipos avaliados necessite de uma condição de cultivo diferente para indução de calos e regeneração de plantas. Sendo assim, maiores investimentos para otimização das condições de cultivo para cada genótipo seriam de fundamental importância. A obtenção de um número grande de genótipos que apresentem boas respostas regenerativas proporcionaria um leque maior para escolha do genótipo mais responsivo a tal característica.

A escolha de genótipos de milho que apresentem melhor capacidade regenerativa é muito importante, já que se trata da primeira etapa de um processo de transformação genética de plantas. Os resultados obtidos por este trabalho constituem a primeira avaliação do germoplasma de milho da Coodetec quanto à capacidade de obtenção de embriões somáticos a partir de embriões imaturos, e da regeneração de embriões somáticos em plantas verdes. Os resultados devem ainda ser validados com um maior número de ensaios, incluindo outros genótipos, mas os primeiros resultados indicam que a linhagem LD 82025 é uma boa escolha para se iniciar os trabalhos de transformação genética.

Este trabalho também teve como objetivo introduzir um protocolo de indução de embriogênese somática em milho, e de regeneração de plantas verdes a partir de embriões somáticos. Atualmente, este protocolo está implantado no Laboratório de Biotecnologia da Coodetec em Cascavel-PR, em função dos resultados obtidos.

5 CONCLUSÕES

Segundo os resultados obtidos nas condições em que foi realizado esse experimento, pode-se concluir que:

- houve diferença entre os genótipos avaliados quanto à capacidade de embriogênese somática e regeneração de plantas *in vitro* a partir do embrião imaturo de milho;

- o efeito do genótipo demonstrou ser importante para o sucesso de indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas;

- para indução de calo embriogênico e regeneração, a linhagem LD82025, foi a mais promissora para utilização em programas que envolvem transformação genética de plantas. A linhagem CML 314 e o híbrido CD 308 também apresentaram bom desempenho;

- a linhagem LD 82025 também foi a que apresentou a melhor capacidade de regeneração;

- os genótipos CD 307, CD 304, OC 705, 105-B e o GU04328, nessas condições de cultivo, não apresentaram respostas positivas para indução de calos embriogênicos;

- o processo de aclimação é um fator limitante para regeneração de plantas *in vitro*;

- com a condução do ensaio, foi introduzido um protocolo de indução de embriogênese somática, a partir de embriões imaturos de milho, e regeneração de plantas verdes, a partir de embriões somáticos, no Laboratório de Biotecnologia da Coodetec, em Cascavel-PR.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. P.; OLIVEIRA, R. D.; DANTAS, J. L. L. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, SP, v. 55, n. 1, p. 51-54, jan./mar. 2001.

ANDRADE, A. **Avaliação de parâmetros que influenciam a transformação genética do *Eucalyptus grandis* via *Agrobacterium***. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/tde>>.

BALAGUÉ, C. et al. Some physiological changes occurring during the senescence of auxin-deprived pear cells in culture. **Plant Physiology**, Rockville, USA, v. 68, p. 1339 -1343, 1982.

BARBOSA, J. M. **Estudo de fatores que influenciam o processo de transformação genética em citrus via *Agrobacterium tumefaciens***. 2002. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP, 2002.

BARROS, L. M. Embriogênese somática. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 26, julho/agosto 2002.

BARRUETO, C. L. P. et al. Plant regeneration from seedling explant of eucalyptus grandis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, The Netherlands, v. 56, p. 17-23, 1999.

BERED, E. et al. Regeneração de plantas de aveia a partir de calos embriogênicos e organogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 33, n. 11, p. 1827-1873, 1998.

BONNER, R. J.; GALSTON, W. A. **Princípios da fisiologia vegetal**. 5. ed. Madrid: Aguilar, 1973. p. 422-425.

BRASILEIRO, A. C.; CARNEIRO, V. T. **Manual de transformação genética de plantas**: serviço de produção de informação. Brasília, DF: [s.n], 1998.

BREGITZER, P.; SOMERS, P. A.; RINES, H. W. Development and characterization of friable, embryogenic oat callus. **Crop Science**, Madison, USA, v. 29, p. 798-803, 1989.

CARNEIRO, A. A. et al. **Milho transgênico**. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br>>. Acesso em: 24 abr. 2005.

CARVALHO, F. I. F. et al. **Condução de população no melhoramento genético de plantas**. Pelotas, RS: Ed. Universitária, 2003.

CAMB, C. R.C. et al. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir do embrião imaturo de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 2, p. 123-130, 2002.

CONAB. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 3 ago. 2005.

COSTA, M. G. C. et al. Transformação genética de cultivares de tomateiro industrial mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Piracicaba, SP, v. 12, n. 2, p. 107-118, 2000.

CRUZ, I. **Anuário Brasileiro do Milho**. 2004. p.26-28.

CUMMINGS, D. P.; GREEN, C. E.; STUTHMANS, D. D. Callus induction and plant regeneration in oats. **Crop Science**, Madison, USA, v. 16, p. 465-470, 1976.

DELPORTE, F.; MOSTADE, O.; JACQUEMIN, J. M. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, The Netherlands, v. 67, p. 73-80, 2001.

DONATO, V. M. T. G. et al. Embriogênese somática vitro em couve-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 4, p. 711-718, 2002.

DRONNE, S.; CABEL, P.; LELU, M, A. Desiccation decreases abscisic acid content in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, Denmark, v. 99, n. 3, p. 433-438, 1997.

FOWLER, M. W. Larger scale cultures of cells in suspension. In: VASIL, I. K. Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea Mays*. **Plant Physiology**, Rockville, USA, p. 399-408, 1986.

FRAME *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. **Plant Physiology**, Rockville, USA, v. 129, p. 13-22, 2002.

GONZÁLEZ, E. R. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E. grandis* x *Euophylla* via *Agrobacterium***. 2002. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 2002.

GOMMES, K. K. P. et al. Callus induction from coconut embryogenic axis. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, SP, v. 26, n. 1, p. 124-126, 2004.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogenese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: SPI, 1999. v. 2.

GUPTA, P. K.; DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. **Bio/Technology**, v. 5, p. 147-151, 1986.

GUIDOLIN, A. F. **Regeneração de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via *Agrobacterium***. 2003. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, SP, 2003.

GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. L. Plant regeneration from tissue cultures of maize. **Crop Science**, Madison, USA, v. 15, p. 417-421, 1975.

GROUT, B. W. W. Meristem tip culture. In: POLLARD, J. W.; WALKER, J. M. **Methods in molecular biology. Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, The Netherlands, 1990. p. 597.

HALLUIN, K. et al. Transgenic maize plants by tissue electroporation. **Plant Cell**, Rockville, USA, v. 4, p. 1495-1505, 1992.

HEINS, D. J.; MEE, G. W. P.; NICKEL, L. G. Chromosome numbers of some saccharum species hybrids and their cell suspension cultures. **American Journal of Botany**, St. Louis, USA, v.56, p.450-456, 1969.

KERBAUY, G. B. **Clonagem de plantas in vitro**. Disponível em: <<http://www.biotechnologia.com.br>>. Acesso em: 24 jul. 2004.

KYUN-HWAN, K. et al. Introduction of a atrus blight-associated gene into Carrizo trange by *Agrobacterium* mediated transformation. **Plant Cell Reports**, New York, USA, v. 23, n. 6, p. 386-390, 2004.

LEE, E. K.; CHO, D. Y.; SOH, W. Y. Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue culture of *Daucus carota*. **Plant Cell Reports**, New York, USA, v. 20, p. 408-415, 2001.

LIPP-NISSINEN, K. H. Molecular and cellular mechanisms of *Agrobacterium* mediated plant transformation. **Ciência e Cultura**, Campinas, SP, v. 45, p. 104-111, 1993.

LOGUÉRCIO, M. F.; CARNEIRO, N. P.; CACACICO, A. A. Milho Bt. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, DF, n. 24, jan./fev. 2002.

LUZ, F. J. F. et al. Produção de calos no cultivo *in vitro* de explantes de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) em meio de cultivo contendo Benziladenina E2, 4-D. **Revista da Faculdade de Agronomia**, n.16, p. 103-114, 1990.

MACHII, H. et al. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from and immature embryo cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Cultures**. Dordrecht, The Netherlands, p. 67-74, 1998.

MILACH, S.; FEDERIZZI, L. C.; CARVALHO, F. I. F. Regeneração de plantas no cultivo de calos de genótipos brasileiros de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, p. 1947-1956, 1991.

MOONEY, P. **Agrobacterium tumefaciens gene transfer into wheat tissues**. **Plant Cell, Tissue and Organ Cultures**. Dordrecht, The Netherlands, v. 25, p. 209-218, 1991.

OZIAS-AKINS, P. et al. Regeneration of transgenic put plants from stably transformed embryogenic callus. **Plant Science**, Rockville, USA, v. 93, p. 185-194, 1993.

OZGEM, M. et al. Callus induction and plant regeneration from imature and mature embryos, of winter durum wheat genotypes. **Plant Breeding**, Madison, USA, p. 455-458, 1996.

PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 25, p. 44-48, mar./abril 2002.

PRIOLI, A. J. **Estudo genético-molecular da esterilidade masculina Texas e desenvolvimento de metodologia de transformação em milho**. Projeto integrado de pesquisa/CNPq. Março /1998.

PRIOLI, L. M.; SILVA, W. J.; SONDAHL, M. R. Tissue culture and plant regeneration in diploide perennial teosint. **Plant Physiology**, Rockville, USA, v. 117, p. 185-190, 1984.

PRIOLI, L. M.; SONDAHL, M. R.; Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize. **Bio/Technology**, v. 7, p. 589-593, 1989.

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

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6 ed., Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2001. p. 793-794.

ROBBINS, W. J. Cultivation of excised roots tips and stem tips under sterile conditions. **Botanical Journal**, v. 73 p. 376-390, 1922.

ROCA, W. M.; MROGISNSK, L. A. (Eds). **Cultivo de tejidos em la agricultura**: fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1991. 970p.

SAUER, K. **Melhoramento de milho**. Campinas, SP, Fundação Cargill, 1966.

SEREJO, J. A. S.; PERECIN, M. L. R. A. Genótipos de milho com alta capacidade para embriogênese somática e regeneração de plantas obtidos a partir de calos. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, SP, v. 57, p. 717-722, out./dez. 2000.

SMITH, S. M.; STREET, H. E. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot are serially subculture. **Annals of Botany**, Oxford, England, v. 39, p. 223-241, 1974.

SWEDLUND, B.; LOCY, R. D. Q. Sorbitol as the primery carbon source for the grouwth of embryogenic callus of maize. **Plant Physiology**, Rockville, USA, p. 1339-1346, 1993.

TEIXEIRA, J. B.; MARBACH, P. A. S. **Otimização do processo de embriogênese somática em cacau**. Disponível em: <<http://www.biotechnologia.com.br>>. Acesso em: 07 maio 2005.

TOMES, D. T.; SMITH, O. S. The effect of parental genotype or initiation of embryogenic callus from elite maize germplasm. **Theoretical Applied Genetics**, Heidelberg, Berlin, v. 70, p. 505-509, 1985.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: SPI, 1999. v. 2.

TSUTOMU, A. E. **Cultura de tecidos de stevia rebaudiana**. 1995. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, PR, 1995.

VAN SLUYS, M. A.; HASHIMOTO, R. Y.; SCORTECCI, K. C. Gene transfer from *Agrobacterium* to plants. **Ciência e Cultura**, Campinas, SP, v. 44, p. 296-300, 1992.

VIEGAS, G. P. **Melhoramento de milho para condições adversas.** Campinas, SP: Fundação Cargill, 1989.

VIERTEL, K.; HESS, D. Shot tips of wheat as an alternative source for regenerable embryogenic callus cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** Dordrecht, The Netherlands, v. 44, p. 183-188, 1996.

WHITE, P. R. Potentially unlimited growth of excise tomato roots tips in liquid medium. **Plant Physiology,** Rochville, USA, n. 9, p. 585-600, 1934.

ZHENG, G.; DESSAI, A. P.; PRAKASH, C. S. Rapid and repetitive plant regeneration in sweetpotato from somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports,** New York, USA, v. 15, p. 381-385, 1996.

ZIMMERMANN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell,** Rockville, USA, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)