



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM ÊNFASE EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS

ANA CAROLINA DA ROCHA OLIVEIRA

**ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE BIOBALÍSTICA EM MILHO VISANDO
AUMENTO NA EFICIÊNCIA DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA**

Recife
2025

ANA CAROLINA DA ROCHA OLIVEIRA

**ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE BIOBALÍSTICA EM MILHO VISANDO
AUMENTO NA EFICIÊNCIA DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Orientadora: Profa. Dra. Valesca Pandolfi

Coorientadora: Dra. Fernanda Freitas Souza

Recife

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Oliveira, Ana Carolina da Rocha.

Estabelecimento do método de biobalística em milho visando aumento na eficiência da transformação genética / Ana Carolina da Rocha Oliveira. - Recife, 2025.

66 p. : il., tab.

Orientador(a): Valesca Pandolfi

Coorientador(a): Fernanda Freitas Souza

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas /Ciências Ambientais - Bacharelado, 2025.

Inclui referências.

1. Genética Vegetal. 2. Biotecnologia Vegetal. 3. Sustentabilidade. 4. Genômica. 5. Organismos Geneticamente Modificados (OGMs). 6. Engenharia Genética. I. Pandolfi, Valesca. (Orientação). II. Souza, Fernanda Freitas. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

ANA CAROLINA DA ROCHA OLIVEIRA

**ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE BIOBALÍSTICA EM MILHO VISANDO
AUMENTO NA EFICIÊNCIA DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Aprovada em: 28/03/2025

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Valesca Pandolfi (orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

M.Sc. Paulo Vitor Galdino da Silva (Membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

M.Sc. Fernanda Alves de Andrade (Membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Recife

2025

Aos meus pais, Maria Eurídice Rocha e Manoel Pereira, e a minha irmã, Cecília Rocha, por todo o amor, carinho, dedicação, apoio, incentivo e confiança que recebi em toda minha vida. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus pela minha vida, saúde.

Aos meus pais, Maria Eurídice da Rocha Oliveira e Manoel Pereira de Oliveira, por escolherem cuidar de mim, me darem a oportunidade de ter uma vida melhor, por me criarem com muito amor e respeito, por me mostrarem que a educação é a única coisa que fica quando todo o resto se vai. Nunca vou esquecer de todos os conselhos, broncas, abraços e carinho que foram necessários para o meu crescimento. Como eu costumo dizer: *“Carrego papai no bolso e mamãe no coração”*.

À minha querida irmã, Cecília da Rocha Oliveira, por todo amor e cuidado, por ser minha melhor amiga, estar sempre do meu lado para me consolar, apoiar, me ajudar em tudo que preciso, ser meu porto seguro e minha segunda mãe. Ela me levava para a faculdade quando eu era bebê. Eu lembro de tudo e vou te agradecer pelo resto da minha vida, sou eu por você sempre! Como está escrito na nossa tatuagem: *“Onde estiver... estarei contigo”*. Agradeço também a todos os amigos da minha irmã que me viram crescer e me acompanham até hoje.

Ao meu príncipe, noivo e futuro marido (se Deus quiser), Rikelme Carmo da Cruz, por ter chegado há pouco tempo e já ter feito tanto, sempre me ajudando, resolvendo todos os meus problemas, dando força, carinho, amor, motivação, tem sido um dos grandes responsáveis pelo meu sucesso acadêmico. Por ser meu parceiro nos estudos e na vida, ter me reaproximado do nosso Pai, me ajudado a amadurecer, ter te conhecido pós-covid foi como um sopro de alívio, ali eu soube que tudo ia ficar bem. Além disso, agradeço também a toda a sua família por todo o acolhimento que recebi.

À toda minha família por participarem do meu crescimento como pessoa, me darem uma base sólida para enfrentar o mundo e todo auxílio prestado durante toda minha vida.

Às minhas amigas do ensino médio, meu trio (Aline Krisley Floriano da Silva, Willaine Gilian Vieira de Lima e Kessia Nayanne Maciel de Melo) pelo aconchego, reciprocidade, carinho, anarquia, longa amizade e por simplesmente permanecer quando a tendência era ir com o passar do tempo, e, a Gabriela Souza Soares por tudo isso citado anteriormente e o bônus de ter sido minha dupla de estudos no foco de passar no Enem, conseguimos juntas.

Ao meu grupinho de amigos na graduação o “povo do busão”: Karen Milleny Madruga Lima de Macêdo, Ana Beatriz Leonardo Félix, Michele Raiza de Souza Nascimento, Ingrid Coriolano Barbosa, Luiz Henrique de Oliveira Euzébio e Miguel Gomes da Silva que em meio ao caos da graduação e problemas pessoais que todos enfrentamos, sempre nos ajudando, um abraço amigo, um conforto e muitas risadas.

À minha orientadora, Valesca Pandolfi, por ter me acolhido, indicado um caminho, me guiado durante toda essa jornada, por contribuir para o descobrimento do meu amor pela genética e abrir meus olhos para minha profissão, além de ser uma fonte de inspiração para mim. Ademais, expresso igualmente gratidão à minha coorientadora, e grande amiga, Fernanda Freitas Souza, por todo auxílio na pesquisa/escrita, por todo apoio moral e emocional, amizade, risadas, brincadeiras, descontração, por me ensinar tantas coisas que me tornaram uma pesquisadora.

Ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV) pela grande contribuição na execução da pesquisa, estendendo meus agradecimentos as professoras Dra. Ana Maria Benko Iseppon e Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal, assim como a técnica do LGBV, Vanessa Cristina de Souza, e ao técnico do Laboratório de Genética Molecular (LGM), Dr. Manassés Daniel da Silva.

A todos os meus amigos do LGBV (Paulo Vitor Galdino da Silva, Evellyn Monique de Aceno Lima Lira, Jailene Kelley Umbelino dos Santos, Gabriel de Almeida Magalhães Dias e Caio Benedito de Lima) pelo suporte, em especial, Fernanda Alves de Andrade, Cleidiane Macedo Santos, Molyna Evelyn Silva e Camilla Emanuella Borba Pereira pelo convívio frequente, apoio, desabafos e momentos alegres, bem como a todos os meus colegas de laboratório.

Agradeço à Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG pela oportunidade de executar parte da pesquisa em suas dependências, especialmente e imensamente à pesquisadora Dra. Andrea Almeida Carneiro e toda sua equipe, singularmente, a Armando Gonçalves de Souza Filho e a técnica Meire de Cassia Alves pela orientação e cordialidade. Da mesma forma, agradeço a Raquel Gomes de Oliveira pela estadia e hospitalidade durante todo o período em que permaneci em Sete Lagoas e a Lise Meireles Soares de Alencar, seu marido e família, pela hospedagem durante o período que passei em Belo Horizonte em prol do estudo.

Aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq, PROPESQI, Facepe e CAPES, por me conceder a bolsa PIBIC e financiar as pesquisas interligadas ao meu projeto.

“Mas buscai primeiro o reino de Deus, e a sua justiça, e todas essas coisas vos serão acrescentadas”

Matheus 6:33 ARC

RESUMO

O milho (*Zea mays L*) é um cereal de extrema relevância para a agricultura familiar e o agronegócio brasileiro. A transformação genética desta cultura tem sido amplamente estudada ao longo dos anos, visando a obtenção de características superiores e resistência a doenças. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo eficiente para a transformação genética do milho via biobalística, utilizando genes repórteres (*GUS* e *RUBY*) em embriões imaturos do milho (linhagem B104) para verificação da expressão gênica. Foram realizados desenho de primers para posterior PCR de colônias e confirmação de plasmídeo. Posteriormente, foram conduzidas as etapas de coleta das espigas de milho (cultivo desenvolvido em casa de vegetação através da polinização manual), desinfestação e isolamento de embriões, e, posteriormente, as etapas de extração e purificação do DNA plasmidial – miniprep. Em seguida, dois experimentos foram realizados, no primeiro experimento, os parâmetros físicos (distância de posicionamento dos embriões e quantidade de membranas de ruptura) foram analisados mediante seis tratamentos, nomeados de A a E, onde o melhor entre eles foi selecionado pela expressão transiente do gene repórter *RUBY* (quantidade de transformantes). No segundo experimento, foi verificado se dois bombardeamentos em uma única placa aumentaria a expressão temporária do gene repórter *GUS*. A melhor eficiência para *RUBY* foi obtida com o tratamento C (três membranas de ruptura e uma distância de 11,5 cm entre a membrana carreadora e o explante), resultando em três embriões imaturos em iniciação de calos expressando o referido gene repórter. Para *GUS*, dois disparos por placa levaram a uma maior taxa de expressão. A experiência adquirida neste estudo será aplicada no laboratório para futura implementação da metodologia. Os resultados reforçam a importância da otimização dos parâmetros para a regeneração de embriões e destacam *GUS* e *RUBY* como genes repórteres eficazes para triagem de explantes transformados. O conhecimento obtido poderá ser utilizado para testar outros genes repórteres e aprimorar a expressão estável, aumentando as chances de sucesso na obtenção de plantas transgênicas de milho.

Palavras-chave: Expressão transiente. Genes repórteres. *GUS*. *RUBY*.

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is an extremely important cereal for family farming and Brazilian agribusiness. The genetic transformation of this crop has been widely studied over the years, **to improve agronomic performance and confer resistance to pathogens**. This study aimed to establish an efficient protocol for genetic transformation of maize via biolistic, using reporter genes (*GUS* and *RUBY*) in immature corn embryos (B104 line) to verify gene expression. Primers were designed for subsequent colony PCR and plasmid confirmation. Subsequently, ears of maize (grown in a greenhouse and manually pollinated) were harvested, disinfected, and processed for immature embryo isolation. Plasmid was extracted and purified using miniprep protocol - miniprep. Two independent experiments were conducted. In the first, the physical parameters (embryo positioning distance and number of ruptured membranes) were analyzed resulting in six treatments (named from A to E). The optimal condition was identified based on transient expression of the *RUBY* reporter gene, determined by the number of embryos showing successful transformation. The second experiment evaluated whether two consecutive bombardments of the same plate would enhance transient expression of the *GUS* reporter gene. The highest level of *RUBY* expression was observed under treatment C, which used three rupture membranes and a microcarrier to explant distance of 11.5 cm. Under these conditions, three immature embryos generated callus with visible *RUBY* expression. For *GUS*, two shots per plate led to a higher expression rate. The knowledge obtained can be used to test other reporter genes and improve stable expression, increasing the chances of success in obtaining transgenic plants. These findings emphasize the importance of optimizing physical parameters to improve both embryo regeneration and transformation efficiency. Furthermore, *GUS* and *RUBY* were demonstrated to be reliable and effective reporter genes for screening transformed maize explants. The insights acquired in this study can be applied to testing additional reporter genes and improving stable expression, increasing the chances of successfully obtaining transgenic maize plants.

Keywords: *GUS*. Reporter genes. *RUBY*. Transient expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Principais etapas na simulação do desenho de primers vetores usando o SnapGene.....	40
Figura 2 –	Procedimento de polinização manual nas espigas de milho. A) Proteção do órgão reprodutivo da planta, para realização da polinização manual; B) Partição dos estigmas (para melhor eficiência da fertilização); C) Transferência do pólen para no estigma do milho; D) Retirada de um embrião para medicação; E) Verificação do tamanho do embrião em papel milimetrado (1,8mm tamanho ideal, sendo importante não ultrapassar 2 mm)..	40
Figura 3 –	Procedimentos de desinfestação das espigas de milho. A) Espigas despalhadas; B) Espigas imersas na solução de hipoclorito de sódio para completa desinfestação; C) Preparação dos utensílios (placas de petri, pinças, bisturis e água destilada autoclavada) em câmara de fluxo laminar para lavar as espigas; D) Isolamento de embriões imaturos do milho com espátula de ponta fina; E) Embriões isolados e em processo de transferência para placa com meio osmótico.....	42
Figura 4 –	Preparo de embriões do milho para transformação via biobalística. A) Embriões em meio osmótico posicionados com o eixo embrionário voltado para baixo; B) Visualização e posicionamento preciso dos embriões utilizando o esteriomicroscópio com aumento de 10x.....	43
Figura 5 –	Parâmetros físicos relacionados ao equipamento <i>genegun</i> . A) Suporte das membranas de ruptura; B) Diferentes distâncias de posicionamento da estante com placa de petri contendo os embriões a serem bombardeados; C) Posicionamento dos embriões imaturos; D) Embriões prontos para serem bombardeados.....	44
Figura 6 –	Embriões imaturos em fase de iniciação de calos embriogênicos em todas as placas, após 3-5 dias de bombardeamento. Para o gene <i>RUBY</i> , cinco tratamentos nomeados de A a E. Para o gene	

	<i>GUS</i> , sete placas contendo embriões bombardeados 2X	46
Figura 7 –	Elektroforese em gel de duas amostras (A e B) provenientes de extrações de DNA Plasmidial contendo a construção de interesse Ubiquitina: <i>RUBY</i>	47
Figura 8 –	Calos embriogênicos de milho expressando o gene repórter <i>RUBY</i> (coloração vermelha) ao tecido transgênico, sob o controle do promotor constitutivo da Ubiquitina. Tratamentos B e C.....	48
Figura 9 –	Embriões de milho expressando o gene repórter <i>GUS</i> (coloração azul) ao tecido transgênico, sob o controle do promotor constitutivo da Ubiquitina.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	<i>Ácido Desoxiribonucleico; Desoxyribonucleic Acid;</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GUS	<i>β-glucuronidase</i>
GFP	<i>Proteína verde fluorescente; Green Fluorescent Protein;</i>
Meio MS	<i>Meio básico MS, Murashige and Skoog Basal Medium</i>
MTCT	<i>Minimal tissue culture transformation</i>
RNA	<i>Ácido ribonucleico; Ribonucleic acid;</i>
RUBY	<i>Sistema de biossíntese da betalaína</i>
SE	<i>Somatic embryogenesis</i>
TCT	<i>Tissue culture-free transformation</i>
X-GLUC	<i>5-bromo-4-cloro-3-indolglucuronídio</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	GERAL.....	17
2.2	ESPECÍFICOS.....	17
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA VEGETAL.....	18
3.1.1	<i>Métodos de transformação genética vegetal.....</i>	18
3.1.1.1	<i>Métodos indiretos.....</i>	18
3.1.1.2	<i>Métodos diretos.....</i>	20
3.1.1.3	<i>Novos métodos e otimizações na transformação genética vegetal.....</i>	21
3.1.2	<i>Plantas Modelos na transgenia.....</i>	25
3.2	CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS.....	28
3.2.1	<i>Micropopagação.....</i>	29
3.2.2	<i>Organogênese.....</i>	30
3.2.3	<i>Embriogênese somática.....</i>	31
3.2.4	<i>Variação somaclonal e seleção in vitro.....</i>	32
3.2.5	<i>Perspectivas.....</i>	33
3.3	GENES MARCADORES: GENES DE SELEÇÃO E GENES REPÓRTERES.....	34
3.3.1	<i>Gene GUS (β-glucuronidase).....</i>	35
3.3.2	<i>Gene RUBY (sistema de biossíntese da betalaína).....</i>	36
3.4	FATORES QUE INFLUENCIAM NA TAXA DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	DESENHO DE PRIMERS E CONSTRUÇÃO DE VETORES.....	40
4.2	POLINIZAÇÃO MANUAL, DESINFESTAÇÃO E ISOLAMENTO DE EMBRIÃO DE MILHO.....	40
4.3	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL.....	42
4.4	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO MILHO VIA BIOBALÍSTICA.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	ISOLAMENTO DOS EMBRIÕES DE MILHO.....	45

5.2	CONFIRMAÇÃO DO PLASMÍDEO.....	46
5.3	TRANSFORMAÇÃO COM GENE REPÓRTER <i>RUBY</i>	47
5.4	TRANSFORMAÇÃO COM GENE REPÓRTER <i>GUS</i>	50
6	CONCLUSÕES.....	52
7	REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea pertencente à família Poaceae (MAGALHÃES; SOUZA, 2015), amplamente reconhecida pela sua diversidade genética e fenotípica. Suas diferentes variedades são utilizadas em diversos setores, seja na alimentação animal (mediante a produção de rações), no consumo humano e extração de subprodutos, como óleo, etanol e amido (RAMESSAR *et al.*, 2008).

Os atributos fenológicos e morfológicos, possibilitam que o milho apresente uma excelente produtividade e adaptabilidade nas regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil (DA SILVA *et al.*, 2021). Entretanto, os principais cultivos agrícolas no país são constantemente afetados por diversas doenças de importância econômica (JUNIOR *et al.*, 2017). Na cultura do milho, a ocorrência de patógenos e fitopatógenos pode comprometer o desenvolvimento das plantas e, consequentemente, afetar negativamente a produtividade.

Nesse contexto, a engenharia genética, utilizando técnicas de transformação vegetal, consolidou-se como uma ferramenta essencial nos programas de melhoramento genético, possibilitando a obtenção de variedades com características agrônomicas aprimoradas (BRASILEIRO; CANEIRO, 2015). Devido a sua praticidade de manejo e a rica diversidade genética o milho se tornou um excelente modelo para engenharia genética especialmente, na produção de plantas geneticamente modificadas (CIPRIANO, 2008; NANNAS; DAWE, 2015). Desde a sua liberação comercial em 1996, o uso de milho geneticamente modificado cresceu significativamente no mundo (NANNAS; DAWE, 2015), incorporando características como resistência a herbicidas, tolerância ao estresse abiótico e biótico, o alto rendimento e qualidade nutricional melhorada (YASSITEPE *et al.*, 2021).

Os primeiros eventos transgênicos de milho foram obtidos por meio do método de transformação Biobalístico (CARNEIRO *et al.*, 2009b). Esse sistema utiliza microprojéteis revestidos com ácidos nucleicos e/ou outras moléculas, que são acelerados a alta velocidade para serem introduzidos diretamente em células e tecidos *in vivo* (VIANNA; ARAGÃO; RECH, 2015). Esses microprojéteis atravessam a parede celular e a membrana plasmática sem comprometer significativamente a integridade estrutural das células (VIANNA; ARAGÃO; RECH, 2015). Entre suas vantagens, destacam-se a sua capacidade de inserir genes exógenos sem relação com a espécie ou tecido, possibilidade de inserção de mais de um material genético

de interesse, vetores de fácil operação e simplicidade na transformação direta de tecidos totipotentes (SANFORD, 1990; CHEN *et al.*, 1998; WU *et al.*, 2002; CARNEIRO *et al.*, 2009a). Entretanto, a eficiência de transformação genética *via* biobalística é relativamente baixa (~ 0,01%), devido fatores como – a construção gênica, os parâmetros físicos do equipamento (Gene *Gun*), biológicos (tecido alvo, concentração osmótica) e os relacionados aos microprojéteis (CARNEIRO; CARNEIRO; PAIVA, 2004).

No que se refere à construção gênica, esta é composta por um gene de interesse, um gene marcador de seleção e/ou repórter e suas respectivas sequências regulatórias, que influenciam na taxa de transcrição (BRASILEIRO; GUIMARÃES, 2015). Os genes repórteres, são importantes para quantificar as células transformadas, monitorar a atividade de um promotor, determinar a localização subcelular de proteínas, além de estabelecer protocolos de transformação (LACORTE; BARROS, 2015). Dentre os genes repórteres mais utilizados, destacam-se *GUS* e *GFP*, amplamente empregados para monitorar a atividade gênica em plantas (LACORTE; BARROS, 2015). Porém, recentemente, o gene repórter *RUBY* tem ganhado destaque na transformação vegetal por sua eficácia na visualização da expressão gênica (WANG *et al.*, 2023).

Com base no exposto e considerando o importante papel da engenharia genética na agricultura sustentável, torna-se viável o estudo de otimizações de protocolos visando o aumento da eficiência de transformação genética do milho. Portanto, este trabalho teve o objetivo de estabelecer um protocolo eficiente para a transformação genética de embriões imaturos de milho (cultivar B104) *via* biobalística utilizando genes repórteres.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Otimizar o processo de transformação genética de milho *via* biobalística, visando aumento na eficiência da transformação genética e implementação da metodologia no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV) /UFPE.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar a transformação genética de embriões imaturos de milho através da técnica de Biobalística;
- ✓ Avaliar a eficiência do processo de transformação genética usando os genes repórteres *GUS* e *RUBY* no milho.
- ✓ Auxiliar nas etapas de implantação e metodologias envolvidas no processo de transformação genética vegetal, atualmente em desenvolvimento no LGBV/UFPE, com foco no aprendizado e treinamento prático na área;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA VEGETAL

A transformação genética é caracterizada pela incorporação de um DNA exógeno ou autólogo no genoma do hospedeiro (SAEED; SHAHZAD, 2016). Trata-se de uma metodologia que consiste em (1) seleção e isolamento do gene de interesse, (2) construção de um cassete de expressão e clonagem no vetor e, posteriormente, (3) seleção do método de transformação (SHARMA; ALEX, 2017). Segundo Sharma e Alex (2017), os vetores utilizados na transferência de genes são classificados em: a) vetores de clonagem; b) vetores de expressão; c) vetores de transporte. Dentre os vetores de clonagem, os plasmídeos bacterianos são amplamente utilizados na engenharia genética para transferência de genes exógenos (AL DOGHAITHER; GULL, 2019), devido a sua facilidade de manipulação. Essas moléculas de DNA circular possuem tamanhos que variam entre 6 e 12 kb (SHARMA; ALEX, 2017).

Para a transferência do material genético, vários parâmetros são considerados, incluindo: escolha da espécie, o tipo de explante (célula, tecido, protoplastos), capacidade de regeneração e técnica de transformação que será empregada (ANJANAPPA; GRUISSEM, 2021). Com base nesses parâmetros, os principais métodos de transformação genética são classificados em duas principais categorias: a) métodos indiretos, onde há necessidade de um agente biológico intermediário, a exemplo da *Agrobacterium tumefaciens* ou *A. rhizogenes* e b) métodos diretos, sendo a biobalística e a eletroporação, dois exemplos mais utilizados (ANDRADE, 2003).

3.1.1 Métodos de transformação genética vegetal

3.1.1.1 Métodos indiretos

Os métodos de transferência indireta de genes em plantas envolvem o uso de microorganismos como a *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*) ou vírus que infectam vegetais (CHAKRABORTY *et al.*, 2020). Em relação à *Agrobacterium*, a

manifestação da doença ocorre em um grande número de plantas dicotiledôneas, devido serem mais susceptíveis a infecção (LEVENGOOD; ZHOU; ZHANG, 2024). Essa bactéria transfere seu material genético para o genoma do hospedeiro vegetal e, após a infecção, induz alterações fisiológicas, como o desenvolvimento de ‘tumor’ conhecido como galha da coroa (*A. tumefaciens*) ou o crescimento raízes (*A. rhizogenes*). Com base nisso, a agrobactéria abriu perspectiva e tornou-se uma ferramenta eficaz para a transferência genética de genes em tecidos vegetais (LEVENGOOD; ZHOU; ZHANG, 2024).

Em 1983, Hoekema e seus colaboradores foram os pioneiros no uso de *A. tumefaciens* para a transformação genética de plantas através de vetores binários (dois plasmídeos, um contendo a região *vir* e o outro carregando o T-DNA) testados em tomate, kalanchoe e tabaco. No entanto, foram Herrera-Estrella e colaboradores (1983) os primeiros a obter uma planta transgênica, utilizando uma construção gênica quimérica (enzima octopina sintase e gene *ocs*, nunca encontrado em extrato vegetais não-transgênicos) para melhor verificação da transformação.

A transformação mediada por *Agrobacterium* é amplamente empregada devido à sua integração genética consistente, transmissão estável dos genes e inserção de um número limitado de cópias, entre outros benefícios (RAJI et al., 2018). Os autores Tzfira e Citovsky (2006), bem como Ramkumar e colaboradores (2020) descrevem todo o mecanismo por trás dessa capacidade. Quando as células vegetais sofrem ferimentos (tratos culturais, insetos ou geadas), liberam compostos fenólicos que são detectados, desencadeando diversas reações associadas às proteínas de virulência (*vir*) do plasmídeo TI (indutor de tumor de *A. tumefaciens*) ou RI (indutor de raízes, de *A. rhizogenes*). Essas proteínas facilitam a transferência do T-DNA (DNA de transferência), que naturalmente contém genes relacionados à síntese de opinas, fontes de carbono utilizadas pela bactéria no interior do hospedeiro (DESSAUX; PETIT; TEMPE, 1992).

No entanto, na engenharia genética a região de indução de tumor é substituída por um gene de interesse e/ou gene marcador de seleção. Neste caso, após infecção, esse segmento de DNA é transferido para o genoma da planta e se integra por recombinação não homóloga. Estudos recentes demonstram o uso, aplicabilidade e eficácia do método. Wu e Zhao (2017) desenvolveram um protocolo otimizado para transformação do sorgo com eficiência de transformação superior a 10%, assim como, Pérez-Pascual e colaboradores (2025) com a aplicação de novas

injúrias em discos foliares de *Coffea canephora* após cocultivo, aumentou significativamente a taxa de transformação (98%).

Em relação aos vírus, estes podem ser modificados geneticamente para funcionar como vetores no processo de introdução de material genético exógeno e aplicados a diversos vegetais, de forma rápida, apesar das transformações serem temporárias (RAMKUMAR *et al.*, 2020). Desta forma, vetores virais se destacam como opções especialmente vantajosas para a produção de vacinas e proteínas terapêuticas, pois não requerem processos longos de transformação. Além disso, são capazes de expressar quantidades significativas do gene de interesse em larga escala em pouco tempo (HEFFERON, 2012), como evidenciado nos experimentos de Tavares-Esashika e colaboradores (2022), que desenvolveram um novo vetor de expressão gênica heterólogo em plantas de *Nicotiana benthamiana* com base em um clone infeccioso de um tobravírus visando a produção de proteínas heterólogas em um sistema vegetal.

3.1.2.2 Métodos diretos

A transferência direta de genes em plantas é classificada em três grupos: métodos físicos, químicos e embebição de DNA em células/ tecidos/ órgãos. Os métodos físicos envolvem a microinjeção, eletroporação, biobalística, encapsulamento de lipossomas e transformação mediada por fibras de carboneto de *silício*. Em contrapartida, os métodos químicos incluem a transferência mediada por polietilenoglicol (PEG), dietilaminoetil (DEAE) dextrano e precipitação de fosfato de cálcio (CHAKRABORTY *et al.*, 2020). O método de embebição de DNA consiste na imersão de embriões somáticos desidratados (estágio em que a bicamada lipídica se torna mais permeável) em uma solução contendo um plasmídeo com o gene de interesse (SENARATNA *et al.*, 1991).

No método físico por microinjeção, apenas uma única célula receptora é transformada, sendo o DNA exógeno injetado, por uma agulha de capilar, no citoplasma ou núcleo da célula (RAMKUMAR *et al.*, 2020). Por outro lado, a transformação genética mediada por eletroporação consiste na incubação de células competentes (protoplastos) com DNA recombinante, seguida pela aplicação de um pulso térmico, que induz a formação temporária de poros (permeabilização) na

membrana celular, facilitando a entrada do DNA exógeno (VAN DIE; BERGMANS; HOEKSTRA, 1983; SINGH *et al.*, 2010).

Entre os métodos mais utilizados, a biobalística, também chamada de bombardeamento de partículas e/ou acelerador de microprojecteis. A técnica se destaca por utilizar micropartículas de ouro ou tungstênio recobertas com DNA, RNA ou proteínas, que são posicionadas em uma membrana macrocarreadora e aceleradas em direção ao tecido vegetal por meio da pressurização do gás hélio (RAMKUMAR *et al.*, 2020). Durante este processo, as micropartículas atravessam a parede e membrana celular, liberando o DNA exógeno no citoplasma, podendo ser expresso de forma transitória ou de forma estável com a incorporação do DNA ao genoma da célula hospedeira (CHAKRABORTY *et al.*, 2020). No entanto, parâmetros químicos, físicos e biológico devem ser considerados no momento da transformação via biobalística.

Inúmeros estudos utilizando espécies cultivadas foram desenvolvidas usando o método de biobalística com a finalidade de aumentar a tolerância a estresses bióticos e/ou abióticos. Entre as espécies destacam-se o milho (OSMAN *et al.*, 2015), feijão-comum (FARIA *et al.*, 2016), feijão-caupi (CITADIN; CRUZ; ARAGÃO, 2013), soja (ENGELS *et al.*, 2013), cana-de-açúcar (JACKSON; ANDERSON; BIRCH, 2013), *Elymus sibiricus* (gramínea) (DU *et al.*, 2021), feijão-mungo (TRIPATHI *et al.*, 2024) e tomate (RASHID; ZAHED, 2024). Assim, a biobalística se tornou uma tecnologia promissora e eficaz para a transformação genética vegetal.

3.1.2.3 Novos métodos e otimizações na transformação genética vegetal

A transformação genética é a base da biotecnologia vegetal e o desenvolvimento de novos métodos e otimizações são extremamente necessários, devido às limitações das técnicas comumente utilizadas. Inicialmente com uso da *Agrobacterium*, posteriormente, com novos métodos (incluindo a biobalística) (PAES DE MELO *et al.*, 2020). Paes de Melo e colaboradores (2020) utilizaram a combinação dos métodos mais utilizados (*Agrobacterium* e biobalística) na transformação de soja. Neste estudo, os autores utilizaram a biobalística (sem material genético) para promover microferrimentos no meristema embrionário e a *Agrobacterium* (com DNA recombinante) para penetrar o tecido e realizar a

transfecção da célula. Embora a taxa de eficiência obtida (9,84%) tenha sido semelhante à relatada em outros estudos utilizando a mesma cultivar, a combinação das metodologias demonstrou ser mais eficaz. Isso se deve à integração das principais vantagens de cada sistema de transformação, especialmente ao uso do eixo embrionário como explante vegetal, o que permitiu que as etapas de transformação, cocultivo e regeneração fossem realizadas de forma integrada em um único fluxo de trabalho.

Tal protocolo evita a manipulação excessiva de explantes, além de não gerar quimeras, uma das principais desvantagens encontradas nos protocolos tradicionais, que utilizam nós cotiledonares isolados de sementes germinadas como explantes. Similarmente, essa combinação também foi utilizada por Ribeiro e colaboradores (2021), os quais obtiveram uma recuperação eficiente de plantas transgênicas, ultrapassando as limitações comuns relacionadas à resistência encontrada em diversos genótipos de algodão, com uma taxa de transformação de até 60%.

Outra abordagem inclui a nanotecnologia, a qual teve sua ascensão em 1980, após o surgimento de instrumentos capazes de realizar uma nanomanipulação (EMBRAPA, 2025). Nos últimos anos, com o avanço dos nanomateriais na área da engenharia genética, métodos de transferência genética alicerçados em nanotecnologia foram desenvolvidos (YAN *et al.*, 2022). Desde a primeira demonstração do uso de cápsulas de lisossomos como vetores de transporte por Matthews e colaboradores (1979) até o desenvolvimento de nanomateriais de carbono (DEMIRER *et al.*, 2020), DNA (ZHANG *et al.*, 2019) e de ouro (ZHANG *et al.*, 2021) independentes de espécie e com sistema de entrega de genes altamente eficientes.

A parede celular vegetal sempre foi um fator limitante na eficiência da transformação genética, pois só permite passagem de biomoléculas menores que 20 nm de diâmetro, acrescido da membrana celular, membrana nuclear e membrana de organelas. Por esse motivo, a transferência de genes continua sendo um desafio em muitas espécies consideradas recalcitrantes (YAN *et al.*, 2022). Desta forma, o uso de nanopartículas pode ser uma estratégia importante a ser utilizada na engenharia genética (YAN *et al.*, 2022; WU *et al.*, 2023). As vantagens das nanopartículas incluem independência das espécies, operação simples, biocompatibilidade, alta capacidade de carga e elevada eficiência de transformação (YAN *et al.*, 2022). Além disso, seu pequeno tamanho, capacidade de entrar passivamente em membranas

celulares e capacidade de proteger material genético nu também se evidenciam (LEVENGOOD; ZHOU; ZHANG, 2024).

Entre as limitações estão a disponibilidade restrita de nanocarreadores e a influência das propriedades físicas e químicas dos transportadores (YAN *et al.*, 2022). Acerca disso, Demirer *et al.* (2019) demonstraram uma entrega eficiente de DNA a partir de nanomateriais e a forte expressão de proteína sem integração de transgene em folhas de *Nicotiana benthamiana*, rúcula, trigo e algodão além de protoplastos de rúcula. A partir dos resultados obtidos, constatou-se que esses nanomateriais não apenas facilitavam a entrega, mas também protegiam as moléculas transportadas da degradação. Além disso, Jat, Bhattacharya e Sharma (2020) desenvolveram nanomateriais como portadores de entrega de genes e aplicaram em tabaco, tomate, milho, *Arabidopsis thaliana*, cebola e outros.

A edição de genomas também trouxe uma nova era de possibilidades para a agricultura, uma delas foi o manuseio de forma direcionada (não aleatória) de genomas (CHEN *et al.*, 2019). Entre as tecnologias de edição do genoma, a Zinc Finger Nuclease (ZFN), a Transcriptional Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) e as Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR), em ordem de surgimento, são as mais aplicadas (DALLA COSTA; MALNOY; GRIBAUDO, 2017). Sobretudo, os aperfeiçoamentos atuais das técnicas de edição possibilitaram a aquisição de plantas geneticamente modificadas, isento de inserção cromossômica de DNA exógeno, podendo ser interpretadas como não transgênicos (JANSING *et al.*, 2019).

Essas novas tecnologias, a exemplo, das Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interpaçadas (CRISPR), surgiram como métodos revolucionários para a engenharia genética especialmente para culturas economicamente importantes (DALLA COSTA; MALNOY; GRIBAUDO, 2017; CAMPOS *et al.*, 2021). Os cientistas Jinek e colaboradores (2012), descobriram e descreveram como as sequências palindrômicas curtas e repetitivas, agrupadas em espaços regulares, forneciam às bactérias e arqueas imunidade flexível contra vírus e plasmídeos, assim como, as bactérias/arqueas usam RNAs CRISPR para orientar a clivagem de DNA/RNA invasores. A descoberta dessas "tesouras moleculares" proporcionou as pesquisadoras Charpentier e Doudna o Prêmio Nobel de Química em 2020 (LOPES FILHO *et al.*, 2020). Desde então, protocolos fundamentados em

CRISPR/Cas com RNAs projetáveis têm revolucionado a transformação genética (LOPES FILHO *et al.*, 2020).

Apesar dos avanços tecnológicos ao longo das últimas décadas, os métodos de transformação genética ainda dependem de longas etapas de cultura de tecidos. Logo, são limitados pela baixa capacidade de transferência gênica, alta dependência de tecido e genótipo, longas etapas e menor rendimento, os quais refletem grandes obstáculos para o uso generalizado de tecnologias transgênicas e de edição de genoma em inúmeras espécies vegetais (CHEN *et al.*, 2022; SU *et al.*, 2023). Por isso, torna-se imprescindível desenvolver novos sistemas de transformação que envolvam uma menor dependência do genótipo e processos mais rápidos (CHEN *et al.*, 2022).

Com base nisso, um sistema eficiente de transformação, sem passar por cultura de tecidos (TCFT - *Tissue culture-free transformation*) surgiu como alternativa para reduzir o fluxo na entrega de genes, tornando-se uma técnica altamente apreciável (ZHONG *et al.*, 2025). O desenvolvimento do método de transformação de imersão floral em *Arabidopsis* (BECHTOLD, 1993) e a posterior otimização (CLOUGH; BENT, 1998) contribuíram significativamente para essa narrativa. Contudo, o desenvolvimento de sistema MTCT (minimal tissue culture transformation), ou transformação mínima de cultura de tecidos eficientes tem obtido sucesso recentemente (ZHONG *et al.*, 2025). Esses métodos apresentam muitas vantagens como rapidez, praticidade, economia, diminuição no risco de variações somaclonais e maior qualidade do evento e eficiência de transformação. Além disso, a maioria desses sistemas utilizam a técnica de transformação *in planta*, caracterizada pela obtenção de um evento transgênico estável a partir do uso de uma parte de uma planta inteira como alvo da transformação (ZHONG *et al.*, 2024).

Recentemente, Zhong e colaboradores (2024) desenvolveram o sistema de transformação rápida independente de genótipo (GiFT) de alto rendimento em soja, utilizando explantes de sementes embebidas infectados com *Agrobacterium*, regeneração *in planta* de brotos transgênicos de meristemas axilares (após pré-seleção, os explantes são transplantados diretamente para o solo) e seleção com um sistema de pulverização automatizado de herbicida, com objetivo de extinguir quimeras, obtendo eventos transgênicos com o mínimo de empenho e recursos.

Um grande avanço na transformação de plantas inteiras foi pontuado através das plantas inteiras injetadas com *Agrobacterium* (transportando vetores contendo

reguladores de desenvolvimento (DRs) e maquinário de edição CRISPR-Cas9) cultivadas no solo, que induziram um novo meristema editado e a posterior formação de brotos em tabaco, tomate, uva e batata, dispensando o uso da cultura de tecidos (MAHER *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, um método de transferência gênica mediado por *A. rhizogenes* em uma única etapa foi desenvolvido, na qual as estacas de brotos de batata-doce foram inoculadas com a bactéria e plantadas no solo para desenvolver tubérculos e brotos transgênicos (ZHANG *et al.*, 2023). Assim como Cao e colaboradores (2023) desenvolveram um sistema simples de entrega de corte-imersão-brotamento (CDB) mediada por *A. rhizogenes*, que funcionou em seis espécies vegetais diferentes, sem a necessidade de cultura de tecidos. Um exemplo disso, são as plantas transgênicas de dente-de-leão russo obtidas a partir de raízes inoculadas com *A. rhizogenes* e posterior brotamento.

Zhou e colaboradores (2023) apresentaram um método de transformação eficiente em amendoim mediado por *A. tumefaciens*, através de injeção no tubo polínico. Recentemente, Mei e colaboradores (2024) descreveram um protocolo de transformação mediado por *A. tumefaciens* com diferenciais, chamado de entrega de injeção *in planta* dependente de atividade regenerativa (RAPID) em batata, batata-doce e lúpulos. Este método utiliza a capacidade natural de regeneração *in planta* de estacas de brotos extraídos, crescidos da injeção de cepa *A. tumefaciens* contendo reguladores de crescimento para induzir tecidos transgênicos estáveis, diferenciando-o da técnica de regeneração *in planta*.

3.1.2. Plantas Modelos na transgenia

Plantas modelo são amplamente utilizadas em estudos de biologia e genética devido à alta eficiência dos protocolos de transformação, à variedade de ferramentas genômicas disponíveis, ao ciclo de vida curto e ao genoma pequeno (BRASILEIRO; CARNEIRO, 2015). Nesse sentido, de acordo com Chang, Bowman e Meyerowitz (2016), um sistema modelo é classificado em três categorias: a) motivos funcionais (benefício econômico ou características essenciais para uso em laboratório, como dimensões reduzidas, facilidade de cultivo, ciclo de vida curto, genoma compacto, Poentre outros); b) propriedades derivadas (técnicas padronizadas para a obtenção

de DNA e RNA, transformação, purificação de proteínas e outros métodos utilizados em ambientes de experimentação); c) aspectos da comunidade (disponibilidade de linhagens genéticas, construções de genes repórteres, genomas completamente anotados, e afins). Entre as plantas modelo com genoma totalmente sequenciado incluem: *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* (tomate), *Oryza sativa* (arroz) e *Zea mays* (milho).

A *Arabidopsis thaliana* é uma planta de pequeno porte da família *Brassicaceae*, que se destacou como o principal organismo modelo para estudos em biologia (MEINKE *et al.*, 1998). Seu genoma foi sequenciado nos anos 2000 (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000), se destacando em estudos posteriores como principal organismo modelo para pesquisas em plantas nos últimos trinta anos, possibilitando grandes avanços para a biologia celular, sinalização hormonal vegetal, defesa de patógenos, resposta ao estresse abiótico, epigenética, dentre outros (PROVART *et al.*, 2016). Diferente dos modelos vegetais anteriores, *A. thaliana* possui um genoma pequeno, um ciclo de vida curto e protocolos de transformação genética estabelecidos (KOORNNEEF; MEINKE, 2010). Vários estudos têm sido realizados com esta planta-modelo. Safdar e colaboradores (2025), avaliaram a fitotoxicidade da estrutura metal-orgânica (MOF) PCN-224 em *A. thaliana* devido à sua disponibilidade comercial e uso generalizado. Niu e colaboradores (2025) realizaram a expressão heteróloga do gene *Tiller Angle Control 2* (*TAC2*) em *Arabidopsis*, a fim de investigar as funções biológicas e efeito desse gene.

Outra planta modelo de grande notoriedade é o milho (*Zea mays*) (STRABLE; SCANLON, 2009). Esta planta apresenta-se como alvo de pesquisas genéticas desde que Gregor Mendel o adotou para validar algumas de suas descobertas e confirmar certos achados anteriores na ervilha-de-jardim (COE, 2001). Desde então, o milho vem sendo utilizado como um organismo modelo para uma gama de estudos, incluindo epigenética (CANDELA; HAKE, 2008). É uma das plantas modelo mais investigadas em razão da sua capacidade de cruzamento e significativa diversidade genética natural (STRABLE; SCANLON, 2009; RAJI *et al.*, 2018), apresenta um extenso conjunto de acervos mutantes e alinhamento gênico dentro de gramíneas correlacionadas (STRABLE; SCANLON, 2009). Possui um genoma vasto, além de ser uma espécie vegetal de tamanho considerável e desenvolvimento tardio (CHANG; BOWMAN; MEYEROWITZ, 2016). A pluralidade genética do milho vem sendo aplicada para compreender a fundamentação molecular da diversificação

fenotípica e aperfeiçoar tanto o desempenho quanto a sustentabilidade agrícola (MCMULLEN *et al.*, 2009).

Na transformação genética, o milho é a monocotiledônea mais frequentemente empregada no método de biobalística. Em meados dos anos 90, diversos genótipos foram utilizados para o desenvolvimento de transgênicos (YADAVA *et al.*, 2017). Nessa óptica, o milho bt, cultivado globalmente, se destacou significativamente na transgenia em 2014, expressando genes de Bt (*Bacillus thuringiensis*) para resistência a insetos (RAJI *et al.*, 2018). Recentemente, essa acessibilidade de uso é percebida nos estudos de Qi *et al.* (2024) com clonagem, caracterização e transformação de um gene no milho, no intuito de verificar sua função biológica e epigenética. Embora tenha havido um progresso considerável, a eficiência da transformação genética do milho continua sendo inadequada, necessitando de otimizações e sistemas de transformação mais flexíveis (YADAVA *et al.*, 2017).

O arroz (*Oryza sativa*) é uma planta modelo de grande importância econômica, genoma administrável e pequeno porte (CHANG; BOWMAN; MEYEROWITZ, 2016). Seu uso em estudos genéticos e moleculares, ocorreu após o sequenciamento completo do seu genoma (no ano de 2002), com alta homologia com proteínas de outros cereais (milho, trigo e cevada), tornando-se uma excelente modelo para melhoria dos cereais (MÜLLER; GROSSNIKLAUS, 2010).

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é uma planta modelo bem estabelecida para o amadurecimento dos frutos, característica única que a *Arabidopsis* e o arroz não tem (SHIKATA; EZURA, 2016). Teve seu genoma sequenciado em 2012 (TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012). Também é utilizada para o estudo do crescimento da planta, desenvolvimento de folhas compostas e resistência a doenças (CHANG; BOWMAN; MEYEROWITZ, 2016). Dentre as diversas variedades de tomate, o Micro-Tom teve destaque como cultivar modelo, em virtude da sua capacidade de crescer em condições controladas, seu pequeno porte e ciclo de vida curto (SHIKATA; EZURA, 2016).

A *Nicotiana benthamiana* (Tabaco) é reconhecida como uma planta modelo indispensável, especialmente para experimentos de transgenia (MUSHTAQ *et al.*, 2020). Esta espécie é nativa da Austrália e pertence à família *Solanaceae*, como a pimenta, tomate, batata. A partir desse modelo vegetal, foram estudados a expressão transiente de genes por agroinfiltração foliar e o potencial para funcionar

como uma biofábrica vegetal (a gama de alvos para terapias produzidas por *Nicotiana*, *N. benthamiana* e *N. tabacum*, é gigantesco), entre outros (BALLY *et al.*, 2018). Assim, aprimorar o procedimento de transferência genética nesta planta pode incentivar os pesquisadores a implantar protocolos eficientes em outras espécies vegetais recalcitrantes almejadas.

Apesar dos avanços proporcionados pelos organismos-modelos citados anteriormente, nem todas as indagações podem ser respondidas através deles, tornando necessário o desenvolvimento de novos modelos. Levengood, Zhou e Zhang (2024) destacam três espécies modelos emergentes: glória-da-manhã (Convolvulaceae) com diversidade relativa de fenótipos, tempos de geração rápidos e facilidade de adaptação a ambientes de estufa/campo), *Plantago* (Plantaginaceae) com tecido vascular puro, genoma pequeno e ciclo de vida curto) e cana-de-açúcar (Poaceae), poliploide, com métodos de transformação e edição estabelecidos).

3.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

A cultura de tecidos vegetais refere-se ao cultivo de células, tecidos, órgãos e seus componentes seguindo parâmetros físico-químicos determinados *in vitro*. A base teórica e experimental dessa técnica, assim como o conceito de totipotência foram definidos por Gottlieb Haberlandt a partir de 1902, posteriormente reconhecido como o pai da cultura de tecidos vegetais (THORPE, 2007). A totipotência se refere à habilidade de regeneração e especialização, formando uma planta inteira (VERDEIL *et al.*, 2007). Já a regeneração vegetal refere-se à resposta fisiológica que possibilita o reparo de tecidos danificados ou a formação de novos órgãos e indivíduos (IKEUCHI *et al.*, 2016).

Os primeiros tecidos e órgãos vegetais cultivados *in vitro* com sucesso, apresentando multiplicação e diferenciação, incluem raízes de tomate (WHITE, 1934), pontas caulinares, ápice do broto e meristemas de *Tropaeolum* e *Lupinus* (BALL, 1946). A padronização da cultura de tecidos avançou significativamente com o desenvolvimento de um novo meio de cultivo por Murashige e Skoog (1962). Esse meio MS (*Murashige and Skoog*), composto por macro e micronutrientes, uma fonte de carbono, nitrogênio reduzido, vitaminas do complexo B e reguladores de crescimento, tornou-se amplamente utilizado para o cultivo de diversas espécies vegetais. Sua principal distinção em relação a outros meios é o alto teor de nitrato,

potássio e amônia (GAMBORG *et al.*, 1976), consolidando-se como o meio de cultura mais empregado em biotecnologia vegetal (THORPE, 2007).

Nesse contexto, diversos meios de cultura sintéticos desempenham um papel fundamental na regeneração vegetal, incluindo Murashige e Skoog (MS), N6, Woody Plant Medium (WPM) e B5, amplamente utilizados na indução de calos e na diferenciação de brotos. Portanto, a escolha do meio de cultura ideal depende da espécie vegetal e do tipo de tecido utilizado, sendo frequentemente necessária sua otimização para melhores resultados (LONG *et al.*, 2022).

3.2.1 Micropopagação

A micropopagação é definida como a multiplicação em larga escala de plantas, a partir do crescimento ou indução de brotos em meios de culturas *in vitro*. As plantas geradas por essa técnica, preservam as características genéticas do indivíduo original, sem pragas e livres de microrganismos contaminantes, sendo os atributos mais desejados da micropopagação comercial (SINGH, 2015; CARDOSO; SHENG GERALD; TEIXEIRA DA SILVA, 2018).

Segundo Ziv e Altman (2003), a proliferação *in vitro* de genótipos superiores ocorre em quatro etapas: (a) escolha e preparo do explante, (b) regeneração e multiplicação, (c) aclimação e enraizamento e (d) transferência para casa de vegetação ou campo. Com relação aos explantes mais utilizados, destacam-se as pontas de brotos e as gemas axilares. Além disso, gemas adventícias podem ser obtidas a partir de outros tipos de explantes, como folhas e raízes, por meio dos processos de desdiferenciação e rediferenciação, tornando essa abordagem mais complexa e exigindo maior controle técnico (ZIV; ALTMAN, 2003).

De acordo com Thorpe (2007), a micropopagação pode ser executada por três métodos principais: (i) intensificação da quebra de gemas axilares, (ii) produção de gemas adventícias, de forma direta ou indireta via calo, e (iii) embriogênese somática, que também pode ocorrer de maneira direta ou indireta a partir de explantes.

A micropopagação vegetal foi usada em espécies economicamente relevantes como *Jatropha curcas*, *Eucalyptus*, banana e bambu (SINGH, 2015). Nos dias atuais, a micropopagação de *Cannabis sativa* tem sido aprimorada por Shi,

Collado e Hernández (2024), assim como, para viés de conservação de espécies ameaçadas protocolos de micropropagação foram estabelecidos por Farkas e colaboradores (2025). Com relação aos obstáculos da micropropagação, envolvem a diminuição de despesas, maior eficiência, inovações e a combinação dessa técnica com outros sistemas de multiplicação, como microestacas, hidroponia e aeroponia (CARDOSO; SHENG GERALD; TEIXEIRA DA SILVA, 2018).

3.2.2 Organogênese

Um dos métodos mais utilizados na regeneração vegetal é a organogênese de novo, caracterizada pela formação de meristemas apicais localizados em posições anormais obtidas de estacas ou explantes de plantas, resultando no subsequente desenvolvimento de brotos e raízes (IKEUCHI *et al.*, 2016). Os meristemas são tecidos vegetais especializados, responsáveis pela formação de células, tecidos e órgãos, devido à sua capacidade de divisão celular contínua (IKEUCHI *et al.*, 2016).

De forma objetiva, Lardon e Geelen (2020) se referem a organogênese de novo como um sistema regenerativo que não utiliza um embrião somático, mas sim células-tronco pluripotentes que possuem a habilidade de formar novos meristemas com o intuito de reconstruir órgãos, indicando a pluripotência das células vegetais. Essa via é caracterizada por formar apenas um órgão aéreo ou raiz, e desses uma nova planta completa é originada (HASNAIN *et al.*, 2022). Além disso, apresenta vias de regeneração direta (meristemas pré-existentes de brotos e/ou raízes) ou indireta (órgãos danificados) (LONG *et al.*, 2022). Na organogênese indireta de novo, as células passam por desdiferenciação e os controladores de crescimento das plantas impulsionam a divisão celular, originando calos pluripotentes (LONG *et al.*, 2022).

Ademais, os meristemas apicais e brotos axilares dão origem a todos os órgãos vegetais. Todavia, a raiz lateral advém das células diferenciadas do periciclo do xilema (ATTA *et al.*, 2009), demonstrando como a pluripotência pode ser adquirida a partir de células especializadas (YU *et al.*, 2007). Além disso, tanto a iniciação do primórdio da raiz lateral (LRP) quanto a indução de calos originados das células do periciclo são controladas em circunstâncias de alta auxina, promovendo a

desdiferenciação de tecidos. Apenas quando tratados com meio rico em citocinina ocorre a regeneração do broto em ambos os casos (PULIANMACKAL *et al.*, 2014), pois, esse tratamento induz a expressão do gene meristemático de brotos *WUSCHEL* (*WUS*) (CHATFIELD *et al.*, 2013). Resumindo, a organogênese de novo pode ser obtida diretamente de explantes de raiz ou por meio de um estágio de calo. Mas para que a regeneração ocorra, é necessária a presença de células de periciclo para desencadear o LRP (PULIANMACKAL *et al.*, 2014).

Portanto, a principal diferença entre a organogênese de novo e a embriogênese somática é que o primeiro não forma embriões somáticos. E, assemelham-se ao fato de ambos os fenômenos possuírem métodos diretos e indiretos de regeneração (LONG *et al.*, 2022). O calo é formado nos métodos indiretos de ambos os casos, mas cada um possui suas especificidades (LONG *et al.*, 2022). Outro diferencial, é que a organogênese de novo induz calo não embriogênico a pluripotência (FEHÉR, 2019), enquanto a embriogênese somática induz calo embriogênico a totipotência e posterior formação de embrião somático (IKEUCHI *et al.*, 2016; FEHÉR, 2019). São análogos na questão de que ambos podem causar instabilidade genética e variância somaclonal, como demonstrado nos estudos de Vitamvas e colaboradores (2019), em que a morfogênese indireta, responsável pela indução da variação somaclonal, foi alcançada por essas vias de regeneração na mandioquinha-salsa.

3.2.3 Embriogênese somática

A embriogênese somática é o processo no qual células não reprodutivas (somáticas) são reprogramadas em células-troncos embrionárias (VERDEIL *et al.*, 2007; LONG *et al.*, 2022) para desenvolver estruturas que se parecem com embriões fertilizados (zigóticos), chamados de embriões somáticos, capazes de originarem corpos vegetais inteiros (IKEUCHI *et al.*, 2016). Uma grande vantagem desse fenômeno é que apenas um único embrião da semente original pode gerar vários embriões somáticos e posteriormente diversas plantas regeneradas (EGERTSDOTTER; AHMAD; CLAPHAM, 2019).

Os embriões somáticos podem ser induzidos direta ou indiretamente. Os embriões somáticos podem ser induzidos diretamente ou indiretamente

(HORSTMAN; BEMER; BOUTILIER, 2017). A embriogênese somática direta ocorre a partir de uma célula somática individual e não possui a fase de calo. Todavia, sob condições apropriadas, é possível se desenvolver em uma planta inteira (LONG *et al.*, 2022).

A embriogênese somática indireta (mais comumente utilizada) ocorre a partir de um tecido desdiferenciado chamado de “calo embrionário”, caracterizado pela formação de uma massa celular desorganizada, originando embriões somáticos capazes de gerar brotos e raízes, em meios de cultura apropriados (LONG *et al.*, 2022; CRUZ *et al.*, 2024). Por exemplo, em milho, o calo embriogênico pode ser gerado de explantes (desde embriões imaturos a meristemas de brotos), cultivados em meio de cultura contendo altos níveis do hormônio auxina (RAKSHIT *et al.*, 2010). Devido a passagem por estagio de calos, a embriogênese somática indireta apresenta uma via de regeneração mais longa, porém, são obtidos maior número de plantas regeneradas em comparação à embriogênese somática direta (LONG *et al.*, 2022). Esta (embriogênese somática direta), por sua vez, ocorre a partir de uma célula somática individual, sem passar pela fase de calo, onde, sob cultivo em meio apropriado pode gerar uma planta inteira (LONG *et al.*, 2022).

Os calos frescos/jovens possuem uma grande capacidade de diferenciação, garantindo uma maior taxa de plântulas regeneradas. Tal característica é fundamental no sucesso da transformação genética vegetal. Por outro lado, a formação de calos pode promover maior índice de "escape gênico", devido à alta regeneração de plântulas não transformadas, mesmo com a ação do agente seletivo (DALLA COSTA; MALNOY; GRIBAUDO, 2017).

3.2.4 Variação somaclonal e seleção *in vitro*

A cultura de tecidos é uma ferramenta eficaz para produzir clones em larga escala, porém, as plantas regeneradas ocasionalmente exibem variações somaclonais (variabilidade genética), podendo ser uma variação genética ou epigenética (MEHBUB *et al.*, 2022). No melhoramento de plantas, essa variação pode ser desejável, devido a capacidade de gerar variantes de uma cultivar comercial sem a necessidade de cruzamento com outros genótipos (DALLA COSTA; MALNOY; GRIBAUDO, 2017).

Os fatores que estimulam essas mutações *in vitro* incluem a composição de nutrientes, as condições de iluminação, concentração de auxinas (KRISHNA *et al.*, 2016), etapas de regeneração e duração de subcultivos (RANGHOO-SANMUKHIYA, 2021). Vale salientar que um alto percentual de variantes pode ser adquirido na embriogênese somática indireta a partir do cultivo de calos (cultura de longa duração) ou através da embriogênese secundária (DALLA COSTA; MALNOY; GRIBAUDO, 2017).

Embora na micropropagação e na transformação genética variantes somáticos não sejam desejáveis, uma vez que o objetivo é garantir a obtenção de plantas geneticamente homogêneas (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011), a seleção de genótipos/variantes somaclonais resistentes /tolerantes à determinados componentes no meio de cultura (ex. sal, patógenos, herbicidas, entre outros tipos de stresses bióticos e abióticos) são especificamente úteis em programas de melhoramento genético vegetal (WENZEL; FOROUGUI-WEHR, 1993). Neste contexto, a biologia molecular tem fornecido novas aplicabilidades no processo seletivo. Um exemplo é a seleção de plantas transformadas mediante a utilização de genes marcadores de seleção, como é o caso, de genes que confere resistência à herbicida (VIDIGAL *et al.*, 2014). Portanto, na transgenia, a seleção de eventos de transformação é uma etapa fundamental, principalmente visando atenuar o aparecimento de quimeras (ZHONG *et al.*, 2024).

3.2.5 Perspectivas

O uso da embriogênese somática (SE - *Somatic embryogenesis*) na produção de plantas em larga escala tem sido uma tarefa demorada e trabalhosa, embora algumas dessas etapas tendem a ser automatizadas (EGERTSDOTTER; AHMAD; CLAPHAM, 2019). Na etapa de multiplicação, apesar das taxas de multiplicação das massas pró-embriogênicas (PEMs) serem mais altas em culturas de suspensão líquida, grande parte das culturas de SE (como exemplo em coníferas) precisam passar pela maturação em meio sólido, visando maior eficiência (MAMUN; AIDUN; EGERTSDOTTER, 2018). Neste contexto, os biorreatores de imersão temporária destacam-se como uma estratégia mais atrativa na multiplicação e maturação de ES, uma vez que combina as vantagens da multiplicação de PEMs em meio líquido,

incluindo a capacidade de automação, com a maturação em meio sólido (MAMUN, AIDUN e EGERTSDOTTER, 2018). Tendo em vista a grande aplicabilidade desse sistema, uma série de patentes estão contribuindo na automação em diferentes etapas envolvendo métodos para separação de embriões maduros de embriões somáticos (EGERTSDOTTER, AHMAD E CLAPHAM, 2019).

Ademais, os estudos de YU e colaboradores (2024) demonstram como a superexpressão de genes associados a regeneração vegetal podem influenciar positivamente na eficiência da regeneração *in vitro* e transformação genética. Portanto, as perspectivas futuras da cultura de tecidos têm circulado em volta da automação e o uso de imagens hiperespectrais na visualização de embriões maduros (EGERTSDOTTER; AHMAD; CLAPHAM, 2019), acrescido da otimização nas técnicas de regeneração de plantas *in vitro* (YU *et al.*, 2024).

3.3 GENES MARCADORES: GENES DE SELEÇÃO E GENES REPÓRTERES

A seleção e detecção de plantas transgênicas é realizada através do uso de agentes seletivos, baseados em genes de resistência introduzidos nas plantas transgênicas. A canamicina, geneticina, higromicina, espectinomicina e gentamicina são exemplos de agentes de seleção mais utilizados na transgenia. Alguns herbicidas, como 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (epsp), o glifosato N-acetiltransferase (GAT) também são usados para triagem de transformantes (WANG *et al.*, 2025).

Os genes repórteres originam-se de microorganismo, tais como bactérias, plantas ou insetos. São genes, que quando presentes, codificam uma proteína fácil detecção e quantificação (WOOD, 1995). Em termos gerais, os genes repórteres estão frequentemente associados a promotores e terminadores, como o gene 35S do vírus do mosaico do couve-flor (CaMV) e as opinas de *Agrobacterium* (ROSELLINI, 2012). Embora esses elementos não se originam de plantas, têm sido amplamente aplicadas na transformação de plantas devido à sua eficácia como sequências regulatórias (MERCANTE; RUMJANEK; FRANCO, 2000). Esses são utilizados para caracterizar a atividade de expressão gênica, permitindo determinar se genes exógenos foram transferidos com sucesso para células, tecidos ou órgãos vegetais (WANG *et al.*, 2025), sem eliminar as células não transformadas.

. Diversos genes repórteres têm sido utilizados para monitorar a expressão de transgenes, localização subcelular e respostas ao estresse. Os genes repórteres como *nos*, *cos*, *lacZ*, *cat* e *neo* foram pioneiros em sua aplicação, mas seu alto custo, a dificuldade de quantificação e, no caso de alguns, a necessidade de exposição à radiação, resultaram em um uso cada vez mais reduzido (BRASILEIRO; DUSI, 1999). Esses desafios levaram ao desenvolvimento de alternativas mais acessíveis e eficientes para a caracterização da expressão gênica.

Os genes *luc*, *gus* (*uidA*) e *gfp* são amplamente empregados em pesquisas de transformação genética de plantas. Recentemente, um outro sistema de detecção visual baseado em pigmentos naturais (*RUBY*) foram desenvolvidos por HE e colaboradores (2020). Diferentemente de outros genes repórteres supracitados, o sistema *RUBY* não exige substratos caros ou equipamentos especializados para a detecção de sinais visíveis, permitindo ainda um monitoramento não invasivo e contínuo (PRAMANIK; LEE; WANG, 2024). A seguir, será discutido sobre os genes *gus* e *RUBY*, abordando suas características e aplicações:

3.3.1 Gene *GUS* (β -glucuronidase)

O gene *gus* (*uidA*) de *Escherichia coli* codifica a enzima β -glucuronidase (JEFFERSON, 1989; MCELROY, 1995). Com a descoberta desta enzima, ensaios histoquímicos, utilizando o substrato 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-3-D-glucuronide (X-Glu), são realizados para detectar a sua atividade enzimática, onde sob a presença da enzima forma um precipitado azul (NALEWAY, 1992; STOMP, 1992). Um outro método para quantificação do gene *gus* envolve o uso do substrato 4-metilumbeliferil glucuronídeo (MUG). Embora o MUG não apresente fluorescência intrínseca, o mesmo pode ser clivado pela enzima β -glucuronidase, resultando na produção de 4-MUG, o qual emite fluorescência em condições de pH elevado (JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987).

O gene repórter *gus/uidA* é usualmente empregado nas pesquisas genéticas vegetais, principalmente na análise da expressão gênica de plantas geneticamente modificadas. Sua aplicabilidade inclui a análise de excisão de elementos transponíveis, modulação do desenvolvimento, análise de promotores, sinais de direcionamento de proteínas para diferentes organelas, estabilidade do mRNA, e

expressão específica a determinados tecidos (GALLAGHER, 1992; HULL; DEVIC, 1995; LANA; NEGRI; SOUSA, 2017).

As maiores vantagens do ensaio *gus* são sua simplicidade e sem a necessidade de equipamentos caros. Por outro lado, trata-se de um sistema destrutivo (LACORTE, BARROS, 2015), porém de baixo custo em comparação aos outros para análise *in vitro*. Estudos anteriores como os de Ohta e colaboradores (1990) utilizaram o repórter *GUS* modificado para monitorar a transferência e expressão mediada por *Agrobacterium* em tabaco. Daniell, Krishnan e Mcfadden (1991) verificaram a expressão transitória de *GUS* em diferentes compartimentos celulares após bombardeamento de partículas em trigo. Zhong e colaboradores (1993) constataram a atividade dessa enzima em plantas transgênicas de grama. Souza e colaboradores (2017), mostraram que o gene *uidA/gusA* foi utilizado para comparar a eficiência da transformação genética por *A. tumefaciens* em milho. Já os autores Feng e colaboradores (2019) em pesquisas com morango, empregaram o repórter *gus* para revelar a distribuição de auxina na semente, no fruto e na raiz, além de verificar a expressão de mais dois genes. Os experimentos de Liu e colaboradores (2020) que manipularam a β -glucuronidase (*GUS*) para analisar a eficiência da transformação transitória em *Pinus tabuliformis*, o qual também contribui para outras espécies de coníferas.

3.3.2 Gene *RUBY* (sistema de biossíntese da betalaína)

O gene *RUBY* converte tirosina em betalaína (um pigmento natural produzido em plantas), cujo acúmulo resulta em uma cor vermelha brilhante (HE *et al.*, 2020). As betalaínas são pigmentos vegetais hidrofílicos vermelhos-violeta e amarelo contendo nitrogênio, derivados da tirosina, os quais ocorrem apenas um único grupo de angiospermas, a ordem *Caryophyllales*. Há duas exceções, as famílias *Caryophyllaceae* e *Molluginaceae*, onde a coloração se deve às antocininas, outra família de pigmentos, betalaínas e antocininas nunca são encontradas juntas na mesma planta (GANDÍA-HERRERO; GARCÍA-CARMONA, 2013).

As betalaínas são divididas em dois tipos, betaxantinas que conferem coloração amarela, e betacianinas, que proporcionam a coloração violeta. Exemplos de espécies que contém tais pigmentos incluem: *Beta vulgaris* (beterraba) (GANDÍA-HERRERO; GARCÍA-CARMONA; ESCRIBANO, 2004), *Portulaca oleracea*

(STEINER *et al.*, 1999) e *Suaeda salsa* (WANG *et al.*, 2007). A partir dessas espécies vegetais e do fungo *Amanita muscaria* (MUELLER; HINZ; ZRÝD, 1996) a tirosinase, enzima responsável pela hidroxilação da L-tirosina em L-DOPA, que corresponde ao início da biossíntese da betalaína, foi caracterizada (GANDÍA-HERRERO; GARCÍA-CARMONA, 2013). Além disso, foi observado que a conversão da L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA) em ácido betalâmico pela enzima DOPA 4,5-dioxigenase (DOD), resulta na formação espontânea de betaxantinas ou betacinas (POLTURAK *et al.*, 2016), sendo a descrição do processo de produção das betalaínas.

As produções *in vivo* de betaxantinas e betacinas, iniciaram-se em microorganismos, através da alimentação com L-DOPA como substrato (HATLESTAD *et al.*, 2012; POLTURAK; AHARONI, 2018). Com o grande avanço na engenharia genética, Polturak e colaboradores (2016) demonstraram pela primeira vez um sistema de biossíntese da betalaína (*CYP76AD1* combinado com *BvDODA1* e *cDOPA5GT*) que descarta a necessidade de alimentação por suprimento externo de L-DOPA, o qual contribuiu para a possibilidade de produção heteróloga da betalaína em outras espécies.

Desde então, o potencial desse sistema de servir como gene repórter para rastrear a expressão genética ou para visualizar eventos transgênicos tem sido bastante estudado e realizado, tendo em vista que precisa de apenas três reações enzimáticas para se obter a betalaína (HE *et al.*, 2020). Este método é visível a 'olho desarmado', dispensa o processamento de amostras e possibilita a investigação contínua de eventos durante todo o ciclo de vida de um organismo, se trata de uma ferramenta não invasiva (HE *et al.*, 2020). Exemplos de sua aplicação incluem a observação da síntese de betalaína em tabaco, *Arabidopsis*, arroz (HE *et al.*, 2020), tomate (GRÜTZNER *et al.*, 2021), milho (LEE *et al.*, 2023) e rabanete (YI *et al.*, 2024).

Recentemente, Pramanik, Lee e Wang, 2024, desenvolveram um método simples e confiável para extrair e quantificar betalaína. Os autores utilizaram tecidos frescos de plantas de tabaco e de milho, sendo transformadas transitoriamente e estável, respectivamente (PRAMANIK; LEE; WANG, 2024). De acordo com os autores, os níveis quantitativos de betalaína foram consistente com os níveis de pigmentação visual observados em sementes, folhas e raízes das plantas,

destacando o grande potencial do sistema *RUBY* para avançar na engenharia genética de plantas (PRAMANIK; LEE; WANG, 2024).

3.4 FATORES QUE INFLUENCIAM NA TAXA DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

Os métodos de transferências de genes requerem otimizações de diversas variáveis, principalmente, devido aos diferentes tipos de organismos e sistemas celulares em que são submetidos (CARNEIRO; CARNEIRO; PAIVA, 2004; MEKALA *et al.*, 2016). Entre os que influenciam na eficiência da transformação no método direto via biobalística estão: a) construção gênica (escolha dos genes que serão utilizados); b) parâmetros físicos relacionados ao equipamento (quantidade de disparos, nível do vácuo, tamanho e tipo do explantes utilizados, posição da placa contendo o tecido-alvo abaixo da tela de retenção); c) parâmetros físicos relacionados as micropartículas (tipo, tamanho e quantidade); d) e parâmetros biológicos relacionados a cultura de tecidos (escolha e estado fisiológico do tecido, proporções e qualidade dos reagentes nos meios de cultura) (CARNEIRO, CARNEIRO e PAIVA, 2004).

Taparia, Gallo e Altpeter (2012) revelaram que microprojéteis de 0,3 µm de diâmetro produziam 5 vezes mais linhas transgênicas quando comparadas aos de 1 µm. Do mesmo modo, Jagga-Chugh e colaboradores (2012) apontaram que o bombardeio duplo com partículas de ouro de 1,0 µm e o tratamento osmótico de calos com sorbitol (0,4 M) aumentaram a eficiência da transformação, sendo possível o estabelecimento de um protocolo com 45,3% de eficiência em *Eleusine coracana*. Angulo-Bejarano, Sharma e Paredes-López (2019) estabeleceram condições ideais para o bombardeamento de partículas em explantes de nopal testando a pressão do disco de ruptura de hélio, distância de deslocamento do microprojétil, tempo de exposição, concentração de DNA e tipo de partícula, obtendo uma eficiência de transformação de 23%. Laishram e colaboradores (2020) verificaram maior eficiência transitória e estável em calos embriogênicos de capim *buffel*, bombardeados em três distâncias diferentes.

Em contrapartida, os parâmetros *via Agrobacterium* englobam: tipos de cepa de *Agrobacterium*, tipos de vetores, procedimento de seleção (meio e condições de co-cultivo), tipo e idade do explantes para inoculação, período de infecção e acetoseringona (MARKA; NANNA, 2018). Além disso, o êxito na

transferência de T-DNA é influenciado por diversos fatores, incluindo a virulência da bactéria, a resistência da planta à transformação e a redução da capacidade de regeneração após a infecção (TRIPATHI *et al.*, 2024).

Em relação ao método *Agrobacterium*, foram observadas otimizações sobre os parâmetros citados. Marka e Nanna (2018) utilizaram três explantes diferentes de amendoim e diferentes concentrações do inóculo de *A. tumefaciens* com o intuito de verificar as situações em que teriam uma maior eficiência na eficiência de transformação. Li e colaboradores (2021) observaram o aumento ou diminuição na eficiência de transformação no repolho chinês comparando diferentes concentrações de acetosiringona. Foi visto que esse parâmetro elevou a eficiência de transformação para 22,33% e 8,57% com 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Entretanto, fatores como: concentração de antibiótico, tempo de pré cultura, triagem de cepas de *Agrobacterium* e concentração de Hyg também foram analisados para realização de uma otimização completa. Sadhu e colaboradores (2022) realizaram estudos com diferentes cultivares de grão de bico visando a obtenção de elevada eficiência de transformação, usando o método de sonicação e infiltração. Segundo os autores, a cultivar JAKI9218 obteve a eficiência de 8,6%. Sundararajan e colaboradores (2020) relataram como os fatores físico-químicos presentes nos meios de cultura usados na transformação via *Agrobacterium* interferem na regeneração *in vitro* e transformação de cultivares recalcitrantes do arroz. Os referidos autores relataram a melhor fonte de carbono, a formulação de hormônios, os agentes gelificantes, as condições de incubação e como a dessecação parcial influenciou positivamente na eficiência da regeneração *in vitro* de arroz.

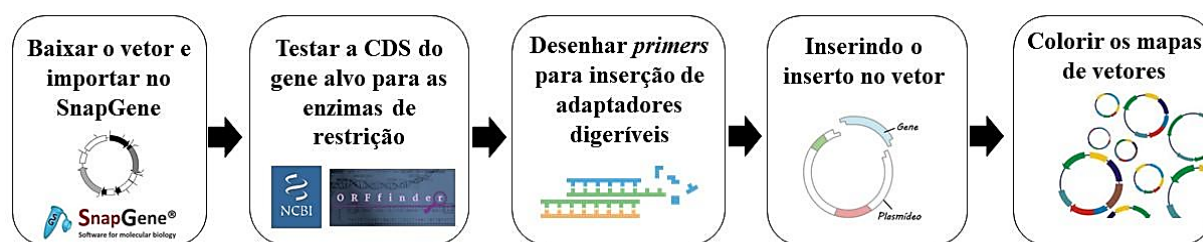
He e colaboradores (2022) usaram genes reguladores do desenvolvimento na transformação genética de milho visando melhorar a indução do meristema e a capacidade de regeneração. Além disso, estudos de Chakraborty e colaboradores (2020) destacam a importância da escolha do explante, considerando fatores como idade, tamanho, posição de extração, orientação (polar/apolar e abaxial/adaxial), genótipo, pré-tratamento (osmótico) e preparação (esterilização de superfície). Portanto, todos esses estudos citados são importantes para otimizações do método, servindo como exemplo para aplicação em diferentes espécies.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DE *PRIMERS* E CONSTRUÇÃO DE VETORES

O desenho de *primers* e construção de vetores foi realizado através do software *SnapGene* (disponível em: <https://www.snapgene.com/>) (Figura 1). Os vetores de transformação empregados neste estudo foram fornecidos pela Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Sete Lagoas, MG.

Figura 1. Principais etapas para simulação do desenho de *primers* e vetores usando o *SnapGene*.

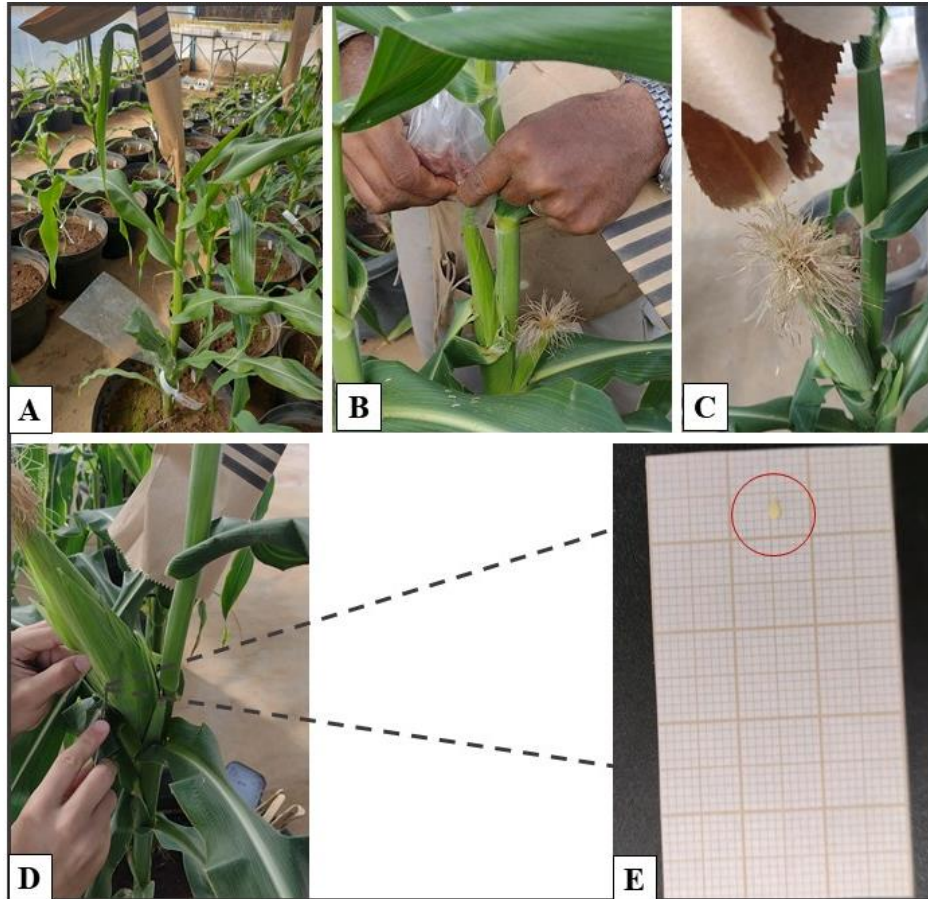


Fonte: A autora (2023)

4.2 POLINIZAÇÃO MANUAL, DESINFESTAÇÃO E ISOLAMENTO DE EMBRIÃO DE MILHO

Todas as etapas foram conduzidas em laboratório e casa de vegetação da Embrapa Milho e Sorgo, durante o mês de maio/2023. A fase inicial consistiu na seleção das espigas de milho (linhagem B104), que foram submetidas à polinização manual (Figura 2). Após um período de 10 a 12 dias (podendo se estender até 15 dias em condições de temperatura reduzida), as espigas que continham embriões entre 1,5 a 2,0 mm foram coletadas e armazenadas em câmara fria (4°C) para posterior procedimentos de transformação.

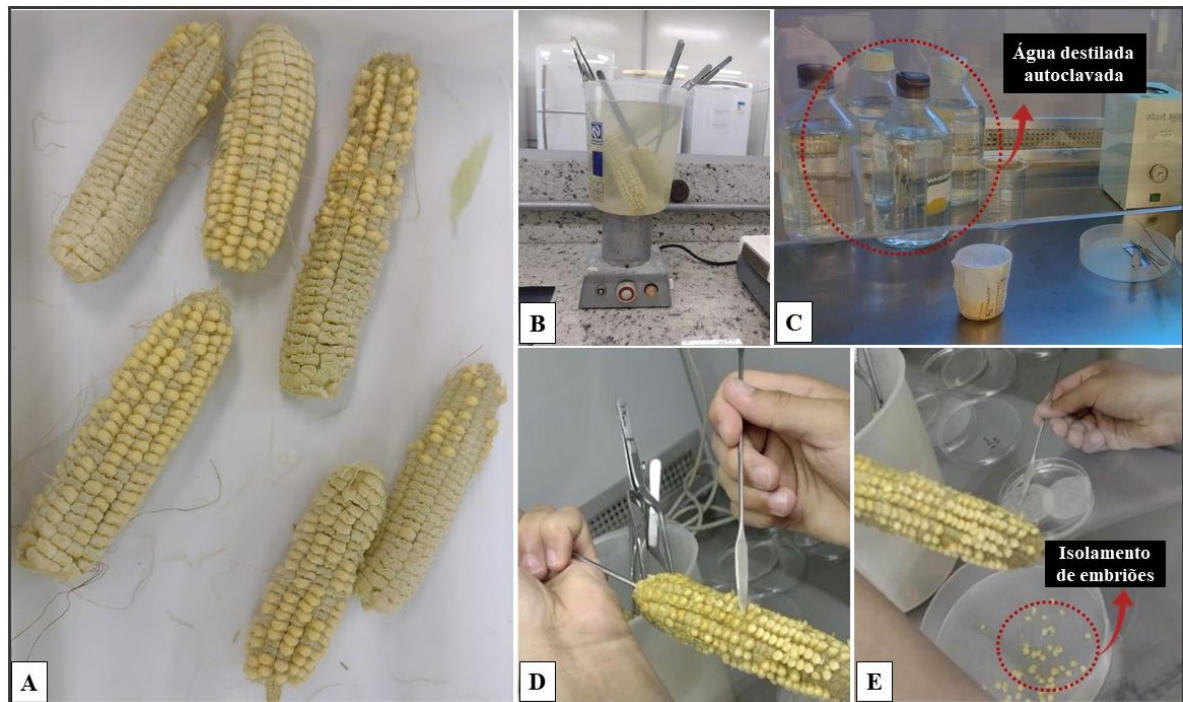
Figura 2. Procedimento de polinização manual nas espigas de milho. (A) Proteção do órgão reprodutivo da planta, para realização da polinização manual; (B) Partição dos estigmas (para melhor eficiência da fertilização); (C) Transferência do pólen para no estigma do milho; (D) Retirada de um embrião para medicação; (E) Verificação do tamanho do embrião em papel milimetrado (1,8mm tamanho ideal, sendo importante não ultrapassar 2mm).



Fonte: A autora (2023)

A segunda fase consistiu na desinfestação de seis espigas (Figura 3A) de milho (previamente armazenadas em câmara fria) por imersão em álcool absoluto (99,3%). Em seguida, as espigas foram transferidas para um béquer contendo hipoclorito de sódio à 50% e quatro gotas de detergente comercial onde permaneceram imersas durante 30 min, sob agitação (Figura 3B). As espigas foram então lavadas 3x com água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar (Figura 3C). Por fim, os embriões imaturos de milho foram isolados com auxílio de uma espátula de ponta fina (Figura 3D) e transferidos para placa com meio osmótico (3,98 g/l N6 sais, 1 ml N6 vitaminas (estoque 1000X), 3,4 g/l MS sais, 1 ml MS vitaminas (estoque 1000X), 2 ml 2,4-D (estoque 1 mg/mL), 100 mg/l myo-Inositol, 2,76 g/l prolina, 100 mg/l caseína hidrolisada 30 g/l sacarose, 36,4 g/l sorbitol, 36,4 g/l manitol, 3,0 g/l phytigel, 5.8 pH), onde permaneceram armazenados até a etapa de transformação (Figura 3E).

Figura 3. Procedimentos de desinfestação das espigas de milho. (A) Espigas despalhadas; (B) Espigas imersas na solução de hipoclorito de sódio e detergente; (C) Preparação dos utensílios (placas de petri, pinças, bisturis e água destilada autoclavada) em câmara de fluxo laminar para lavar as espigas; (D) Isolamento de embriões imaturos do milho com espátula de ponta fina; (E) Embriões isolados e em processo de transferência para placa com meio osmótico.



Fonte: A autora (2023)

4.3 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Dois cassetes gênicos foram utilizados na transformação de milho: (a) o primeiro contendo o gene repórter uidA (GUS) sob o controle do promotor da ubiquitina de milho (PromUbiquitinaZm::BAR::uidA::term); e (b) o segundo referente ao sistema RUBY, composto pelos genes CYP76AD1, BvDODA1 e cDOPA5GT (PromUbiquitinaZm::CYP76AD1::2A::BvDODA1::2A::cDOPA5GT::TermNOS).

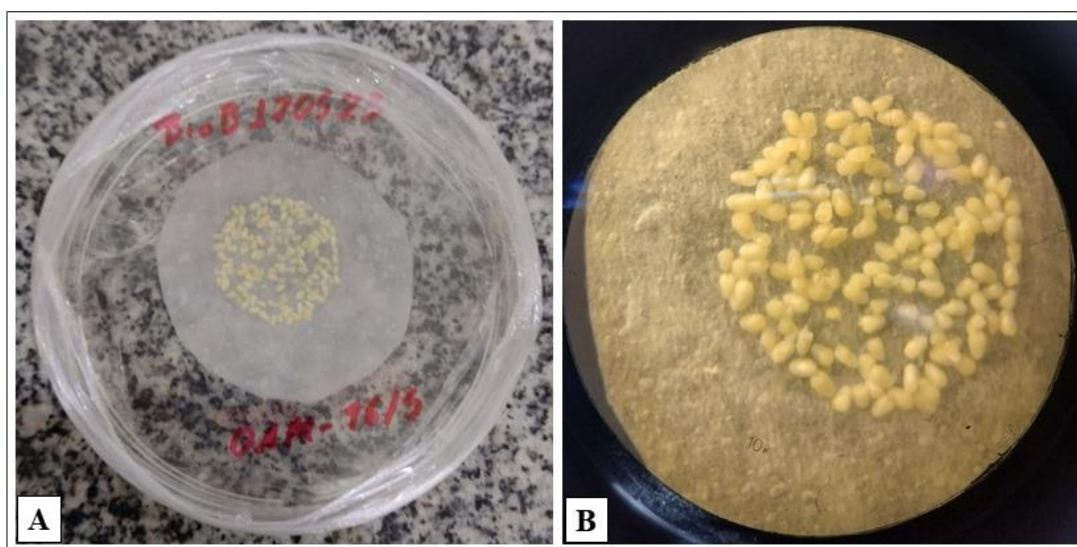
As alíquotas de bactérias *Escherichia coli*, previamente transformadas com o vetor de interesse pelo grupo de pesquisa da Embrapa Milho e Sorgo, estavam armazenadas a -80°C . A partir disso, foi realizada uma estria em placa de petri para crescimento de colônias transformadas com a construção RUBY. A placa contendo as colônias foi utilizada para o isolamento do DNA plasmidial, por meio do kit de purificação Wizard® Plus SV Minipreps (Promega), seguindo as especificações do fabricante. As amostras foram quantificadas em Nanodrop. Em seguida, as foram

submetidas a eletroforese horizontal em gel de agarose à 1% para verificar a integridade e a qualidade do DNA plasmidial. Para o vetor que continha o gene *GUS* não foi necessário realizar esses procedimentos, pois a miniprep já tinha sido realizada e disponibilizada.

4.4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO MILHO VIA BIOBALÍSTICA

Após os procedimentos de desinfestação e retirada dos embriões das espigas, os embriões imaturos foram transferidos para uma placa de Petri contendo meio osmótico (Figura 4A), com auxílio de uma pinça de ponta fina e bisturi, onde permaneceram *overnight*. Os eixos embrionários foram posicionados para baixo, a fim de evitar o crescimento da radícula e estimular a formação de calos embrionários (Figura 4B).

Figura 4. Preparo de embriões do milho para transformação via biobalística. (A) Embriões em meio osmótico posicionados com o eixo embrionário voltado para baixo; B) Visualização e posicionamento preciso dos embriões utilizando o esteriomicroscópio com aumento de 10x



Fonte: A autora (2023)

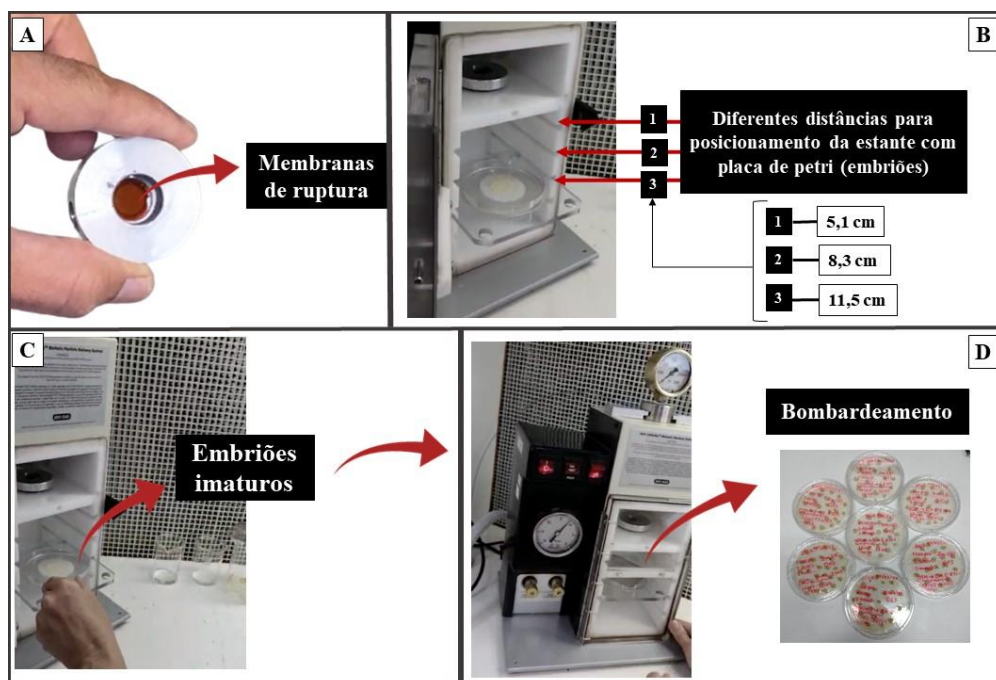
Foram preparadas as micropartículas de tungstênio (M10) e recobertas com o vetor plasmidial. Esse procedimento foi realizado individualmente para cada vetor analisado, seguindo a metodologia descrita por Carneiro, Carneiro e Paiva (2004).

Em seguida, foi realizado o processo de transformação via biobalística. Dois experimentos foram estabelecidos e conduzidos, nos quais, para cada vetor, analisou-se a expressão dos genes repórteres com o objetivo de otimizar os

parâmetros físicos relacionados ao bombardeamento. O delineamento experimental está descrito a seguir:

- **Experimento 1 (vetor que carrega a sequência do gene *RUBY*):** Foi analisado a distância entre a membrana carreadora e o explante (Figura 5B) e a quantidade de membranas de ruptura (Figura 5A) presentes na câmara de contenção de gás hélio. O experimento foi dividido em 5 tratamentos (nomeados de A a E), sendo 3 placas por tratamento e cada placa contendo aproximadamente 25 embriões, totalizando 450 embriões (Tabela 1). Os tratamentos foram devidamente separados por letras (Figura 5B).

Figura 5. Parâmetros físicos relacionados ao equipamento *gene gun*. (A) Suporte das membranas de ruptura; (B) Diferentes distâncias de posicionamento da estante contendo os embriões a serem bombardeados; (C) Posicionamento dos embriões imaturos; (D) Embriões prontos para serem bombardeados.



Fonte: A autora (2023)

Tabela 1. Análise parâmetros físicos (distância entre a membrana carreadora e o explante, quantidade de membranas de ruptura e pressão do gás hélio) na transformação genética de milho via biobalística usando o gene repórter *RUBY*.

PARÂMETROS FÍSICOS				
Tratamento	Distância (cm)	Nº de membranas de ruptura	Pressão do gás hélio (psi)	Condição analisada
A	5,1*	3	~1050	D
B	8,3*	3*	~1050*	D/QM
C	11,5*	3	~1050	D
D	8,3	1*	~350*	QM
E	8,3	2*	~750*	QM

*Parâmetro que está sendo analisado por tratamento; D: Distância; QM: Quantidade de membranas;

Após os eventos de transformação, os embriões foram transferidos do meio osmótico para o meio de repouso, que possui os mesmos componentes e concentrações do meio anterior, exceto pela ausência de sorbitol e manitol. Com o auxílio de um estereomicroscópio, foi realizada a análise individual da formação de calos embriogênicos e expressão gênica (coloração vermelha).

- **Experimento 2 (vetor contendo a sequência do gene GUS):** Neste experimento, foi avaliada a influência de dois disparos (*gene gun*) em uma única placa (Figura 5D). Decorridas 18 horas após o bombardeamento, os embriões foram transferidos do meio osmótico para o meio de repouso e distribuídos em sete placas, contendo aproximadamente 25 embriões cada, totalizando 175 embriões. Cinco dias após o bombardeamento, foi realizado um ensaio histoquímico em alguns embriões de todas as placas, o qual consistiu na incubação dos embriões com o substrato X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolglucuronídeo) por 24 horas, conforme protocolo descrito por Carneiro, Carneiro e Paiva (2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

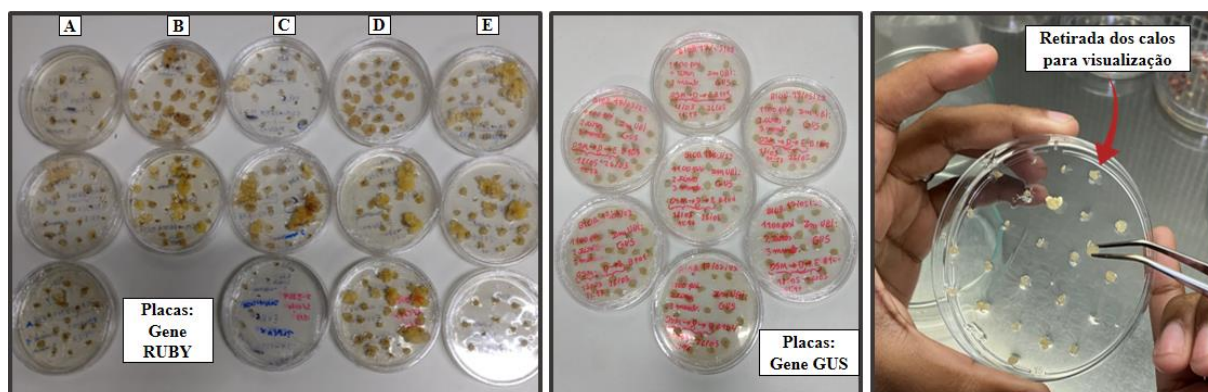
5.1 ISOLAMENTO DOS EMBRIÕES DE MILHO

A excisão dos embriões das espigas de milho foi uma etapa crucial, tendo em vista que o manuseio cauteloso e correto evita danos aos embriões. Tal procedimento é essencial para garantir a eficácia da inserção do gene de interesse

através do método biobalístico. Os embriões imaturos não devem ultrapassar 2 mm de comprimento (o tamanho ideal varia de 1,5 a 1,8 mm) (RAJI *et al.*, 2018). Segundo Carneiro, Carneiro e Paiva (2004), a escolha do tecido-alvo apropriado e o estado fisiológico do material vegetal, antes e após o bombardeamento, são críticos para a regeneração de transformantes estáveis.

Após o evento de bombardeamento (entre 3-5 dias), foi observado em todas as placas de peltri que os embriões imaturos estavam na fase inicial de formação de calos do tipo I (Figura 6). Em todas as amostras, ocorreu a regeneração de calos amarelos e esbranquiçados, um padrão esperado para essa cultivar B104. De acordo com a literatura, os calos embriogênicos do tipo I apresentam aspecto esbranquiçados ou amarelos, rígidos, densos e geralmente capazes de regenerar plantas (ARMSTRONG; GREEN, 1985; TOMES; SMITH, 1985; CARNEIRO *et al.* 2009b; AVILA-VICTOR *et al.*, 2023). Vale salientar que calos contaminados foram descartados, a fim de evitar contaminação dos outros calos na placa (procedimento realizado durante todo o período de análise).

Figura 6. Embriões imaturos em fase de iniciação de calos embriogênicos em todas as placas, após 3-5 dias de bombardeamento. Para o gene *RUBY*, cinco tratamentos nomeados de A a E. Para o gene *GUS*, sete placas contendo embriões bombardeados 2x.



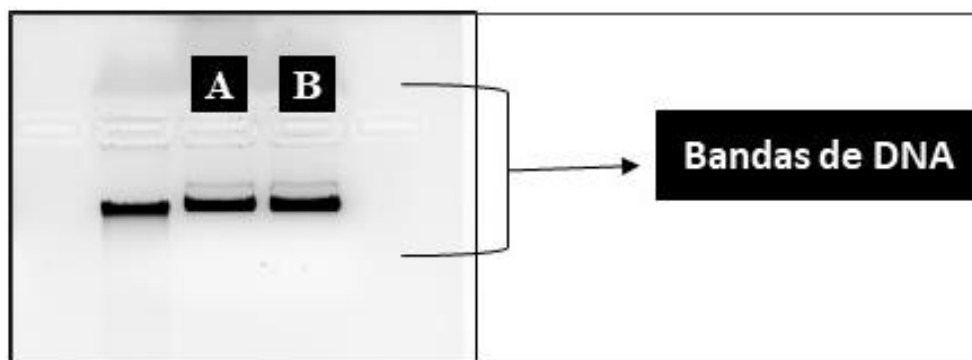
Fonte: A autora (2023)

5.2 CONFIRMAÇÃO DO PLASMÍDEO

Foram obtidas placas com colônias putativamente transformadas, sendo posteriormente utilizadas para multiplicação e extração do DNA plasmidial apenas da construção *RUBY*. Após os procedimentos de extração plasmidial, alíquotas foram avaliadas em eletroforese em gel de agarose (1%) para observação da

integridade das bandas, utilizando o próprio vetor como referência, que apresenta 15550 pb, resultando em bandas íntegras (Figura 7).

Figura 7. Eletroforese em gel de duas amostras (A e B) provenientes de extrações de DNA Plasmidial contendo a construção de interesse Ubiquitina: *RUBY*.



Fonte: A autora (2023).

Ademais, voltado a posterior verificação de plasmídeo em bactérias transformadas armazenadas em glicerol a -80°C , a experiência obtida no treinamento de desenho de *primers* foi utilizada para obtenção de *primers* dos genes *GUS* e *BAR* (marcador de seleção), de um único vetor (Tabela 2).

Tabela 2. *Primers* obtidos a partir das sequências dos genes *BAR* (BAR_L/Foward; BAR_R/Reverse) e *GUS* (GUS_L/Foward; GUS_R/Reverse). Tm: Temperatura de *melting*; G/C (%): percentual de nucleotídeos Guanina (G) e Citosina (C); Length: comprimento do *primer*.

Gene	Sequência (5'-3')	Length	Tm (°C)	G/C(%)
BAR	(F) GCACGCAACGCCTACGACTGG	21-mer	64	67
	(R) CAGATTTCGGTGACGGGGAGCA	22-mer	62	59
GUS	(F) CCTCCACCGAAATGCTTAGACCTG	24-mer	60	54
	(R) GCCAGTCAACGCTGGCATGGTTG	23-mer	64	61

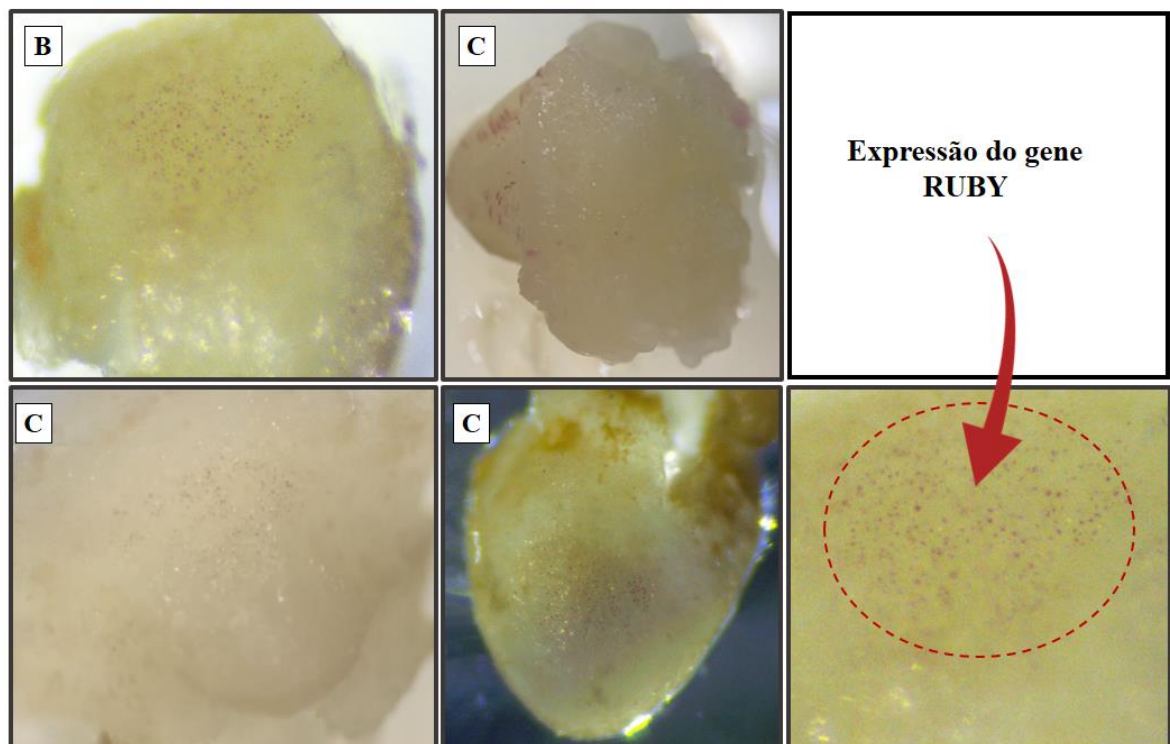
5.3 TRANSFORMAÇÃO COM GENE REPÓRTER *RUBY*

Todos os embriões imaturos em formação de calos foram observados individualmente com auxílio de uma estereomicroscópio, para visualização da expressão do gene *RUBY*, caracterizado pela coloração vermelha do tecido vegetal. A coloração é proveniente da biossíntese de betalainas, que são pigmentos vermelho-violeta e amarelo oriundos da tirosina (TATSIS; O'CONNOR, 2016).

Em plantas modelos, como arroz e *A. thaliana*, o gene *RUBY* revelou ser um marcador eficaz selecionando de forma não invasiva, e que pode ser usado sem

quaisquer tratamentos químicos ou equipamentos especiais na visualização da expressão gênica (HE *et al.*, 2020). Assim, os resultados revelam que a expressão do *RUBY* foi observada em embriões dos tratamentos B e C (Figura 8). Os calos provenientes do tratamento “C” (11,5 cm de distância entre a membrana carreadora e o explante e 3 membranas de ruptura/ ~1050 psi - padrão) foi considerado o mais eficaz, devido as três réplicas técnicas apresentarem três transformantes expressando o referido gene, um em cada réplica (placa), representado na Figura 8. Todavia, Levensgood, Zhou e Zhang (2024) divergem nesse aspecto, ao relatarem que o aumento das distâncias reduz a eficiência da transformação devido à diminuição da pressão, resultando em menor quantidade de material genômico na célula. Para o tratamento “C” uma taxa de transformação de 4% foi observada, enquanto para o tratamento “B” (8,3 cm de distância – padrão e 3 membranas de ruptura/ ~1050 psi – padrão) uma taxa de 1,33% foi obtida. O experimento 1, no geral, apresentou uma taxa de 1,06%. Razi e Rahnema (2012) verificaram na linhagem B73 de milho, um aumento significativo (1,8%) na taxa de transformação quando as placas foram bombardeadas duas vezes a 9 cm ou a 9 e 6 cm a 1100 psi.

Figura 8. Calos embriogênicos de milho expressando o gene repórter *RUBY* (coloração vermelha) ao tecido transgênico, sob o controle do promotor constitutivo da Ubiquitina. Tratamentos B e C.



Fonte: A autora (2023)

Chee, Lycett e Chin (2018) em estudos com pimenta, observaram uma maior intensidade da expressão transitória do gene repórter *GFP* na distância do meio (6 cm) entre a membrana carregadora e o explante. Diferindo do tratamento “B” (três membranas de ruptura e distância de 8,3 cm), que apesar de também ser a distância do meio, resultou em apenas uma placa com um embrião expressando o gene em baixa intensidade.

Ademais, o tratamento “A” (5,1 cm de distância e 3 membranas de ruptura) pode não ter apresentado resultado devido a distribuição desigual das micropartículas em uma menor distância, como apontado por Davlekamova e colaboradores (2023) em seus estudos com *Nicotiana tabacum*. Assim como, o tratamento “D” (8,3 cm de distância – padrão e 1 membrana de ruptura) devido a menor pressão de gás hélio (~350 psi) em que foi submetida, intimamente relacionada com a quantidade de membranas de rupturas. Pois, de acordo com a Bio-Rad, desenvolvedora da pistola biolística PDS-1000/He, uma pressão ideal de 1100 psi foi estipulada para seu equipamento, já que pressões mais altas podem causar danos intensos ao tecido, enquanto pressões mais baixas diminuem a eficiência da transformação (LEVENGGOOD; ZHOU; ZHANG, 2024). Porém, essa pressão pode não ser sempre ideal para todas as espécies e explantes (LEVENGGOOD; ZHOU; ZHANG, 2024), demandando otimizações (DAVLEKAMOVA *et al.*, 2023).

Além disso, resultados interessantes foram encontrados nos estudos de Tan e colaboradores (2024) com a espécie *Areca catechu L.*, onde verificaram a eficiência de transformação transitória contando os pontos azuis, expressadas pelo gene *GUS* e os pontos vermelhos, expressados pelo gene *RUBY*. Divergindo do atual estudo, que constatou mesma eficiência através da quantidade de transformantes e intensidade da expressão dos genes repórteres. Outrossim, Mei e colaboradores (2024) estabeleceram um método eficaz de transformação via *A. Tumefaciens* em diversos genótipos de batata-doce, batata e *Ipomoea pes-caprae*, com o auxílio de dois genes repórteres (*GUS* e *RUBY*). Paralelamente, o mesmo ocorreu no presente estudo, diferindo no método (biobalística) e espécie (milho).

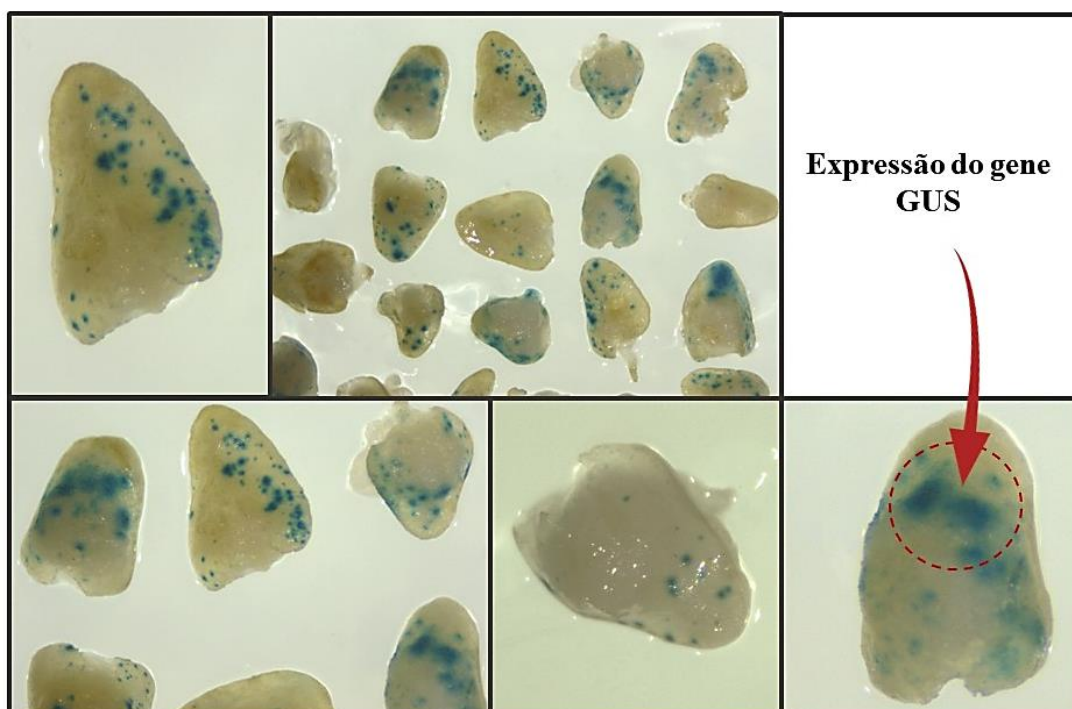
Diante este panorama, nossos resultados indicam que o gene *RUBY* é um excelente candidato para a análise de células transformadas em cultura de tecidos *in vitro*, e que tanto a distância quanto a pressão de ruptura, dentre os parâmetros

físicos da biobalística, são fatores cruciais para o sucesso na eficiência dos explantes transformados.

5.4 TRANSFORMAÇÃO COM GENE REPÓRTER *GUS*

Com relação a expressão do gene *GUS* (*uidA*), os embriões imaturos coletados de todas as placas, após ensaio histoquímico no substrato X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolglucuronídeo), apresentaram, em alguns pontos, coloração azul (Figura 9) no tecido vegetal avaliado, sendo característico da expressão do gene *GUS*. Segundo He e colaboradores (2020), a coloração *GUS* é invasiva e frequentemente requer o sacrifício das plantas, diferenciando-se do *RUBY*, que é considerado um marcador eficaz e não invasivo. Do mesmo modo, o *GUS* pode não ser ideal para condições estéreis, como cultura de tecidos, pois a adição de substratos aumenta a chance de contaminação.

Figura 9. Embriões de milho expressando o gene repórter *GUS* (coloração azul) ao tecido transgênico, sob o controle do promotor constitutivo da Ubiquitina.



Fonte: A autora (2025)

Observou-se que todos os embriões submetidos ao ensaio, coletados alguns de todas as placas bombardeadas com o gene *GUS*, exibiram uma expressão transiente intensa, tornando sua detecção mais fácil. Essa maior expressão do gene

GUS observada na linhagem B104 pode estar relacionada, não apenas a coloração mais visível e intensa (devido a sensibilidade do método de detecção), mas à quantidade de eventos (dois disparos) na metodologia biolística.

Resultados variados foram observados na literatura. Reggiardo e colaboradores (1991) revelaram que dois bombardeamentos (“tiros”) por placa resultou em uma diminuição considerável de células transformadas de milho. Wang e colaboradores (1998) após bombardearem de uma a três vezes células de arroz e trigo, descobriram que o número de células transformadas aumentou quase proporcionalmente com o número de bombardeios. Petrillo e colaboradores (2008), em seus estudos com milho, obtiveram um aumento da expressão transiente do gene *GUS* diretamente proporcional ao aumento no número de bombardeios por placa, estabelecendo as melhores condições (pressão de gás hélio 1.100 psi, dois disparos por placa e uma distância 6,6 cm entre o disparo e placa). Mahdavi, Mahmood e Noor (2014) observaram uma expressão transitória ótima da proteína verde fluorescente (GFP) quando os tecidos cultivados de banana foram bombardeados duas vezes a 1100 psi de pressão de hélio.

Além disso, a coloração *GUS* pode ter sofrido influência do tempo em que os embriões permaneceram em meio osmótico após o bombardeio. Pois, com base em estudos, quando embriões prematuros permanecem em meio osmótico pós-bombardeio por um período de 16 h ou mais, um aumento estatístico na expressão transitória e uma revitalização mais elevada de eventos estáveis é observada (VAIN; MCMULLEN; FINER, 1993; WANG; FRAME; MARCELL, 2003; PETRILLO *et al.*, 2008), sendo necessário posterior comprovação por meio de novas experimentações.

Com base no exposto, nosso estudo mostrou uma expressão transiente do gene *GUS*, porém, não é possível afirmar que resultará em uma transformação de expressão estável. Segundo Mohammad e colaboradores (2024), a expressão transitória oferece, entre outros benefícios, menor dependência da posição do gene no genoma e reduz os efeitos de silenciamento genético.

Vale ressaltar que o protocolo estabelecido neste estudo teve como alicerce os protocolos de bombardeamento de partículas para a linhagem B104 descrito por Raji e colaboradores (2018), Carneiro, Carneiro e Paiva (2004), Cipriano (2008) e Petrillo e colaboradores (2008). Portanto, os resultados obtidos até o momento servirão como base para melhorias nos protocolos de transformação milho no LGBV,

utilizando cultivares de milho com alta taxa de regeneração, visando melhor eficiência de transformação.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos a partir de uma avaliação qualitativa e quantitativa, para o gene *RUBY*, os parâmetros físicos que tiveram melhor eficiência na transformação por biobalística de milho foi a utilização de três membranas de ruptura, com uma distância de 11,5 cm da membrana carreadora até o explante (tratamento C), com expressão observada em três embriões imaturos em processo de iniciação de calos, apresentando uma taxa de transformação de 4%. O experimento 1, no geral, apresentou uma taxa de 1,06%. Para o gene *GUS*, a partir de uma avaliação qualitativa, dois eventos (disparos) por placa resultou em uma intensa expressão transiente nos embriões de milho.

O processo de regeneração dos calos não foi concluído, pois o treinamento ocorreu fora de Pernambuco e não houve tempo suficiente para realizar essa análise. No entanto, a experiência e a expertise adquiridas serão aplicadas em nosso laboratório, com o objetivo de implementar essa metodologia em um futuro próximo.

Os dados obtidos neste estudo demonstram a relevância dos parâmetros avaliados na taxa de regeneração de embriões de milho, além de evidenciar a eficácia dos genes repórteres *GUS* e *RUBY* para a triagem de explantes transformados. Considerando que esses genes apresentam expressão transiente, a experiência adquirida poderá ser aplicada na utilização de outros genes repórteres, com o intuito de selecionar o mais eficaz para garantir a expressão estável.

Essa abordagem potencializa as chances de sucesso na integração do gene e na obtenção de plantas transgênicas de milho *via* biobalística. Dessa forma, pode-se concluir que o gene repórter *RUBY* mostrou-se eficaz para o monitoramento não invasivo da transformação genética.

7 REFERÊNCIAS

- AL DOGHAITHER, H.; GULL, M. Plasmids as Genetic Tools and Their Applications in Ecology and Evolution. *In*: GULL, M. **PLASMID**. [S. l.]: IntechOpen, 70 p., 2019. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/66546>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- ANDRADE, S.R.M. **Transformação de plantas**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 28 p., 2003 — (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 102).
- ANGULO-BEJARANO, P. I.; SHARMA, A.; PAREDES-LÓPEZ, O. Factors affecting genetic transformation by particle bombardment of the prickly pear cactus (*O. ficus-indica*). **3 Biotech**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 98, 2019.
- ANJANAPPA, R. B.; GRUISSEM, W. Current progress and challenges in crop genetic transformation. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 261, p. 153411, 2021.
- ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, [s. l.], v. 164, n. 2, p. 207–214, 1985.
- ATTA, R. *et al.* Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 626–644, 2009.
- AVILA-VICTOR, C. M. *et al.* Callus type, growth regulators, and phytigel on indirect somatic embryogenesis of coffee (*Coffea arabica* L. var. Colombia). **Plants**, [s. l.], v. 12, n. 20, p. 3570, 2023.
- BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 147–173, 2011.
- BALL, E. Development in Sterile Culture of Stem Tips and Subjacent Regions of *Tropaeolum Majus* L. And of *Lupinus Albus* L. **American Journal of Botany**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 301–318, 1946.
- BALLY, J. *et al.* The Rise and Rise of *Nicotiana benthamiana*: A Plant for All Reasons. **Annual Review of Phytopathology**, [s. l.], v. 56, p. 405–426, 2018.
- BECHTOLD, N. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. **C R Acad Paris Life Sci**, [s. l.], v. 316, p. 1194-1199, 1993.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. Introdução à transformação genética de plantas. *In*: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, p. 15-20, 2015.
- BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI Embrapa-CNPH, v. 2, p. 679-735, 1999.

- BRASILEIRO, A. C. M.; GUIMARÃES, P. M. Cultivo e conservação de *Escherichia coli* e *Agrobacterium* spp. *In*: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, p. 21-38, 2015.
- CAMPOS, G. *et al.* New Technologies and Strategies for Grapevine Breeding Through Genetic Transformation. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plantscience/articles/10.3389/fpls.2021.767522/full>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- CANDELA, H.; HAKE, S. The art and design of genetic screens: maize. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 192–203, 2008.
- CAO, X. *et al.* Cut–dip–budding delivery system enables genetic modifications in plants without tissue culture. **The Innovation**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2023. Disponível em: [https://www.cell.com/the-innovation/abstract/S2666-6758\(22\)00141-2](https://www.cell.com/the-innovation/abstract/S2666-6758(22)00141-2). Acesso em: 13 mar. 2025.
- CARDOSO, J. C.; SHENG GERALD, L. T.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Micropropagation in the Twenty-First Century. *In*: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (org.). **Plant Cell Culture Protocols**. New York, NY: Springer, 2018. p. 17–46. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_2. Acesso em: 13 mar. 2025.
- CARNEIRO, A. A. *et al.* Milho Bt: teoria e prática da produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica**, 135, [s. l.], 25 p., 2009a. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/748936>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- 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, 132, 16 p., 2009b. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/659041>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 32, 44 p., 2004. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/488676>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- CHAKRABORTY, N. *et al.* Choice of Explant for Plant Genetic Transformation. *In*: RUSTGI, S.; LUO, H. (org.). **Biolistic DNA Delivery in Plants: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2020. p. 107–123. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7_5. Acesso em: 13 mar. 2025.
- CHANG, C.; BOWMAN, J. L.; MEYEROWITZ, E. M. Field Guide to Plant Model Systems. **Cell**, [s. l.], v. 167, n. 2, p. 325–339, 2016.
- CHATFIELD, S. P. *et al.* Incipient stem cell niche conversion in tissue culture: using a systems approach to probe early events in -dependent conversion of lateral root primordia into shoot meristems. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 73, n. 5, p. 798–813, 2013.

- CHEE, M. J. Y.; LYCETT, G. W.; CHIN, C. F. Development of a direct transformation method by GFP screening and *in vitro* whole plant regeneration of *Capsicum frutescens* L. **Electronic Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 34, p. 51–58, 2018.
- CHEN, K. *et al.* CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 70, n. Volume 70, 2019, p. 667–697, 2019.
- CHEN, L. *et al.* Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 1060–1064, 1998.
- CHEN, Z. *et al.* Recent advances in crop transformation technologies. **Nature Plants**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 1343–1351, 2022.
- CIPRIANO, T. M. **Silenciamento mediado por RNA interferente do gene *sbe1* que codifica para enzima de ramificação do amido 1 (SBE I) em milho (*Zea mays*L.).** 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2008.
- CITADIN, C. T.; CRUZ, A. R. R.; ARAGÃO, F. J. L. Development of transgenic imazapyr-tolerant cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant cell reports**, [s. l.], v. 32, p. 537-543, 2013.
- CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for -mediated transformation of. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 735–743, 1998.
- COE, E. H. The origins of maize genetics. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 2, n. 11, p. 898–905, 2001.
- CRUZ, M. A. *et al.* Culture conditions for somatic embryogenesis in banana: brief review of the current practices, advantages, and constraints. **Technology in Horticulture**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2024. Disponível em: <https://www.maxapress.com/article/doi/10.48130/tihort-0024-0013>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- DA SILVA, D. F. *et al.* Morphological characteristics, genetic improvement and planting density of sorghum and corn crops: a review. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. e12310313172, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i3.13172. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/13172>. Acesso em: 11 apr. 2025.
- DALLA COSTA, L.; MALNOY, M.; GRIBAUDO, I. Breeding next generation tree fruits: technical and legal challenges. **Horticulture Research**, [s. l.], v. 4, p. 17067, 2017.
- DANIELL, H.; KRISHNAN, M.; MCFADDEN, B. F. Transient expression of β -glucuronidase in different cellular compartments following biolistic delivery of foreign DNA into wheat leaves and calli. **Plant Cell Reports**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 615–619, 1991.
- DAVLEKAMOVA, A. A. *et al.* Optimization of biolistic transformation parameters for *Nicotiana tabacum*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 368-372, 2023.
- DEMIRER, G. S. *et al.* Carbon nanocarriers deliver siRNA to intact plant cells for efficient gene knockdown. **Science Advances**, [s. l.], v. 6, n. 26, p. eaaz0495, 2020.

- DEMIRER, G. S. *et al.* High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants. **Nature Nanotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 456–464, 2019.
- DESSAUX Y.; PETIT A.; TEMPE´ J. Opines in Agrobacterium biology. *In*: VERMA, D. P. S. **Molecular signals in plant-microbe communications**. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, p. 109–136, 1992.
- DU, P. *et al.* Establishment of Biolistic Mediated Transformation System for Elymus sibiricus. **Chinese Bulletin of Botany**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 62, 2021.
- EGERTSDOTTER, U.; AHMAD, I.; CLAPHAM, D. Automation and Scale Up of Somatic Embryogenesis for Commercial Plant Production, With Emphasis on Conifers. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2019.00109/full>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- ENGELS, C. *et al.* Introduction of the rd29A: AtDREB2A CA gene into soybean (Glycine max L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, p. 556-565, 2013.
- EMBRAPA. **Nanotecnologia**. Embrapa nanotecnologia nota técnica, 2025. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/tema-nanotecnologia/nota-tecnica>. Acesso em: 04 mar. 2025.
- FARIA, J., *et al.* Golden mosaic of common beans in Brazil: management with a transgenic approach. **APS Features**, 2016. DOI: 10.1094/APSFeature-2016-10. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1054875>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- FARKAS, D. *et al.* In vitro micropropagation protocols for two endangered Dianthus species - via in vitro culture for conservation and recultivation purposes. **Plant Methods**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 13, 2025.
- FEHÉR, A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology?. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2019.00536/full>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- FENG, J. *et al.* Reporter gene expression reveals precise auxin synthesis sites during fruit and root development in wild strawberry. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 563–574, 2019.
- GALLAGHER, S. R. Quantitation of GUS activity by fluorometry. *In*: GALLAGHER, S. R. (Ed.). **GUS Protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression**. San Diego: Academic Press, p.47-59, 1992.
- GAMBORG, O. L. *et al.* Plant Tissue Culture Media. **In Vitro**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 473–478, 1976.
- GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 334–343, 2013.
- GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F.; ESCRIBANO, J. Purification and Characterization of a Latent Polyphenol Oxidase from Beet Root (Beta vulgaris

- L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 609–615, 2004.
- GRÜTZNER, R. *et al.* Engineering Betalain Biosynthesis in Tomato for High Level Betanin Production in Fruits. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2021.682443/full>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- HASNAIN, A. *et al.* Plants in vitro propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 13, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.1009395/full>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- HATLESTAD, G. J. *et al.* The beet R locus encodes a new cytochrome P450 required for red betalain production. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 44, n. 7, p. 816–820, 2012.
- HE, W. *et al.* Development Regulatory Factors Promoting Efficient Plant Genetic Transformation and Their Application in Maize. **China Biotechnology**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 85–98, 2022.
- HE, Y. *et al.* A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation. **Horticulture Research**, [s. l.], v. 7, p. 152, 2020.
- HEFFERON, K. L. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. **Virology**, [s. l.], v. 433, n. 1, p. 1–6, 2012.
- HERRERA-ESTRELLA, L. *et al.* Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. **Nature**, [s. l.], v. 303, n. 5914, p. 209–213, 1983.
- HOEKEMA, A. *et al.* A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, [s. l.], v. 303, n. 5913, p. 179–180, 1983.
- HORSTMAN, A.; BEMER, M.; BOUTILIER, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. **Regeneration**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 201–216, 2017.
- HULL, G. A.; DEVIC, M. The β -Glucuronidase (gus) Reporter Gene System. In: JONES, H. (org.). **Plant Gene Transfer and Expression Protocols**. Totowa, NJ: Springer New York, 1995. p. 125–141. Disponível em: <https://doi.org/10.1385/0-89603-321-X:125>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- IKEUCHI, M. *et al.* Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. **Development**, [s. l.], v. 143, n. 9, p. 1442–1451, 2016.
- JACKSON, M. A.; ANDERSON, D. J.; BIRCH, R. G. Comparison of *Agrobacterium* and particle bombardment using whole plasmid or minimal cassette for production of high-expressing, low-copy transgenic plants. **Transgenic Research**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 143–151, 2013.
- JAGGA-CHUGH, S. *et al.* Optimization of factors influencing microprojectile bombardment-mediated genetic transformation of seed-derived callus and regeneration of transgenic plants in *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, [s. l.], v. 109, n. 3, p. 401–410, 2012.

- JANSING, J. *et al.* Genome Editing in Agriculture: Technical and Practical Considerations. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 2888, 2019.
- JAT, S. K.; BHATTACHARYA, J.; SHARMA, M. K. Nanomaterial based gene delivery: a promising method for plant genome engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 8, n. 19, p. 4165–4175, 2020.
- JEFFERSON, R. A. The GUS reporter gene system. **Nature**, [s. l.], v. 342, n. 6251, p. 837–838, 1989.
- JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 6, n. 13, p. 3901–3907, 1987.
- JINEK, M. *et al.* A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, [s. l.], v. 337, n. 6096, p. 816–821, 2012.
- JUNIOR, G. M. B. *et al.* Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis* in vitro. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 45-51, 2017.
- KOORNNEEF, M.; MEINKE, D. The development of Arabidopsis as a model plant. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 61, n. 6, p. 909–921, 2010.
- KRISHNA, H. *et al.* Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. **3 Biotech**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 54, 2016.
- LACORTE, C.; BARROS, L. M. G. Genes repórteres gus (β -glucuronidase e gfp (proteína verde-fluorescente). In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, p. 147-164, 2015.
- LAISHRAM, S. D. *et al.* Assessment of biolistic and Agrobacterium-mediated genetic transformation methods in *Cenchrus ciliaris*. **The Nucleus**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 303–312, 2020.
- LANA, U. G. de P.; NEGRI, B. F.; SOUSA, S. M. de. **Quantificação da atividade da enzima repórter β -glucoronidase (GUS) em plantas**. [s. l.], 2017. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1081539>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- LARDON, R.; GEELEN, D. Natural Variation in Plant Pluripotency and Regeneration. **Plants**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 1261, 2020.
- LEE, K. *et al.* New T-DNA binary vectors with NptII selection and RUBY reporter for efficient maize transformation and targeted mutagenesis. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 192, n. 4, p. 2598–2603, 2023.
- LEVENGOD, H.; ZHOU, Y.; ZHANG, C. Advancements in plant transformation: from traditional methods to cutting-edge techniques and emerging model species. **Plant Cell Reports**, [s. l.], v. 43, n. 11, p. 273, 2024.
- LI, X. *et al.* Establishment of A Simple and Efficient Agrobacterium-mediated Genetic Transformation System to Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). **Horticultural Plant Journal**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 117–128, 2021.
- LIU, S. *et al.* An efficient system for Agrobacterium-mediated transient transformation in *Pinus tabulaeformis*. **Plant Methods**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 52, 2020.

- LONG, Y. *et al.* New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 13, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.926752/full>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- LOPES FILHO, J. H. *et al.* Introdução à edição genômica em plantas. *In*: MOLINARI, H. B. C. *et al.* (Ed.). **Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, p.11-48, 2020.
- MAHDAVI, F.; MAHMOOD, M.; NOOR, N. M. Optimization of particle bombardment parameters for DNA delivery into the male flowers of banana. **Biologia**, v. 69, p. 888-894, 2014.
- MAGALHÃES, P.S.; SOUZA, T. C. Cultivo do milho. *In*: PEREIRA FILHO, I. A. (ed.). **Sistema de Produção**. Minas Gerais: Emprapa Milho e Sorgo, p. 1, 2015. ISSN 1679-012X.
- MAHER, M. F. *et al.* Plant gene editing through de novo induction of meristems. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 84–89, 2020.
- MAMUN, N. H. A.; AIDUN, C. K.; EGERTSDOTTER, U. Improved and synchronized maturation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) H.Karst.) somatic embryos in temporary immersion bioreactors. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 612–620, 2018.
- MARKA, R.; NANNA, R. S. Optimization of factors affecting Agrobacterium-mediated genetic transformation in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Adv Plants Agric Res**, v. 8, n. 3, p. 275, 2018.
- MATTHEWS, B. *et al.* Liposome-Mediated transfer of bacterial RNA into carrot protoplasts. **Planta**, [s. l.], v. 145, n. 1, p. 37–44, 1979.
- MCELROY, D. *et al.* Development of gusA reporter gene constructs for cereal transformation: Availability of plant transformation vectors from the CAMBIA Molecular Genetic Resource Service. **Molecular Breeding**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 27–37, 1995.
- MCMULLEN, M. D. *et al.* Genetic Properties of the Maize Nested Association Mapping Population. **Science**, [s. l.], v. 325, n. 5941, p. 737–740, 2009.
- MEHBUB, H. *et al.* Tissue Culture in Ornamentals: Cultivation Factors, Propagation Techniques, and Its Application. **Plants**, [s. l.], v. 11, n. 23, p. 3208, 2022.
- MEI, G. *et al.* A simple and efficient in planta transformation method based on the active regeneration capacity of plants. **Plant Communications**, [s. l.], v. 5, n. 4, 2024. Disponível em: [https://www.cell.com/plant-communications/abstract/S2590-3462\(24\)00042-7](https://www.cell.com/plant-communications/abstract/S2590-3462(24)00042-7). Acesso em: 13 mar. 2025.
- MEINKE, D. W. *et al.* Arabidopsis thaliana: A Model Plant for Genome Analysis. **Science**, [s. l.], v. 282, n. 5389, p. 662–682, 1998.
- MEKALA, G. K. *et al.* Optimization of Agrobacterium-mediated genetic transformation of shoot tip explants of green gram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 127, p. 651-663, 2016.
- MERCANTE, F. M.; RUMJANEK, N. G.; FRANCO, A. A. Aplicação de genes marcadores em estudos de ecologia microbiana com ênfase no sistema GUS. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 30, p. 533–539, 2000.

- MOHAMMAD, T. *et al.* Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transient gene expression in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). **Plants**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 664, 2024.
- MUELLER, L. A.; HINZ, U.; ZRÝD, J.-P. Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 1511–1515, 1996.
- MÜLLER, B.; GROSSNIKLAUS, U. Model organisms — A historical perspective. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 73, n. 11, Model organism proteomics, p. 2054–2063, 2010.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, [s. l.], v. 15, n. 3, 1962. Disponível em: <https://openurl.ebsco.com/contentitem/doi:10.1111%2Fj.1399-3054.1962.tb08052.x?sid=ebsco:plink:crawler&id=ebsco:doi:10.1111%2Fj.1399-3054.1962.tb08052.x>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- MUSHTAQ, R. *et al.* Isolation of biotic stress resistance genes from cotton (*Gossypium arboreum*) and their analysis in model plant tobacco (*Nicotiana tabacum*) for resistance against cotton leaf curl disease complex. **Journal of Virological Methods**, [s. l.], v. 276, p. 113760, 2020.
- NALEWAY, J. J. Histochemical, Spectrophotometric, and Fluorometric GUS Substrates. In: GALLAGHER, S. R. (Ed.). **GUS Protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression**. San Diego: Academic Press, 1992, pp. 61–65.
- NANNAS, N. J.; DAWE, R. K. Genetic and genomic toolbox of *Zea mays*. **Genetics**, [s. l.], v. 199, n. 3, p. 655–669, 2015.
- NIU, F. *et al.* Heterologous expression of SpsTAC2 in *Arabidopsis* affected branch angle and secondary vascular system development. **Plant Signaling & Behavior**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 2450821, 2025.
- OHTA, S. *et al.* Construction and Expression in Tobacco of a β -Glucuronidase (GUS) Reporter Gene Containing an Intron Within the Coding Sequence. **Plant and Cell Physiology**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 805–813, 1990.
- OSMAN, G. H. *et al.* Development of insect resistant maize plants expressing a chitinase gene from the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 18067, 2015.
- PAES DE MELO, B. *et al.* Soybean Embryonic Axis Transformation: Combining Biolistic and *Agrobacterium*-Mediated Protocols to Overcome Typical Complications of In Vitro Plant Regeneration. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2020.01228/full>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- PÉREZ-PASCUAL, D. *et al.* Wounding after cocultivation improves somatic embryogenesis response and *agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Coffea canephora* L. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 176, p. 49–61, 2025.
- PETRILLO, C. P. *et al.* Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 43, p. 371–378, 2008.

- POLTURAK, G. *et al.* Elucidation of the first committed step in betalain biosynthesis enables the heterologous engineering of betalain pigments in plants. **New Phytologist**, [s. l.], v. 210, n. 1, p. 269–283, 2016.
- POLTURAK, G.; AHARONI, A. “La Vie en Rose”: Biosynthesis, Sources, and Applications of Betalain Pigments. **Molecular Plant**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 7–22, 2018.
- PRAMANIK, D.; LEE, K.; WANG, K. A simple and efficient method for betalain quantification in RUBY-expressing plant samples. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 15, 2024. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2024.1449409/full>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- PROVART, N. J. *et al.* 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. **New Phytologist**, [s. l.], v. 209, n. 3, p. 921–944, 2016.
- PULIANMACKAL, A. J. *et al.* Competence and regulatory interactions during regeneration in plants. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 5, 2014. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2014.00142/full>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- QI, X. *et al.* Cloning, Characterization and Transformation of Methyltransferase 2a Gene (Zmet2a) in Maize (*Zea mays* L.). **Phyton (0031-9457)**, v. 93, n. 7, 2024. Disponível em: <https://openurl.ebsco.com/contentitem/doi:10.32604%2Fphyton.2024.052844?sid=ebsco:plink:crawler&id=ebsco:doi:10.32604%2Fphyton.2024.052844>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- RAJI, J. A. *et al.* Agrobacterium- and Biolistic-Mediated Transformation of Maize B104 Inbred. In: LAGRIMINI, L. M. (org.). **Maize: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer, p. 15–40, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7315-6_2. Acesso em: 13 mar. 2025.
- RAKSHIT, S. *et al.* Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 31–37, 2010.
- RAMESSAR, K. *et al.* Maize plants: an ideal production platform for effective and safe molecular pharming. **Plant Science**, [s. l.], v. 174, n. 4, p. 409–419, 2008.
- RAMKUMAR, T. R. *et al.* A Short History and Perspectives on Plant Genetic Transformation. In: RUSTGI, S.; LUO, H. (org.). **Biolistic DNA Delivery in Plants: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2020. p. 39–68. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7_3. Acesso em: 13 mar. 2025.
- RANGHOO-SANMUKHIYA, V. M. Somaclonal Variation and Methods Used for Its Detection. In: SIDDIQUE, I. (org.). **Propagation and Genetic Manipulation of Plants**. Singapore: Springer, p. 1–18, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-15-7736-9_1. Acesso em: 13 mar. 2025.
- RASHID, R.; ZAHED, Z. Genetic Transformation of Tomato (*Solanum Lycopersicum*. L) Using Cry1Ac Gene to Impart Resistance Against Fruit Borer. **Journal of Natural Science Review**, [s. l.], v. 2, n. Special.Issue, p. 332–339, 2024.
- REGGIARDO, M. I. *et al.* Transient transformation of maize tissues by microparticle bombardment. **Plant Science**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 237–243, 1991.

- RIBEIRO, T. P. *et al.* Improved cotton transformation protocol mediated by *Agrobacterium* and biolistic combined-methods. **Planta**, [s. l.], v. 254, n. 2, p. 20, 2021.
- ROSELLINI, D. Selectable markers and reporter genes: a well furnished toolbox for plant science and genetic engineering. **Critical reviews in plant sciences**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 401-453, 2012.
- RAZI, Z.; RAHNAMA, H. Factors affecting delivery of DREB1A gene in maize B73 split-seeds via biolistic system. **Iranian journal of genetics and plant breeding**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 36-43, 2012.
- SADHU, S. K. *et al.* Optimization of different factors for an *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system using embryo axis explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Journal of Plant Biotechnology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 61–73, 2022.
- SAEED, T.; SHAHZAD, A. Basic Principles Behind Genetic Transformation in Plants. *In*: SHAHZAD, A.; SHARMA, S.; SIDDIQUI, S. A. (org.). **Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers**. Cham: Springer International Publishing, p. 327–350, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-19288-8_13. Acesso em: 13 mar. 2025.
- SAFDAR, M. *et al.* Dose-responsive phytotoxicity and oxidative stress induced by metal–organic framework PCN-224 in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 486, p. 137067, 2025.
- SANFORD, J. C. Biolistic plant transformation. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 206–209, 1990.
- SENARATNA, T. *et al.* Direct DNA uptake during the imbibition of dry cells. **Plant Science**, v. 79, n. 2, p. 223-228, 1991.
- SHARMA, G.; ALEX, L. Vectors: Its Importance in Biotechnology and Different Types of Vectors. *In*: RAI, V. **Recent Advances in Biotechnology**. Shree Publishers & Distributors, New Delhi–110 002, vol. 2, p. 72-81, 2017.
- SHI, X.; COLLADO, C. E.; HERNÁNDEZ, R. Improve *Cannabis sativa* micropropagation through increasing air change rate in photoautotrophic and traditional tissue culture. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 333, p. 113238, 2024.
- SHIKATA, M.; EZURA, H. Micro-Tom Tomato as an Alternative Plant Model System: Mutant Collection and Efficient Transformation. *In*: BOTELLA, J. R.; BOTELLA, M. A. (org.). **Plant Signal Transduction: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer, p. 47–55, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3115-6_5. Acesso em: 13 mar. 2025.
- SINGH, A. Micropropagation of Plants. *In*: BAHADUR, B. *et al.* (org.). **Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology**. New Delhi: Springer India, p. 329–346, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_16. Acesso em: 13 mar. 2025.
- SINGH, M. *et al.* Plasmid DNA transformation in *Escherichia Coli*: effect of heat shock temperature, duration, and cold incubation of CaCl₂ treated cells. **International Journal of Biotechnology & Biochemistry**, [s. l.], v. 6, p. 561–568, 2010.

- SOUZA, R. A. V. de *et al.* *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a tropical elite maize line. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [s. l.], v. 17, p. 133–140, 2017.
- STEINER, U. *et al.* Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. **Planta**, [s. l.], v. 208, n. 1, p. 114–124, 1999.
- STOMP, A. M. Histochemical Localization of β -Glucuronidase. *In*: GALLAGHER, S. (Ed.). **GUS Protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression**. San Diego: Academic Press, p. 104-105, 1992.
- STRABLE, J.; SCANLON, M. J. Maize (*Zea mays*): A Model Organism for Basic and Applied Research in Plant Biology. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s. l.], v. 2009, n. 10, p. pdb.emo132, 2009.
- SU, W. *et al.* Technological Development and Application of Plant Genetic Transformation. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 13, p. 10646, 2023.
- SUNDARARAJAN, S. *et al.* Physicochemical factors modulate regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of recalcitrant indica rice cultivars - ASD16 and IR64. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 24, p. 101519, 2020.
- TAN, H. *et al.* Optimizing Transformation for Transient Expression of Exogenous Genes in Areca Palm via Microparticle Bombardment. **Preprints.org**, 2024.
- TAPARIA, Y.; GALLO, M.; ALTPETER, F. Comparison of direct and indirect embryogenesis protocols, biolistic gene transfer and selection parameters for efficient genetic transformation of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, [s. l.], v. 111, n. 2, p. 131–141, 2012.
- TATSIS, E. C.; O'CONNOR, S. E. New developments in engineering plant metabolic pathways. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 42, p. 126–132, 2016.
- TAVARES-ESASHIKA, M. L. *et al.* Development of a heterologous gene expression vector in plants based on an infectious clone of a tobnavirus, pepper ringspot virus. **Annals of Applied Biology**, [s. l.], v. 181, n. 1, p. 107–116, 2022.
- THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, [s. l.], v. 408, n. 6814, p. 796–815, 2000.
- THORPE, T. A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 169–180, 2007.
- TOMATO GENOME CONSORTIUM. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**, [s. l.], v. 485, n. 7400, p. 635-641, 2012. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature11119#citeas>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- TOMES, D. T.; SMITH, O. S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, [s. l.], v. 70, n. 5, p. 505–509, 1985.
- TRIPATHI, A. *et al.* *Agrobacterium* and biolistic mediated genetic transformation of mungbean cultivar Samrat using embryogenic explant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, [s. l.], v. 157, n. 3, p. 72, 2024.

- TZFIRA, T.; CITOVSKEY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 147–154, 2006.
- VAIN, P.; MCMULLEN, M. D.; FINER, J. J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cell Reports**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 84–88, 1993.
- VAN DIE, I. M.; BERGMANS, H. E. N.; HOEKSTRA, W. P. M. Transformation In *Escherichia coli*: Studies On The Role Of The Heat Shock In Induction Of Competence. **Microbiology**, [s. l.], v. 129, n. 3, p. 663–670, 1983.
- VERDEIL, J.-L. *et al.* Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy?. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 245–252, 2007.
- VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E. L. O sistema biobalístico. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, p. 90-104, 2015.
- VIDIGAL, T. M. A. *et al.* Regeneração de plantas a partir de dois tipos de explantes de milho submetidos à transformação genética por biobalística. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 44, p. 1804–1809, 2014.
- VITAMVAS, J. *et al.* Assessment of somaclonal variation in indirect morphogenesis-derived plants of *Arracacia xanthorrhiza*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 54, p. e00301, 2019.
- WANG, C.-Q. *et al.* Correlation of tyrosinase activity and betacyanin biosynthesis induced by dark in C3 halophyte *Suaeda salsa* seedlings. **Plant Science**, [s. l.], v. 173, n. 5, p. 487–494, 2007.
- WANG, D. *et al.* The RUBY reporter enables efficient haploid identification in maize and tomato. **Plant Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 1707–1715, 2023.
- WANG, K.; FRAME, B.; MARCELL, L. Genetic transformation of maize. In: JAIWAL, P.K.; SINGH, R.P. (Ed.). **Plant genetic engineering: improvement of food crops**. Houston: **Sci Tech Publishing LLC**, v.2, p.175-216, 2003.
- WANG, P. *et al.* Plant genetic transformation: achievements, current status and future prospects. **Plant Biotechnology Journal**, 2025. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pbi.70028>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- WANG, Y.-C. *et al.* Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. **Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 433–439, 1988.
- WENZEL, G.; FOROUGH-WEHR, B. In vitro selection. In: HAYWARD, M. D. *et al.* (org.). **Plant Breeding: Principles and prospects**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993. p. 353–370. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-011-1524-7_22. Acesso em: 13 mar. 2025.
- WHITE, P. R. POTENTIALLY UNLIMITED GROWTH OF EXCISED TOMATO ROOT TIPS IN A LIQUID MEDIUM. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 585–600, 1934.

- WOOD, K. V. Marker proteins for gene expression. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 50–58, 1995.
- WU, E.; ZHAO, Z.-Y. Agrobacterium-Mediated Sorghum Transformation. In: SCHMIDT, A. (org.). **Plant Germline Development: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer, p. 355–364, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7286-9_26. Acesso em: 13 mar. 2025.
- WU, K. *et al.* Application of Nanotechnology in Plant Genetic Engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 19, p. 14836, 2023.
- WU, L. *et al.* Expression and Inheritance of Nine Transgenes in Rice. **Transgenic Research**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 533–541, 2002.
- YADAVA, P. *et al.* Advances in Maize Transformation Technologies and Development of Transgenic Maize. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 7, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2016.01949/full>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- YAN, Y. *et al.* Nanotechnology Strategies for Plant Genetic Engineering. **Advanced Materials**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 2106945, 2022.
- YASSITEPE, J. E. C. T. *et al.* Maize transformation: From plant material to the release of genetically modified and edited varieties. **Frontiers in Plant Science**, p. 2244, 2021.
- YI, X. *et al.* Exploring an economic and highly efficient genetic transformation and genome-editing system for radish through developmental regulators and visible reporter. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 120, n. 4, p. 1682–1692, 2024.
- YU, J. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. **Science**, [s. l.], v. 318, n. 5858, p. 1917–1920, 2007.
- YU, Y. *et al.* Enhancing wheat regeneration and genetic transformation through overexpression of TaLAX1. **Plant Communications**, [s. l.], v. 5, n. 5, 2024. Disponível em: [https://www.cell.com/plant-communications/abstract/S2590-3462\(23\)00284-5](https://www.cell.com/plant-communications/abstract/S2590-3462(23)00284-5). Acesso em: 13 mar. 2025.
- ZHANG, H. *et al.* DNA nanostructures coordinate gene silencing in mature plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 116, n. 15, p. 7543–7548, 2019.
- ZHANG, H. *et al.* Gold-Nanocluster-Mediated Delivery of siRNA to Intact Plant Cells for Efficient Gene Knockdown. **Nano Letters**, [s. l.], v. 21, n. 13, p. 5859–5866, 2021.
- ZHANG, W. *et al.* Fast track to obtain heritable transgenic sweet potato inspired by its evolutionary history as a naturally transgenic plant. **Plant Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 671–673, 2023.
- ZHONG, H. *et al.* A fast and genotype-independent in planta Agrobacterium-mediated transformation method for soybean. **Plant Communications**, v. 5, n. 12, 2024.
- ZHONG, H. *et al.* Development of high-throughput tissue culture-free plant transformation systems. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 121, n. 1, p. e17163, 2025.

- ZHONG, H. *et al.* Transgenic plants of turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. **Plant Cell Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–6, 1993.
- ZHOU, M. *et al.* An efficient method for the production of transgenic peanut plants by pollen tube transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, [s. l.], v. 152, n. 1, p. 207–214, 2023.
- ZIV, M.; ALTMAN, A. TISSUE CULTURE | General Principles. *In*: THOMAS, B. (org.). **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. Oxford: Elsevier, p. 1341–1353, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122270509002131>. Acesso em: 13 mar. 2025.