

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE MILHO TROPICAL DE ALTA QUALIDADE PROTEICA

MARIA JOSÉ VILAÇA DE VASCONCELOS¹, MARCELO ANTONIOL FONTES²,
CARLOS HENRIQUE SIQUEIRA DE CARVALHO³ e MAURICIO ANTONIO LOPES⁴

¹*Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151- 35.701-970, Sete Lagoas, MG*
mjose@cnpms.embrapa.br

²*PRONEX/Embrapa Milho e Sorgo*

³*Embrapa Café, Varginha - MG; carlos.carvalho@embrapa.br*

⁴*Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia; mauricio.lopes@cenargen.embrapa.br*

Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.8, n.2, p. 105-116 2009

RESUMO - Experimentos de transformação genética requerem protocolos ajustados de indução de calogênese e regeneração de plantas, sendo poucos os genótipos de milho tropical com a capacidade de induzir e regenerar plantas férteis e que possuem protocolos bem definidos. No presente trabalho, avaliou-se a capacidade de formação de calos embriogênicos e regeneração de plantas de nove linhagens de milho selecionadas para alta qualidade proteica (quality protein maize/QPM) e adaptadas ao clima tropical. Milhos de alta qualidade protéica são importantes para a alimentação de animais monogástricos, devido ao aumento da quantidade de alguns aminoácidos essenciais, necessários a sua dieta. Basicamente, foram utilizados meios de cultura similares àqueles propostos por Chu et al. (1975), porém, diferentes concentrações de dicamba (15 ou 30 μM), L-prolina (6 ou 25 mM) e nitrato de prata (0 ou 88 μM) foram testadas. Os calos formados foram classificados como dos tipos I e II. As maiores porcentagens de formação de calos embriogênicos foram obtidas no meio suplementado com 30 μM de dicamba, 25 mM de L-Prolina e 88 μM de nitrato de prata, em que obtiveram-se 100% de formação de calos do tipo II, com a linhagem HGZ-A18. Os calos formados pela linhagem HGZ-A18 foram transferidos para magentaTM, com quatro diferentes tipos de meios, sendo que 71,4% dos calos regeneraram plantas quando se utilizou o meio contendo sais N_6 suplementado com 1,0 mg.L^{-1} de BAB e 0,5 mg.L^{-1} de AIB, resultando em 75% de plantas férteis em casa de vegetação.

Palavras-chave: linhagens de milho QPM, embriões imaturos, cultura de tecidos, embriogênese somática, *Zea mays*.

IN VITRO REGENERATION OF TROPICAL QUALITY PROTEIN MAIZE

ABSTRACT - Experiments on genetic transformation require well-defined protocols for callus induction and plant regeneration but few tropical maize genotypes are capable of inducing and regenerating fertile plants. In the present work, nine tropical maize inbred lines selected for high-quality protein were evaluated for the capacity of embryogenic calli formation and plant regeneration. High quality protein maize is an important component in monogastric animal nutrition due to the increased amounts of essential amino acids. Basically, culture media similar to those proposed by Chu et al. (1975) were used, but containing different concentrations of Dicamba (15 or 30 μ M), L-proline (6 or 25 mM) and silver nitrate (0 or 88 μ M). Calli produced were classified as types I and II. The highest percentage of embryogenic calli was obtained in the medium supplemented with 30 μ M Dicamba, 25 μ M, L-proline and 88 μ M silver nitrate. The line HGZ-A18 presented 100% of type II embryogenic calli. These calli were transferred to magenta™ with four different media. This line presented 71.4% of regenerated plants when applied the medium containing N₆ salts supplemented with 1.0 mg.L⁻¹ BAB and 0.5 mg.L⁻¹ AIB, resulting in 75% of fertile plants in the greenhouse.

Key words: Quality protein maize lines, tissue culture, immature embryos, somatic embryogenesis, *Zea mays*.

Milhos de alta qualidade proteica – QPM – são importantes para a alimentação de animais monogástricos, devido ao aumento da quantidade de alguns aminoácidos essenciais, necessários a sua dieta. Trabalhos com o objetivo de desenvolver protocolos de embriogênese somática e regeneração de plantas de milho visando o seu uso na transformação genética são importantes em programas de pesquisa focados na modificação das proteínas do milho. A regeneração de plantas de milho utilizando embriões imaturos como fonte de explantes foi descrita pela

primeira vez por Green & Phillips, em 1975. Embriões com 10 a 15 dias após a fecundação das sementes, medindo aproximadamente 1,0 a 2,0 mm de comprimento, foram coletados e colocados em placas de Petri, com o eixo embrionário em contato com o meio, para a indução e proliferação de células do escutelo, as quais formam os calos. Essa técnica tem sido a mais comumente utilizada para a regeneração de gramíneas (Binott et al., 2008; Ombori et al., 2008; Oduor et al., 2006; Danson et al., 2006; Jedidah et al., 2006; Huang et al., 2004; El-Itriby et al., 2003; Frame et al., 2002; Santos-

Serejo & Aguiar-Perecin, 2000; Carvalho et al., 1997; Bohorova et al., 1995).

Calos embriogênicos podem ser classificados como dos tipos I e II. Os calos do tipo I são constituídos de dois tecidos distintos: um tecido duro, compacto e amarelo ou branco, geralmente capaz de regenerar plantas; o outro é granular, amarelo-pálido ou cinza-claro, translúcido e não é capaz de regenerar plantas (Vasil & Vasil, 1981). Já os calos classificados como do tipo II são macios, friáveis e altamente embriogênicos (Armstrong & Green, 1985; Tomes & Smith, 1985). As culturas formadoras de calos do tipo II crescem rapidamente, podem ser mantidas por um longo período de tempo e formam um grande número de embriões somáticos facilmente transformáveis em plantas (Vasil, 1987).

Poucas são as linhagens de milho tropical identificadas como produtoras de calos embriogênicos do tipo II e que tenham boa capacidade de regeneração *in vitro*, daí a necessidade de encontrar outros genótipos com essas características, para que se possa aumentar a base genética dos programas de melhoramento que usam métodos de cultivo *in vitro* e técnicas de transformação. Porém, com as alterações feitas na composição dos meios de cultura e também nas relações e doses dos reguladores de crescimento, juntamente com o avanço da metodologia de cultivo *in vitro*, tornou-se possível a regeneração de um grande número de genótipos (Prioli & Silva, 1989; Furini & Jewell, 1994 e 1995; Bohorova et al., 1995; Carvalho

et al., 1997; Frame et al., 2002; El-Itriby et al., 2003; Danson et al., 2006; Jedidah et al., 2006; Oduor et al., 2006; Binott et al., 2008). A habilidade de regenerar plantas de milho a partir de embriões provenientes de cultura de calos tem sido relatada como dependente do genótipo usado. Diversos trabalhos já foram conduzidos para estudar o controle genético na regeneração de plantas no cultivo *in vitro* de várias espécies, devido à possibilidade de selecionar genótipos com alta frequência de regeneração de plantas e transferência dessa característica para genótipos superiores, mas com baixo potencial para cultivo *in vitro* (Sharma et al., 2005; Huang et al., 2004; Shohalel et al., 2003; Fluminhan & Aguiar-Perecin, 1998; Prioli & Silva, 1989; Lee & Phillips, 1987; Hodgs *et al.*, 1986).

Como descrito, a iniciação de calos regeneráveis em milho, bem como a frequência de regeneração de plantas são afetadas por componente genético e dependem do genótipo utilizado (Phillips et al., 1988). Além disso, várias características podem alterar a expressividade dos genes que controlam a indução da embriogênese somática e a regeneração de plantas, entre elas, pode-se destacar: o estágio de desenvolvimento e o estado fisiológico do explante no momento da excisão, interações específicas entre o genótipo e condições de cultivo da planta doadora e as estações do ano (Prioli & Silva, 1989). Dessa forma, até as plantas ou genótipos considerados altamente recalcitrantes podem chegar à morfogênese, quando utilizados

explantes de plantas que cresceram sob condições ótimas e que estejam em adequado estágio de desenvolvimento. De maneira inversa, plantas que geralmente produzem calos e regeneram-se facilmente *in vitro* podem não regenerar ou ter muita dificuldade, quando da utilização de plantas cultivadas em condições adversas ou explantes inadequados (Vasil, 1987).

Este trabalho objetivou otimizar um protocolo para a formação de calos embriogênicos friáveis e regeneração de plantas de milho tropical de alta qualidade proteica (Quality Protein maize - QPM), visando o seu uso na transformação genética. Foram testadas nove linhagens e meios de cultura com diferentes níveis de prolina, nitrato de prata e dicamba, visando o ajuste de protocolo de regeneração de plantas a ser utilizado em transformação genética de milho QPM.

Material e Métodos

Material genético

Nove genótipos de milho de alta qualidade proteica (Tabela 1) pertencentes ao programa de melhoramento genético de milho para alta qualidade proteica da Embrapa Milho e Sorgo foram plantados no campo, para produção de espigas de milho como fonte de embriões imaturos, no Núcleo de Biologia Aplicada – NBA da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG.

Formação de calos e regeneração de plantas

O procedimento usado para formação de calos e regeneração de plantas foi baseado na metodologia usada por Bohorova *et al.* (1999). As espigas foram coletadas 10 a 15 dias após a fecundação e desinfestadas superficialmente

TABELA 1. Linhagens de milho de alta qualidade proteica obtidas do programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais.

Número	Genótipo	Origem
01	CMS 477 BC ₄ F ₂	Embrapa Milho e Sorgo
02	HGZ-A 04	Embrapa Milho e Sorgo
03	HGZ-A 05	Embrapa Milho e Sorgo
04	HGZ-A 08	Embrapa Milho e Sorgo
05	HGZ-A 09	Embrapa Milho e Sorgo
06	HGZ-A 10	Embrapa Milho e Sorgo
07	HGZ-A 15	Embrapa Milho e Sorgo
08	HGZ-A 17	Embrapa Milho e Sorgo
09	HGZ-A 18	Embrapa Milho e Sorgo

por imersão em 70% de etanol, operação essa seguida de incubação, por 40 minutos, em solução de 2,5% de hipoclorito de sódio e três lavagens com água deionizada estéril. Embriões medindo aproximadamente 1,0 a 1,2 mm de comprimento foram extraídos de espigas de milho, com o auxílio de uma pinça, e inoculados em placas de Petri de 8 cm de diâmetro, com o eixo embrionário em contato com o meio de cultura. Em seguida, as placas foram incubadas à temperatura de 25 ± 2 °C, na ausência de luz, por seis semanas.

Meios para cultura de tecidos

O meio de iniciação dos calos foi formado por sais e vitaminas N_6 (Chu et al. 1975), (CM-1), suplementado com 6 ou 25 mM de prolina, 3% (p/v) de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de casaminoácido, 15 ou 30 µM de dicamba e 0 ou 88 µM de nitrato de prata, solidificados com phytigel (1,8 g.L⁻¹) (Tabela 2A). O meio de manutenção foi o mesmo usado para a indução de calos, excetuando-se o nitrato de prata (Tabela 2A). A resposta embriogênica, expressa em percentagem de formação de calos, foi analisada após 45 dias em meios de indução de calos.

Meios para regeneração de plantas

Após 42 dias, os calos embriogênicos formados foram inoculados em diferentes meios de regeneração, com variações nas concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) e AIB (ácido indol butírico). Todos os meios continham sais

MS (Mushirage e Skoog, 1962), 0.040 mg.L⁻¹ tiamina, 0,15 g.L⁻¹ L-asparagina, 20 g.L⁻¹ de sacarose, 0.5 mL⁻¹ IAA, 1 mL.L⁻¹ BAP, 100 mg.L⁻¹ mio-inositol e 8 g.L⁻¹ ágar (Tabela 2B). A regeneração das plantas foi realizada utilizando-se seis magentas para cada meio, sendo que, em cada magenta, foram inoculados três setores de calos por meio de cultura (Tabela 2B). Os calos embriogênicos foram mantidos a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa em torno de 36 µmoles m⁻².s⁻¹, até a formação das plantas.

Meio para enraizamento

Após 30 dias de idade, as plantas regeneradas foram avaliadas e, então, transferidas para o meio de enraizamento (Tabela 2C). Após o processo de enraizamento, as plantas foram retiradas da condição *in vitro* e plantadas em vasos de plástico contendo uma mistura solo – vermiculita, na proporção 1:1. Em seguida, foram conduzidas à casa-de-vegetação, para o processo de aclimatização e obtenção de plantas adultas, sendo irrigadas conforme necessidade. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (meios de cultivo) e seis repetições.

Resultados e Discussão

O desenvolvimento de protocolo de calogênese e regeneração de plantas de milho tropical é essencial para o desenvolvimento de um eficiente protocolo de transformação

TABELA 2. Meios de cultura. Núcleo de Biologia Aplicada, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais.**A- Formação de calos**

Tipos de meios	Descrição dos meios de cultura
Meio A	CM-1 + 25 mM L-Proline + 15 μ M Dicamba + 88 μ M AgNO ₃
Meio B	CM-1 + 25 mM L-Proline + 30 μ M Dicamba + 88 μ M AgNO ₃
Meio C	CM-1 + 6 mM L-Proline + 30 μ M Dicamba
Meio D	CM-1 + 25 mM L-Proline + 30 μ M Dicamba

B - Regeneração de plantas

Tipos de meios	Descrição dos meios de cultura
Meio I	Sais básicos N ₆ (Chu et al., 1975)
Meio II	Sais básicos N ₆ , suplementado com 0,25 mg/L de BAP e 0,125 mg/L de AIB (Ácido indol butírico)
Meio III	Sais básicos N ₆ , suplementado com 0,50 mg/L de BAP e 0,25 mg/L de AIB
Meio IV	Sais básicos N ₆ , suplementado com 1,0 mg/L de BAP e 0,5 mg/L de AIB.

C – Enraizamento

Tipo de meio	Descrição do meio
Enraizamento	Sais básicos MS (Murashige e Skoog, 1962) meia força, suplementado com 1,5% (p/v) de sacarose e 1,0 mg/L de ANA

AgNO₃ - Nitrato de prata

BAP - 6-Benzilaminopurina

AIB - Ácido indol butírico

genética de milho. Esse processo é fundamental no desenvolvimento de plantas transgênicas para qualquer característica, independentemente se são características que afetam a produtividade, como tolerância a seca, resistência a insetos-pragas, resistência a doenças, alta qualidade proteica ou outras. Muitos laboratórios têm trabalhado nesse sentido, mas os resultados não têm sido muito promissores.

Linhagens temperadas, como a A188 (Ishida et al., 1996) ou o híbrido Hi II (Zhao et al., 1998) têm sido popularmente usadas para a transformação genética de milho temperado, não sendo próprias para o clima tropical. Armstrong et al. (1992) descreveram a existência de um gene maior ou genes no braço longo do cromossomo 9 da linhagem A188, que são responsáveis pela promoção de formação de calos embriogênicos e regeneração de plantas de milho.

No presente trabalho, foi observada a formação de calos do tipo II e a capacidade de regenerar plantas normais de linhagens tropicais com alta qualidade proteica, plaqueando embriões imaturos de milho com 1,0 a 1,2 mm de comprimento, onde, dez a quinze dias após esse plaqueamento, foi feito o corte dos coleóptilos e os embriões recultivados em mesmo meio de cultura. As linhagens HGZ10 e HGZ-18 apresentaram a mais alta formação de calos embriogênicos quando o meio de cultura B foi usado (Tabela 3). Foi observada uma intensa formação de calos embriogênicos nos embriões imaturos que foram, em parte, subcultivados em pequenos setores (meios I, II, III e IV). A percentagem de formação de calos variou de 2 a 100% nos genótipos analisados (Tabela 3). Dois

tipos de calos embriogênicos foram formados, calos tipo I e tipo II. A formação destes dois tipos de calos foi descrita em milho por Jiménez & Bangert (2001). Variações em genótipos de milho para formar calos do tipo I e II foram descritas como sendo uma característica aditiva com efeito positivo na heterose (Thomes & Smith, 1985). A linhagem HGZ-A18 teve um excelente resultado quanto à formação de calos do tipo II na qual tanto calos embriogênicos como não embriogênicos foram detectados. Esse tipo de formação de calo também foi descrito em outros genótipos de milho (Shohael et al., 2003; Jiménez & Bangerth, 2001) e sorgo.

Estudos têm mostrado que a idade dos embriões é um fator crítico na determinação da capacidade de iniciação de formação de calos de

TABELA 3. Formação de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos de genótipos de milho de alta qualidade proteica, cultivados em diferentes meios de cultura. Núcleo de Biologia Aplicada, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais.

Número	Genótipo	Meio B
		Calos embriogênicos (%)
01	CMS 477 BC ₄ F ₂	50
02	HGZ-A 04	03
03	HGZ-A 05	67
04	HGZ-A 08	17
05	HGZ-A 09	02
06	HGZ-A 10	100
07	HGZ-A 15	61
08	HGZ-A 17	46
09	HGZ-A 18	100
	Média	49,55

embriões imaturos, sendo isso, provavelmente, devido à redução da atividade meristemática com envelhecimento das células, o desenvolvimento e o estágio fisiológico dos embriões são importantes na determinação da inicialização da resposta (Ombori *et al.*, 2008). Diferentes genótipos apresentam diferenças significativas na formação de calos, isso tem sido também relatado por outros autores (Ratif *et al.*, 2006; Bohorova *et al.*, 1995).

A linhagem HGZ-A 18, que teve excelentes resultados para a formação de calos, foi submetida aos testes de regeneração para um estudo detalhado da formação de embriões. Pequenas seções de calos foram inoculadas em meio de regeneração e, logo após a inoculação, iniciou-se o processo de enverdecimento dos mesmos em todos os meios analisados. O processo de formação de parte aérea iniciou-se primeiramente no meio II, após o oitavo dia de cultivo. Nos outros meios (I, III e IV),

após o décimo primeiro dia. Em todos os meios analisados, houve intensa formação de folhas (foliogênese) com alguns regenerantes desprovidos de eixo caulinar (Tabela 4). De acordo com Che *et al.* (2006), os calos se tornam verdes devido ao aumento da regulação de alguns genes relacionados à fotossíntese ou para outros componentes do cloroplastos. A formação de raízes ocorreu, em média, após a primeira semana em cultivo em meio de enraizamento.

Pelos resultados obtidos, verifica-se que o melhor meio de cultura para regeneração de plantas da linhagem HGZ-A18, a partir de embriões somáticos, foi o meio IV, com 71,4% de formação de regenerantes com eixo caulinar e 87,5% de formação de raízes. Os regenerantes em meio IV tiveram um índice de sobrevivência em condição *ex vitro* de 75%. Embora nos tratamentos I, II e III, houvesse índice de regeneração superior ao

TABELA 4. Respostas morfogênicas da linhagem HGZ-A18 submetidas a diferentes meios de cultura para regeneração de plantas de milho e quantidade de plantas aclimatadas em casa-de-vegetação para cada meio utilizado. Núcleo de Biologia Aplicada, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais.

Meios	Respostas morfogênicas					Casa-de-vegetação
	Regenerantes	Com eixo caulinar	Sem eixo caulinar	Albinos	Enraizamento	
Meio I	9/18 (50,0%)	5/9 (55,5%)	4/9 (44,5%)	1/9 (11%)	3/5 (60%)	2 (40%)
Meio II	11/18 (61%)	6/11 (54,5%)	5/11 (45,5%)	3/11 (27,3%)	4/6 (67%)	4 (67%)
Meio III	9/18 (50%)	3/9 (33,3%)	6/9 (67%)	6/9 (67%)	5/6 (83%)	4 (67%)
Meio IV	7/18 (39%)	5/7 (71,4%)	2/7 (28,5%)	2/7 (28,5%)	7/8 (87,5%)	6 (75%)
TOTAL	36/72 (50%)	19/36 (52,8%)	17/36 (47,2%)	12/36 (33,3%)	19/25 (76%)	16 (64%)

do tratamento IV, esses apresentaram altos índices de regenerantes sem a presença de eixo caulinar (Tabela 4), com uma média de 52,3 %, ao passo que, no tratamento IV, esse índice foi de 28,5%. Dessa forma, pode-se obter, como no tratamento IV, ao final do processo de regeneração, um número maior de plantas, devendo este ser recomendado nos trabalhos de transformação genética.

A Figura 1 mostra uma visão do processo de embriogênese somática e regeneração de plantas de milho a partir de embriões imaturos

da linhagem HGZ-A18, onde, na Figura 1A, há uma visão panorâmica da formação de calos embriogênicos do tipo II. A Figura 1B mostra o início da regeneração de plantas de milho HGZ-A18, a 1C, plantas em processo de aclimatação e a 1D, plantas adultas em casa-de-vegetação.

Conclusão

Um sistema de formação de calo e regeneração de plantas de uma linhagem tropical de milho de alta qualidade protéica

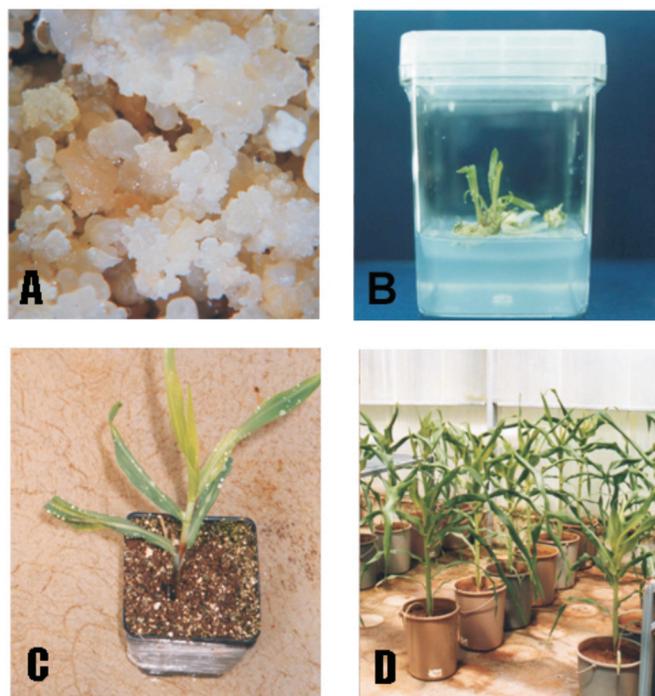


FIGURA 1. Regeneração de plantas de milho a partir de embriões imaturos da linhagem HGZ-A18. A - Calos embriogênicos, B – regeneração de plantas, C – Aclimatação e D – Plantas adultas em casa-de-vegetação. Núcleo de Biologia Aplicada, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais.

(HGZ-A18), utilizando-se embriogênese somática a partir de embriões imaturos, pode ser estabelecido, superando a limitação genotípica de milho tropical em regenerar plantas férteis, através da otimização dos meios de cultura para genótipos específicos. A otimização de um protocolo apresentado no presente trabalho, como modificação de vários meios descritos em trabalhos anteriores, foi eficiente na obtenção de plantas de milho férteis e, conseqüentemente, hábeis para o uso em transformação genética desse cereal tão importante para a agricultura mundial.

Agradecimentos

Marcelo Antoniol Fontes agradece ao PRONEX à concessão de sua bolsa de DTI.

Literatura Citada

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

ARMSTRONG, C. L.; ROMERO-SEVERSON, J.; HODGES, T. K. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through back cross breeding and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 84, n. 6, p. 755-762, 1992.

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**, Grahamstown, v. 7, n. 8, p. 981-987, 2008.

BOHOROVA, N. E.; LUNA, B.; BRITO, R. M.; HUERTA, L. A. HOISINGTON, D. A. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude, and highland maize inbred. **Maydica**, Bergamo, v. 40, p. 275-281, 1995.

BOHOROVA, N. E.; FENELL, S.; MALEAN, S.; PELLEGRINESCHI, A.; HOISINGTON, D. E. **Laboratory protocols: CIMMYT Applied Genetic Engineering Laboratory**. Mexico D.F.: CIMMYT, 1999. Paginação irregular.

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**, Berlin, v. 17, p. 73-76, 1997.

CHE, P.; LOVE, T. M.; FRAME, B. R.; WANG, K.; CARRIQUIRY, A. L.; HOWELL, S. H. Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II callus culture. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 62, n. 1, p. 1-14, 2006

CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; CHU, C. Y.; BI, F. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, Peking, v. 18, p. 659-668, 1975.

DANSON, W. J.; LEGAT, M.; MBOGORI, M. Screening tropical maize lines for production and regeneration of friable and embryogenic type II

- callus. **African Journal of Biotechnology**, Grahamstown, v. 5, n. 23, p. 2367-2370, 2006.
- 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 and Development Biology**, New York, v. 39, p. 524-531, 2003.
- FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R. K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T. M.; GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. L. Plant regeneration from tissue culture of maize. **Crop Science**, Madison, v. 15, p. 417-421, 2002.
- FURINI, A.; JEWELL, D. C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature and mature embryos of tropical and subtropical *Zea mays* L. genotypes. **Maydica**, Bergamo, v. 39, p. 155-164, 1994.
- FLUMINHAN, A.; AGUIAR-PERECIN M. L. R. Embryogenic response and mitotic instability in callus cultures derived from maize inbred lines differing in heterochromatic knob content of chromosomes. **Annals of Botany**, Oxford, v. 82, p. 569-576, 1998.
- GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. L. Plant regeneration from tissue cultures of maize. **Crop Science**, Madison, v. 15, p. 417-421, 1975.
- HUANG, X. Q.; WEI, Z. M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from immature embryos of maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 22, p. 293-800, 2004.
- ISHIDA, V.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEL, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, p. 745-750, 1996.
- JIMÉNEZ, V. M.; BANGERTH F. Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus culture derived from them as related to morphogenesis in vitro. **Plant Science**, Limerick, v.160, n. 2, p. 247-257, 2001.
- LEE, M.; PHILLIPS, R.L. Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. **Genome**, Toronto, v. 29, p.122-128, 1987.
- 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**, Grahamstown, v. 5, p. 2367-2370, 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- ODUOR, R. O.; NJAGI, E. N. M.; NDUNGU, J. S. In vitro regeneration of dryland Kenyan maize genotypes through somatic embryogenesis. **International Journal of Botany**, Oxford, v. 40, p. 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, Faisalabad, v. 7, n. 2, p. 224-232, 2008.

PRIOLI, L. M., SILVA, W. J. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in tropical maize inbreds. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 553-566, 1989.

RATIF, M.; FATMA, T.; BASHIR, K.; KAN, M. A.; RIAZUDDIN S. Regeneration and transformation of elite inbred lines of maize (*Zea mays* L.), with a gene from *Bacillus thuringiensis*. **South African Journal Botany**, Grahamstown, v.72, n. 4, p. 460-466, 2006.

SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR – PERECIN, M. L. R Genotypes with high somatic embryogenesis and plant regeneration capacity obtained from tissue culture. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 717-722, 2000.

SHARMA, V. K.; HANSCH, R.; MENDEL, R. R.; SCHULZE, J. Seasonal effect on tissue culture response and plant regeneration frequency from non-bombarded immature scutella of barley (*Hordeum vulgare*) harvested from controlled environment. **Plant Cell Tissue Culture**, Dordrecht, v. 81, p. 19-26, 2005.

SHOHALEL, A. M.; AKANDA, M. A. L.; PARVEZ, S.; MAHFUJA, S.; ALAM, M. F.; ISLAM, R.; JPARDER, N. Somatic

embryogenesis and plant regeneration from immature embryo derived callus of inbred maize (*Zea mays* L.) **Biotechnology**, New York, v. 2, n. 2, p. 154-161, 2003.

TOMES, D. T.; SMITH, O. S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 70, p. 505-509, 1985.

VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems of the improvement of cereal and grass crops. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 128, p. 193-218, 1987.

VASIL, V.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum* and *P. americanum* X *P. purpureum* hybrid. **American Journal of Botany**, Bronx, v. 68, p. 864-872, 1981.

ZHAO, Z. Y.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L. A.; BOND, D.; KRELL, S.; RUDERT, M. L.; BRUCE, W. B.; PIERCE, D. A. Molecular analysis of T0 plants transformed by *Agrobacterium* and comparison of *Agrobacterium* mediated transformation with bombardment transformation in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v. 72, p. 34-37, 1998