

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**BIOTECNOLOGIA VEGETAL VISANDO A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA
DE MILHO COM OS GENES *vip3Aa* E *bar* VIA *Agrobacterium tumefaciens***

GUILHERME MORIKOSHI VIEIRA

Engenharia Agrônômica

**Jaboticabal - SP
2025**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

BIOTECNOLOGIA VEGETAL VISANDO A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA
DE MILHO COM OS GENES *vip3Aa* E *bar* VIA *Agrobacterium tumefaciens*

GUILHERME MORIKOSHI VIEIRA

Orientador: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Coorientador: Profa. Dra. Sandra Helena Unêda-Trevisoli

Trabalho apresentado à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, para graduação em
ENGENHARIA AGRONÔMICA.

Jaboticabal - SP
1º Semestre/2025

V658b

Vieira, Guilherme Morikoshi

BIOTECNOLOGIA VEGETAL VISANDO A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA
DE MILHO COM OS GENES *vip3Aa* E *bar* VIA *Agrobacterium tumefaciens* /
Guilherme Morikoshi Vieira. -- Jaboticabal, 2025

76 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Agrônômica) -
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Janete Aparecida Desidério

Coorientadora: Sandra Helena Unêda-Trevisoli

1. Gene repórter RUBY. 2. *Zea mays*. 3. *Agrobacterium*. 4. *Bacillus*
thuringiensis. 5. Cultura de tecido. I. Título.

AUTOR
GUILHERME MORIKOSHI VIEIRA

TÍTULO DO TRABALHO ACADÊMICO
Biotecnologia vegetal visando a transformação genética de milho com os genes *vip3Aa* e *bar* via *Agrobacterium tumefaciens*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Agrônômica.

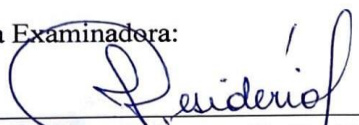
Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério
Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Unêda-Trevisoli

Área de Concentração: Engenharia Agrônômica

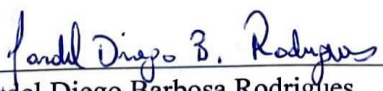
Data da defesa: 24/06/2025

(x) Aprovado
() Reprovado

Banca Examinadora:


Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério
Docente do Departamento de Biologia – FCAV/UNESP


Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza
Docente do Departamento de Biologia – FCAV/UNESP


Dr. Jardel Diego Barbosa Rodrigues
Pós-Doutorado Departamento de Biologia – FCAV/UNESP

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 15/07/2025


Prof. Dr. Davi Rodrigo Rossatto
Chefe do Departamento

Ofereço aos meus pais Waldomiro
Machado Vieira, Paula Antolin Morikoshi e
ao meu irmão Henrique Morikoshi Vieira

Agradecimentos

A música “We Didn't Start The Fire”, na versão da banda Fall Out Boy, cita os eventos mais provocantes das últimas duas décadas. Entre referências como Pokémon, Kim Jong-Un e a morte de Michael Jackson, a palavra “GMO” aparece, mostrando como esse pequeno fragmento da ciência conseguiu penetrar o senso comum. Esse “pequeno” achado científico fez até políticos que jamais tocaram a terra ou uma placa de Petri se debruçarem sobre o assunto. Este projeto, com todos os seus contratempos, representa minha paixão pelas Ciências Agrárias. A partir de hoje, me consagro como o primeiro graduado desta unidade a alterar o DNA de uma planta — feito pelo qual fui premiado. Nunca me senti tão frustrado, tão paranoico, e, ao mesmo tempo, tão vitorioso. Por isso, cabe a mim agradecer a tudo e a todos que fizeram parte dessa jornada.

Agradeço, em primeiro lugar, à Profa. Dra. Janete Desidério, por confiar em meu potencial e enfrentar este enorme desafio ao ponto de trabalhar comigo na bancada. Agradeço à Profa. Dra. Sandra Trevisoli, por confiar no meu trabalho e me apoiar durante todo o processo. Agradeço às duas equipes do laboratório LGBBA e ao laboratório de Melhoramento Genético de Soja pelo apoio, companhia e aprendizado. Sou imensamente grato à minha família, pelo apoio quase incondicional nesta jornada — em especial ao Ageu, com quem escolhi compartilhar a vida. Agradeço à EMBRAPA Milho e Sorgo, em especial à Dra. Meire e à Dra. Andrea, por me ensinarem com dedicação e contribuírem de forma fundamental para o sucesso deste projeto. Meu agradecimento à Profa. Dra. Maria Helena Goldman, por me receber em seu laboratório e

compartilhar com tanta atenção e prazer seus conhecimentos sobre transformação genética.

A todos os professores do curso de Agronomia, meu sincero obrigado. Cada um teve papel fundamental em manter vivo meu fascínio por essa ciência. Agradeço também ao PIBIC pelo financiamento e fomento à pesquisa que tornou este trabalho possível. Sinceramente, gostaria de agradecer nominalmente a cada pessoa que me ajudou, pois precisei de muita ajuda, mesmo! — e cada participação foi crucial para a conclusão deste projeto. Por fim, agradeço às mais de 700 plantinhas de milho que cuidei com raiva e com amor, e que deram sua vida por este estudo. Por meio delas, pude honrar minhas orientadoras e representar a FCAV na premiação do CIC.

ÍNDICE

RESUMO	5
SUMMARY	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. A Cultura do Milho	13
2.2. A Hidroponia para Cultura de Tecidos	15
2.3. A cultura de tecidos no milho	17
2.4. Transformação genética do milho via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 20	
2.5. Construções gênicas repórteres na transformação de plantas.....	22
2.6. Milho transgênico resistente a pragas e tolerante a herbicida	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Condições para cultivo em hidroponia da variedade de milho FCAV/UNESP	30
3.2. Condições para cultivo em vasos da variedade de milho FCAV/UNESP	31
3.3. Obtenção dos explantes da variedade FCAV/UNESP para indução de calos.....	31
3.4. Expressão transiente da construção repórter RUBY em linhagens de milho da EMBRAPA	33
3.4.1. Obtenção dos embriões imaturos das linhagens de milho da EMBRAPA	34
3.4.2. Transformação via <i>A. tumefaciens</i> e seleção dos calos transformados	35
3.5. Obtenção da linhagem de milho promissora com a construção contendo os genes <i>vip3Aa</i> e <i>bar</i> de <i>B. thuringiensis</i>	37
3.5.1. Confirmação dos clones de <i>A. tumefaciens</i> contendo os genes <i>vip3Aa</i> e <i>bar</i>	38
3.5.2. Transformação via <i>Agrobacterium</i> e obtenção das plantas de milho transformadas.	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Variedade de milho FCAV/UNESP cultivada em hidroponia	42
4.2. Obtenção dos explantes da variedade FCAV/UNESP para indução de calos.....	44
4.3. Expressão transiente da construção repórter RUBY em linhagens de milho da EMBRAPA	50
4.4. Transformação da linhagem de milho B104 da EMBRAPA com a construção pMCG1005:: <i>vip3Aa::bar</i>	57
5. CONCLUSÕES	62
LITERATURA CITADA.....	64

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a avaliação de um protocolo eficiente de transformação de milho aplicado a linhagens de milho (*Zea mays* L.), com foco na transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Para isso, foram testados e adaptados quatro protocolos distintos previamente descritos na literatura, com aplicação prática em linhagens de milho desenvolvidas pela UNESP. O estudo envolveu mais de 700 plantas, cultivadas sob condições controladas por meio de técnicas como hidroponia e cultivo em casa de vegetação, visando o fornecimento de explantes adequados para a indução de calos e posterior regeneração. Como etapa preliminar, foi realizado o ensaio de transformação transiente utilizando a construção genética RUBY, que atua como sistema repórter visual baseado na via biossintética da betalaína. Esse ensaio foi conduzido nas linhagens B104, L12 e L14, com o intuito de avaliar a eficiência da entrega gênica e a suscetibilidade das variedades ao processo de transformação. A linhagem B104 demonstrou maior compatibilidade com os protocolos testados, permitindo a regeneração de plantas completas em meio de cultura, o que possibilitou sua posterior utilização nos ensaios de transformação estável. Na etapa seguinte, a linhagem B104 foi submetida ao processo de transformação genética mediado por *A. tumefaciens*, utilizando estirpes contendo o vetor binário pMCG1005::*vip3Aa::bar*. Este vetor carrega os genes *vip3Aa*, proveniente de *Bacillus thuringiensis*, responsável por conferir resistência a lagartas da ordem Lepidoptera, e *bar* (de *Streptomyces hygroscopicus*), utilizado como marcador seletivo por meio da aplicação do herbicida glufosinato de amônio, também conhecido comercialmente como BASTA®. Após o processo de cocultivo, os calos embriogênicos foram submetidos à seleção em meio contendo o herbicida, e os tecidos sobreviventes foram regenerados até a obtenção de plantas completas. A metodologia proposta permitiu a obtenção de eventos transgênicos em milho, demonstrando a viabilidade do protocolo estabelecido e a efetividade da linhagem B104 como genótipo modelo para transformação. Este trabalho contribui para o avanço das técnicas de engenharia genética em milho tropical, fornecendo uma base metodológica sólida para futuras pesquisas com outras variedades e genes de interesse agrônomo.

Palavras-chave – Gene repórter RUBY, *Zea mays*, *Agrobacteria*, *Bacillus thuringiensis*, Cultura de tecido.

SUMMARY

The present study aimed to develop and evaluate an efficient transformation protocol for maize (*Zea mays* L.), focusing on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation applied to maize inbred lines. To this end, four distinct protocols previously described in the literature were tested and adapted for practical application in maize lines developed by UNESP. The study involved more than 700 plants, grown under controlled conditions using techniques such as hydroponics and greenhouse cultivation, in order to provide suitable explants for callus induction and subsequent regeneration. As a preliminary step, a transient transformation assay was performed using the RUBY genetic construct, which functions as a visual reporter system based on the betalain biosynthetic pathway. This assay was conducted on the B104, L12, and L14 lines to assess gene delivery efficiency and the susceptibility of each variety to the transformation process. The B104 line showed greater compatibility with the tested protocols, allowing for the regeneration of complete plants in culture medium, which enabled its subsequent use in stable transformation experiments. In the next stage, the B104 line was subjected to *Agrobacterium*-mediated genetic transformation using strains carrying the binary vector pMCG1005::*vip3Aa::bar*. This vector contains the *vip3Aa* gene, derived from *Bacillus thuringiensis*, responsible for conferring resistance to caterpillars of the order Lepidoptera, and the *bar* gene (from *Streptomyces hygroscopicus*), used as a selectable marker through the application of the herbicide glufosinate ammonium, commercially known as BASTA®. After the cocultivation process, embryogenic calli were subjected to selection in medium containing the herbicide, and surviving tissues were regenerated until complete plants were obtained. The proposed methodology enabled the generation of transgenic maize events, demonstrating the feasibility of the established protocol and the effectiveness of the B104 line as a model genotype for transformation. This work contributes to the advancement of genetic engineering techniques in tropical maize, providing a solid methodological foundation for future research involving other varieties and agronomically important genes.

Keywords - RUBY reporter gene, *Zea mays*, *Agrobacterium*, *Bacillus thuringiensis*, Tissue culture.

1. INTRODUÇÃO

O milho [*Zea mays* (L.)] é uma das culturas mais antigas cultivadas pelo homem e está intimamente ligada ao desenvolvimento das primeiras civilizações. A ampla variabilidade genética desta planta permite seu cultivo nas mais diversas regiões e faz deste cereal uma das três principais culturas produzidas no planeta. No Brasil, esta é a segunda maior cultura de relevância econômica, sendo superada apenas pela soja que lidera a produção de grãos no país. Para a safra 2024/2025 a previsão de colheita é de 124,7 milhões de toneladas, dos quais 87,1 milhões de toneladas serão destinados ao consumo interno (CONAB, 2025).

A demanda por esse grão tem sido cada vez maior, dado o crescimento populacional, razão pela qual o desenvolvimento de plantas mais produtivas e

resistentes a diferentes estresses (bióticos e abióticos) é um dos maiores desafios da ciência na agricultura.

O melhoramento genético clássico, realizado por meio de técnicas de indução de mutação e cruzamentos entre plantas para desenvolvimento do milho híbrido, visto até a década de 1990, foi o responsável pelo contínuo aumento de produtividade. No entanto, o avanço do conhecimento científico permitiu o desenvolvimento das plantas transgênicas e, no final da década de 1990, teve início o cultivo do milho transgênico, tecnologia que proporcionou novos ganhos de produtividade, estabilizando a área necessária para cultivo (PEREIRA FILHO; BORGHI, 2020).

A transgenia é uma das ferramentas mais rapidamente adotada na agricultura global para uma produção de alimentos cada vez mais sustentável. Embora seja importante dizer que existem produtos transgênicos aplicados às áreas da saúde, meio ambiente e insumos para a indústria, na agricultura eles promoveram uma verdadeira revolução. Os transgênicos permitiam melhorar o desempenho de culturas agrícolas partindo da ideia de que a expressão de características encontradas em outras espécies poderia adicionar vantagens não disponíveis naturalmente nas culturas (KHUSH, 2012).

O Brasil é o segundo país em área plantada com transgênicos no mundo, sendo que o milho transgênico, na safra 2024/2025, representa 96% de todo o milho plantado no país. A taxa de adoção desta tecnologia é similar à dos EUA, considerado o maior produtor de milho geneticamente modificado no mundo (FAO, USDA, 2020).

Dos 307 eventos de transformação no milho introduzidos no mercado ao redor do mundo, 80 estão autorizados no Brasil para consumo humano ou animal. Os genes inseridos são, em sua maioria, aqueles que conferem resistência a insetos e tolerância a herbicidas, conjuntamente. O milho Bt é um evento de sucesso que se refere à inserção de genes inseticidas, provenientes da bactéria de solo, *Bacillus thuringiensis* (Bt), que produz toxina capaz de provocar paralisia no sistema digestório de pragas invasoras ao se alimentarem da planta modificada (ISAAA, 2019).

As propriedades entomo-pesticidas naturais de *B. thuringiensis* são devidas à produção de proteínas cristalinas e solúveis durante diferentes fases de crescimento. Além das proteínas Cry e Cyt, essa bactéria também produz a proteína inseticida vegetativa (Vip) durante sua fase de crescimento vegetativo, que é considerada uma excelente candidata tóxica devido à diferença na homologia de sequência e nos sítios receptores das proteínas Cry. As proteínas denominadas Vip3 têm atividade inseticida contra pragas da ordem Lepidoptera e são semelhantes às proteínas Cry em termos de potencial de toxicidade contra insetos suscetíveis (ESTRUCH et al., 1996). As proteínas Vip3 foram piramidadas com sucesso, juntamente com proteínas Cry, em arroz, milho e algodão transgênicos para combater populações de pragas resistentes (GUPTA et al., 2021).

Os genes de tolerância a herbicidas podem ser provenientes de vários tipos de bactérias e têm a função de promover tolerância à uma molécula de herbicida específica, como por exemplo, o gene *bar*, originalmente clonado de

Streptomyces hygroscopicus, um organismo que produz o tripeptídeo bialafos como um metabólito secundário. O produto do gene *bar* foi purificado e mostrou ser uma enzima modificadora que não acetila o bialafos ou glutamato. A transferência interespecífica deste gene de *Streptomyces* para *Escherichia coli* mostrou que ele poderia ser usado como um marcador selecionável em outras bactérias. Nas plantas transgênicas o gene *bar* é usado para projetar plantas resistentes a herbicidas, impedindo a morte da planta quando submetida ao manejo de plantas daninhas (THOMPSON et al., 1987). Ambos os traços inseridos são extremamente atrativos aos produtores, pois auxiliam significativamente o manejo de pragas e ervas daninhas.

Como aplicação atual desta tecnologia, a Embrapa, em parceria com a Empresa Semeali Sementes, desenvolveu um híbrido de milho transgênico que combina duas importantes tecnologias: tolerância a lagartas e a resistência ao herbicida glifosato. Essa combinação de características torna a cultivar altamente versátil, possibilitando o seu uso em diversos ambientes de cultivo em todo o Brasil. Chamado de XB 3042 VTPRO2, o novo milho, lançado em 2023, possui características que possibilitam a redução do ataque de lagartas, facilitando o controle de insetos-praga que frequentemente prejudicam as lavouras de milho, reduzindo o uso de inseticidas e diminuindo os impactos ambientais e os custos associados ao controle de pragas. Além disso, o material apresenta resistência ao glifosato, um herbicida amplamente utilizado na agricultura para o controle de plantas daninhas, sem prejudicar o cultivo do milho, o que facilita o manejo da lavoura e aumenta a eficiência na produção (EMBRAPA, 2024a).

Um dos métodos de obtenção de plantas geneticamente modificados é aquele mediado pela bactéria de solo *Agrobacterium tumefaciens*. A agrobactéria selvagem é conhecida por causar a doença denominada galha da coroa em plantas, inserindo genes indutores de tumores e produtores de um substrato do qual a bactéria consiga se alimentar. O plasmídeo Ti (indutor de tumor) da agrobactéria foi modificado por meio de ferramentas da biologia molecular e teve os genes patogênicos substituídos por genes de interesse comercial, os quais concedem valor agrônomo às plantas transformadas (GELVIN, 2003).

A transformação do milho realizada por agrobactéria evoluiu ao longo dos anos. Inicialmente as linhagens de agrobactérias não infectavam os tecidos de monocotiledôneas e os primeiros milhos transgênicos foram obtidos, em sua maioria, através do método da biobalística (TAYLOR; FAUQUET, 2002). Porém, em 1992 os primeiros milhos transgênicos obtidos por meio da transformação com agrobactéria foram obtidos quando se adicionou o componente, acetoseringona no meio de cocultivo, que é um composto liberado pela planta mediante estresse físico dos tecidos e que está presente em dicotiledôneas, mas ausente em monocotiledôneas (FRAME et al., 2002; LUPOTTO et al., 2004).

Além da questão envolvendo a agrobactéria, muitas são as etapas que devem ser otimizadas para se obter sucesso na transformação do milho. A regeneração das plantas em cultura de tecidos é uma das mais desafiadoras. A obtenção de calos embriogênicos viáveis, a formulação precisa do meio de cultura, os tipos de explantes a serem extraídos e o método de cocultivo, foram

etapas cruciais, as quais exigiram um esforço global, com 25 anos de pesquisas para a otimizar os processos e obtenção de milhos transgênicos estáveis (KAUSCH et al., 2021; HOPP, 2022).

Embora haja a necessidade de muitas pesquisas envolvendo as modificações genéticas na obtenção do milho transgênico, é inquestionável a necessidade de se investir no conhecimento e aperfeiçoamento das técnicas que promovam o aumento da produtividade agrícola de forma sustentável, reduzindo perdas causadas por insetos e diminuindo o uso intensivo de defensivos químicos. Como resultado, os agricultores podem obter maiores rendimentos por hectare, utilizar menos produtos químicos, o que reduz impactos ambientais e melhora a segurança alimentar em um cenário de crescimento populacional e mudanças climáticas.

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo geral a inserção do gene inseticida *vip3Aa* e do gene *bar* tolerante a herbicida em milho, visando a obtenção de um evento com duas importantes características agronômicas, usando técnicas de biologia molecular e transformação via agrobactéria.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais gramíneas cultivadas no mundo pertencente à família Poaceae. É originário da América Central e foi domesticado há cerca de 9 mil anos, desempenhando um papel central na agricultura de várias civilizações antigas (SANGOI et al., 2002). A planta apresenta características morfológicas distintas, como raízes fasciculadas, colmos robustos e folhas largas, com inflorescências masculinas (pendão) e femininas (espiga) separadas na mesma planta. A taxonomia do milho o classifica dentro da subfamília Panicoideae, tribo Andropogoneae, e seu genoma é altamente complexo, contendo muitos elementos repetitivos e segmentos duplicados (BENNETZEN et al., 2004).

A fenologia do milho é dividida em fases vegetativas (V) e reprodutivas (R), sendo amplamente influenciada por fatores ambientais como fotoperíodo,

temperatura e disponibilidade hídrica. As fases fenológicas vão desde a emergência (VE) até o estágio fisiológico de maturidade (R6). A duração dessas fases varia conforme o híbrido e as condições edafoclimáticas, influenciando diretamente a produtividade (TRINDADE et al., 2006). O manejo adequado com base na fenologia permite a aplicação racional de insumos como fertilizantes e defensivos, além de contribuir para o escalonamento da produção e controle fitossanitário (SANGOI, 2001).

A fisiologia do milho está fortemente relacionada à sua alta eficiência fotossintética do tipo C4, o que permite maior aproveitamento de luz e menor perda de água em relação a plantas C3. Isso proporciona ao milho grande adaptabilidade a diferentes condições climáticas, desde que haja fornecimento adequado de nutrientes e água (TAIZ et al., 2017). Os principais processos fisiológicos que impactam na produtividade incluem absorção de nutrientes, transporte de fotoassimilados e respiração celular. Deficiências em macro e micronutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio, zinco e boro comprometem o desenvolvimento radicular e o enchimento de grãos (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

O milho é o cereal mais produzido no mundo, com destaque para os Estados Unidos, China e Brasil como principais produtores. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2025), a produção brasileira de milho na safra 2024/2025 está estimada em 124,7 milhões de toneladas, com destaque para o Centro-Oeste como principal região produtora. No mundo, a produção estimada de milho para o mesmo período é de 1,22 bilhão de toneladas, conforme dados do U.S. Food and Drug Administration (FDA,

2024). A Embrapa (2024b) aponta que o milho é responsável por cerca de 40% do consumo total de grãos no Brasil, sendo amplamente utilizado para alimentação animal, consumo humano e bioenergia. A produtividade média nacional gira em torno de 5,7 toneladas por hectare, com tendência de crescimento impulsionada por avanços genéticos e tecnológicos.

2.2. A hidroponia para cultura de tecidos

A técnica da hidroponia, definida como o cultivo de plantas em meio desprovido de solo, utilizando soluções nutritivas cuidadosamente balanceadas, constitui uma das abordagens mais avançadas e promissoras no contexto da agricultura intensiva e tecnificada. Fundamentada na reposição contínua de nutrientes essenciais por meio de soluções aquosas, a hidroponia permite o monitoramento exato do fornecimento de macro e micronutrientes, promovendo crescimento vegetal acelerado e altamente eficiente em termos de uso de recursos naturais. Tal modalidade de cultivo reduz significativamente a incidência de patógenos de solo, o uso de defensivos químicos e a variabilidade fenotípica entre as plantas (FURLANI, 1999). Simultaneamente, a técnica da cultura de tecidos vegetais, alicerçada na totipotência celular, viabiliza a regeneração de indivíduos inteiros a partir de células ou tecidos meristemáticos cultivados *in vitro*, sob condições assépticas e fisiologicamente controladas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A integração desses dois sistemas representa uma convergência sinérgica de tecnologias de cultivo que priorizam a uniformidade, a previsibilidade e a sustentabilidade do processo produtivo vegetal.

O emprego combinado de hidroponia e cultura de tecidos se justifica não apenas por seu potencial produtivo, mas também pela convergência metodológica que ambas compartilham em relação ao controle ambiental, à assepsia e à nutrição mineral precisa. A utilização de plântulas oriundas da micropropagação confere vantagens operacionais substanciais aos sistemas hidropônicos, destacando-se pela homogeneidade genética, ausência de fitopatógenos e elevada taxa de sobrevivência durante a fase de aclimação (TORRES et al., 1988). Em um contexto de produção intensiva, como aquele proporcionado pela hidroponia, essas características se traduzem em otimização do espaço produtivo, uniformidade nos ciclos fenológicos e incremento significativo nos índices de produtividade por metro quadrado (SANTOS; CASALI, 2004). A base biotecnológica que sustenta a produção dessas mudas *in vitro* também favorece a inserção de melhoramentos genéticos, seja por via convencional ou por técnicas de transformação genética, permitindo o cultivo de genótipos superiores com elevada eficiência agrônoma.

Do ponto de vista fisiológico, ambas as técnicas compartilham uma profunda dependência do entendimento preciso dos mecanismos bioquímicos e hormonais que regulam o crescimento e o desenvolvimento vegetal. Na hidroponia, a composição da solução nutritiva deve ser ajustada em função das exigências fisiológicas da cultura e de suas diferentes fases ontogenéticas, exigindo conhecimento aprofundado sobre interações iônicas, dinâmica da absorção radicular e comportamento fenológico das plantas (TAIZ et al., 2017). Por outro lado, na cultura de tecidos vegetais, o sucesso da regeneração e da

diferenciação celular depende fundamentalmente da composição do meio de cultura, como o consagrado meio MS, formulado por Murashige e Skoog (1962), que incorpora nutrientes minerais, vitaminas e fitohormônios em proporções meticulosamente ajustadas. A manipulação da relação entre auxinas e citocininas, por exemplo, é determinante na indução de calos, raízes ou brotações, sendo, portanto, um ponto crítico de domínio técnico para os profissionais que operam essa biotecnologia.

Conjuntamente, a hidroponia e a cultura de tecidos vegetais constituem pilares fundamentais da horticultura de precisão e da agricultura vertical, cujos paradigmas visam maximizar a produtividade vegetal com o mínimo impacto ambiental. A aplicação integrada dessas técnicas é particularmente eficaz na produção de hortaliças folhosas, plantas ornamentais e espécies de elevado valor agregado, nas quais a uniformidade e a sanidade são atributos comerciais decisivos. Ao utilizar mudas obtidas via micropropagação, é possível estabelecer sistemas hidropônicos com elevado grau de previsibilidade, eficiência e segurança fitossanitária, propiciando ciclos produtivos otimizados e economicamente viáveis (RESENDE et al., 2012).

2.3. A cultura de tecidos no milho

A cultura de tecidos vegetais aplicada ao milho configura-se como uma das mais sofisticadas ferramentas na biotecnologia vegetal moderna, permitindo o desenvolvimento de metodologias de propagação clonal,

conservação de germoplasma, transformação genética e experimentação fisiológica em nível celular. Contudo, a espécie apresenta notável recalcitrância à regeneração *in vitro*, fato atribuído, principalmente, à intensa oxidação fenólica, à elevada dependência genotípica e à limitada competência embriogênica de grande parte das linhagens comerciais (VARMAN et al., 2018; SHARMA et al., 2023). Tais características impõem severas barreiras à uniformização de protocolos reprodutíveis e eficientes, o que torna a cultura de tecidos do milho um campo que exige contínua otimização técnica e científica.

A regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos é o caminho mais comum nos protocolos para o milho, com embriões imaturos sendo a fonte explantada preferencial. O meio de cultura de Murashige e Skoog (MS), suplementado com o auxínico sintético 2,4-D, é amplamente empregado para indução calogênica (MURASHIGE; SKOOG, 1962; ABDULWAHID et al., 2021). A resposta morfogênica obtida depende de inúmeros fatores, como a idade fisiológica do explante, a natureza do agente hormonal, a fonte de carbono e a composição físico-química do meio. O aminoácido L-prolina, por exemplo, exerce efeito significativo sobre a friabilidade e a embriogenicidade dos calos (ARMSTRONG; GREEN, 1985), enquanto antioxidantes como ácido ascórbico e cisteína demonstraram eficácia na atenuação do escurecimento dos tecidos cultivados (TALEB et al., 2020).

A resposta regenerativa apresenta-se profundamente influenciada pelo genótipo do milho, com variações acentuadas entre linhagens endogâmicas e híbridas. Protocolos específicos vêm sendo ajustados para genótipos

particulares, envolvendo alterações na concentração de macro e micronutrientes, densidade de inoculação celular, condições fotoperiódicas e estímulos osmóticos (RAJHI et al., 2019; GORDON-KAMM et al., 1990). Avanços na compreensão das interações hormonais, especialmente entre auxinas e citocininas, têm revelado aspectos fundamentais da reprogramação celular envolvida na embriogênese somática (LI et al., 2017a). A inclusão de reguladores de crescimento alternativos, como thidiazuron (TDZ) e benzilaminopurina (BA), também tem sido explorada como estratégia para ampliar o espectro regenerativo de genótipos recalcitrantes.

As dificuldades técnicas enfrentadas na cultura de tecidos do milho são multifatoriais. Entre os principais obstáculos encontram-se a indução de calos não embriogênicos, a rápida necrose dos explantes, a perda de embriogenicidade durante subculturas sucessivas e a baixa taxa de regeneração em plantas viáveis (SHARMA et al., 2023; TALEB et al., 2020). Tais limitações resultam em ineficiência nos protocolos e, por vezes, em variações genéticas indesejadas nas plantas regeneradas, conhecidas como somaclonia. Além disso, há desafios inerentes à contaminação microbiológica, à exigência por infraestrutura controlada e à elevada sensibilidade dos tecidos aos fatores ambientais *in vitro*. Frente a isso, esforços recentes têm buscado integrar abordagens fisiológicas e moleculares para elucidar os mecanismos que limitam a totipotência celular no milho e, assim, desenvolver metodologias mais robustas.

2.4. Transformação genética do milho via *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação via *Agrobacterium tumefaciens* e a biobalística são os dois principais métodos utilizados na introdução de genes no genoma das plantas (TINGAY et al., 1997; DAI et al., 2001, LI et al., 2013). No entanto, a transformação mediada por *Agrobacterium* é preferível à biobalística devido à sua expressão mais estável, menores chances de silenciamento do transgene, inserção precisa, introdução de poucas cópias no genoma e maiores chances do transgene segregar de forma mendeliana (ALIMOHAMMADI; BAGHERIEH-NAJJAR, 2009). A modificação genética de milho, considerada por algum tempo recalcitrante, via *A. tumefaciens*, tornou-se um procedimento de rotina por empresas de biotecnologia produtoras de sementes e na maioria dos laboratórios públicos e privados que trabalham com esta cultura. Essa estratégia tem se tornado eficiente para gerar genótipos mais tolerantes e resistentes para ambientes restritivos de cultivo, por meio da inserção de genes com características de interesse agrônomo, como resistência a pragas e tolerância a herbicidas (KAMM et al., 1990; FRAME et al., 2002; ISHIDA et al., 2007; CAMILO et al., 2019).

Durante muito tempo, a transformação genética de monocotiledôneas usando *Agrobacterium* teve baixa eficiência, mas recentemente essa técnica tem se tornado o método preferido para esse grupo de plantas (ISHIDA et al., 1996). *A. tumefaciens*, uma bactéria do solo, transfere naturalmente genes para plantas, levando ao surgimento de tumores na região da infecção. Estes tumores resultam da presença do plasmídeo Ti ou plasmídeo indutor de tumor na célula bacteriana, o qual contém duas regiões importantes: o T-DNA,

responsável por causar tumores e produzir opinas e hormônios, e a região vir, que permite a transferência do T-DNA para o genoma vegetal

As opinas são aminoácidos utilizados apenas pela *Agrobacterium* como fonte de carbono e nitrogênio, enquanto os hormônios são responsáveis pela indução de tumores em vegetais (GELVIN, 2003). As regiões dos T-DNAs de plasmídeos selvagens contêm genes que comandam a produção de opinas e hormônios, tais como auxina e citocinina, pela célula vegetal. O T-DNA tem, aproximadamente, entre 10 e 30 Kb e suas extremidades são delimitados por duas sequências de 25 pb altamente homólogas, denominados extremidades direita e esquerda. *Agrobacterium* selvagem transfere o seu T-DNA através das membranas das células vegetais e o incorpora no DNA genômico da planta. O processamento do T-DNA e sua transferência para a célula vegetal é devido em grande parte a atividade de virulência das proteínas codificadas na região vir (GELVIN, 2003).

Para uso biotecnológico, os genes que causam tumores são removidos do T-DNA e substituídos por genes de interesse. Como o plasmídeo Ti é grande e difícil de manipular, foram desenvolvidos vetores binários (BEVAN, 1984), menores, fáceis de manipular em laboratório e capazes de replicar tanto em *E. coli* quanto em *Agrobacterium*. Esses vetores são introduzidos em *Agrobacterium* desarmadas (sem T-DNA, mas com região vir intacta), que transferem os genes modificados para células vegetais. As células ou tecidos transformados podem ser utilizados para regeneração de plantas transgênicas (HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996).

O primeiro protocolo eficiente de transformação de milho usando *Agrobacterium* foi desenvolvido em 1996 por Ishida et al. (1996), no qual foram capazes de infectar embriões imaturos de milho A188 utilizando vetores superbinários. O plasmídeo superbinário desenvolvido por Komari (1990) contém uma cópia extra de alguns dos genes de virulência. Para o milho, a técnica de *Agrobacterium* foi relatada resultar em alta eficiência, com alto número de eventos contendo apenas uma ou um baixo número de cópias do transgene no genoma, quando comparado com a biobalística (ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; LUPOTTO et al., 2004; ISHIDA et al., 2007; CAMILO, et al., 2019).

2.5. Construções gênicas repórteres na transformação de plantas

A otimização dos protocolos de regeneração e de transformação é crucial para a compreensão da função genética e a melhoria das características agronômicas do milho. Nesse contexto, os genes repórter desempenham um papel fundamental na avaliação e no aprimoramento dos métodos de transformação. Entre os genes repórter mais utilizados, destacam-se a proteína fluorescente verde (GFP) (CHALFIE et al., 1994) e a β -glucuronidase (GUS) (JEFFERSON et al., 1987). Embora a GFP seja eficaz para o monitoramento da expressão gênica, sua visualização requer equipamentos capazes de detectar diferentes comprimentos de onda da luz. O gene repórter GUS também é utilizado, com sucesso, para monitorar padrões de expressão gênica. No entanto, a coloração GUS é invasiva e frequentemente requer a eliminação das plantas, além de exigir a adição de

substratos caros, como o X-Gluc. Além disso, o uso do GUS não é ideal para condições estéreis, como culturas de tecido, pois a adição de substratos aumenta o risco de contaminação por microrganismos.

A construção RUBY é um repórter visual inovador que tem sido utilizada para facilitar a identificação de plantas geneticamente transformadas. Ela é composta por três genes da via de biossíntese das betalainas: CYP76AD1, DODA e GT, que atuam na conversão da tirosina em pigmentos de coloração vermelha intensa, visível a olho nu em tecidos vegetais (HE et al., 2020a). Diferente de genes repórteres clássicos, como GUS ou GFP, o RUBY permite uma detecção não invasiva, sem necessidade de substratos ou equipamentos específicos.

No milho, uma das culturas mais transformadas geneticamente no mundo, a utilização do RUBY como marcador visual representa uma solução prática para superar desafios associados à seleção de eventos transgênicos. Estudos demonstraram que calos embriogênicos e plântulas de milho transformadas com RUBY apresentam coloração vermelha intensa desde os estágios iniciais, permitindo uma seleção precoce e precisa dos eventos positivos, sem interferência no desenvolvimento ou regeneração das plantas (ZHI et al., 2021).

Além de reduzir custos com reagentes seletivos e simplificar os protocolos de regeneração, a construção RUBY também pode ser combinada com genes de interesse (por exemplo, genes de resistência a pragas ou tolerância a herbicidas) em eventos únicos ou vetores binários, ampliando sua

aplicabilidade na biotecnologia vegetal. Estudos recentes mostram que RUBY é funcional em diversos tecidos do milho, como raízes, folhas, sementes e estruturas reprodutivas, sem efeitos negativos sobre a viabilidade ou produtividade (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 2023; GUO et al., 2023).

Utilizando esta estratégia, Carneiro et al. (2024) realizou a transformação genética de embriões imaturos de sorgo mediada por *A. tumefaciens* e demonstrou a viabilidade da sua utilização para monitorar a transformação de diferentes linhagens de sorgo, pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo e da linhagem pública P898012. A abordagem proposta visa não apenas melhorar a eficiência dos protocolos de transformação, mas também forneceu uma ferramenta prática e econômica para o monitoramento da expressão gênica no milho.

2.6. Milho transgênico resistente a pragas e tolerante a herbicida

A combinação dos genes *vip3Aa* (*B. thuringiensis*) e *bar* (de *Streptomyces hygroscopicus*) tem sido amplamente explorada no desenvolvimento de eventos transgênicos de milho, com o objetivo de promover resistência a pragas lepidópteras e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria gram-positiva, esporulante e presente naturalmente no solo, notável por sua capacidade de produzir proteínas com ação inseticida. Durante a esporulação, Bt sintetiza cristais de proteínas tóxicas denominadas δ -endotoxinas (Cry e Cyt), que possuem ação

específica contra diferentes ordens de insetos, como Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (PALMA et al., 2014). A ingestão dessas proteínas por insetos suscetíveis leva à sua ativação no trato digestivo alcalino, onde se ligam a receptores nas células epiteliais do intestino médio, promovendo lise celular e morte do inseto (SANZ-BARRIONUEVO et al., 2023).

Além das proteínas Cry e Cyt, o Bt também produz proteínas Vip (Vegetative Insecticidal Proteins), expressas durante a fase vegetativa da bactéria. Entre elas, destaca-se a Vip3Aa, que apresenta um espectro de ação complementar às proteínas Cry, sendo eficaz contra importantes pragas agrícolas como *Spodoptera frugiperda* (KOLSAWADE et al., 2023). Essas proteínas têm sido amplamente exploradas na biotecnologia agrícola, principalmente por meio da inserção de seus genes em plantas transgênicas para o controle de pragas, reduzindo o uso de inseticidas químicos e contribuindo para a sustentabilidade da agricultura (CARNEIRO et al., 2024).

A proteína Vip3Aa, produzida por *Bacillus thuringiensis* (Bt), representa um avanço significativo no controle biológico de pragas em culturas agrícolas, especialmente no milho transgênico. Diferente das clássicas proteínas Cry, que são expressas na fase de esporulação, as proteínas Vip (Vegetative Insecticidal Proteins) são secretadas durante a fase vegetativa do Bt, possuindo estrutura e mecanismos de ação distintos (SANZ-BARRIONUEVO et al., 2023). A Vip3Aa é altamente eficaz contra diversas pragas da ordem Lepidoptera, como *S. frugiperda*, *Helicoverpa zea* e *Chrysodeixis includens*, que são de difícil controle com toxinas Cry (CARNEIRO et al., 2024).

A introdução do gene *vip3Aa* em cultivares de milho transgênico tem sido uma estratégia valiosa para aumentar a eficiência inseticida e para atrasar a evolução da resistência em populações de insetos-praga. A combinação de genes que expressam toxinas Cry e Vip, como nos eventos piramidais (por exemplo, MIR162 e SmartStax PRO), oferece ação sinérgica e proteção ampliada, pois os alvos moleculares das proteínas são diferentes (KOLSAWADE et al., 2023). Essa abordagem é fundamental para o manejo integrado de pragas e sustentabilidade da tecnologia Bt.

Estudos recentes demonstram que plantas de milho transformadas com *vip3Aa* apresentam altos níveis de controle de larvas mesmo em populações já resistentes a Cry1Ab ou Cry1F, o que reforça sua importância em contextos de resistência cruzada (BURTON et al., 2021). Além disso, o uso dessa proteína contribui para a redução do uso de inseticidas químicos, mitigando impactos ambientais e riscos à saúde humana e animal.

Apesar de sua eficácia, há necessidade de estratégias complementares, como o uso de áreas de refúgio e monitoramento constante da eficácia, a fim de preservar a durabilidade da tecnologia. A engenharia genética tem se mostrado capaz de ampliar o arsenal de proteínas inseticidas, e a Vip3 continua sendo uma das mais promissoras para o controle de lepidópteros em milho Bt.

O uso combinado de proteínas Cry e Vip em cultivares Bt tem se mostrado eficaz para retardar a evolução da resistência de pragas, pois atuam em diferentes alvos moleculares. Essa estratégia, conhecida como "pyramiding", é amplamente utilizada em eventos comerciais de milho e

algodão geneticamente modificados (GILL et al., 2022). Entretanto, a resistência a toxinas de Bt já foi documentada em algumas populações de pragas, o que reforça a necessidade de estratégias integradas de manejo (TABASHNIK et al., 2021).

Diversos eventos comerciais de milho transgênico expressam o gene *vip3Aa*, destacando-se como ferramentas eficazes no manejo de pragas lepidópteras resistentes a toxinas Cry. Um dos primeiros eventos a utilizar essa tecnologia foi o MIR162, desenvolvido pela Syngenta, que expressa a proteína Vip3Aa20 e é altamente eficaz contra *S. frugiperda*, *Helicoverpa zea* e *Diatraea saccharalis* (BURTON et al., 2021). Esse evento foi combinado com outros genes em tecnologias piramidais, como o Agrisure Viptera®, que associa o MIR162 a eventos com proteínas Cry e o gene *cp4 epsps*, conferindo também tolerância ao glifosato. Outro exemplo relevante é o evento MON 89034 × MIR162, presente na plataforma SmartStax PRO®, que combina múltiplas proteínas Cry e Vip3Aa, oferecendo amplo espectro de controle e maior durabilidade da tecnologia (TABASHNIK et al., 2021).

No Brasil, diversos híbridos comerciais incorporam o gene *vip3Aa*, com aprovação regulatória pela CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança), como os híbridos da série PowerCore® Ultra e Agrisure Viptera® 3111, amplamente cultivados em regiões afetadas por populações resistentes de *S. frugiperda*. A inclusão do gene *vip3Aa* nesses eventos representa um avanço importante no controle biológico de pragas, especialmente em regiões tropicais, onde há alta pressão de infestação (CARNEIRO et al., 2024).

O gene *bar*, originário de *Streptomyces hygroscopicus*, codifica a enzima fosfinotricina-acetiltransferase, que inativa o herbicida glufosinato (phosphinothricin), popularmente usado no sistema LibertyLink. Ele foi um dos primeiros marcadores de seleção em transformação genética de milho, permitindo a regeneração eficiente de linhas transformadas por meio de cultivo de embriões resistentes a herbicida. Desde então, o *bar* tem sido amplamente adotado como marcador por sua eficácia e confiabilidade (ZHANG et al., 2009).

Em métodos convencionais de *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT), embriões tipo II foram utilizados para introduzir vetores contendo *bar* e outros genes (ex.: *epsps*), conferindo simultaneamente tolerância a glufosinato e glifosato. Esses estudos demonstraram integração estável do transgene, expressão eficaz (confirmada por Northern blot e testes de pintura foliar) e alta eficiência (~0,6 %) de regeneração de plantas tolerantes (SHRAWAT et al., 2007).

Mais recentemente, abordagens inovadoras como transfecção de pólen com nanopartículas magnéticas (MNPs) têm sido aplicadas (WANG et al., 2022), permitindo uma transformação independente de genótipo e sem necessidade de cultura in vitro. Em 2022, Wang et al. reportaram que, após aplicar o gene *bar* junto a nanopartículas ao pólen de milho foram obtidas plantas T₁ resistentes ao glufosinato (~1,41%) com herança estável para T₂, confirmada por Southern blot e testes imunológicos.

Além disso, linhagens transgênicas como o evento SCB-29, contendo simultaneamente *bar* e cp4 *epsps*, demonstram tolerância dual e estabilidade

de expressão por pelo menos três gerações, com níveis contínuos de proteína Bar e desempenho semelhante ao convencional mesmo sob aplicação de herbicidas. A tecnologia LibertyLink (*bar*) e Enlist (múltiplos genes) oferecem controle flexível de plantas daninhas, reduzindo a necessidade de herbicidas adicionais (DIAS, 2023). Essa abordagem “piramidada” permite o uso combinado de glufosinato e glifosato, ampliando a flexibilidade do manejo de plantas daninhas (BHANDARI et al., 2022).

Um dos eventos mais destacados com a combinação *vip3A* e *bar* é o CSPB04, aprovado no Brasil, que expressa simultaneamente os genes *vip3Aa20*, *cry1Ab*, *cry1F* e *bar*, como parte da tecnologia PowerCore® Ultra. Outro exemplo relevante é o evento MIR162 × TC1507, que emparelha o *vip3Aa20* com o *bar* (presente em TC1507), promovendo um amplo espectro de resistência a insetos e tolerância ao glufosinato (CTNBio, 2023). A integração dessas duas características agrônômicas em eventos piramidais busca melhorar o manejo de resistência de pragas e facilitar a adoção de sistemas de controle de plantas daninhas.

Além dos benefícios agrônômicos, estudos recentes mostram que esses eventos demonstram estabilidade na expressão dos transgenes, desempenho agrônômico equivalente às cultivares convencionais e impacto ambiental reduzido, devido à menor aplicação de inseticidas químicos (CARNEIRO et al., 2024).

Em resumo, o milho Bt com gene *vip3A* representa um avanço no controle de lepidópteros, a tolerância ao herbicida com gene *bar* permite

fitossanidade eficaz, e as variedades combinadas oferecem soluções completas, desde que manejadas com estratégia de resistência e práticas sustentáveis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condições para cultivo em hidroponia da variedade de milho FCAV/UNESP

Cerca de 40 sementes da variedade de milho FCAV/UNESP, previamente tratadas com polímero, herbicida, fungicida e grafite, eram pré-germinadas semanalmente em papel filtro germinativo por três dias, no escuro, a 28 °C e implantadas na espuma fenólica (suporte inerte para sustentar as plantas em desenvolvimento). A solução nutritiva utilizada para a hidroponia foi a descrita por Jemimah et al. (2018) a qual consiste na seguinte composição: Para 10 L de água foram adicionados 5,8 g de nitrato de cálcio, 4,8 g de nitrato de potássio, 1,6 g de cloreto de potássio, 2,4 g de sulfato de magnésio, 1,5 g de MAP (Monofosfato de Amônio) 0,5g de sulfato de cobre e 1g de suplemento de micronutrientes. A este meio foram adicionadas as

seguintes modificações: 1,16 g a mais de nitrato de potássio e 0,2 g a mais de nitrato de cálcio, para atender às demandas nutricionais das plantas de milho. As bandejas de plástico foram mantidas em sala de cultivo no Departamento de Produção Vegetal da FCAV, com fotoperíodo de 14 h de luminosidade artificial, por duas semanas até a excisão dos explantes.

3.2. Condições para cultivo em vasos da variedade de milho FCAV/UNESP

Em vasos de 5L foram cultivadas 72 plantas de milho com a finalidade de se extrair o embrião imaturo da semente. As plantas foram mantidas a 28°C com fotoperíodo de 14 h de luz artificial e a adubação seguiu os parâmetros do BOLETIM 100 (IAC, 2022). Para a manutenção fitossanitária foram realizadas duas aplicações de inseticidas e duas aplicações de fungicida no decorrer do cultivo. Devido ao alto grau de heterozigose dos indivíduos, a polinização não foi assistida e as espigas foram obtidas com 3 a 4 meses após plantio, até que a espiga atingisse o ponto leitoso e claro e no qual os embriões imaturos estivessem na faixa de 2-5 mm de tamanho.

3.3. Obtenção dos explantes da variedade FCAV/UNESP para indução de calos

Os explantes das plantas de milho, provenientes de hidroponia, foram os foliares, radiculares e meristema apical. Esses explantes foram retirados das plantas removidas cuidadosamente da espuma fenólica, a fim de evitar qualquer dano às suas partes. A manipulação das plantas foi feita em fluxo

laminar, com total assepsia, e os explantes foram obtidos com a ajuda de bisturi estéril, da seguinte maneira.

Para explantes a partir de folhas: de cada planta com até três folhas, com 2 semanas de idade, com a terceira folha mais jovem totalmente aberta ou parcialmente fechada, cortou-se quadrantes transversais em relação à nervura da folha com cerca de 5 mm de tamanho.

Para explantes a partir de hipocótilos: os hipocótilos foram cortados com cerca de 1 cm a partir de plantas com 2 semanas de idade.

Para explantes a partir de meristema apical: para a obtenção destes explantes, as folhas e raízes de plantas com duas semanas de idade foram removidas e o meristema foi cortado transversalmente a partir do colmo. Ambas as metades do meristema apical foram colocadas inclinadas em relação ao meio indutor de calos, de acordo com cada protocolo testado.

Os protocolos de indução de calos, a partir dos diferentes tipos de explantes acima citados, foram os seguintes:

1º Protocolo: descrito por Pathi et al. (2013), a partir do qual testou-se oito variações de concentração da auxina artificial 2,4 D, sendo elas: 1,8; 2,0; 2,2; 2,4; 2,5; 2,6; 2,8 e 3,0 mg/L e ainda a adição de 20 mg/L de sulfato de cobre e concentrações variando de 0,5 a 0,8 mg/L de nitrato de prata. Também foram realizados testes sem a presença dos dois últimos. Nas placas contendo os meios de cultivo foram colocados 120 explantes, sendo estes o hipocótilo cortado ao meio, com 6 dias de idade, sendo 5 explantes por placa.

2º Protocolo: descrito por Ahmadabadi et al. (2007), no qual testou-se 100 explantes foliares de plantas com 1 semana de idade. Os fragmentos foram obtidos da 3ª folha mais jovem. Testou-se 32 variações, sendo elas as combinações de: 1,8; 2,2; 2,4; 2,8 mg/L de 2,4 D, a presença e ausência de 20; 10; 35 mg/L de sulfato de cobre e a presença e ausência de 0,8; 1,8; 2,0 mg/L de nitrato de prata.

3º Protocolo: descrito por Sidorov et al. (2006), a partir do qual foram realizadas 32 combinações de concentrações de 2,4 D, que variaram de 1,8 a 2,8 mg/L, a presença e ausência de 20 mg/L de sulfato de cobre e a presença e ausência de 1,76 mg/L de nitrato de prata. Testou-se 480 explantes provenientes de meristema apical, sendo colocados 4-6 explantes por placa.

Para obtenção dos explantes a partir de grãos imaturos, seguiu-se o protocolo descrito por Ishida et al (2007), partindo-se de 72 espigas (uma de cada planta) e de cada uma foram retirados 5 grãos imaturos, dos quais retirou-se os embriões, medindo em torno de 2 a 5 mm, os quais foram cultivados em 2 mg/L de 2,4 D e presença e ausência de 0,7 g/L de L-Prolina.

3.4. Expressão transiente da construção repórter RUBY em linhagens de milho da EMBRAPA

Esta parte do Trabalho de Iniciação Científica foi desenvolvido junto ao Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo – Sete Lagoas-MG, sob a supervisão da Dra. Meire de Cássia Alves, como complementação dos estudos iniciais, visto as limitações encontradas na etapa de regeneração dos

calos inicialmente obtidos na FCAV. O objetivo dos experimentos na EMBRAPA foi selecionar o melhor genótipo de milho para a produção de calos e submetê-los à transformação com *A. tumefaciens*. Calos do genótipo selecionado seguiram para a transformação com os genes *bar* e *vip3Aa* de *B. thuringiensis* e posterior regeneração em cultura de tecidos, permitindo a conclusão dos objetivos propostos.

3.4.1. Obtenção dos embriões imaturos das linhagens de milho da EMBRAPA

As linhagens de milho utilizadas foram L12, L14 e B104, mantidas previamente em casa de vegetação sob condições de irrigação, controle de temperatura e fitossanitário, conforme práticas estabelecidas pela EMBRAPA Milho e Sorgo.

Os explantes embrionários das variedades de milho da EMBRAPA, L12, L14 e B104, foram embriões zigóticos imaturos extraídos de sementes de espigas com duas semanas após a polinização e medindo aproximadamente 2 a 4 milímetros de tamanho (CARNEIRO et al., 2009).

Cerca de 150 embriões zigóticos imaturos (50 de cada linhagem) foram cuidadosamente extraídos de sementes de espigas esterilizadas das linhagens L12, L14 e B104, da seguinte maneira: Espigas esterilizadas em solução de 1:1 de água sanitária comercial: água destilada com 1-2 gotas de Tween 20, foram colocadas em uma placa de Petri dentro do fluxo laminar.

Os embriões foram extraídos das sementes com um bisturi, removendo a região superior do pericarpo. Em seguida o endosperma foi retirado com cautela para não danificar o embrião e, com ajuda de uma espátula, o embrião foi colocado em um tubo de 1,5 mL contendo água estéril, onde foi rapidamente lavado com meio de infecção, contendo sais e vitaminas N6 ($68,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), sacarose ($36 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), glicose ($0,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), prolina ($0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 2,4-D ($100 \mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$), acetoseringona, Phytigel ($3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e pH ajustado para 5,2, seguindo-se as especificações de De Souza et al. (2016), sendo assim preparados para se iniciar o processo de transformação.

3.4.2. Transformação via *A. tumefaciens* e seleção dos calos transformados

A transformação foi realizada de acordo com Frame et al. (2002) e Vega et al. (2008). A bactéria *A. tumefaciens* EHA101, contendo o plasmídeo UBQ:RUBY, portador da construção repórter RUBY, foi cultivada em meio YEP, composto por extrato de levedura ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), peptona ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e dextrose ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), com pH ajustado para 6,5 (SHERMAN et al; 1983), contendo canamicina (50 mg/l) e espectinomicina (50 mg/l) e mantida por 5 dias a 19 °C. A construção RUBY desenvolvida por He et al. (2020a) (Figura 1) converte tirosina em betalaína de coloração vermelho vivo, claramente visível a olho nu, sem a necessidade de equipamentos especiais ou tratamentos químicos, permitindo a seleção dos embriões transformados.

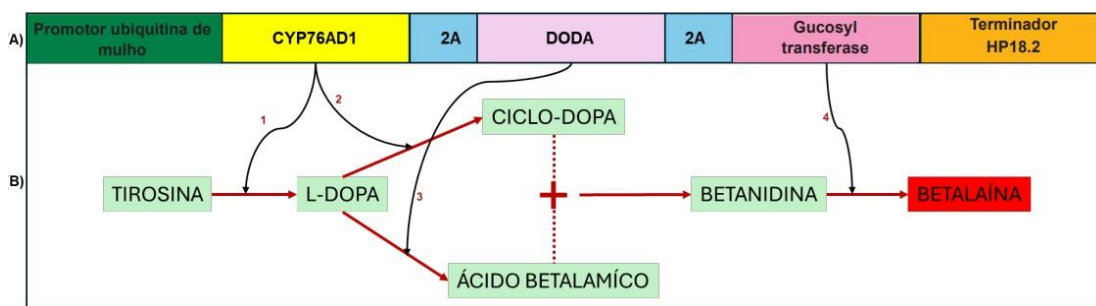


Figura 1. Sistema repórter RUBY e biossíntese de betalaina. (A) Sistema repórter RUBY: contém os três genes biossintéticos da via metabólica das betalainas (CYP76AD1, DODA e Glucosiltransferase) fundidos em uma única região codante. Entre os genes, foram inseridas sequências que codificam peptídeos 2A. O sistema repórter RUBY está sob o controle do promotor de ubiquitina de milho (ZmUBI) e do terminador transcricional HSP18.2 de *Arabidopsis* (He et al., 2020a). (B) Biossíntese da betalaina: a tirosina é oxidada pela CYP76AD1 (1) em L-DOPA, que pode ser convertida em CICLODOPA (2) pela CYP76AD1. Na presença da L-DOPA 4,5-dioxygenase (DODA) (3), a DOPA é oxidada e circularizada em ácido betalâmico. A CICLODOPA se condensa com o ácido betalâmico, numa reação não enzimática, para produzir betanidina. A glucosilação da betanidina (4) gera a betalaina de cor vermelha. (Fonte: CARNEIRO et al., 2024).

No dia da transformação, a *Agrobacterium* foi ressuspensa em meio de infecção suplementado com acetoseringona até atingir uma OD550 = 0,3-0,4 e incubada a 150 rpm, 23 °C por 2 h. Para a infecção, 50 embriões imaturos de milho foram coletados em 1 mL de meio de infecção acrescido de acetoseringona utilizando tubos eppendorf. Momentos antes da infecção, os embriões foram lavados duas vezes em novo meio de infecção. Em seguida, foi adicionado 1 mL da cultura bacteriana e incubado por 5 min, no escuro.

Após a infecção, os embriões, com o escutelo voltado para cima, foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cocultivo (DE SOUZA et al., 2016), composto por sais e vitaminas N6 (30 g·L⁻¹), sacarose (0,7 g·L⁻¹), prolina (0,25 g·L⁻¹), 2,4-D (100 µM·L⁻¹), acetoseringona (0,85 mg·L⁻¹), nitrato de prata (3 mg·L⁻¹), L-cisteína, Phytigel (3 g·L⁻¹) e pH ajustado para 5,8. Após o período de cocultivo, os embriões infectados foram transferidos para o meio de repouso (MS Sais - 4,3 g/L; Sacarose - 30g/L; L-Prolina-0,7 g/L;

Myo-Inositol-100 mg/L; Caseína hidrolisada - 100 mg/L; Tampão MES - 0,5 g/L; Phytigel - 3g/L; Vitaminas MS 1 mL/L; Dicamba (30mM) - 0,5 ml/L ; AgNO₃ - 1,76 mL/L; Cefotaxima (100 mg/mL) - 1,5 mL/L, pH 5,8), sendo colocados 50 embriões por placa (DE SOUZA, et al.; 2016). O antibiótico cefotaxima é utilizado para eliminar *A. tumefaciens* e promover o desenvolvimento inicial dos embriões. As placas foram incubadas em ambiente escuro a 27 °C em sala de crescimento por 5 dias. Após esse período, os embriões foram transferidos para um novo meio de repouso, onde permaneceram por mais 5 dias. Durante esse tempo, os embriões imaturos começaram a formar calos embriogênicos.

Para a seleção das células transformadas, foi utilizado o sistema repórter RUBY, que permite a detecção das células transformadas pela produção de betalaína, um composto de cor vermelha. As células que apresentavam essa coloração indicavam sucesso na transformação genética.

3.5. Obtenção da linhagem de milho promissora com a construção contendo os genes *vip3Aa* e *bar* de *B. thuringiensis*

Após a determinação da linhagem de milho promissora, a qual apresentou a melhor eficiência da expressão transiente RUBY, seguiu-se a transformação via *A. tumefaciens* com a construção contendo os dois genes de interesse: *vip3Aa* e *bar* (FARINACIO, 2019), que expressam as características de resistência a pragas da ordem Lepidoptera e de tolerância a herbicidas respectivamente.

3.5.1. Confirmação dos clones de *A. tumefaciens* contendo os genes *vip3Aa* e *bar*

A presença dos referidos genes na cepa de *A. tumefaciens* foi detectada por meio da técnica de PCR (Reação da Cadeia de Polimerase), de acordo com a seguinte metodologia:

A bactéria *A. tumefaciens* da linhagem EHA101 da coleção de cepas do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da FCAV – UNESP, armazenada em glicerol a -80 °C, contendo o vetor pMCG1005::*vip3Aa*::*bar* (Figura 2), previamente construído por FARINACIO (2019), foi preparada para cultivo em meio LB composto por triptona (10 g·L⁻¹), extrato de levedura (5 g·L⁻¹), cloreto de sódio (10 g·L⁻¹) e água destilada, com pH ajustado para 7,0; desenvolvido por Luria e Bertani (1951), o qual foi utilizado para cultivo da bactéria em meio sólido e líquido, a 28 °C.

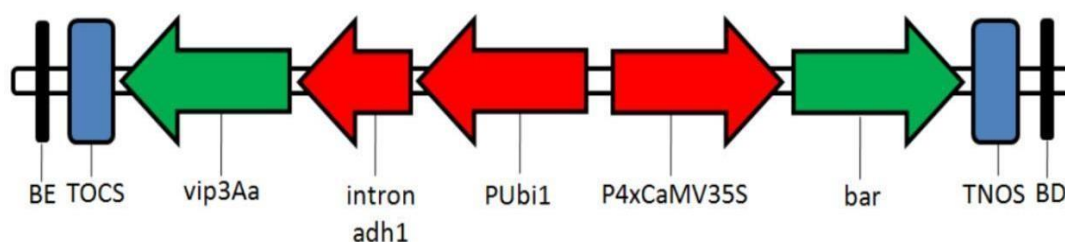


Figura 2. Esquema da região do T-DNA do vetor pMCG1005::*vip3Aa*. Gene *vip3Aa* de *B. thuringiensis* sob o promotor da ubiquitina 1 do milho (PUBi1), com o primeiro intron do gene da álcool desidrogenase (*adh1*) e terminador da octopina sintase (TOCS), gene bialaphos (*bar*) sob o controle do promotor 4xCaMV35S e terminador da nopalina sintase (TNOS), borda esquerda (BE) e direita (BD) (FARINACIO, 2019).

O DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina (BIRNBOIM ; DOLY, 1979), a partir do cultivo das colônias em meio líquido. A quantidade e qualidade das amostras de DNA foram obtidas por leitura em

espectrofotômetro Nanodrop. Para a detecção dos genes de interesse realizou-se a técnica da PCR, em volume total de 25 µL, contendo 150 ng de DNA; 1 U de enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Life Technologies do Brasil, São Paulo, SP); 1 X High Fidelity PCR Buffer (Invitrogen); 1,5 mmol L⁻¹ de MgSO₄; 0,5 pmol de cada oligonucleotídeo; 0,16 mmol L⁻¹ de dNTP; e água destilada deionizada estéril (q.s.p. 25 µL). O programa no termociclador seguiu as etapas de desnaturação por 2 min a 94 °C, seguida por 30 ciclos compostos de 1 min a 94 °C (desnaturação); 1 min à temperatura recomendada para cada gene (anelamento); 2 min a 68 °C (extensão); mais um passo adicional de 5 min a 68 °C e, ao final do processo, o produto foi mantido a 4 °C para a manutenção das amostras até a retirada dos tubos do aparelho.

Para amplificação do gene *vip3Aa* foram utilizados os iniciadores direto 5'AAGACACTGCGCTACGAGGT3' e reverso 5'CCGAAGCCATTGATAGGTGT3', os quais amplificam um fragmento de 185 pares de bases (pb) do gene *vip3Aa*, sob a temperatura de pareamento de 60 °C e, para o gene *bar*, os iniciadores utilizados foram direto, para um fragmento do promotor 35S 5'ATGACGCACAATCCCACTATCC3' e reverso para o terminador TNOS 5'GCGGGACTCTAATCATAAAAACC3', com pareamento de 58 °C, resultando em um produto de amplificação de 1200 pb.

Para a visualização da amplificação, foram adicionados 3 µL de tampão de amostra (0,5 % de azul de bromofenol, 50 % de glicerol) ao tudo contendo 7 µL do produto da PCR, totalizando 10 µL para cada amostra, as quais foram

aplicadas em gel de agarose a 0,8 %, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ mL) e submetido à eletroforese em cuba horizontal, por 1 h e 30 min, a 70 V, conduzida em tampão TEB 1X [Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM (pH 8,2)]. Também foi aplicado no gel de agarose uma amostra do marcador molecular “GeneRuler™ 1 kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canadá) que serviu de referência para a confirmação do tamanho molecular obtido na reação de amplificação. Posteriormente, o gel de agarose foi visualizado sob luz ultravioleta (UV) e fotodocumentado em equipamento fotodocumentador Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por meio do software Quantity-one.

3.5.2. Transformação via *Agrobacterium* e obtenção das plantas de milho transformadas.

Após seleção da colônia de *A. tumefaciens* contendo a construção pMCG1005::*vip3Aa::bar*, seguiu-se a transformação de cerca de 500 embriões da linhagem de milho com maior taxa de expressão transiente. A metodologia de obtenção dos embriões zigóticos imaturos, da transformação e regeneração em cultura de tecidos, foram as mesmas descritas no item 3.4.1.

A seleção dos embriões transformados foi realizada em meio contendo o herbicida BASTA (glufosinato de amônio), o qual seleciona os embriões com presença do gene *bar*. Após uma semana da infecção, os embriões foram transferidos para o meio de repouso (item 3.4.2) onde ocorreu a indução de calos, por 1 mês, para então serem transferidos ao meio de seleção I, em seguida do meio de seleção II, permanecendo por 1 mês em cada meio. A

composição do meio de seleção tanto I quanto II é a mesma do meio de repouso usado previamente, porém com a adição de 2 mg/L de BASTA para a seleção I e 5 mg/L de BASTA para seleção II. Em seguida, os calos sobreviventes foram transferidos para o meio de regeneração MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com a adição de 10 mg/mL dos hormônios vegetais ABA, AIA, BAP, TDZ, CuSO₄, Zeatina por 3 semanas.

Quando as brotações começaram a se desenvolver, as plântulas foram transferidas para frascos contendo meio de germinação MS contendo 10 mg/mL de AIB, por 3 semanas. Após o período de germinação, as plântulas foram aclimatadas em casa de vegetação, um estágio final que prepara as plantas para a transição ao ambiente externo, garantindo sobrevivência e crescimento adequados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sendo a cultura de tecidos o alicerce unificador para padronizar o protocolo de transformação e obter calos regeneráveis se faz necessário a elaboração dependente de genótipo para o estabelecimento de um protocolo o qual possa gerar calos embriogênicos, para se realizar esta etapa foi necessário testar diferentes protocolos de indução de calos próprios a transformação genética com modificações realizadas durante o processo que considerem a constituição genética das variedades de milho FCAV/UNESP.

4.1. Variedade de milho FCAV/UNESP cultivada em hidroponia

A produção de milho hidropônico envolve o cultivo de plantas sem solo, mas em água ou solução rica em nutrientes, em uma estufa, por um curto período (MARTINS, 2012). Sachs (1860) e Knop (1865) desenvolveram a tecnologia para o cultivo de plantas em solução nutritiva, sendo estes os primeiros a elaborar fórmulas com micro e macronutrientes. Várias são as

espécies que podem ser cultivadas em hidroponia como sorgo, soja, trigo, arroz, aveia, cevada, centeio, milho, milheto, trigo entre outras, sobretudo levando em conta que as condições climáticas e ambientais externas pouco interferem. Uma das grandes vantagens do milho hidropônico é que com pouco espaço pode-se produzir uma grande quantidade de massa verde (PAULINO et al., 2004). O cultivo em hidroponia apresenta maior desempenho agrônômico da planta em relação ao cultivo em solo, visto que, em uma faixa de tempo similar, a planta hidropônica apresenta maior altura e maior número de folhas, devido principalmente à constância de um detalhado e completo perfil nutricional (MILLER et al., 1989). Além disso, o uso de hidroponia em cultura de tecidos está associado ao sucesso na obtenção de explantes, devido ao alto controle do ambiente oferecido pela hidroponia, reduzindo problemas de contaminação microbiológica no processo. A solução nutritiva preparada em laboratório em condições de assepsia controlada, reduz a presença de contaminantes, quando comparado ao uso do solo (NHUT et al., 2022). Em suma, a hidroponia foi adotada como método fornecedor de explantes pois ela acelera e uniformiza o ciclo das plantas além de reduzir contaminações.

No presente trabalho, sementes da variedade de milho FCAV/UNESP foram cultivadas em hidroponia com a solução nutritiva descrita por Jemimah et al. (2018) com algumas modificações. A adoção do cultivo hidropônico mostrou-se condizente com a literatura especializada, promovendo um ambiente controlado que favoreceu o crescimento acelerado, uniforme e asséptico das plantas. As alterações nos teores de nitrato de cálcio e nitrato de potássio na solução nutritiva foram essenciais para sustentar o bom

desempenho fisiológico do genótipo estudado. Inicialmente, observou-se que, nas últimas semanas de cultivo, as plantas apresentavam sintomas característicos de deficiência nitrogenada, o que motivou os ajustes na composição da solução. A rápida resposta das plantas às modificações confirma a importância do manejo nutricional adequado em sistemas hidropônicos. Como a hidroponia foi utilizada com o objetivo principal de obtenção de explantes, estes foram coletados conforme os protocolos específicos de indução de calos. As plantas remanescentes, quando ainda presentes após a coleta, foram devidamente descartadas para evitar qualquer interferência nos experimentos subsequentes. Na Figura 3 observa-se plantas de milho em hidroponia em diferentes fases de desenvolvimento.



Figura 3. Plantas de milho em hidroponia, em diferentes estágios de desenvolvimento. A: Plantas com 3 dias de idade. B: Plantas com 9 dias de idade. C: plantas com 14 dias de idade.

4.2. Obtenção dos explantes da variedade FCAV/UNESP para indução de calos

A cultura de tecidos vegetais aplicada ao milho (*Zea mays* L.) configura-se como uma das mais sofisticadas ferramentas na biotecnologia vegetal moderna, permitindo o desenvolvimento de metodologias de

propagação clonal, conservação de germoplasma, transformação genética e experimentação fisiológica em nível celular. Contudo, a espécie apresenta notável recalcitrância à regeneração *in vitro*, fato atribuído, principalmente, à intensa oxidação fenólica, à elevada dependência genotípica e à limitada competência embriogênica de grande parte das linhagens comerciais (VARMAN et al., 2018; SHARMA et al., 2023). Tais características impõem severas barreiras à uniformização de protocolos reprodutíveis e eficientes, o que torna a cultura de tecidos do milho um campo que exige contínua otimização técnica e científica.

Neste trabalho foram testados quatro protocolos visando a obtenção de calos embriogênicos de milho, a partir de explantes retirados de folhas, de hipocótilos e de tecidos meristemáticos.

Referente ao protocolo descrito por Pathi et al. (2013), nenhum calo foi obtido a partir dos hipocótilos, em todas as condições de meio de indução de calos testadas. Dos 120 explantes testados, 66% apresentaram browning, após 2 semanas, ou seja, houve o escurecimento dos explantes, o que consiste em um problema grave na cultura de tecidos vegetais, pois dificulta a propagação *in vitro* bem-sucedida das plantas. O restante nem chegou a se desenvolver, mostrando-se recalcitrantes às condições testadas.

O mesmo ocorreu quando o protocolo de Ahmadabadi et al. (2007) foi testado com explantes foliares. A indução de calos a partir da 3ª ou 4ª folha mais nova, parcialmente ou totalmente fechada de plântulas com duas semanas de idade, não demonstrou nenhum tipo de desenvolvimento e

nenhum tipo de resposta foi notado mesmo em concentrações relativamente altas de nitrato de prata (2 mg/L) e 2,4 D (2,8 mg/L). Em todos os 100 explantes testados considerando as 32 variações observou-se o mesmo comportamento, ou seja, a lâmina foliar permaneceu viva e verde por 3 semanas até a ocorrência do browning. Tanto os explantes provenientes de hipocótilo quanto os provenientes das folhas se mostraram insensíveis às concentrações de 2,4 D, sulfato de cobre e nitrato de prata testados nos meios de indução de calos.

Os resultados obtidos sugerem que a principal razão para o insucesso na obtenção de calos é devida ao genótipo utilizado, sendo este incompatível aos protocolos utilizados, haja vista ter sido esta a mais relevante diferença entre eles e o experimento do presente trabalho. Existem limitações importantes no uso de variedades de milho para obtenção de explantes para cultura de tecidos, especialmente quando comparadas ao uso de linhagens puras. Variedades de milho de polinização aberta apresentam alta heterogeneidade genética, o que significa que diferentes plantas (mesmo da mesma variedade) podem responder de forma muito distinta aos protocolos de cultura de tecidos. Essa variabilidade dificulta a padronização dos resultados e reduz a eficiência da regeneração *in vitro* (RAJI; LADIPO, 2016). No entanto, a busca pelo desenvolvimento de protocolos genótipo-independentes para o milho ainda é um grande desafio e requer muitos estudos.

O protocolo de indução de calos a partir de gomos nodais (segmentos de coleótilo de plântulas), descrito por Sidorov et al. (2006), o qual relata taxa

de indução de calos de ~38–42%, com sucesso na transformação genética, foi o foco deste trabalho, com 480 explantes sendo submetidos à indução de calos. No entanto, um dos maiores desafios foi contornar as frequentes contaminações fúngicas que surgiram neste experimento. Devido a isso adicionou-se, na formulação da solução nutritiva hidropônica, 0,5g\10 L de água de sulfato de cobre, o que levou a uma melhoria em relação às contaminações. No entanto, muitas vezes a esterilização com alguns produtos é capaz de inibir a indução de calos ou, até mesmo, se torna letal para o explante (MISRA; MISRA, 2012).

Porém, as contaminações seguiram sendo observadas, sendo estas atribuídas à diversidade microbiológica de tecidos próximos à raiz e à microbiota endofítica.

Dos 32 testes realizados com tecido meristemático, no qual se variou a concentração de nitrato de prata, sulfato de cobre e 2,4 D, apenas uma combinação resultou na formação de calos: o meio MS com todos os nutrientes e vitaminas descritos (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 2,8 mg/L de 2,4 D e sem adição de nitrato de prata e sulfato de cobre. Todos os 30 explantes advindos de 15 plantas diferentes foram capazes de gerar calos friáveis que permaneceram vivos por 2 semanas (Figura 4). Este foi um resultado promissor para um genótipo sem nenhum histórico de práticas para cultura de tecidos. No entanto, a interferência nos dados causado pelas contaminações, impossibilitaram a continuidade dos experimentos e uma amostragem confiável com a variedade FCAV/UNESP.

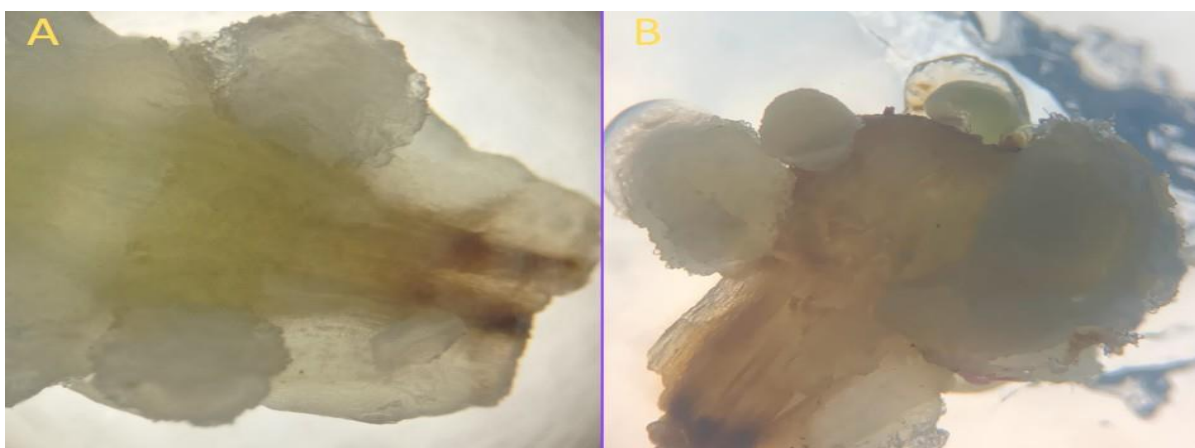


Figura 4. Explantes provenientes de meristema apical da variedade de milho FCVA/UNESP. **A:** Calos friáveis em formação após uma semana em meio de indução de calos. **B:** Calos com maior tamanho após duas semanas em meio de indução de calos.

Embora o protocolo de indução de calos de Sidorov et al. (2006), com as modificações realizadas neste trabalho, tenha se mostrado promissor para uma variedade de milho, algumas sugestões podem ser adicionadas aos experimentos, como a utilização do antibiótico cefotaxima para controlar as contaminações, o uso do tampão MES (2-N-morfolino etanosulfônico) para melhor controle do pH do meio, a adição de concentrações ideais de sulfato de cobre no meio de cultivo MS e o ajuste das doses de L-Prolina para ajudar na embriogênese somática dos calos.

Além dos experimentos utilizando os explantes acima relatados e seus protocolos, um outro protocolo foi testado com o objetivo de se obter outro tipo de explante, o embrião zigótico imaturo, a partir de grãos imaturos de espigas obtidas de plantas cultivadas em vasos, em casa de vegetação.

O protocolo desenvolvido por Ishida et al. (2007) não proporcionou resultados positivos para os 350 embriões submetidos ao meio de indução de calos indicado. Muitas foram as adversidades ocorridas na condição do cultivo

das plantas em casa de vegetação, as quais resultaram em plantas com condições não ideais à aplicação do referido protocolo. Além dessas limitações, os autores deste protocolo relatam que o longo tempo, demandado para o cultivo da planta até a fase reprodutiva, pode gerar uma série de problemas ao serem introduzidas na cultura de tecidos, resultando no insucesso na produção de calos viáveis.

A regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos é o caminho mais comum nos protocolos para o milho, com embriões imaturos sendo a fonte explantada preferencial (CARNEIRO, 2009; CAMILO et al., 2019). O meio de cultura de Murashige e Skoog (MS), suplementado com o auxínico sintético 2,4-D, é amplamente empregado para indução calogênica (MURASHIGE; SKOOG, 1962; ABDULWAHID et al., 2021). No entanto, a resposta morfogênica obtida depende de inúmeros fatores, como a idade fisiológica do explante, a natureza do agente hormonal, a fonte de carbono e a composição físico-química do meio.

Neste estudo, 4 protocolos foram testados em um total de 72 variações envolvendo vários componentes no meio de indução de calos, sendo o 2,4 D o principal deles. Utilizou-se 700 plantas em hidroponia e 72 plantas de ciclo completo, e somente uma concentração de 2,4 D, em um único protocolo, foi capaz de gerar calos, sendo este o de Sidorov et al. (2006) com a concentração de 2,8 mg/L de 2,4 D. Este resultado demonstra a sensibilidade e a especificidade dos genótipos em relação à cultura de tecidos e ressalta a importância das pesquisas que visam o desenvolvimento de protocolos ajustados para cada genótipo de milho, e que possam resultar na obtenção de

calos viáveis a serem transformados, apesar das contaminações os calos gerados pelo protocolo estabelecido por Sidorov et al. (2006) apresentaram calos pois o genótipo da UNESP é sensível às concentrações de reagentes e explantes usadas em sua indução.

4.3. Expressão transiente da construção repórter RUBY em linhagens de milho da EMBRAPA

Os resultados a seguir foram obtidos a partir dos experimentos realizados junto ao Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo – Sete Lagoas-MG, os quais permitiram complementar os objetivos propostos no projeto de Iniciação Científica, contribuindo para a formação acadêmica do estudante, na sua área de interesse.

O objetivo dos experimentos na EMBRAPA foi selecionar o melhor genótipo de milho para a produção de calos e submetê-los à transformação com *A. tumefaciens*. Calos do genótipo selecionado seguiram para a transformação com os genes *bar* e *vip3Aa* de *B. thuringiensis* e posterior regeneração em cultura de tecidos.

Para a seleção da melhor linhagem de milho, a estratégia foi utilizar a transformação, via *Agrobacterium*, com a construção repórter RUBY, que seleciona os embriões transformados por coloração.

Cerca de três dias após a transformação genética dos embriões zigóticos, provenientes das linhagens L12, L14 e B104 com a construção

RUBY, foi possível observar a coloração avermelhada nos embriões. Após uma semana em meio de cultivo os embriões foram analisados quanto à eficiência de expressão transiente em cada linhagem. Observou-se diferenças na intensidade da cor avermelhada nos embriões imaturos, sendo considerada eficiente a linhagem que apresentou a maior porcentagem de embriões com maior área com coloração avermelhada, como observado na Figura 5. A eficiência da expressão transiente foi observada em 58% dos embriões da linhagem B104, 0% da linhagem L14 e 6% da linhagem L12.

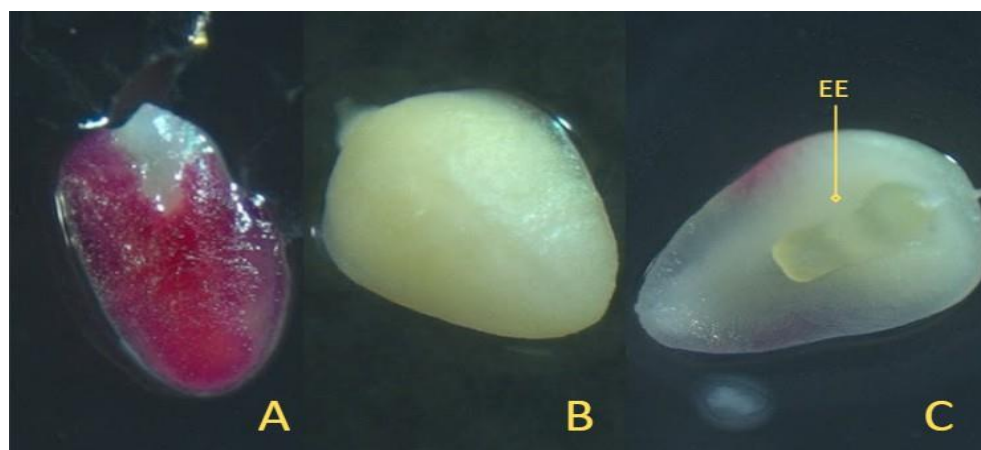


Figura 5. Embriões imaturos das linhagens de milho da EMBRAPA, após transformação com a construção RUBY. **A:** Embrião da linhagem B104 com intensa cor vermelha em grande parte dos tecidos. **B:** Embrião da linhagem L14 onde não se observa cor vermelha, sem expressão transiente. **C:** Embrião da linhagem L12 com baixa intensidade de expressão. **EE:** Eixo embrionário exposto.

Os genes repórteres desempenham um papel fundamental na avaliação e no aprimoramento dos métodos de transformação. Entre os genes repórter mais utilizados, destacam-se a proteína fluorescente verde (GFP) (CHALFIE et al., 1994) e a β -glucuronidase (GUS) (JEFFERSON et al., 1987). No entanto, as análises destes genes requerem equipamentos especializados ou substratos caros, que aumentam o risco de contaminação por microrganismos,

além de resultarem em coloração invasiva que frequentemente necessitam da eliminação das plantas.

Neste trabalho foi utilizada uma abordagem recente, descrita por He et al. (2020b), na qual o desenvolvimento do sistema repórter é baseado na via metabólica das betalaínas. O novo repórter denominado RUBY, catalisa a conversão de tirosina em betalaína vermelha intensa, permitindo visualização direta a olho nu, sem necessidade de instrumentação específica ou adição de reagentes externos. Essa construção tem sido utilizada por Carneiro et al. (2024) para monitorar a infecção de embriões imaturos de sete linhagens de sorgo. A linhagem pública P898012 e as linhagens da Embrapa ATF10B, ATF14B apresentaram 86%, 67% e 63% de sucesso, respectivamente. Os resultados mostraram que o sistema RUBY facilitou a seleção de genótipos de sorgo com maior potencial para transformação.

A transformação genética do milho com *Agrobacterium tumefaciens* é uma ferramenta poderosa da biotecnologia moderna para a introdução de genes de interesse agrônomo, como resistência a pragas, tolerância a herbicidas ou estresses abióticos. No entanto, o milho (*Zea mays* L.), sendo uma monocotiledônea, apresenta desafios particulares à transformação via *Agrobacterium*, que originalmente é mais eficiente em dicotiledôneas (FRAME et al., 2002).

Segundo Ishida et al. (2007), o uso da *Agrobacterium* na transformação de milho permite a integração de menos cópias do transgene, de forma mais previsível do que a biobalística, reduzindo efeitos de silenciamento gênico,

resulta na maior estabilidade de expressão gênica nas gerações seguintes e possibilita a cotransformação eficiente, onde vários genes podem ser inseridos simultaneamente com maior controle sobre a co-integração no genoma.

Vários são os fatores requeridos para a transformação eficiente do milho com *Agrobacterium*, como o genótipo do milho, com alguns sendo mais responsivos à transformação; o tipo de explante, com os embriões imaturos (7 a 12 dias após a polinização) sendo os mais usados; condicionamento da pré-inoculação, a escolha das cepas supervirulentas de *Agrobacterium* como EHA101, EHA105 e LBA4404; a adição de acetoseringona ao meio para induzir os genes de virulência e permitir a integração do gene exógeno; as condições ambientais e de cocultivo e, finalmente, eficientes protocolos de seleção e regeneração para produzir plantas viáveis (LI et al., 2017b).

Nas condições descritas para este trabalho, foi possível indicar a linhagem B104 como a mais responsiva à transformação com a cepa utilizada de *Agrobacterium*, portadora da construção RUBY. Portanto, é possível inferir que a estirpe de *Agrobacterium* e o genótipo da planta foram fatores importantes para a obtenção dos embriões transformados. Os procedimentos de transformação devem ser elaborados em sua concepção considerando sempre as peculiaridades genotípicas de cada organismo envolvido.

Com a comprovação da eficácia da expressão transiente na linhagem B104, testes relacionados à indução de calos, formação da embriogênese somática e regeneração foram realizados nas instalações da EMBRAPA MILHO E SORGO, com embriões desta linhagem. A Figura 6 ilustra os resultados obtidos nesta fase do trabalho.

Os embriões extraídos foram colocados em meio de repouso ou meio indutor de calos, no escuro, no qual foram adicionados componentes relevantes para a indução de calos, como o nitrato de prata, dicamba e L-prolina, tampão MES como tampão e cefotaxima, como agente antimicrobiano como diferenciais nesta etapa em específico.

A indução de calos é uma etapa essencial nos protocolos de cultura de tecidos e transformação genética vegetal, especialmente em culturas como o milho, que têm resposta morfogênica variável. A presença de determinados componentes no meio de cultura pode estimular a formação de calos embriogênicos, modular o ambiente químico, ou controlar a contaminação. O nitrato de prata (AgNO_3) atua bloqueando receptores de etileno nas células vegetais; o etileno é frequentemente produzido em resposta ao estresse e pode inibir a embriogênese ou a organogênese. A adição de AgNO_3 aumenta a eficiência de calogênese e regeneração, especialmente em gramíneas como milho (SONGSTAD et al., 1991). Dicamba (ácido 3,6-dicloro-o-anisico) é uma auxina sintética muito eficaz na indução de calos embriogênicos. Promove divisão celular desorganizada, especialmente em tecidos juvenis (como embriões imaturos). É amplamente utilizada em monocotiledôneas, como milho e sorgo (ISHIDA et al., 1996). L-Prolina é um aminoácido que atua como osmorregulador e protetor celular. Estabiliza proteínas e membranas durante o estresse causado pela cultura in vitro. Melhora a qualidade dos calos e a competência morfogênica (ARMSTRONG; GREEN, 1985). Tampão MES (2-(N-morfolino) etanosulfonato) mantém o pH do meio de cultura estável (geralmente em torno de pH 5,7). A estabilidade do pH é crítica para a

atividade hormonal, absorção de nutrientes, e viabilidade celular (SCHENK; HILDEBRANDT, 1972).

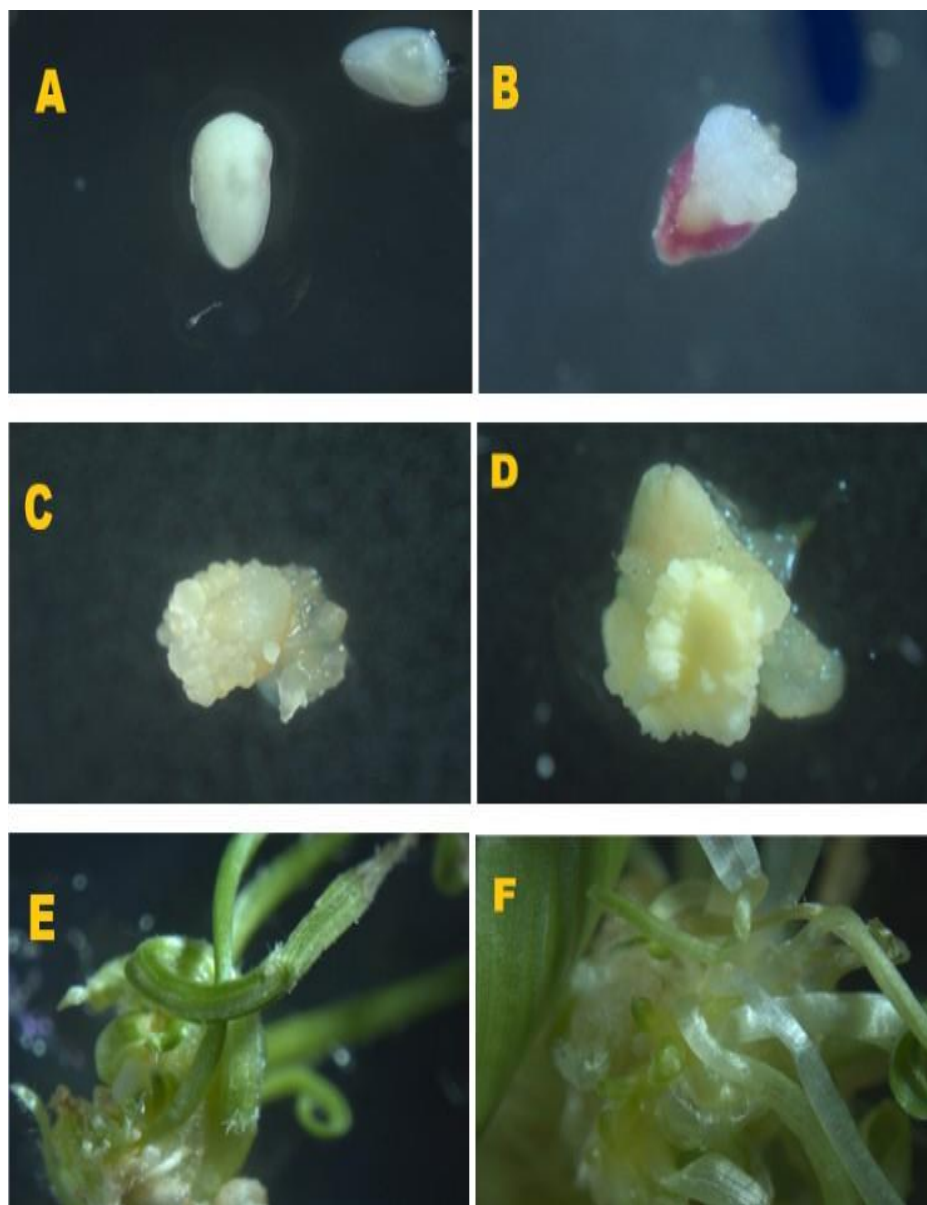


Figura 6. Detecção de expressão transitente e etapas da cultura de tecidos das linhagens de milho da EMBRAPA. **A:** linhagem L12 com baixa expressão transitente de RUBY em meio de cocultivo. **B:** linhagem B104 em meio de cocultivo com alta expressão do gene RUBY iniciando a indução de calos. **C:** linhagem B104 em meio de repouso com início da embriogênese somática **D:** linhagem B104 em meio de repouso com embriões somáticos formados **E:** linhagem B104 em meio de regeneração com folhas se formando a partir dos embriões somáticos **F:** linhagem B104 em meio de germinação com folhas e raízes emergidas a partir dos embriões somáticos.

A cefotaxima (antibiótico beta-lactâmico) é utilizado após a co-cultivação com *Agrobacterium* para eliminar a bactéria do tecido vegetal. Comparado a outros antibióticos (como carbenicilina), a cefotaxima possui baixa fitotoxicidade e pode até estimular a regeneração em algumas espécies (MATHIAS; BOYD, 2003).

Neste meio observou-se a formação de calos tipo I, que por sua vez realizaram a embriogênese somática. Os calos foram transferidos para o meio de regeneração no escuro, notavelmente neste meio se fez-se o uso de hormônios vegetais como o ABA (Ácido abscísico), AIA (Ácido indolacético), BAP (6-Benzilaminopurina), Zeatina e TDZ (Tidiazuron), além do sulfato de cobre (NORIEGA et al., 2007; JIMÉNEZ, 2001). Os hormônios vegetais adicionados ao meio de regeneração de calos têm papéis fundamentais na organogênese e embriogênese somática, que são os processos-chave para regenerar uma planta completa a partir de tecidos cultivados in vitro. Cada um destes hormônios exerce efeitos específicos no desenvolvimento celular e na diferenciação, enquanto o sulfato de cobre atua como cofator enzimático e pode melhorar a resposta morfogênica.

Os embriões somáticos foram mantidos no meio de regeneração até o aparecimento de raízes e folhas. A Figura 7 ilustra etapas do processo de obtenção da planta regenerada da linhagem B104. Concluiu-se, portanto, que a linhagem B104 teve alto sucesso na regeneração e é uma boa candidata como linhagem receptora para se tornar uma nova planta transgênica.

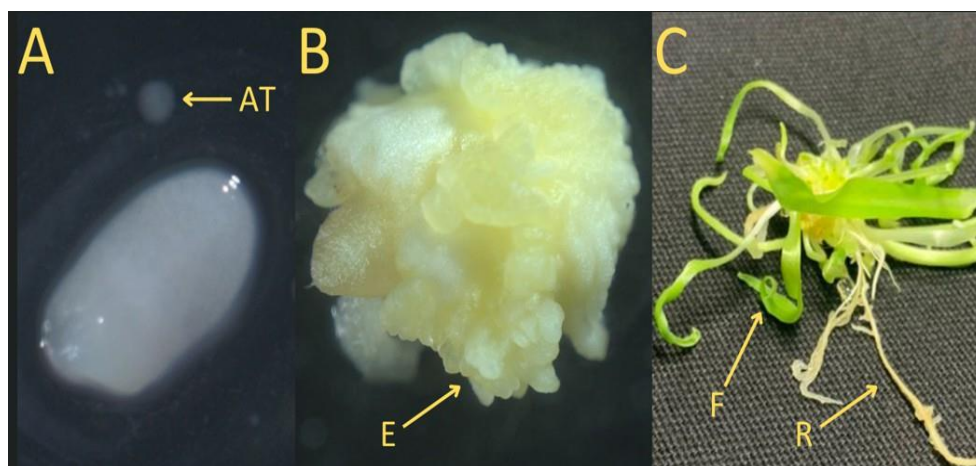


Figura 7. **A:** Etapas na obtenção de uma planta regenerada da linhagem B104. Embrião imaturo com 5 dias de idade e uma colônia de *Agrobacterium tumefaciens* (AT). **B:** Calo tipo I com embriões somáticos (E) em meio de regeneração. **C:** Plantas regeneradas *in vitro* com folhas (F) e raízes em (R).

4.4. Transformação da linhagem de milho B104 da EMBRAPA com a construção pMCG1005::*vip3Aa::bar*

Diante dos resultados obtidos, a linhagem de milho B104 foi a escolhida para se realizar a transformação com o vetor pMCG1005::*vip3Aa::bar*, dada a boa capacidade regenerativa em cultura de tecidos e a alta taxa de expressão transiente.

Para confirmação do clone positivo de *Agrobacterium* para a etapa de transformação dos embriões somáticos da linhagem B104, utilizou-se a técnica de PCR com iniciadores específicos para uma região do gene *vip3Aa*, os quais resultaram em um amplicon de 185 bp e iniciadores elaborados nas regiões do promotor 4x CaMv35s e terminador TNOS, que resultaram na amplificação de um fragmento de 1200 pb que contém o gene *bar*. Na Figura 8 pode-se observar os produtos amplificados referentes aos genes em estudo.

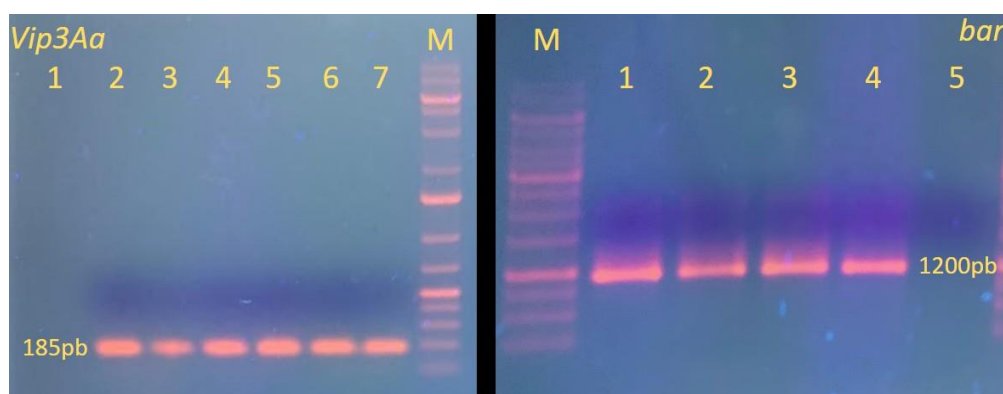


Figura 8. Eletroferograma da amplificação por PCR do gene *vip3Aa* de *B. thuringiensis* e do gene *bar* em *A. tumefaciens*. (A) M = Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); 1 = Controle negativo da reação; 2 a 6 = gene *Vip3Aa* (185 pb). (B) M = Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); 1 a 4 = gene *Bar* (1200 pb); 5 = Controle negativo da reação.

Após a confirmação do gene de interesse *vip3Aa* e o gene de seleção *bar* foi possível prosseguir com a transformação da linhagem, os parâmetros do protocolo de transformação para a construção pMCG1005::*vip3Aa*::*bar* foram os mesmos utilizados para a construção RUBY, conforme descrito em Material e Métodos. Cerca de 500 embriões imaturos com 2-3 mm de tamanho foram transformados, mantidos durante uma semana em meio de co-cultivo para, em seguida, serem transferidos para o meio de repouso até a formação de calos tipo I, marcando o início do desenvolvimento da embriogênese somática (2-3 semanas em meio de cultura) como pode ser observado na Figura 9.



Figura 9. Embrião imaturo de milho com embriões somáticos sendo formados a partir do eixo embrionário.

Após o desenvolvimento de embriões somáticos em meio de repouso, seguiu-se a transferência dos mesmos para o meio de seleção, contendo o herbicida BASTA® (glufosinato de amônio), nas concentrações de 2,0 e 5,0 mg/L, para garantir que apenas embriões transformados, portadores do gene bar, fossem selecionados (Figura 10). Em seguida, os embriões somáticos foram transferidos para o meio de regeneração, sem a presença de herbicida. Quando as brotações começaram a se desenvolver, as plântulas foram transferidas para frascos contendo meio de germinação MS contendo o hormônio vegetal AIB (ácido indolbutírico). O ácido indolbutírico é uma auxina sintética amplamente utilizada na cultura de tecidos vegetais e na propagação de plantas. Ele é estruturalmente semelhante ao ácido indolacético (AIA ou IAA), a auxina natural mais comum, mas mais estável e menos suscetível à degradação oxidativa, o que o torna especialmente útil em condições *in vitro*. É um hormônio frequentemente usado na fase final de regeneração, em meios específicos para estimular o desenvolvimento do sistema radicular antes da aclimação das plantas. (GASPAR et al., 1994).

Após o período de germinação, as plântulas obtidas foram aclimatadas em casa de vegetação, um estágio final que prepara as plantas para a transição ao ambiente externo, garantindo sobrevivência e crescimento adequados.

Como resultado de todo o processo, três plantas foram regeneradas, sendo estas portadoras dos genes de interesse. Estas foram levadas à casa de vegetação para aclimação.



Figura 10. Embriões somáticos em meio seletivo contendo o herbicida BASTA®, o qual seleciona embriões transformados com o vetor pMCG1005::*vip3Aa::bar*. **A:** Planta transgênica contendo os genes *vip3Aa* e *bar*, com resistência a pragas e tolerância a herbicida. **B:** Calo morto não transformado.

A baixa taxa de obtenção de plantas de milho regeneradas após transformação genética, especialmente via *A. tumefaciens*, é um dos maiores desafios na biotecnologia do milho. Isso se deve a uma série de fatores biológicos, técnicos e genotípicos que afetam cada etapa do processo — da

infecção até a regeneração da planta completa. Portanto, muitas são as pesquisas que devem ser direcionadas na tentativa de contribuir, cada vez mais, para a solução destes problemas.

5. CONCLUSÕES

Os procedimentos de cultura de tecidos aplicados ao milho (*Zea mays* L.) apresentam desafios, principalmente na indução e manutenção de calos com capacidade regenerativa, devido à especificidade dos requisitos do meio de cultivo. Entre os protocolos testados, o de Sidorov destacou-se como o único eficaz na obtenção de calos em variedades nacionais, servindo como base fundamental para adaptação e otimização de métodos para cultivares brasileiras. Experimentos com variedades da UNESP/FCAV mostraram que tecidos meristemáticos de plantas jovens, cultivados em meio suplementado com 2,8 mg L⁻¹ de 2,4-D, têm potencial para formar calos, indicando viabilidade para o desenvolvimento de protocolos alternativos mais adequados ao material genético nacional.

Recomenda-se buscar metodologias que evitem o uso de embriões imaturos como explantes, devido às limitações logísticas e econômicas,

priorizando tecidos juvenis meristemáticos, o que pode simplificar processos e reduzir custos, facilitando a produção de plantas transgênicas em maior escala.

Considerando todos os fatores, o projeto teve sucesso na transformação de milho. A linhagem B104 foi transformada com o gene *vip3Aa* e *bar* assim como também teve sucesso na expressão transiente da construção RUBY, obtendo, portanto, plantas transgênicas a partir desta linhagem via transformação com *Agrobacterium tumefaciens*.

LITERATURA CITADA

ABDULWAHID, A. A. et al. Optimization of in vitro regeneration system in maize (*Zea mays* L.) using different explants. **Scientific Reports**, London, v. 11, n. 1, p. 12566, 2021.

AHMADABADI, M.; RUF, S.; BOCK, R. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). **Transgenic Research**, v. 16, p. 437-448, 2007.

ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, Heidelberg, v. 164, n. 2, p. 207–214, 1985.

BENNETZEN, J. L. et al. Structure and evolution of the maize genome. **Plant Physiology, Rockville**, v. 136, n. 3, p. 1194–1201, 2004.

BEVAN, M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. **Nucleic Acids Research**, v. 12, n. 22, p. 8711–8721, 1984.

BHANDARI, R. et al. Gene pyramiding for insect resistance and herbicide tolerance in maize: a comprehensive review. **Plant Biotechnology Journal**, v. 20, n. 6, p. 1043–1058, 2022.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic acids research**, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BURTON, J. et al. Efficacy of Vip3Aa protein against Cry-resistant populations of *Spodoptera frugiperda* in maize. **Journal of Economic Entomology**, v. 114, n. 1, p. 134–142, 2021.

CAMILO, F. R. et al. Efficient maize transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* using mature embryo-derived calli as target material. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 41, e42936, 2019.

CARNEIRO, A. A. et al. Transformação genética de embriões zigóticos da linhagem de milho tropical L3 mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. **Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica**, v. 132, 2009.

CARNEIRO, C. H. S. et al. Uso do sistema RUBY como marcador visual em embriões de sorgo transformados por *Agrobacterium*. **Journal of Biotechnology in Agriculture**, v. 5, n. 1, p. 112–121, 2024.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, n. 5148, p. 802–805, 1994.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos – Safra 2024/25 – **8º Levantamento**. Brasília, 2025. Disponível em: <https://www.conab.gov.br>. Acesso em: 13 jun. 2025.

CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Relatório técnico sobre eventos transgênicos com genes *vip3Aa* e *bar***. Brasília: CTNBio, 2023.

DAI, S. H. et al. Transformation of maize mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 4, p. 407a–407j, 2001.

DE SOUZA, R. A. V. et al. **Influência de diferentes meios de cultura na transformação genética de milho tropical**, EMBRAPA MILHO E SORGO 2016.

DIAS, M. S. Biotecnologia agrícola: avanços na tolerância a herbicidas e resistência a insetos em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 22, n. 2, p. 151–165, 2023.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Novo milho híbrido é tolerante a lagartas e ao herbicida glifosato**. Brasília, 2024a. Disponível em: <https://www.embrapa.br/semiaridoshow/busca-de-noticias/-/noticia/82390451/novo-milho-hibrido-e-tolerante-a-lagartas-e-ao-herbicida-glifosato>. Acesso em: 16 jun. 2025.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Milho: importância econômica e produção nacional**. Brasília, 2024b. Disponível em: <https://www.embrapa.br/milho>. Acesso em: 13 jun. 2025.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Research, Philadelphia, v. 5, n. 3, p. 213-218, **Proceedings of the National Academy of 2005. Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Produção de milho. Guaíba: **Agropecuária**, 2000.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, **The future of food and agriculture: trends and challenges**. Rome: FAO, 2017. Disponível em: <https://www.fao.org/3/i6583e/i6583e.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2020.

FARINACIO, R. Obtenção de eventos transgênicos de cana-de-açúcar portando os genes *bar* e *vip3Aa* e identificação e análise da atividade inseticida de *Burkholderia* sp. contra *Spodoptera frugiperda*, **Repositório UNESP** 2019.

FDA – Food and Drug Administration. **World Agricultural Production Report – Corn Estimates 2024**. Washington, 2024. Disponível em: <https://www.fda.gov>. Acesso em: 13 jun. 2025.

FRAME, B. R. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 1, p. 13–22, 2002.

FURLANI, P. R. **Instruções para o cultivo de hortaliças de folhas pela técnica da hidroponia - Solução Nutritiva**. 2. ed. Campinas: IAC, 1999.

GASPAR, T. et al. Auxin metabolism and rooting in woody plants. In: DAVIES, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (ed.). *Biology of Adventitious Root Formation*. **New York: Plenum Press**, p. 117–131. 1994.

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

GILL, S. S. et al. Pyramiding of insecticidal proteins Cry and Vip for durable resistance in crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 965872, 2022.

GORDON-KAMM, W. J. et al. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 2, n. 7, p. 603–618, 1990.

GRATTAPAGLIA, D. MACHADO, M. A. Micropropagação. In. TORRES, A. C; CALDAS. L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação de Genética de Plantas**, Brasília: Embrapa-SPI/EmbrapaCNPQ, v.1, p.183-260. 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; GUO, Y. et al. Expression and stability of RUBY in various maize tissues. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 112345, 2023.

HE, X. et al. RUBY: a novel visible reporter for plant transformation based on betalain biosynthesis. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, n. 4, p. 1023–1032, 2020a.

HE, Y. et al. A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation. **Horticulture Research**, v. 7, n. 152, p. 1–10, 2020b.

HIEI, Y. et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **Plant Journal**, v. 6, n. 2, p. 271–282, 1994.

HOPP, H. E.; SPANGENBERG, G.; HERRERA-ESTRELLA, L. Plant transformation. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 876671, 2022.

IAC - INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **Recomendações de Adubação e Calagem para o Estado de São Paulo [Boletim 100]**. Campinas: IAC, 2022.

ISAAA. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018: Biotech Crops Continue to Help Meet the Challenges of Increased Population and Climate Change. **ISAAA Brief No. 54**, 2019.

ISHIDA, Y. et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 745–750, 1996.

ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. **Nature protocols**, v. 2, n. 7, p. 1614-1621, 2007.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, v. 6, p. 3901–3907, 1987.

JEMIMAH, E. R. et al. Growth performance and economics of feeding hydroponic maize fodder with replacement of concentrate mixture in New Zealand white rabbit kits. **J. Anim. Health Prod**, v. 6, n. 2, p. 73-76, 2018.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on chemical control. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 211–223, 2001.

KAMM, B. et al. Rapid identification of transgenic maize plants using the *bar* gene and phosphinothricin. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 447–450, 1990.

KAUSCH, A. P. et al. Maize transformation: history, progress, and perspectives. **Molecular Breeding**, v. 41, p. 1-36, 2021.

KHUSH, G. S. Genetically modified crops: the fastest adopted crop technology in the history of modern agriculture. **Agriculture & Food Security**, [S.l.], v. 1, Art. 14, 07 Sept. 2012.

KNOP, J. A. L. W. Quantitative Untersuchungen über den Ernährungsproceß der Pflanze. In: **Die landwirthschaftlichen Versuchs-Stationen**, 2. série, p. 65–99, 279–293. 1865.

KOLSAWADE, R. et al. Functional characterization of Vip3Aa protein from *Bacillus thuringiensis* in transgenic maize. **Crop Protection**, v. 165, p. 105352, 2023.

KOMARI, T. Transformation of cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) using a disarmed Ti-plasmid vector. **Journal of Genetics and Breeding**, v. 44, p. 429–436, 1990.

LI, Z. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize (*Zea mays* L.) and improvement of *Agrobacterium* infection frequency. **Plant Cell Reports**, v. 32, p. 1251–1260, 2013.

LI, W. et al. Hormonal and transcriptional changes associated with enhanced regeneration capacity in maize. **BMC Genomics**, London, v. 18, p. 453, 2017a.

LI, Z. et al. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous plants: A review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, p. 437–449, 2017b.

LUPOTTO, E. et al. Transgenic maize (*Zea mays* L.): an overview. **Maydica**, v. 49, p. 163–172, 2004.

LURIA, S. E.; BERTANI, G. Gene recombination in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 459–473, 1951.

MATHIAS, R. J.; BOYD, L. A. The effect of antibiotics on tissue cultured wheat (*Triticum aestivum*) and their elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 829–834, 2003.

MILLER, M. H. et al. Growth and yield of maize (*Zea mays* L.) grown outdoors hydroponically and in soil. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 69, n. 2, p. 295–302, 1989.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NHUT, D. T. et al. In Vitro Hydroponic Culture System in Plant Micropropagation. In: Nhut, D.T., Tung, H.T., YEUNG, E.C.T. (Eds.). **Plant Tissue Culture: New Techniques and Application in Horticultural Species of Tropical Region**. Singapore: Springer Singapore, p. 191–206. 2022.

NORIEGA, C. et al. Copper sulfate improves plant regeneration and gene transfer efficiency in maize (*Zea mays* L.). **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 514–522, 2007.

PALMA, L. et al. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their mechanisms of action and use in agriculture. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296–3325, 2014.

PATHI, K. M. et al. An efficient and rapid regeneration via multiple shoot induction from mature seed derived embryogenic and organogenic callus of Indian maize (*Zea mays* L.). **Plant signaling & behavior**, v. 8, n. 10, p. e25891, 2013.

PAULINO, V. T. et al. Crescimento e avaliação químico-bromatológica de milho cultivado em condições hidropônicas. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 5, n. 3, p. 1-5, 2004.

PEREIRA FILHO, I. A.; BORGHI, E. **Sementes de milho: nova safra, novas cultivares e continua a dominância dos transgênicos**. 1. ed. Embrapa Milho e Sorgo, 2020.

RAJHI, A. et al. Improvement of maize regeneration from immature embryos through adjustments in the culture medium and genotype selection. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 38, p. 1205–1216, 2019.

RESENDE, G. M. et al. Hidroponia: produção de hortaliças com segurança e qualidade. Brasília: **Embrapa Hortaliças**, 2012.

SACHS, J. “Beiträge zur Lehre von der Ernährung der Pflanzen durch, Germany, Wässerlösungen.” In: Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, **Bmgl.** 13, 311–320. 1860.

SANGOI, L. Interação entre densidade de plantas e épocas de semeadura na produtividade do milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 617–623, 2001.

SANGOI, L. et al. Importância da densidade de plantas na produtividade do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 2, p. 15–28, 2002.

SANTOS, M. R.; CASALI, V. W. D. Produção de hortaliças em hidroponia: aspectos técnicos e econômicos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 1–6, 2004.

SANZ-BARRIONUEVO, M. J. et al. Vip3Aa protein: mode of action and resistance management in *Spodoptera frugiperda*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 145, p. 103754, 2023.

SCHENK, R. U.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, v. 50, p. 199–204, 1972.

SHARMA, S. et al. Genetic Transformation Methods in Plants- “A Review”. **International Journal of Agricultural Science**, v. 8, 2023.

SHERMAN, F.; FINK, G. R.; HICKS, J. Beverly. Methods in yeast genetics: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1983.

SHRAWAT, A. K. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize with *bar* and *epsps* genes conferring herbicide tolerance. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 5, p. 639–647, 2007.

SIDOROV, V. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 320–328, 2006.

SONGSTAD, D. D.; ARMSTRONG, C. L.; PETOLINO, J. F. Silver nitrate increases friable embryogenic callus induction in maize. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 699–702, 1991.

TABASHNIK, B. E. et al. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 39, p. 605–614, 2021.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TALEB, A. et al. Efficient plant regeneration and antioxidant application to reduce tissue browning in maize culture. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, Lucknow, v. 21, n. 25–26, p. 101–110, 2020.

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

THOMPSON, C. J. et al. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. **The EMBO journal**, v. 6, n. 9, p. 2519–2523, 1987.

TINGAY, S. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. **The Plant Journal**, v. 11, n. 6, p. 1369–1376, 1997.

TORRES, A. C. et al. Transformação genética da batata cultivar Achat via *Agrobacterium tumefaciens*. **Horticultura Brasileira**, v. 18, p. 41–45, 1988.

TRINDADE, R. M. et al. Fenologia do milho e suas implicações no manejo da cultura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 5, n. 1, p. 123–132, 2006.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, **National Agricultural Statistics Service – NASS**. U.S. corn growers produced 14.2 billion bushels of corn in 2020, up 1 percent from 2019. Washington, DC: USDA–NASS, 12 jan. 2021. Disponível em: <https://www.nass.usda.gov/Newsroom/archive/2021/01-12-2021a.php#:~:text=U.S.%20corn%20growers%20produced%2014.2,is%20up%201%25%20from%202019>. Acesso em: 16 jun. 2025.

VARMAN, R. S. et al. Culture of plant cells for crop improvement. **Plant Biotechnology Journal**, Cambridge, v. 17, n. 5, p. 893–902, 2018.

VEGA, J. M. et al. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. **Plant cell reports**, v. 27, p. 297–305, 2008.

WANG, X. et al. Pollen-mediated transformation of maize using magnetic nanoparticles carrying bar gene for glufosinate resistance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 12, p. 3650–3659, 2022.

ZHANG, X. et al. Development and evaluation of bar gene-based selectable marker systems for maize transformation. **Plant Cell Reports**, v. 28, n. 5, p. 799–808, 2009.

ZHAO, Z. Y. et al. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. **Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 671–682, 2001.

ZHI, H. et al. Use of RUBY as a visible marker in maize transformation. **Plant Cell Reports**, v. 40, p. 1235–1245, 2021.