

## REVISÃO

# EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MILHO: TRAJETÓRIA E EFICIÊNCIA

## SOMATIC EMBRYOGENESIS IN MAIZE: BACKGROUND AND EFFICIENCY

ANA LUISA MONEZI LUCENA<sup>1</sup>, IVONE BATISTA DE OLIVEIRA ELOI<sup>2</sup>, CLAUDETE APARECIDA MANGOLIN<sup>3</sup>, MARIA DE FÁTIMA PIRES DA SILVA MACHADO<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790 – 87020-900 – Maringá, Pr – lumonezi@yahoo.com.br.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790 – 87020-900 – Maringá, Pr – ivoneeloi@yahoo.com.br.

<sup>3</sup>Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790 – 87020-900 – Maringá, Pr – camangolin@uem.br / mfpsmachado@uem.br

\*Autor para correspondência: mfpsmachado@uem.br

### RESUMO

Selecionar protocolos eficientes para promover a embriogênese somática e regenerar plantas de milho (*Zea mays* L.), é um alvo que deve contribuir para o melhoramento de milho no Brasil. Esse processo deve favorecer a transferência de genes e o desenvolvimento de variedades geneticamente modificadas. Na presente revisão, os protocolos desenvolvidos para indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas foram organizados no sentido de avaliar a eficiência desses protocolos. Um ou mais protocolos promissores foram selecionados para investimentos futuros, com genótipos de interesse para o melhoramento. As investigações com genótipos diferentes de milho estão concentradas em pouco mais de duas décadas (1989 a 2012), período em que foram divulgados apenas 17 estudos, onde foram investigados 179 genótipos, dos quais 77% formaram calos embriogênicos e somente 43,5% regeneraram plantas na ausência ou em presença de aminoácidos e/ou de concentrações diversas de citocininas e auxinas. O meio N6 foi mais utilizado para a indução de calos (89,47% das investigações). A adição de L-prolina, caseína hidrolisada, juntamente com o AgNO<sub>3</sub>, foi verificada em 84%, 56% e 60% dos experimentos, respectivamente. O meio de cultura N6 contendo 2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D tem sido usado para analisar 46% dos genótipos. Mediante esse processo a embriogênese somática ocorreu em 87,9% dos calos. Após mais de três décadas desde a divulgação do primeiro regenerante de milho (1975), a competência para induzir calos embriogênicos e regenerar plantas parece mais dependente do genótipo do que dos suplementos adicionados ao meio de cultura.

**Termos para indexação:** embriogênese adventícia, regeneração de plantas, cultura de calos.

### ABSTRACT

The selection of efficient protocols to promote somatic embryogenesis and plant regeneration of maize (*Zea mays* L.), is a target that should contribute to the improvement of maize in Brazil. This process should encourage the transfer of genes

and the development of genetically modified varieties. In the present review, protocols have been organized and developed for embryogenic callus induction and plant regeneration in order to evaluate the efficiency of the protocols that were used. One or more promising protocols for future investments was selected with genotypes of interest for genetic improvement. The investigations with different maize genotypes are concentrated in just over two decades (1989-2012), when only 17 studies were published and 179 genotypes were investigated, of which 77% formed embryogenic callus and only 43.5% regenerated plants in the absence or presence of amino acids and/or in different concentration of cytokinins and auxins. The N6 medium was the most used for callus induction (89.47% of investigations). The addition of L-proline, hydrolyzed casein, along with AgNO<sub>3</sub> was detected in 84, 56, and 60% of the experiments, respectively. N6 medium containing 2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D has been used to analyze 46% of the genotypes. Through this process somatic embryogenesis has been induced in 87.9% of these cases. It has been three decades since the release of the first corn regenerant (1975), the competence for somatic embryogenesis and plant regeneration has been linked to being more dependent on genotype than on added supplements to the culture medium.

**Index terms:** Adventitious embryogenesis, plant regeneration, callus culture.

### INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é considerado uma das principais matérias-primas na agricultura internacional, como uma fonte de nutrientes para homens e animais (SHOHAEL et al., 2003; PETRILLO et al., 2008). Além de sua importância agrônômica, o milho é um organismo modelo para pesquisas básicas e aplicadas (STRABLE & SCANLON, 2009).

(Recebido em 28 de setembro de 2014 e aprovado em 24 de abril de 2015)

Por muitos anos as pesquisas aplicadas no melhoramento do milho foram direcionadas por métodos convencionais. No entanto, o sucesso desta estratégia foi se tornando limitado por baixas variações genéticas, como resultado de domesticação, custos elevados, incompatibilidade sexual e longo tempo de geração para produzir uma única seleção melhorada. A partir do século XXI, devido a avanços nos conhecimentos dos métodos de biologia celular e molecular, o milho tem sido alvo de transformações genéticas diretas para a produção de culturas transgênicas (ANAMI et al., 2010).

Entretanto o sucesso na transformação estável de culturas de milho é dependente de um protocolo capaz de regenerar plantas completas. A técnica de cultura de tecido, a partir de células embriogênicas para formar calos com competência para regenerar plantas, tem sido um dos pré-requisitos para a obtenção de plantas de milho geneticamente modificadas. Isto porque, muitos genótipos de milho são extremamente recalcitrantes (resistente sob qualquer condição imposta) a resposta *in vitro* (AHMADABADI et al., 2007; ZHONG et al., 2011). Para obter plantas transgênicas, o gene é introduzido em células totipotentes (por exemplo, culturas de calos), e a regeneração quando ocorre é intermediada por essas células. A embriogênese indireta tem sido o processo morfogenético de preferência na regeneração de plantas transgênicas (FRAME et al., 2002, 2006, 2011; HUANG & WEI, 2004; ISHIDA et al., 2007; VEGA et al., 2008; ZHONG et al., 2011).

Segundo González et al. (2012), há mais de 20 anos a embriogênese somática *in vitro* que envolve o estabelecimento de um explante na cultura, proliferação de calos e iniciação da formação de embriões somáticos, tem sido o método mais adequado para a cultura de tecido, regeneração e transformação de milho. A propagação de culturas de células embriogênicas ou meristemática a partir de embriões imaturos de milho permitiram a resposta *in vitro* antes considerada não possível. Desde a década de 80 do século passado, vários protocolos vêm sendo desenvolvidos para estabelecer a embriogênese somática em genótipos de milho com características de interesse

agronômico. A suspeita inicial, e a posterior constatação de que a indução de calos com potencial para formar embriões somáticos que regeneram plantas é dependente do genótipo, determinou a necessidade de buscar protocolos adequados para cada genótipo de interesse (GREEN & PHILIPS, 1975; GREEN, 1982). As investigações vêm sendo realizadas por vários grupos de pesquisadores e na presente revisão de literatura, os protocolos desenvolvidos foram organizados, no sentido de: *a*) registrar a evolução dos procedimentos empíricos que têm sido adotados para induzir embriogênese somática e regenerar plantas *in vitro* de genótipos promissores para o melhoramento, *b*) avaliar a eficiência dos protocolos que foram usados, e *c*) selecionar um ou mais protocolos promissores para investimentos futuros, com genótipos de interesse para o melhoramento. Selecionar um ou alguns protocolos mais eficientes para promover a embriogênese somática e regenerar plantas de milho, é um alvo que deve contribuir para o melhoramento de milho no Brasil, favorecendo a transferência de genes e o desenvolvimento de variedades geneticamente modificadas de milho.

## HISTÓRICO

O sucesso relativo da cultura de tecidos para regeneração de plantas monocotiledôneas, a exemplo do milho, foi possível somente a partir do uso de tecidos meristemáticos e embriogênicos como explantes (GREEN & PHILLIPS, 1975; ARMSTRONG & GREEN, 1985; DUNCAN et al., 1985; SONGSTAD et al., 1992). A partir de então tem se buscado constantemente avanços na área da cultura de tecido em milho, onde o alvo principal de muitos pesquisadores é regenerar plantas dessa espécie *in vitro*. A Tabela 1 contém a relação de autores que utilizaram diferentes tipos de meios de cultura para induzir, cultivar calos, e regenerar plantas de vários genótipos de milho.

Os trabalhos iniciais de regeneração em milho foram realizados por Green & Phillips (1975); esses autores utilizaram o embrião imaturo da linhagem americana A188 e desenvolveram uma planta adulta. Esse resultado, entretanto foi restrito, pois poucos genótipos

considerados linhagens elite, respondem às mesmas condições experimentais utilizadas na propagação da linhagem A188, considerada de pouco valor agrônomo, mas com alta capacidade de regeneração. Estas evidências indicaram que o potencial para regenerar plantas de milho era dependente do genótipo.

A identificação de genótipos de milho com capacidade de regeneração de plantas e que respondem favoravelmente às condições dos meios de cultura, somente tornou-se possível com a utilização de explantes responsivos para iniciação de calos. Os primeiros e mais apropriados explantes em milho, com essa finalidade, foram os embriões imaturos. Dentre outros explantes empregados, sem sucesso, encontram-se: embriões maduros (HUANG & WEI, 2004; JIA et al., 2009; ABEBE et al., 2008), regiões nodais (VLADIMIR et al., 2006), tecidos foliares (CONGER et al., 1987; ZHANG et al., 1996; AHMADABADI et al., 2007), anteras (TING et al., 1981; BARLOY & BECKERT, 1993; HE et al., 2006), pendão (ZHONG et al., 1992; GRANDO et al., 2013) protoplastos (MOROCZ et al., 1990) e brotos meristemáticos (SAIRAM et al., 2003; LI et al., 2004; CHEN et al., 2006). Assim, os embriões imaturos ainda continuam sendo considerados os mais eficientes explantes dentre os demais explantes testados, para a formação de

calos embriogênicos e regenerantes em milho (RAKSHIT et al., 2010).

Ao se inocular embriões imaturos de milho em meio de cultura, há a possibilidade de se formar dois tipos de calos embriogênicos: o tipo I, compacto, e o tipo II, friável de rápido crescimento e com alta capacidade para regeneração. A frequência de indução do calo tipo II é baixa, sendo genótipo específica e dependendo da composição do meio de cultura (EL-ITRIBY et al., 2003).

Também, a formação de calos tipo II tem sido atribuída a influência da orientação dos embriões imaturos no meio de cultura. Comumente é adotada por diversos autores a técnica de colocar o embrião com o eixo embrionário em contato com o meio de cultura, desta forma os calos embriogênicos são efetivamente formados a partir do escutelo (BOHOROVA et al., 1995; CARVALHO et al., 1997; SANTOS-SEREJO & AGUIAR PERECIN, 2000; FRAME et al., 2002; EL-ITRIBY et al., 2003; HUANG & WEI, 2004; JEDIDAH et al., 2006; DANSON et al., 2006; ODUOR et al., 2006; BINOTT et al., 2008; OMBORI et al., 2008; ANAMI et al., 2010; GONZÁLEZ et al., 2012). Segundo registros de Prioli & Silva (1989), os calos embriogênicos iniciados a partir do escutelo, são caracterizados por apresentar inúmeros pró-embriões ou embriões somáticos na superfície do calo que tendem a ter alta capacidade para regeneração.

**TABELA 1** – Relação de autores que utilizaram diferentes tipos de meios de cultura para induzir, cultivar calos, e regenerar plantas de vários genótipos de milho.

| MS                   | N6                      | N6/MS                                | LS/MS               | N6/B5       |
|----------------------|-------------------------|--------------------------------------|---------------------|-------------|
| Bedada et al. (2011) | Fernandes et al. (2008) | Prioli & Silva (1989)                | Anami et al. (2010) | Huang & Wei |
| Gorji et al. (2011)  | Zhong et al. (2011)     | Carvalho et al. (1997)               | Abebe et al. (2008) | (2004)      |
| Jia et al. (2009)    |                         | Santos-Serejo & Aguiar Percin (2000) |                     |             |
|                      |                         | El-Itriby et al. (2003)              |                     |             |
|                      |                         | Danson et al. (2006)                 |                     |             |
|                      |                         | Ortiz et al. (2007)                  |                     |             |
|                      |                         | Ombori et al. (2008)                 |                     |             |
|                      |                         | Petrillo et al. (2008)               |                     |             |
|                      |                         | Binott et al. (2008)                 |                     |             |
|                      |                         | Vasconcelos et al. (2009)            |                     |             |
|                      |                         | Manivannan et al. (2010)             |                     |             |
|                      |                         | Rakshit et al. (2010)                |                     |             |
|                      |                         | Oneto et al. (2011)                  |                     |             |
|                      |                         | González et al. (2012)               |                     |             |

MS: Murashige & Skoog (1962); N6: Chu et al. (1975); LS: Linsmaier & Skoog (1965); B5: Gamborg et al. (1968).

No período de 1982 a 1987, os trabalhos bem sucedidos de indução de calos, friáveis e regeneráveis que formavam embriões foram limitados à linhagem A188, e aos híbridos provindos dela, tais como o híbrido comercial Decalb XL82 (VASIL & VASIL, 1986) e o híbrido B73 (WANG, 1987). Após este período, os trabalhos subsequentes visavam a busca de novos genótipos com tais características. Dentre esses destaca-se o de Prioli & Silva (1989), que testaram a capacidade de formação de calos tipo II, em 35 linhagens, sendo 11 provenientes do germoplasma cateto (Cat) das quais 8 produziram calos friáveis com capacidade regenerativa, e 14 linhagens derivadas do genótipo Tuxpeño das quais apenas duas apresentaram essas características (Tabela 2).

Desde então, com os avanços da pesquisa nessa área tem-se identificado novos genótipos factíveis a indução da embriogênese somática. Carvalho et al. (1997) observaram que dentre 134 linhagens testadas, apenas três do tipo Cateto, e duas da população BR105 e BR112, apresentaram um bom desempenho para a formação de calos tipo II e subsequente regeneração da planta de milho. Shohael et al. (2003), trabalharam com três linhagens (CML-161, CML-326 e CML-327) e obtiveram a maior taxa de calos embriogênicos e regenerantes para uma delas (CML-161), e em menor taxa para as demais linhagens. Da mesma forma El-Itriby et al. (2003) analisaram cinco linhagens elite de milho Egypcio (Sd62, Gz21D, Sd7, Gz643 e Gz624) e estabeleceram a capacidade de formar calos tipo II em todas elas, mas a maior taxa foi detectada em Gz643 e a menor taxa em Sd7, as quais regeneraram 42,43% e 5,62% respectivamente. Outro registro foi feito por Bedada et al. (2011) com milhos tropicais da Etiópia; os autores analisaram cinco linhagens e obtiveram melhores resultados em relação à indução de calos tipo II e regeneração para duas linhagens {Melkassa 6(Q) e [CML 327 x CML176]-B-B-2-3-2-B (QPM)}. A Tabela 2 mostra a avaliação da indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas em diferentes genótipos estudados por vários autores no período de 1989 a 2012.

Alguns requisitos considerados essenciais para a produção de calos embriogênicos, em especial calos do tipo II, e maior potencial de obtenção de plantas foram estabelecidos por Narayanaswamy (1959), Norstog (1961, 1970), Narayanaswamy & Norstog (1964), e Raghavan (1976). Estes requisitos relacionam as características que determinam a melhor resposta do embrião, tais como: (a) o vigor e sanidade das plantas doadoras, o estágio de desenvolvimento e condição fisiológica do embrião, (b) o meio de cultura com alta concentração de sais, nutrientes, reguladores de crescimento e aminoácidos e (c) a importância da orientação física do embrião no meio nutritivo (iniciação do calo a partir do escutelo exposto) para o desenvolvimento de embriões somáticos. A otimização dessas variáveis aliado ao estabelecimento de protocolos eficientes de regeneração, têm sido o objetivo de vários trabalhos de pesquisa. Assim, os protocolos são adaptados continuamente procurando-se estabelecer as condições adequadas, aliado à seleção de genótipos adequados na iniciação de calos embriogênicos e produção de regenerantes.

#### **Explante para indução de calos embriogênicos**

De acordo com Green & Philips (1975), o explante mais apropriado para se iniciar culturas regeneráveis de milho foi o embrião imaturo isolado de sementes, em desenvolvimento, com 11 a 14 dias após a polinização, com o comprimento variando de 1,0 a 2,0 mm. Subsequentemente, vários autores (BRONSEMA et al., 1997; SANTOS-SEREJO & AGUIAR PERECIN, 2000; EL-ITRIBY et al., 2003; KRAKOWSKY et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2009; BINOTT et al., 2008; RAKSHIT et al., 2010) foram adaptando seus protocolos, com coleta dos embriões imaturos variando entre o mínimo 10 e máximo de 24 dias após a polinização (PRIOLI & SILVA, 1989; KEMPER et al., 1996; CARVALHO et al., 1997; SANTOS-SEREJO & AGUIAR PERECIN, 2000; ORTIZ-VALTEZ et al., 2007; OMBORI et al., 2008; FERNANDES et al., 2008; RAKSHIT et al., 2010; ANAMI et al., 2010; DÉCIMA et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2012). Esses autores também constataram que

a variação do período de dias em que os embriões são coletados, após ocorrer polinização, depende da região geográfica em que a planta doadora se desenvolve, do seu vigor fenotípico, da época do ano em que se faz a coleta, e dos ciclos das gerações que foram utilizadas no experimento.

No que se refere ao tamanho dos embriões, Zhong et al. (2011) mostraram que embriões de tamanhos menores que 1,0 mm não respondem ou atrasam a indução de calos, e que os embriões maiores que 2 a 3 mm os calos gradualmente crescem mas, tornam-se moles, escuros e morrem.

**TABELA 2** – Avaliação da indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas em diferentes genótipos estudados por vários autores e os suplementares adicionais contidos nos meios de cultura (MC) utilizados.

| Genótipos      | MC | 2,4-D<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Dicamba<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Indução | Regeneração | Referência            |
|----------------|----|--------------------------------|----------------------------------|---------|-------------|-----------------------|
| Cat 100-1      | N6 | 2,2                            |                                  | +       | +           | Prioli & Silva (1989) |
| Cat 100-2      |    |                                |                                  | +       | +           |                       |
| Cat100-3       |    |                                |                                  | +       | +           |                       |
| Cat100-3       |    |                                |                                  | +       | +           |                       |
| Cat100-4       |    |                                |                                  | +       | +           |                       |
| Cat100-5       |    |                                |                                  | +       | +           |                       |
| Cat100-6       |    |                                |                                  | +       | +           |                       |
| Cat100-7       |    |                                |                                  | +       | +           |                       |
| Cat100-8       |    |                                |                                  | +       | +           |                       |
| Cat85-1        |    |                                |                                  | +       | -           |                       |
| Cat 85-2       |    |                                |                                  | +       | -           |                       |
| Cat 85-3       |    |                                |                                  | -       | -           |                       |
| Eto-1          |    |                                |                                  | +       | -           |                       |
| TuxTe 50-1     |    |                                |                                  | -       | -           |                       |
| TuxTe 50-2     |    |                                |                                  | +       | -           |                       |
| TuxTe 50-3     |    |                                |                                  | +       | -           |                       |
| TuxTe 50-4     |    |                                |                                  | +       | -           |                       |
| Ast-1          |    |                                |                                  | +       | -           |                       |
| TuxPc-1        |    |                                |                                  | +       | -           |                       |
| Tux Pc-1 suo 2 |    |                                |                                  | -       | -           |                       |
| Cyd-1          |    |                                |                                  | +       | -           |                       |
| Tux Mo-1       |    |                                |                                  | -       | -           |                       |
| Tux 100- 1     |    |                                |                                  | +       | -           |                       |
| Tux 100-2      |    |                                |                                  | -       | -           |                       |
| Tux 100-3      |    |                                |                                  | -       | -           |                       |
| Tux 100-4      |    |                                |                                  | -       | -           |                       |
| Tux 100-5      |    |                                |                                  | -       | -           |                       |
| Tux 100-6      |    |                                |                                  | -       | -           |                       |
| Tux 100-7      |    |                                |                                  | -       | -           |                       |
| Tux 100-8      |    |                                |                                  | -       | -           |                       |
| Tux 100-9      |    |                                |                                  | -       | -           |                       |
| Tux 100-10     |    |                                |                                  | +       | -           |                       |
| Tux 100-11     |    |                                |                                  | -       | -           |                       |
| Tux 100-12     |    |                                |                                  | -       | -           |                       |
| Tux 100-13     |    |                                |                                  | -       | +           |                       |

Continua...

**TABELA 2** – Continuação...

| Genótipos          | MC    | 2,4-D<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Dicamba<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Indução | Regeneração | Referência                            |
|--------------------|-------|--------------------------------|----------------------------------|---------|-------------|---------------------------------------|
| 13342/2            | N6    | 1,0                            |                                  | +       | +           | Santos-Serejo & Aguiar-Perecin (2000) |
| 13342/5            |       |                                |                                  | +       | +           |                                       |
| 132331/1           |       |                                |                                  | +       | +           |                                       |
| 13342/2 x 13342/5  |       |                                |                                  | +       | +           |                                       |
| 13342/2 x 132331/1 |       |                                |                                  | +       | +           |                                       |
| 132331/1 x 3342/5  |       |                                |                                  | +       |             |                                       |
| CML-161            | N6/MS | 1,0                            |                                  | +/+     | +           | Shohael et al. (2003)                 |
| CML-323            |       |                                |                                  | +/+     | +           |                                       |
| CML-327            |       |                                |                                  | +/+     | +           |                                       |
| Sd62               | N6    | 1,0/2,0                        |                                  | +       | +           | El-Itriby et al. (2003)               |
| G221D              |       |                                |                                  | +       | +           |                                       |
| Sd7                |       |                                |                                  | +       | +           |                                       |
| Gz643              |       |                                |                                  | +       | +           |                                       |
| Gz624              |       |                                |                                  | +       | +           |                                       |
| CML202             | N6    |                                | 2,0                              | S/D     | -           | Danson et al. (2006)                  |
| CML395             |       |                                |                                  | S/D     | -           |                                       |
| CML442             |       |                                |                                  | S/D     | -           |                                       |
| CML444             |       |                                |                                  | S/D     | -           |                                       |
| POOL A6-3          |       |                                |                                  | +       | -           |                                       |
| CMB7               |       |                                |                                  | +       | +           |                                       |
| CMB8               |       |                                |                                  | +       | +           |                                       |
| CMB9               |       |                                |                                  | S/D     | -           |                                       |
| CMB17              |       |                                |                                  | +       | +           |                                       |
| CMB19              |       |                                |                                  | S/D     | -           |                                       |
| CMB20              |       |                                |                                  | S/D     | -           |                                       |
| CMB21              |       |                                |                                  | +       | +           |                                       |
| CMB10              |       |                                |                                  | S/D     | -           |                                       |
| CMB11              |       |                                |                                  | S/D     | -           |                                       |
| J115               |       |                                |                                  | S/D     | -           |                                       |
| CMB16              |       |                                |                                  | S/D     | -           |                                       |
| J118               |       |                                |                                  | S/D     | -           |                                       |
| CMB5               |       |                                |                                  | +       | -           |                                       |
| CMB6               |       |                                |                                  | S/D     | -           |                                       |
| CMB12              |       |                                |                                  | S/D     | -           |                                       |
| CMB13              |       |                                |                                  | S/D     | -           |                                       |
| CMB14              |       |                                |                                  | S/D     | -           |                                       |
| LPC13              | N6    | 2,0                            |                                  | +       | +           | Ortiz et al. (2007)                   |
| 87014 x Z28-11     | N6/MS | 2,0                            |                                  | +       | N/T         | Usman et al. (2007)                   |
| POP48SRS5-57       |       |                                |                                  | +       | N/T         |                                       |
| L3                 | N6    |                                | 3,3                              | +       | +           | Petrillo et al. (2008)                |
| L1345              |       |                                |                                  | +       | +           |                                       |
| TL08               | N6    | 2,0                            |                                  | +       | -           | Binott et al. (2008)                  |
| TL09               |       |                                |                                  | +       | -           |                                       |
| TL18               |       |                                |                                  | +       | +           |                                       |
| TL19               |       |                                |                                  | +       | +           |                                       |

Continua...

TABELA 2 – Continuação...

| Genótipos                            | MC    | 2,4-D<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Dicamba<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Indução | Regeneração | Referência                |
|--------------------------------------|-------|--------------------------------|----------------------------------|---------|-------------|---------------------------|
| TL20                                 |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| TL21                                 |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| TL22                                 |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| TL23                                 |       |                                |                                  | +       | +           |                           |
| TL24                                 |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| TL25                                 |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| TL26                                 |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| TL27                                 |       |                                |                                  | +       | +           |                           |
| TH24                                 |       |                                |                                  | +       | +           |                           |
| TH25                                 |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| TH26                                 |       |                                |                                  | +       | +           |                           |
| TH27                                 |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| TL18                                 | N6    | 1,5                            |                                  | +       | +           | Ombori et al. (2008)      |
| TL27                                 |       | 2,0                            |                                  | +       | +           |                           |
| MU25                                 |       | 2,5                            |                                  | +       | +           |                           |
| CML216                               |       | 1,5                            |                                  | +       | +           |                           |
| CML78                                |       | 2,0                            |                                  | +       | +           |                           |
| CML331                               |       | 2,0                            |                                  | -       | -           |                           |
| CMS477BC <sub>4</sub> F <sub>2</sub> | N6    |                                | 3,3 / 6,6                        | +       | +           | Vasconcelos et al. (2009) |
| HGZ-A04                              |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| HGZ-A05                              |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| HGZ-A08                              |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| HGZ-A09                              |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| HGZ-A10                              |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| HGZ-A15                              |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| HGZ-A17                              |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| HGZ-A18                              |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| CML216                               | LS/N6 | 1,0/1,5                        |                                  | +/+     | +           | Anami et al. (2010)       |
| CML244                               |       |                                |                                  | +/+     | +           |                           |
| TL26                                 |       |                                |                                  | +/+     | -           |                           |
| CML216 X TL26                        |       |                                |                                  | N/T     | +           |                           |
| CML244 X TL26                        |       |                                |                                  | N/T     | +           |                           |
| CM111                                | MS/N6 | 1,0                            | 2,0                              | +/+     | -           | Rakshit et al. (2010)     |
| CM117                                |       |                                |                                  | +/+     | -           |                           |
| CM124                                |       |                                |                                  | +/+     | +           |                           |
| CM125                                |       |                                |                                  | +/+     | -           |                           |
| CM300                                |       |                                |                                  | +/+     | +           |                           |
| HKI1105                              | N6    | 2,0                            |                                  | +       | +           | Manivannan et al. (2010)  |
| HKI335                               |       |                                |                                  | +       | +           |                           |
| HKI126                               |       |                                |                                  | +       | +           |                           |
| LM5                                  |       |                                |                                  | +       | +           |                           |
| CM300                                |       |                                |                                  | +       | +           |                           |
| LP236                                | N6    | 2,0                            |                                  | +       | -           | González et al. (2011)    |
| LP214                                |       |                                |                                  | +       | -           |                           |
| LP2542                               |       |                                |                                  | +       | +           |                           |
| LP179                                |       |                                |                                  | +       | -           |                           |

Continua...

TABELA 2 – Continuação...

| Genótipos  | MC | 2,4-D<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Dicamba<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Indução | Regeneração | Referência           |
|------------|----|--------------------------------|----------------------------------|---------|-------------|----------------------|
| LP1513     |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP122-2    |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP918      |    |                                |                                  | -       | -           |                      |
| LP612      |    |                                |                                  | +       | +           |                      |
| LP299-2    |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP2        |    |                                |                                  | +       | +           |                      |
| LP917      |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP221      |    |                                |                                  | +       | +           |                      |
| LP613      |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP605      |    |                                |                                  | +       | +           |                      |
| LP562      |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP563      |    |                                |                                  | -       | -           |                      |
| LP463      |    |                                |                                  | +       | +           |                      |
| LP125-r    |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP317      |    |                                |                                  | +       | +           |                      |
| LP438      |    |                                |                                  | -       | -           |                      |
| LP126      |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP1411     |    |                                |                                  | -       | -           |                      |
| LP4703     |    |                                |                                  | +       | +           |                      |
| LP561      |    |                                |                                  | +       | +           |                      |
| LP1512     |    |                                |                                  | +       | +           |                      |
| LP509      |    |                                |                                  | +       | +           |                      |
| LP1032     |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP199      |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP59       |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP521      |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP256-r    |    |                                |                                  | +       | +           |                      |
| LP662      |    |                                |                                  | -       | -           |                      |
| LP3830     |    |                                |                                  | -       | -           |                      |
| LP579      |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP5708     |    |                                |                                  | +       | +           |                      |
| LP311      |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP124      |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP915      |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LPB1       |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LPB2       |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP869      |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| LP1044     |    |                                |                                  | +       | +           |                      |
| LP197      |    |                                |                                  | -       | -           |                      |
| LP13       |    |                                |                                  | -       | -           |                      |
| LP147      |    |                                |                                  | -       | -           |                      |
| BLS61      |    |                                |                                  | +       | -           |                      |
| BLS91      |    |                                |                                  | +       | +           |                      |
| B1101      |    |                                |                                  | -       | -           |                      |
| Melkassa-2 | MS | 1,5                            |                                  | +       | +           | Bedada et al. (2011) |
| Melkassa-4 |    | 1,0                            |                                  | +       | +           |                      |



TABELA 2 – Continuação...

| Genótipos                             | MC | 2,4-D<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Dicamba<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Indução | Regeneração                     | Referência          |
|---------------------------------------|----|--------------------------------|----------------------------------|---------|---------------------------------|---------------------|
| Melkassa-6Q                           |    | 1,0                            |                                  | +       | +                               |                     |
| [CML312/CML206]                       |    | 1,0                            |                                  | -       | -                               |                     |
| B-3-2-1-1-1                           |    |                                |                                  |         |                                 |                     |
| [CML387/CML176]-<br>B-B-2-3-2-B [QPM] |    | 2,5                            |                                  | +       | +                               |                     |
| W21019                                | N6 | 3,0                            |                                  | +       | + (0,5 mg L <sup>-1</sup> 6-BA) | Zhong et al. (2011) |
| B7                                    |    | 2,0                            |                                  | +       | + (1 mg L <sup>-1</sup> 6-BA)   |                     |
| QCL5036                               |    | 2,0                            |                                  | +       | + (1,5 mg L <sup>-1</sup> 6-BA) |                     |
| B73                                   | N6 | 2,0                            |                                  | +       | -                               | Gorji et al. (2011) |
| Oh28                                  |    | 2,0                            |                                  | +       | -                               |                     |
| Va35                                  |    |                                | 2,0                              | +       | +                               |                     |
| Gss0966                               |    |                                | 2,0                              | +       | -                               |                     |
| Vog134                                |    |                                | 1,0                              | +       | +                               |                     |
| Hi34                                  |    |                                | 1,0                              | +       | -                               |                     |
| 222F                                  | MS | 3,0                            |                                  | +       | N/T                             | Omer et al. (2012)  |
| Hudiba-1                              |    | 1,5                            |                                  | +       | N/T                             |                     |
| 441                                   |    | 2,5                            |                                  | +       | N/T                             |                     |
| Giza-2                                |    | 2,5                            |                                  | +       | N/T                             |                     |
| PR5655                                |    | 1,5                            |                                  | +       | N/T                             |                     |
| Mojitamma-45                          |    | 1,5                            |                                  | +       | N/T                             |                     |

N6: Meio formulado por Chu et al. (1975). MS: Meio formulado por Murashige and Skoog (1962). LS: Meio formulado por Linsmaier e Skoog (1965); Indução de calos e regeneração de plantas (+); ausência de indução de calos e plantas regeneráveis (-). S/D: Dados não mostrados na referência. N/T: não testados; 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; Dicamba: 3,6-dicloro-2-ácido metoxybenzoico; <sup>(\*)</sup>(1,5 mg L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>: Nitrato de prata; 6-BAP: 6- benziladenina.

### Componentes do meio nutritivo

Os componentes do meio de cultura são fatores decisivos para a obtenção de calos competentes para regeneração (NEUMANN et al., 2009). Os componentes essenciais incluem os sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e fitorreguladores. Demais componentes, tais como aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas, inibidores da biossíntese ou ação do etileno podem ser incluídas no meio para otimizar determinada resposta.

### Nutrição mineral

Os macro e micro nutrientes são essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta por terem função importante na fisiologia, bioquímica e metabolismo, devendo ser incluídos na composição dos meios de cultura (BEYL, 2004). São várias as formulações de sais minerais empregadas na propagação *in vitro* de plantas.

Zhong et al. (2011) relatam que em milho, para a iniciação de calos e regeneração de plantas têm sido usadas as formulações MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), N6 (CHU et al., 1975), combinações de N6/B5 (DUNCAN et al., 1985) e LS (LINSMAIER & SKOOG, 1965). Embora não exista um padrão, as formulações N6 (CHU et al., 1975) e MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com algumas modificações, têm sido as recomendadas com maior frequência para indução de calo, manutenção de calo, indução de embriões e regeneração em genótipos distintos de milho (Tabela 1).

Shohael et al. (2003) e Rakshit et al. (2010) avaliaram comparativamente dois meios (MS e N6) quanto a capacidade de indução e formação de calos embriogênicos e regeneração de plantas de milho em três linhagens (CML-161, CML- 323 e CML-327) e cinco linhagens (CM111, CM117, CM124, CM125, CM300)

(Tabela 2). Nestes estudos os autores identificaram que o meio N6 foi mais adequado na indução de calo para a maioria dos genótipos. Para o genótipo CM125 de milho, Rakshit et al. (2010) observaram que a indução e formação de calo foi melhor em meio MS. Para a fase de regeneração o meio MS foi o mais adequado para todos os genótipos investigados por esses autores (Tabela 2). Esses estudos evidenciam a dependência do genótipo na resposta aos diferentes meios de cultura.

### Nutrição orgânica

Dentre os compostos orgânicos importantes na indução de calo embriogênico em milho destacam-se os carboidratos, vitaminas, aminoácidos e amidas, hexitóis, substâncias reguladoras do crescimento e substâncias orgânicas complexas. As variações das concentrações desses compostos têm mostrado suas influências nas diferentes fases da embriogênese somática (KEMPER et al., 1996). Por exemplo, na Tabela 3 são apresentados alguns suplementos incluídos na formulação dos meios N6 e MS.

### Carboidratos

A sacarose tem sido utilizada como fonte de carboidratos no meio de cultivo, em razão de certas características, como alta solubilidade e rápida metabolização pela maioria das células vegetais (THORPE & BEAUDOIN-EAGAN, 1984). Além da importância como fonte de glicose, a sua concentração efetiva tem grande influência nos processos de cultivo *in vitro*. Na fase inicial da cultura de calos em milho, as concentrações de sacarose empregadas entre 2% e 3% são as mais efetivas para o desenvolvimento dos calos. Após 15 a 20 dias no meio de indução de calos, os calos são transferidos para o meio de manutenção, e nesta segunda fase a concentração de sacarose é duplicada na maioria dos protocolos, passando de 3% para 6%.

Em contraste com estas indicações, os experimentos de Prioli & Silva (1989) mostraram que a indução de calos opacos e friáveis embriogênicos em algumas linhagens de milho derivadas de germoplasma tropical foi maior (5% a 10% mais frequente) em meio contendo 6% de sacarose, e

que 3% de sacarose foi a concentração mais adequada para a manutenção destes calos após os primeiros subcultivos. Por outro lado, para três das 34 linhagens tropicais avaliadas (Cat100-6, Cat100-8, e TuxMo-1) pelos referidos investigadores, a frequência de indução de calos friáveis embriogênicos foi maior em meio contendo 3% de sacarose (PRIOLI & SILVA, 1989). Estes experimentos indicaram que a concentração de sacarose é um fator limitante para a indução de calos e que pode ser diferente dependendo do genótipo de milho avaliado. Em outras nove linhagens de milho tropical, Vasconcelos et al. (2009) utilizaram a mesma concentração de sacarose (3%) para a indução e manutenção dos calos, enquanto que para 11 outros genótipos (linhagens e híbridos) a indução e manutenção de calos embriogênicos em uma linhagem (LD82025) e em dois híbridos (CD308 e CML314) foi descrita em meio contendo apenas 2% de sacarose (FERNADES et al., 2008). Para uma linhagem elite de milho tropical, Gonçalves et al. (2010) usou 3% de sacarose para indução e manutenção dos calos e duplicou a concentração para a regeneração.

### Substâncias reguladoras de crescimento

Com relação a inclusão no meio de substâncias reguladoras de crescimento as mais utilizadas na indução de calo embriogênico em milho são o 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) e dicamba (3,6-dicloro-2-ácido metoxybenzoico). Na maioria dos trabalhos de cultivo *in vitro* é comum testar diferentes concentrações de 2,4-D e dicamba para otimizar as concentrações na indução de calos em um determinado genótipo (Tabela 4).

Meio desprovido de auxina ou com alta concentração prejudicam a iniciação do calo (SHOHAEL et al., 2003; OMBORI et al., 2008; RAKSHIT et al., 2010; MANIVANNAN et al., 2010; BEDADA et al., 2011; ZHONG et al., 2011; GORJI et al., 2011; OMER et al., 2012). Concentrações de 1,0 a 3,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D foram as mais adequadas para induzir calos em diferentes genótipos de *Zea mays* (Tabela 5); concentrações menores do que 1,0 e maiores que 5,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D não foram efetivas para a indução de calos nos genótipos analisados.

**TABELA 3** – Suplementos adicionais nos meios de cultivo N6 e MS, para indução e manutenção de calos de *Zea mays*.

| Suplemento          | Concentração (mg L <sup>-1</sup> ou g L <sup>-1</sup> ) | Referência  |
|---------------------|---|---|
| Sacarose            | 20; 30 e 60 g L <sup>-1</sup>                           | Prioli e Silva, (1989)<br>Santos e Serejo et al. (2000)<br>El-Itriby et al. (2003)<br>Danson et al. (2006)<br>Usman et al. (2007)<br>Ortiz et al. (2007)<br>Petrillo et al. (2008)<br>Binott et al. (2008)<br>Ombori et al. (2008)<br>Vasconcelos et al. (2009); Anami et al. (2010)<br>Rakshit et al. (2010)<br>Manivannan et al. (2010)<br>González et al. (2011)<br>Zhong et al. (2011)<br>Gorji et al. (2011)<br>Bedada et al. (2011)<br>Omer Rasha et al. (2012) |
| L-Prolina           | 2,3 mg L <sup>-1</sup> – 2,3 g L <sup>-1</sup>          | Santos e Serejo et al. (2000); Shohael et al. (2003)<br>El-Itriby et al. (2003)<br>Danson et al. (2006)<br>Ortiz et al. (2007)<br>Ombori et al. (2008)<br>Vasconcelos et al. (2009)<br>Rakshit et al. (2010)<br>Anami et al. (2010)<br>Gorji et al. (2011)<br>González et al. (2011)<br>Bedada et al. (2011)<br>Zhong et al. (2011)<br>Omer Rasha et al. (2012)   |
| Caseína Hidrolisada | 100; 200 e 220 mg L <sup>-1</sup>                       | Shohael et al. (2003)<br>Danson et al. (2006)<br>Ortiz et al. (2007)<br>Ombori et al. (2008)<br>Anami et al. (2010)<br>Rakshit et al. (2010)<br>Bedada et al. (2011)<br>González et al. (2011)<br>Zhong et al. (2011)<br>Gorji et al. (2011)<br>Omer Rasha et al. (2012)  |
| Nitrato de Prata    | 0,85 – 10, 15 e 20 mg L <sup>-1</sup>                   | El-Itriby et al. (2003)<br>Danson et al. (2006)<br>Ortiz-Valdez et al. (2007); Ombori et al. (2008)<br>Vasconcelos et al. (2009); Anami et al. (2010)<br>Rakshit et al. (2010)<br>Bedada et al. (2011)<br>Zhong et al. (2011)<br>Gorji et al. (2011)<br>Omer et al. (2012)<br>González et al. (2012)  |
| Mio-inositol        | 100 mg L <sup>-1</sup>                                  | Zhong et al. (2011)   |
| MES                 | 0,01 e 0,5 g L <sup>-1</sup>                            | Vasconcelos et al. (2009)<br>Anami et al. (2010)  |

MES: Ácido 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic.

**TABELA 4** – Relação de autores e concentrações de 2,4-D e Dicamba utilizadas na indução de calo em determinados genótipos.

| Referência                                   | Concentrações de 2,4-D ou Dicamba (mg L <sup>-1</sup> )                          |
|--|--|
| Prioli & Silva (1989)                        | 0,5 e 2,2 ( 2,4 -D)  |
| Santos-Serejo & Aguiar-Perecin et al. (2000) | 1,0 e 0,5 (2,4-D)  |
| Shohael et al. (2003)                        | 1,0 (2,4-D)  |
| El-Itriby et al. (2003)                      | 1,0 e 2,0 (2,4-D)  |
| Danson et al. (2006)                         | 2,0 (Dicamba)  |
| Ortiz et al. (2007)                          | 2,0 (2,4-D)  |
| Ombori et al. (2008)                         | 0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1; 1,5; 2; 2,5; 5; 10; 15 e 20 (2,4-D)               |
| Vasconcelos et al. (2009)                    | 3,3 e 6,6 (Dicamba)  |
| Anami et al. (2010)                          | 2,0 e 1,5 (2,4-D)  |
| Rakshit et al. (2010)                        | 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 (2,4-D em-MS)<br>1,0; 2,0; 3,0; 4,0 (Dicamba em N6)           |
| Manivannan et al. (2010)                     | 1,0; 2,0; 3,0 (2,4-D); 1,0; 2,0; 3,0 (Dicamba)                                   |
| González et al. (2012)                       | 2,0 (2,4-D)  |
| Bedada et al. (2011)                         | 1,0; 1,5 e 2,0 (2,4-D)   |
| Zhong et al. (2011)                          | 0; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 3,5 (2,4-D)  |
| Gorji et al. (2011)                          | 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 (2,4-D em MS)<br>1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 (Dicamba em N6) |
| Omer et al. (2012)                           | 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 10,0 (2,4-D)                          |

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; Dicamba: 3,6-dicloro-2-ácido metoxybenzoico.

**TABELA 5** – Variações de concentração dos reguladores de crescimento (2,4-D ou Dicamba) que estimularam a indução de calos embriogênicos em genótipos específicos.

| Referência           | 2,4-D (mg L <sup>-1</sup> ) | Dicamba (mg L <sup>-1</sup> ) | Genótipos    |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------|
| Ombori et al. (2008) | 1,5                         |                               | TL18         |
|                      | 2,0                         |                               | TL27         |
|                      | 2,5                         |                               | MU25         |
| Bedada et al. (2011) | 1,5                         |                               | CML216       |
|                      | 2,0                         |                               | CML78        |
|                      | 1,5                         |                               | Melkassa-2   |
|                      | 1,0                         |                               | Melkassa-4   |
| Zhong et al. (2011)  | 1,0                         |                               | Melkassa-6Q  |
|                      | 3,0                         |                               | W21019       |
|                      | 2,0                         |                               | B7           |
| Gorji et al. (2011)  | 2,0                         |                               | QCL5036      |
|                      | 2,0                         |                               | B73          |
|                      | 2,0                         |                               | Oh28         |
|                      |                             | 2,0                           | Va35         |
|                      |                             | 2,0                           | Gss0966      |
|                      |                             | 1,0                           | Vog134       |
| Omer et al. (2012)   |                             | 1,0                           | Hi34         |
|                      | 3,0                         |                               | 222F         |
|                      | 1,5                         |                               | Hudiba-1     |
|                      | 2,5                         |                               | 441          |
|                      | 2,5                         |                               | Giza-2       |
|                      | 0,5; 1 e 1,5                |                               | PR5655       |
|                      | 1,5                         |                               | Mojitamma-45 |

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; Dicamba: 3,6-dicloro-2-ácido metoxybenzoico.

### Aminoácidos e proteínas hidrolisadas

Os aminoácidos têm importância na amplificação das respostas morfogênicas proporcionando maior crescimento celular e facilitando sua diferenciação e regeneração (GAMBORG, 1991). Dentre os aminoácidos utilizados na embriogênese somática em milho destacam-se a L-prolina e caseína hidrolisada (fonte de aminoácidos) (Tabela 3).

A L-prolina tem sido citada como um importante indutor de culturas friáveis de calos tipo II (EL-ITRIBY et al., 2003), enquanto que de acordo com os relatos De Lucca (2003), a caseína hidrolisada tem efeito benéfico na capacidade regenerativa na indução e multiplicação de calos embriogênicos somáticos de milho.

Concentrações baixas de L-prolina (2,3 mg L<sup>-1</sup>, por exemplo) e concentrações muito mais elevadas (1000 vezes maior; 2,3 g L<sup>-1</sup>, por exemplo) estão relacionadas como suplementos adicionais nos diversos experimentos divulgados. Enquanto as concentrações de L-prolina se apresentam como marcadamente variáveis (alta ou baixa) nos diversos experimentos, as concentrações de caseína

hidrolisada foram mais estáveis, correspondendo a 100, 200, ou até 220 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 6).

### Inibidores da ação de etileno

Em milho, a suplementação do meio de indução de calo com o nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) tem efeito benéfico na embriogênese somática por estimular a formação de calo tipo II. Esse composto atua na inibição da ação do etileno, hormônio produzido pela cultura in vitro, que prejudica diretamente a obtenção de culturas embriogênicas friáveis (VAIN et al., 1989a, b; SONGSTAD et al., 1991; CARVALHO et al., 1997). As concentrações recomendadas de nitrato de prata são apresentadas na Tabela 7. Huang & Wei (2004) consideraram 10 mg L<sup>-1</sup> a concentração mais adequada de AgNO<sub>3</sub> dentre seis concentrações testadas, enquanto Ortiz-Valdez et al. (2007) recomendam a concentração de 15 mg L<sup>-1</sup> como a mais significativa para o aumento da embriogênese somática e produção de calos tipo II (Tabela 7).

### Condições de incubação

Em geral, as culturas para a indução de calo devem ser mantidas no escuro sob temperatura constante de 25 ± 2 °C (Vasconcelos et al. (2009).

**TABELA 6** – Relação de suplementos adicionais: caseína hidrolisada e L- prolina como fontes de nitrogênio.

| Referências                           | Caseína Hidrolisada<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | L-Prolina<br>(g L <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------------|--|-----------------------------------|
| Santos-Serejo & Aguiar-Perecin (2000) | —  | 1,38                              |
| Shohael et al. (2003)                 | 200  | 2,3                               |
| El-Itriby et al. (2003)               | —  | 2,88                              |
| Danson et al. (2006)                  | 200  | 2,3                               |
| Ortiz et al. (2007)                   | 200  | 0,230                             |
| Ombori et al. (2008)                  | 100  | 0,285                             |
| Vasconcelos et al. (2009)             | —  | 0,288                             |
|                                       |  | 0,690                             |
|                                       |  | 2,878                             |
| Anami et al. (2010)                   | —  | 0,7                               |
| Rakshit et al. (2010)                 | 200  | 2,303                             |
| González et al. (2012)                | 100  | 2,9                               |
| Bedada et al. (2011)                  | 100  | 2,875                             |
| Zhong et al. (2011)                   | 100  | 0,690                             |
| Gorji et al. (2011)                   | 220  | 0,230                             |
| Omer et al. (2012)                    | 100  | 2,875                             |

### **Desenvolvimento dos embriões, conversão em plantas e aclimação**

Após a formação dos calos embriogênicos, as fases seguintes compreendem o desenvolvimento do embrião, conversão em plantas e aclimação. Inicialmente, as culturas embriogênicas devem ser transferidas para meios desprovidos de reguladores de crescimento ou com baixas concentrações destes, suplementados com carboidratos, vitaminas e aminoácidos. O 2,4-D e o Dicamba devem ser substituídos por uma auxina de mais baixa atividade biológica tais como, o ácido 3-indolilacético (AIA) e ácido 3-indolilbutírico (AIB). A citocinina mais usada é a N<sup>6</sup>-benziladenina (6-BA). Também, as culturas devem ser mantidas sob iluminação com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa em torno de 36  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , até a formação das plantas e temperatura de 25±2 °C (VASCONCELOS et al., 2009). Desta maneira os pró-embriões formados desenvolvem-se passando pelos diferentes estádios da embriogênese levando à formação do embrião.

As formulações salinas usadas para desenvolvimento do embrião incluem a MS, MS diluída e N6. A Tabela 8 contém a relação de autores com as respectivas formulações salinas utilizadas no desenvolvimento dos embriões.

Vários trabalhos relatam sobre a importância do balanço entre citocinina e auxina, principalmente 6-BA e AIA, no desenvolvimento dos embriões somáticos e formação de propágulos (Tabela 9). Por exemplo, a interação entre AIA e 6-BA, em doses diferenciadas, foi considerada por Gorji et al. (2011) como um fator determinante na indução de brotos em diferentes genótipos tropicais de milho. A utilização desta combinação foi descrita também nos trabalhos de Bohorova et al. (1995), Ortiz-Valdez et al. (2007), Manivannan et al. (2010) e Rakshit et al. (2010) (Tabela 9).

Alguns investigadores consideram a etapa de conversão dos embriões em propágulos como última etapa antes da aclimação. Outros dividem a regeneração em duas etapas: formação de propágulos e a de enraizamento. Alguns trabalhos recomendam para o enraizamento dos propágulos o meio MS com metade da sua concentração

salina suplementado com concentração de sacarose reduzida pela metade (Tabela 8); outros (VASCONCELOS et al., 2009; OMBORI et al., 2008; HUANG & WEI 2004; PRIOLI, 1987) utilizam este meio após as plantas atingirem aproximadamente 3 a 8 cm de altura, por até 15 dias ou então por apenas uma noite e sem sacarose, como foi descrito por Rakshit et al. (2010), Manivannan et al. (2010) e Gorji et al. (2011).

Além da redução pela metade da concentração salina do meio MS (<sup>1/2</sup>MS) também tem sido testada a adição de duas auxinas diferentes, AIB (ácido 3-indol-butírico) e ANA (ácido  $\alpha$ -naftaleno acético), descritas como eficientes no processo de indução de raízes (Tabela 10). A eficiência de AIB pode ser caracterizada no trabalho de Ombori et al. (2008), que após realizarem testes com concentrações de 0 a 1 mg L<sup>-1</sup> de AIB, relataram a concentração de 0,8 mg L<sup>-1</sup> como a mais adequada para a indução de raízes em linhagens tropicais de milho. A utilização de ANA foi considerada eficiente para indução de raízes em linhagens de milho Indiano investigados por Rakshit et al. (2010) e linhagens tropicais de milho analisadas por Gorji et al. (2011); os autores testaram três concentrações de ANA (0; 1,0; 2,0 mg L<sup>-1</sup>) e observaram que concentração de 2,0 mg · L<sup>-1</sup> de ANA foi a mais adequada para a formação de raízes. Além dos resultados descritos por Rakshit et al. (2010) e Gorji et al. (2011), a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB também foi considerada como efetiva por Shohael et al. (2003) e Zhong et al. (2011) para o enraizamento, enquanto que Vasconcelos et al. (2009) e Manivannan et al. (2010) utilizaram 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA para indução das raízes (Tabela 10).

### **Aclimação**

A última etapa e também de grande importância para a obtenção de plantas de milho regeneradas, se refere a aclimação. Após o desenvolvimento das raízes as plantas formadas são aclimatizadas em casa de vegetação; esta fase é considerada crítica. De acordo com Santos-Serejo & Aguiar-Perecin (2000) a planta ao ser transferida das condições *in vitro* para *in vivo* é submetida a um estresse

fisiológico, devido às mudanças ambientais impostas na fase de aclimação. Esses autores consideram que na aclimação em casa de vegetação devem ser consideradas as variáveis umidade, temperatura, época do ano e intensidade de luz, que devem ser testadas visando a obtenção de maior rendimento de regenerantes a partir dos genótipos investigados.

Para completar os trabalhos de indução e regeneração de plantas de milho, em geral, são finalizados pelos autores através de uma síntese e análise da formação de regenerantes por calos embriogênicos e sua relação com a quantidade de brotos e raízes apropriadas, observando as plantas que toleraram a aclimação e que foram verdadeiramente regeneradas.

**TABELA 7** – Concentrações de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) utilizadas por diferentes autores nas fases iniciais de indução e maturação de calos na cultura de tecidos de milho.

| Referências                | $\text{AgNO}_3$ (mg L <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------|---------------------------------------|
| El-Itriby et al. (2003)    | 1,7                                   |
| Danson et al. (2006)       | 15                                    |
| Ortiz-Valdez et al. (2007) | 10                                    |
|                            | 15                                    |
|                            | 20                                    |
| Ombori et al. (2008)       | 10                                    |
| Vasconcelos et al. (2009)  | 15                                    |
| Anami et al. (2010)        | 1,6                                   |
|                            | 0,85                                  |
| Rakshit et al. (2010)      | 15                                    |
| González et al. (2012)     | 1,7                                   |
| Bedada et al. (2011)       | 10                                    |
| Zhong et al. (2011)        | 5                                     |
| Gorji et al. (2011)        | 16                                    |
| Omer et al. (2012)         | 10                                    |

**TABELA 8** – Tipos de meios de cultivo utilizados por diferentes autores nas fases de regeneração *in vitro* (brotamento/enraizamento) de milho.

| Referências                           | Meio usado para regeneração |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| Prioli & Silva (1989)                 | MS / 1/2MS                  |
| Santos-Serejo & Aguiar-Perecin (2000) | N6 / MS                     |
| Shohael et al. (2003)                 |                             |
| El-Itriby et al. (2003)               | MS                          |
| Danson et al. (2006)                  | MS                          |
| Ortiz et al. (2007)                   | MS                          |
| Ombori et al. (2008)                  | MS / 1/2MS                  |
| Vasconcelos et al. (2009)             | MS / 1/2MS                  |
| Anami et al. (2010)                   | MS                          |
| Rakshit et al. (2010)                 | MS                          |
| Manivannan et al. (2010)              | MS                          |
| González et al. (2012)                | MS                          |
| Bedada et al. (2011)                  | MS                          |
| Zhong et al. (2011)                   | N6                          |
| Gorji et al. (2011)                   | MS / 1/2MS                  |

Meio para regeneração de brotos / meio para formação de raiz. N6: meio formulado por Chu et al. 1975); MS: meio formulado por Murashige and Skoog (1962); ½ MS: sais básicos utilizados em MS reduzidos a metade.

**TABELA 9** – Reguladores de crescimento (AIA e 6-BA) utilizados de forma combinadas ou isolada, no processo de indução de propágulos clorofilados na superfície dos calos de milho formados.

| Referências                | AIA (mg L <sup>-1</sup> ) | 6-BA (mg L <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Shohael et al. (2003)      | 0,1; 0,5 e 1,0            | 0; 0,5 e 1,0               |
| Danson et al. (2006)       | 0,5                       | 1,0                        |
| Ortiz-Valdez et al. (2007) | 0,5                       | 1,0                        |
| Vasconcelos et al. (2009)  | —                         | 0,25; 0,5 e 1,0            |
| Rakshit et al. (2010)      | 0; 0,5 e 1,0              | 0,1 e 0,2                  |
| Manivannan et al. (2010)   | 1,0 e 0,5                 | 1,0                        |
| Zhong et al. (2011)        | —                         | 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,5     |
| Gorji et al. (2011)        | 0; 0,5 e 1,0              | 0,1 e 2,0                  |

6-BA: 6-benziladenina; AIA: ácido 3-indolacético.

**TABELA 10** – Auxinas (AIB e ANA) utilizadas para estimular a formação de raízes.

| Referências               | AIB (mg L <sup>-1</sup> ) | ANA (mg L <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Ombori et al. (2008)      | 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0  | —                         |
| Vasconcelos et al. (2009) | 0,25 e 0,5                | 1,0                       |
| Rakshit et al. (2010)     | —                         | 0; 0,5 e 1,0              |
| Manivannan et al. (2010)  | —                         | 1,0                       |
| Zhong et al. (2011)       | 0,5                       | —                         |
| Gorji et al. (2011)       | —                         | 1,0                       |

AIB: ácido indol 3-butírico acético; ANA: ácido  $\alpha$ -naftaleno acético.

## CONCLUSÕES

Considerando que foram transcorridos mais de três décadas (37 anos) desde a divulgação do primeiro regenerante de milho a partir da linhagem A188, poucos investimentos foram feitos para assegurar um progresso efetivo de obtenção de plantas de milho regeneradas *in vitro*. As investigações com genótipos diferentes de milho estão concentradas em pouco mais de duas décadas (23 anos: 1989 a 2012), período em que foram divulgados apenas 17 estudos, onde foram investigados 179 genótipos, dos quais 77% dos genótipos formaram calos embriogênicos e somente 43,5% regeneraram plantas. O meio de cultura N6 formulado por Chu et al. (1975) foi mais utilizado para a indução de calos (89,47% das investigações). O meio de cultura N6 contendo 2,0 mg · L<sup>-1</sup> de 2,4-D foi usado para analisar 46% dos genótipos investigados e induziu calos embriogênicos em 87,9% destes, mas somente 43,3% regeneraram plantas, indicando que a regeneração de plantas é uma etapa mais crítica do que a indução de calos embriogênicos, e que precisa de investimentos pontuais e específicos.

Os investimentos subsequentes a partir do ano 2000 são marcados pela adição de suplementos adicionais tais como L-prolina e caseína hidrolisada como fonte suplementar de nitrogênio no meio de cultura, juntamente com o nitrato de prata, atenuador de diferentes tipos de estresse. A adição dos suplementos nos meios de cultura parece ter sido uma estratégia interessante porque enquanto nos em meio de cultura contendo apenas 2,4-D e sacarose, sem o uso de suplementos adicionais, a proporção de genótipos que formaram calos foi 57%, a indução de calos ocorreu em 79% dos 48 genótipos investigados usando meio de cultura contendo L-prolina, caseína hidrolisada e AgNO<sub>3</sub>.

De acordo com os registros na literatura especializada, não encontramos um protocolo padrão com maiores chances de garantia de sucesso, ou com maior probabilidade de ser aplicado para garantir a indução de calos embriogênicos em genótipos diferentes de *Zea mays*. A dependência do genótipo pode ser considerada um fator limitante, que determina e orienta para uma necessidade



de realizar experimentos testando protocolos e estratégias diferentes, para garantir a embriogênese somática em genótipos diferentes de milho.

A baixa taxa de regeneração encontrada nos experimentos preliminares na ausência de 2,4-D conduziram os investigadores a testar concentrações diferentes do meio MS, testar o meio N6, concentrações diferentes da fonte de carbono, e tipos e concentrações diferentes de reguladores de crescimento, na ausência ou na presença ou de concentrações reduzidas do 2,4-D. Concentrações diferentes de reguladores de crescimento (AIA, 6-BA, ANA, AIB, ABA), aminoácidos, e de mio-inositol foram as variáveis adotadas para estimular a formação de partes aéreas e de raízes nas plantas produzidas *in vitro*. De 179 genótipos analisados, apenas 43,5% regeneraram plantas na ausência ou em presença de aminoácidos e/ou de concentrações diversas de citocininas e auxinas. A competência para regenerar parece intrinsecamente associada com o genótipo, mais dependente deste do que dos suplementos adicionados ao meio de cultura.

Experimentos adicionais com determinados genótipos em meios de cultura contendo tipos e concentrações diferentes de reguladores de crescimento e/ou suplementos de outra natureza química, como aminoácidos, por exemplo, são necessários para esclarecer o quanto o potencial de regenerar plantas completas de milho é de fato dependente dos genótipos e/ou dos meios de cultura e/ou das condições da cultura *in vitro*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEBE, D. Z.; TEFFERA, W.; MACHUKA, S. J. Regeneration of tropical maize lines (*Zea mays* L.) from mature zygotic embryo through callus initiation. **African Journal of Biotechnology**, 7(13):2181-2186, 2008.
- AHMADABADI, M.; RUF, S.; BOCK, R. A leaf based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). **Transgenic Research**, 16(4):437-448, 2007.
- ANAMI, S.; MGUTU, A.; TARACHA, C.; COUSSENS, G.; KARMIM, M.; HILSON, P.; VAN LIJSEBETTESNS, M.; MACHUKA, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration and tropical maize genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 102(3):285-295, 2010.
- ARMSTRONG, C.L.; GREEN, C.E. Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, 164(2):207-214, 1985.
- BARLOY, D.; BECKER, M. Improvement of regeneration ability of androgenetic embryos by early anther transfer in maize plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 33(1):45-50, 1993.
- BEDADA, L. T.; SETH, M. S.; RUNO, S. M.; TEFERA, W.; MACHUKA, J. Plant regeneration of Ethiopian tropical maize (*Zea mays* L.) genotypes. **Biotechnology**, 10(6):506-513, 2011.
- BEYL, C. A. Componentes of the tissue culture medium. In: TRIGIANO, R. N. & GRAY, D. J. (Eds.). **Plant development and biotechnology**. CRC Press, p.22-17, 2004.
- BINOTT, J. J.; SONGA, J. M.; ININD, J.; NJAGI, E. M.; MACHUKA, J. Plant regeneration from immature embryos of Kenyan maize inbred lines and their respective single cross hybrids through somatic embryogenesis. **African Journal of Biotechnology**, 7(8):981-987, 2008.
- BOHOROVA, N. E.; LUNA, B.; BRITO, R. M.; HUERTA, L. D.; HOISINGTON, D. A. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude, and highland maize inbreds. **Maydica**, 40(4):275-281, 1995.
- BRONSEMA, F. B. F.; VAN OOSTVEEN, W. J. F.; VAN LAMMEREN, A. A. M. Immunocytochemical localization of auxin-binding proteins in coleoptiles and embryos of *Zea mays* L. **Protoplasma**, 202(1-2):65-75, 1997.
- CARVALHO, C. H. S.; BOHOROVA, N. E.; BORDALO, P. N.; ABREU, L. L.; VALICENTE, F. H.; BRESSAN, W.; PAIVA, E. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotype. **Plant Cell Reports**, 17(3):73-76, 1997.
- CHEN, Z. Y.; BROWN, R. L.; RAJASEKARAN, K.; DAMANN, K. E.; CLEVELAND, T. E. Evidence for involvement of a pathogenesis-related protein in maize resistance to *Aspergillus flavus* infection/aflatoxin production. **Phytopathology**, 96(2):87-95, 2006.

- CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; CHU, C. Y. Establishment of an efficient medium for rice anther culture through comparative experiments on the nitrogen source. **Scientia Sinica**, 18(5):659-668, 1975.
- CONGER, B. V.; NOVAK, F. J.; AFZA, B. E.; EDELSKY, K. E. Somatic embryogenesis from culture leaf segments of *Zea mays*. **Plant Cell**, 6:345-347, 1987.
- DANSON, W. J.; LAGAT, M.; MBOGORI, M. Screening tropical maize lines for production and regeneration of friable and embryogenic type II callus. **African Journal of Biotechnology**, 5(23):2367-2370, 2006.
- DÉCIMA, O.; GONZÁLEZ, G.; LEWI, D. Influencia del genotipo y del tiempo em cultivo *in vitro* sobre la embriogénesis somática y la obtención de plantas de maíz. **Revista de La Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentares**, 2(3):21-33, 2011.
- DUNCAN, D. R.; WILLIAMS, M. E.; ZEHR, B. E.; WIDHOLM, J. M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. **Planta**, 165(3):322-332, 1985.
- EL-ITRIBY, A. H.; ASSEM, S. K.; HUSSEIN, E. H. A.; ABDEL-GALIL, F. M.; MADKOUR, M. A. Regeneration and transformation of Egyptian maize inbred lines via immature embryo culture and biolistic particle delivery system. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 39(5):524-531, 2003.
- FERNANDES, E. H.; PRIOLI, A. J.; SCAPIM, C. A.; SCHUSTER, I.; VIEIRA, E. S. N.; AMARAL J. R. A. T.; MOTERLE, L. M. Embriogénesis somática a partir de embriões imaturos em genótipos de milho. **Ciência Rural**, 38(9):2604-2607, 2008.
- FRAME, B.; MAIN, M.; SCHICK, R.; WANG, K. Genetic transformation using maize immature zygotic embryos. In: THORPE, T. A.; YEUNG, E.C. (Eds), **Plant embryo culture: methods and protocols. Biology**. New York: Springer Science, p.327-341, 2011.
- FRAME, B. R.; McMURRAY, J. M.; FONGER, T. M.; MAIN, M. L.; TAYLOR, K. W.; TORNEY, F. J.; PAZ, M. M.; WANG, K. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. **Plant Cell Reports**, 25:1024-1034, 2006.
- FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R. K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T. M.; PEGG, S. E. K.; LI, B.; NETTLETON, D. S.; PEI, D.; WANG, K. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system breakthrough technologies. **Plant Physiology**, 129(1):13-22, 2002.
- GAMBORG, O. L. Media preparation. In: LINDSEY, K. (Ed.). **Plant tissue culture manual**. Supplement 3, Section A. Dordrecht: Kluwer, p.1-24, 1991.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, O. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. **Experimental Cell Research**, 50(1):151-158, 1968.
- GONZÁLEZ, G. A.; PACHECO, M. G.; ONETO, D. C.; ETCHART, V. J.; KANDUS, M. V.; SALERNO, J. C.; EYHERABIDE, G.; PRESELLO, D.; LEWI, D. M. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity en Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. **Electronic Journal of Biotechnology**, 15(1):1-15, 2012.
- GORJI, H. A.; ZOLNOORI, M.; JAMASBI, A.; ZOLNOORI, Z. *In vitro* plant generation of tropical maize genotypes. **Biomedical and Biotechnology**, 16(1):52-59, 2011.
- GRANDO, M. F.; VARNIER, M. L.; SILVA, M. R.; EMYDIO, B. M.; PEREIRA, R. L.; SUZIN, M. Immature tassels as alternative explants in somatic embryogenesis and plant regeneration in south Brazilian maize genotypes. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 35(1):39-47, 2013.
- GREEN, C. E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from the friable callus of *Zea mays*. In: Fujimura, A. (Ed.). **Plant tissue culture**. Tokyo, Maruzen, p.107-108, 1982.
- GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. J. Plant regeneration from tissue cultures of maize. **Crop Science**, 15(3):417-421, 1975.
- HE, G.; ZHANG, J.; LI, K.; XIONG, Z.; CHEN, M.; CHANG, J.; WANG, Y.; YANG, G.; BARNABA, S. An improved system to establish highly embryogenic haploid cell and protoplast cultures from pollen calluses of maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 86(1):15-25, 2006.

- HUANG, X. Q.; WEI, Z. M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from immature embryos of maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Reports**, 22(11):793-800, 2004.
- ISHIDA, Y.; HIEEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium* - mediated transformation of maize. **Nature Protocols**, 2(7):1614-1621, 2007.
- ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, 14(6):745-750, 1996.
- JEDIDAH, W. D.; LAGAT, M. K.; MBOGORI, M. Screening tropical maize lines for the production and regeneration of friable and embryogenic type II callus. **African Journal of Biotechnology**, 5(23):2367-2370, 2006.
- JIA, X. X.; ZHANG, J. W.; WANG, H. N.; KONG, W. P. Efficient maize (*Zea mays* L.) regeneration derived from mature embryos *in vitro*. **Maydica**, 53(1):239-248, 2009.
- KEMPER, E. L.; SILVA, M. J.; ARRUDA, P. Effect of microprojectile bombardment parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (*Zea mays* L.) embryos. **Plant Science**, 29(1):85-93, 1996.
- KRAKOWSKY, M. D.; LEE, M.; GARAY, L.; WOODMAN-CLIKEMAN, W.; LONG, M. J.; SHAROPOVA, N.; FRAME, B.; WANG, K. Quantitative trait loci for callus initiation and totipotency in maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 113(5):821-830, 2006.
- LI, Y.; SHI, Y.; SONG, Y.; DU, J.; TUBEROSA, R.; WANG, T. Analysis of genetic diversity in maize inbred lines based on AFLP markers. **Maydica**, 49(1):89-95, 2004.
- LINSMAIER, E.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 18(1):100-127, 1965.
- LU, C.; VASIL, I. K.; OZIAS-AKINS, P. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. **Theoretical and Applied Genetics**, 62(1):109-112, 1982.
- MANIVANNAN, A.; KAUL J.; SINGODE A.; DASS, S. Callus induction and regeneration of elite Indian maize inbreds. **African Journal of Biotechnology**, 9(44):7446-7452, 2010.
- MOROCZ, S.; DONN, G.; NEMETH, J.; DUDITS, D. An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from highly embryogenic suspension culture. **Theoretical and Applied Genetics**, 80(6):721-726, 1990.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, 15(3):473-497, 1962.
- NARAYANASWAMY, S. Experimental studies on growth of excised grass embryos *in vitro*. I. Overgrowth of the scutellum of *Pennisetum* embryos. **Phytomorphology**, 9(2):358-367, 1959.
- NARAYANASWAMY, S.; NORSTOG, K. Plant embryo culture. **Botanical Review**, 30(4):587-628, 1964.
- NEUMANN, K-H.; KUMAR, A.; IMANI, J. Callus cultures. In: **Plant cell and tissue culture – A toll in biotechnology: basics and application**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p.13-29, 2009.
- NORSTOG, K. Induction of embryo-like structures by kinetin in cultured barley embryos. **Developmental Biology**, 23(4):665-670, 1970.
- NORSTOG, K. The growth and differentiation of cultured barley embryos. **American Journal of Botany**, 48(5):876-884, 1961.
- O’KENNEDY, M. M.; BURGER, J. T.; BERGER, D. K. Transformation of elite white maize using the particle inflow gun and detailed analysis of a low-copy integration. **Plant Cell Reports**, 20(8):721-730, 2001.
- ODUOR, R. O.; NIJAGI, E. N. M.; MACHUKA, J. S. In vitro regeneration of dry land Kenyan maize genotypes through somatic embryogenesis. **International Journal of Botany**, 2(2):146-151, 2006.
- OMBORI, O.; GITONGA, N. M.; MACHUKA, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea Mays* L.) inbred lines. **Biotechnology**, 7(2):224-232, 2008.

- OMER, R. A.; MATHEKA, J. M.; RUNO, S.; ALI, A. M.; KURIA, E.; MASIGA, C.; MUGOYA, C.; MACHUKA, J. Effects of auxin and source of explants on callus induction of tropical maize. **Biotechnology**, 11(4):225-231, 2012.
- ONETO, C. D.; GONZALEZ, G. A.; LEWI, D. M. **Maize Genetic Transformation: The Biolistic Protocol**. Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria (INTA-Castelar); Instituto de Genetica Edwald A. Favret, Buenos Aires, Argentina, 2011. 66p.
- ORTIZ-VALDEZ, A.; GODOY-MEDINA, S.; VALVERDE, E. M.; LOPEZ-PAREDES, O. A transgenic tropical maize line generated by the direct transformation of the embryo-scutellum by *A. tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 91(3):201-214, 2007.
- PETRILLO, C. P.; CARNEIRO, N. P.; PURCINO, A. A. C.; CARVALHO, C. H. S.; ALVES, J. D.; CARNEIRO, A. A. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43(3):371-378, 2008.
- PRIOLI, L. M.; SILVA, W. J. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in tropical maize inbreds. **Brazilian Journal of Genetics**, 12(3):553-566, 1989.
- RAGHAVAN, V. **Experimental Embryogenesis in Vascular Plants**. New York: Academic Press, v. 10, 1976. 603p.
- RAKSHIT, S.; ZERKA, R.; SEKHAR, J.; FATMA, T.; SAIN, D. Callus induction and whole plant regeneration in elite maize (*Zea mays* L.) inbred. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 100(1):31-37, 2010.
- SAIRAM, R. V.; PARAN, M.; FRANKLIN, G.; LIFENG, Z.; SMITH, B.; MACDOUGALL, J.; WILBERT, C.; SHEIKNI, H.; KASHIKAR, N.; MEEKER, K. Shoot meristem an ideal explants for *Zea mays* L. transformation. **Genome**, 46(2):323-329, 2003.
- SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Genótipos de milho com alta capacidade para embriogênese somática e regeneração de plantas obtidas a partir de calos. **Scientia Agricola**, 57(4):717-722, 2000.
- SHOHAEL, A. M.; AKANDA, M. A. L.; PARVEZ, S.; MAHFUJA, S.; ALAM, M. F.; ISLAM, R.; JOARDER, N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo derived callus of inbred maize (*Zea mays* L.). **Biotechnology**, 2(2):154-161, 2003.
- SIDOROV, V.; GILBERTSON, L.; ADAE, P.; DUNCAN, D. *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus. **Plant Cell Reports**, 25(4):320-328, 2006.
- SONGSTAD, D. D.; ARMSTRONG, C. L.; PETERSON, W. L. AgNO<sub>3</sub> increases type II callus production from immature embryos of maize inbred B73 and its derivatives. **Plant Cell Reports**, 9(12):699-702, 1991.
- SONGSTAD, D.D.; PETERSEN, W.L.; ARMSTRONG, C.L. Establishment of friable embryogenic (type II) callus from immature tassels of *Zea mays* (Poaceae). **American Journal of Botany**, 76(7):761-764, 1992.
- STRABLE, J.; SCANLON, M. J. Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology. **Cold Spring Harbor Protocols**, 4(10):1238-1246, 2009.
- THORPE, T. A.; BEAUDOIN-EAGAN, L. D. <sup>14</sup>C-metabolism during growth and shoot formation in tobacco callus cultures. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, 113(4):337-346, 1984.
- TING, Y. C.; YU, M.; ZHENG, W. Z. Improved anther culture of maize. **Plant Science Letters**, 23(2):139-145, 1981.
- USMAN, I.S.; ADO, S.G.; NG, S.Y. Media appraisal for somatic embryogenesis of elite inbred lines of maize. **African Crop Science Conference Proceedings**, 8:769-772, 2007.
- VAIN, P.; FLAMENT, P.; SOUNDAIN, P. Role of ethylene in embryogenic callus initiation and regeneration in *Zea mays* L. **Journal of Plant Physiology**, 135(5):537-540, 1989.
- VAIN, P.; YEAN, H.; FLAMENT, P. Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. by AgNO<sub>3</sub>. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 18(2):143-151, 1989.
- VASCONCELOS, M. J. V.; FONTES, M. A.; CARVALHO, C. H. S.; LOPES, M. A. Regeneração *in vitro* de milho tropical de alta qualidade proteica. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, 8(2):105-116, 2009.

- VASIL, V.; VASIL, I. K. Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays* L. **Journal of Plant Physiology**, 124(3):399-408, 1986.
- VEGA, J. M.; YU, W.; KENNON, A.; CHEN, X.; ZHANG, Z. J. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. **Plant Cell Reports**, 27(2):297-305, 2008.
- VLADIMIR, S.; GILBERTSON, L.; ADAE, P.; DUNCAN, D. *Agrobacterium* mediated transformation of seedling-derived maize callus. **Plant Cell Report**, 25:320-328, 2006.
- WANG, A. S. Callus induction and plant regeneration from maize mature embryos. **Plant Cell Report**, 6(5):360-362, 1987.
- ZHANG, S.; WARKENTIN, D.; SUN, B.; ZHONG, H.; STICKLEN, M. Variation in the inheritance of expression among in maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 92(6):742-761, 1996.
- ZHONG, DE-Y.; ZHU, Y-Y.; LIU, Q.; ZHOU, T.; ZHAO, DE-G. Production of embryogenic callus and plant regeneration from elite guizhou wazy maize inbred lines. **Science Direct**, 10(4):490-498, 2011.
- ZHONG, H.; SRINIVASAN, C.; STICKLEN, M. B. In-vitro morphogenesis of corn (*Zea mays* L.). I. Differentiation of multiple shoot clumps and somatic embryos from shoot tips. **Planta**, 187(4):483-489, 1992.