

SP
01450



revista brasileira de
BIOCIÊNCIAS

volume 8 | especial | janeiro/dezembro 2003

SE
2
Efeito de alguns reguladores de
2003 SP-PP-01450



CPATSA-29044-1

ISSN 0080-2228

revista brasileira de BIOCÊNCIAS

Publicação do Centro de Ciências Biológicas - CCB
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
50679-420 Recife - Pernambuco - Brasil
biociencias@ufpe.br

UFPE

reitor Amaro Lins

vice-reitor Gilson Edmar

CCB

diretora Ana Maria Santos Cabral

vice-diretora Leonor Costa Maia

editores

Ralf Schwamborn

José Roberto Botelho de Souza

Bureau de Design - PROEXT - UFPE

projeto gráfico Moacyr Campêlo

coordenação Paula Valadares



Após alguns anos de interrupção, estamos com este volume iniciando uma nova etapa dos esforços editoriais da UFPE no âmbito das Ciências Biológicas. Com o objetivo de oferecer aos pesquisadores atuantes em todo este amplo leque das biociências um novo veículo para seus trabalhos, a nossa meta principal é a agilidade e qualidade na publicação dos manuscritos, após a revisão pelos especialistas nas respectivas áreas. Dando continuidade à tradição de algumas décadas de publicações em Ciências Biológicas sob o nome de *Revista do Instituto de Antibióticos*, e posteriormente como *Biologica Brasílica*, com este volume apresentamos a *REVISTA BRASILEIRA DE BIOCIÊNCIAS - BRAZILIAN JOURNAL OF BIOSCIENCES*.

Neste primeiro volume sob o nome de *REVISTA BRASILEIRA DE BIOCIÊNCIAS - BRAZILIAN JOURNAL OF BIOSCIENCES*, com novo conceito editorial (vide Instruções para os autores) e layout, contamos com contribuições da várias áreas. Apresentamos aqui artigos relacionados à oceanografia biológica, agronomia, fisiologia animal, bioquímica, ecologia vegetal, limnologia e fisiologia vegetal, mostrando assim um pouco da enorme variedade que atualmente existe no campo das Biociências no Brasil.

Recife, 10 de novembro de 2003.



EDITORIAL



- 7** Variação Sazonal da Produção de Algas Perifíticas nos Estuários dos Rios Paripe e Igarassu, Localizados ao Sul do Canal de Santa Cruz (Pernambuco, Brasil)
Ariadne do Nascimento Moura | *José Zanon de Oliveira Passavante*
- 13** Comparação de Cultivares de Milho (*Zea mays L.*) em Solo Salinizado
Ana Maria Siqueira-Reis | *Lilia Willadino* | *Ariadne do Nascimento Moura* | *Terezinha Rangel Camara*
- 19** Efeitos da Amilorida Sobre o Fluxo de Água em Bexiga Urinária de Sapo
Renata Tardivo Cinqeira | *Alina José Q. F. Alves* | *Carlos Roberto Rúbio*
- 27** Peroxidação de Lipídeos e Produção de Peróxidos de Hidrogênio em Presença de b-lapachona
Lilya N. Yuldasheva | *Oleg V. Krasnikov* | *Reginaldo Pereira da Silva* | *Romildo de Albuquerque Nogueira*
- 35** Musgos de Floresta Higrófila e Savana Gramíneo-Lenhosa do Recôncavo Baiano, Bahia, Brasil
Cid José Passos Bastos | *Amélia dos Santos Carqueira* | *Olga Yano*
- 49** Adequação Metodológica para Determinação do Nitrogênio Orgânico Total em Macrófitas Aquáticas e Sedimentos
Fábio Marques Aprile | *Virineu Bianchini Jr*
- 57** Adequação Metodológica para Determinação do Fósforo Total em Macrófitas Aquáticas e Sedimentos
Fábio Marques Aprile | *Virineu Bianchini Jr*
- 65** Efeito de Alguns Reguladores de Crescimento na Regeneração de Plantas de Mandioca (*Manihot Esculenta Crantz*) Cultivadas *In Vitro*
Claudia Ulisses | *Lilia Willadino* | *Terezinha R. Câmara* | *Amobio Gonçalves de Andrade* | *Nataniel Franklin de Melo*

Efeito de Alguns Reguladores de Crescimento na Regeneração de Plantas de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) Cultivadas *In Vitro*

Cláudia Ulisses

Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil

Lilia Willadino

Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil

Terezinha R. Câmara

Arnóbio Gonçalves de Andrade

Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil

Natoniel Franklin de Melo

Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Semi-Árido, Caixa Postal 23, 56300-000, Petrolina, PE, Brasil

RESUMO

No presente trabalho foi avaliado o efeito de alguns reguladores de crescimento na regeneração de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) via organogênese e/ou embriogênese somática. Na primeira etapa (indução), induziu-se a formação de calos a partir de folhas jovens, utilizando o meio MS suplementado com 5, 10, 15 e 20 mg.L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) ou 1, 2, 4, e 6 mg.L⁻¹ de ANA (ácido α -naftalenoacético), além de um tratamento controle, sem reguladores de crescimento. Na fase seguinte (desenvolvimento), os calos obtidos nos referidos tratamentos foram transferidos para meio MS, suplementado com combinações fatoriais de AG₃ (ácido giberélico) e BAP (6-benzilaminopurina) nos níveis de 0 e 1 mg.L⁻¹, a fim de induzir a formação de embriões. Os resultados obtidos mostraram que, na fase de indução, o 2,4-D estimulou a formação de calos friáveis e o ANA favoreceu a formação de calos compactos. Os calos obtidos em meio MS com adição de 2, 4 e 6 mg.L⁻¹ de ANA, apresentaram organogênese indireta de brotos, e organogênese direta e indireta de raízes. Por sua vez, os calos tratados com 1 mg.L⁻¹ de ANA apresentaram apenas organogênese indireta de raízes, enquanto que, no controle, houve uma discreta formação de raízes. Embriões somáticos foram obtidos na fase de desenvolvimento, apenas a partir de calos friáveis, cultivados em meios contendo 1 mg.L⁻¹ de BAP, ou 1 mg.L⁻¹ de BAP associado com 1 mg.L⁻¹ de AG₃.

Palavras-chave: organogênese, embriogênese somática, reguladores de crescimento.

ABSTRACT

Effect of some growth regulators on the plant regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultured in vitro. In the present work, the effect of some growth regulators on the regeneration of cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) was evaluated by organogenesis and/or somatic embryogenesis. In a first stage (induction), the formation of calli was induced in young leaves using MS medium supplemented with 5, 10, 15 and 20 mg.L⁻¹ of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) or 1, 2, 4, and 6 mg.L⁻¹ of NAA (α -naftalenoacetic acid), besides a control treatment without growth regulators. In the second phase (development), the calli obtained in the above treatments were transferred to MS medium supplemented with a factorial combination of GA₃ (gibberellic acid) and BAP (6-benzylaminopurine) at 0 and 1 mg.L⁻¹, in order to induce the formation of embryos. The results showed that, in the induction phase, the 2,4-D stimulated friable calli formation whereas ANA induced compact calli formation. The calli obtained in the MS medium with ANA at 2, 4 and 6 mg.L⁻¹ presented indirect organogenesis of shoots, and direct and indirect organogenesis of roots. The calli treated with 1 mg.L⁻¹ ANA only displayed indirect organogenesis of roots, while, in the control, there was a little root formation. Somatic embryos were obtained in the second phase (development), only from friable calli in the medium supplemented with 1 mg.L⁻¹ BAP, or 1 mg.L⁻¹ BAP associated with 1 mg.L⁻¹ AG₃.

Keywords: organogenesis, somatic embryogenesis, growth regulators.



INTRODUÇÃO

A mandioca é uma espécie que apresenta vantagens culturais de subsistência à seca, capacidade de produzir em solos com baixa fertilidade, habilidade competitiva com plantas invasoras e resistência a pragas, além de servir tanto para alimentação humana como animal (Fukuda *et al.*, 1996; Nassar, 2000). Entretanto, o sistema de produção empregado ainda é inadequado, resultando em uma baixa produtividade, devida, principalmente, aos tratamentos culturais precários e ao acúmulo de doenças (Fukuda, 1993).

Por outro lado, processos biotecnológicos podem ser empregados para a obtenção de materiais mais produtivos e isentos de patógenos. Dentre essas técnicas, a regeneração de brotos e o cultivo de calos organogênicos são as mais significativas para a formação de plantas a partir de pecíolos, folhas e segmentos nodais (Eskes *et al.*, 1974; Parke, 1978; Tilquin, 1979; Roca, 1984; Smith *et al.*, 1986; Taylor *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2000). Embriões somáticos de mandioca também têm sido induzidos a partir de folhas jovens imaturas ou de ápices caulinares de plantas propagadas *in vitro* (Szabados *et al.*, 1987; Matsumoto *et al.*, 1991; Melo, 2002). Vale salientar que a embriogênese somática em mandioca é um processo que pode oferecer importantes possibilidades, não só para a propagação massiva de genótipos isentos de doenças, mas também como uma ferramenta de apoio aos programas de melhoramento associada com métodos de genética molecular e celular (Vasil, 1996). Entretanto, a regeneração de plantas a partir de sistemas de cultura de células e tecidos é ainda uma etapa limitante na aplicação de vários processos biotecnológicos.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito de alguns reguladores de crescimento sobre a regeneração de plantas de mandioca cultivadas *in vitro* a partir de folhas jovens.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado foi gentilmente cedido pelo Banco de Germoplasma do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA). Foram utilizadas plantas de mandioca (*M. esculenta* Crantz) da cultivar Trouxinha, mantidas *in vitro* em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962).

A multiplicação do material foi realizada utilizando segmentos nodais, os quais foram inoculados verticalmente em frascos contendo meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962), modificado quanto à concentração de sacarose, diminuída de 30 g.L⁻¹ para 20 g.L⁻¹, e à concentração de tiamina, aumentada de 0,1 mg.L⁻¹ para 0,5 mg.L⁻¹. O meio MS foi suplementado ainda com 0,04 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 0,02 mg.L⁻¹ de ANA (ácido a-naftalenoacético), 0,05 mg.L⁻¹ de AG₃ (ácido giberélico) e 7,5 g.L⁻¹ de ágar. Após a primeira multiplicação, a concentração de AG₃ foi aumentada para 0,1 mg.L⁻¹ a fim de promover um maior alongamento das plantas. As plantas permaneceram na fase de multiplicação por 4 meses, totalizando 4 subcultivos.

Após a multiplicação, a indução de calos foi realizada a partir de folhas jovens medindo aproximadamente 6 mm de comprimento, provenientes das plantas micropropagadas. As

folhas foram inoculadas horizontalmente em meio de cultura semi-sólido, composto pelos sais e vitaminas de MS, suplementado com os seguintes reguladores de crescimento: 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), nos níveis 5, 10, 15 e 20 mg.L⁻¹ e ANA (ácido a-naftalenoacético), nos níveis 1, 2, 4, e 6 mg.L⁻¹. Como controle, foi utilizado o mesmo meio sem reguladores de crescimento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 6 repetições por tratamento.

Para indução da embriogênese somática, os calos formados a partir de folhas jovens foram transferidos para meio básico MS, suplementado

com combinações fatoriais de AG₃ e BAP. Foram estabelecidos 4 tratamentos, num fatorial 2x2, compreendendo dois níveis de AG₃ (0 e 1 mg.L⁻¹) e dois níveis de BAP (0 e 1 mg.L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 6 repetições por tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De uma maneira geral, o número médio de segmentos nodais, obtidos na fase de multiplicação *in vitro*, resultou em aproximadamente 6 plantas por segmento nodal inoculado. Entretanto, para a cultivar estudada

Regulador de Crescimento	Coloração das Folhas		Formação de Calos*	
	1ª Semana	2ª Semana	1ª Semana	2ª Semana
ANA	verde	verde	ausente	++
2,4-D	verde	amarela	ausente	+++
Controle	verde	verde	ausente	+

* (+ pouca, ++ média, +++ intensa)

Tabela 1 – Efeito do ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre o cultivo *in vitro* de folhas jovens de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).

Tabela 2 – Respostas morfogênicas dos calos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em relação às concentrações de ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) utilizadas no cultivo *in vitro* de folhas jovens.

Tratamentos	Raízes	Brotos
2,4-D (5 mg.L ⁻¹)	ausente	ausente
2,4-D (10 mg.L ⁻¹)	ausente	ausente
2,4-D (15 mg.L ⁻¹)	ausente	ausente
2,4-D (20 mg.L ⁻¹)	ausente	ausente
ANA (1 mg.L ⁻¹)	Organogênese indireta	ausente
ANA (2 mg.L ⁻¹)	Organogênese direta e indireta	Organogênese indireta
ANA (4 mg.L ⁻¹)	Organogênese direta e indireta	Organogênese indireta
ANA (6 mg.L ⁻¹)	Organogênese direta e indireta	Organogênese indireta
Controle	Organogênese direta e indireta	ausente

no presente trabalho, observou-se um alongamento reduzido das plantas, quando cultivadas em meio contendo $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de AG_3 . O aumento da concentração do AG_3 para $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ promoveu um alongamento mais adequado, favorecendo o processo de multiplicação.

A Tabela 1 resume as respostas morfogênicas dos explantes aos reguladores de crescimento, durante a indução de calos. Na primeira semana após a inoculação das folhas, a coloração das mesmas permaneceu inalterada, não se observando calogênese em nenhum dos tratamentos avaliados. Na segunda semana de avaliação, as folhas mantidas em meio com 2,4-D apresentavam coloração amarelada, constatando-se uma intensa formação de calos do tipo friável. Nos tratamentos com ANA, a calogênese foi menos intensa e os calos formados eram do tipo compacto. Nesses últimos tratamentos, as folhas permaneceram clorofiladas. No tratamento controle, a calogênese foi mínima quando comparada com os demais tratamentos, evidenciando a importância das auxinas na indução de calos. Nesse caso, o rápido aumento da taxa de crescimento celular, promovido pelas auxinas, é consequência de um mecanismo múltiplo de ação, resultando em uma condição final de crescimento ou desenvolvimento representativa do efeito do balanço hormonal (Davies, 1995; Biasi, 2002).

A formação de órgãos, como raízes e brotos, foi observada também a partir da segunda semana de cultivo. Nos tratamentos com ANA ocorreu organogênese de brotos e raízes na maioria dos níveis empregados, com exceção do tratamento contendo 1 mg.L^{-1} , no qual só observou-se

formação de raízes. No tratamento controle também ocorreu apenas formação de raízes, ainda que com menor intensidade do que nos demais tratamentos. Nos meios nutritivos onde se empregou o 2,4-D não houve formação de tecidos diferenciados. A formação de raízes ocorreu tanto por organogênese direta como indireta, enquanto que a formação de brotos foi exclusivamente por via indireta (Tabela 2). Os fatores que controlam a organogênese são vários e resultam da divisão e diferenciação celular, organizada com padrões definidos que dependem da atividade e expressão de certos genes (Peres, 2002).

Por outro lado, observou-se a formação de embriões somáticos nos estádios globular e torpedo, na terceira semana após a inoculação dos calos nos meios contendo 1 mg.L^{-1} de BAP ou 1 mg.L^{-1} de BAP associado com 1 mg.L^{-1} de AG_3 . Nesse caso, vale salientar que apenas os calos formados em meio com 2,4-D apresentaram competência embriogênica. Os calos induzidos com ANA não apresentaram formação de embriões até 8 semanas após a inoculação dos calos. Algumas espécies apresentam respostas diferentes em relação a formação de calos. Em cenoura (*Daucus carota*), por exemplo, a formação de diferentes tipos de calos foi reportada por Jimenez & Bangerth (2001) durante o processo de embriogênese. Nessa espécie, calos translúcidos não produziram embriões somáticos, enquanto calos compostos de estruturas pré-globulares e globulares foram competentes em regenerar embriões somáticos. Em mandioca, observou-se resposta embriogênica somente nos calos do tipo friável. Esse resultado sugere a ocorrência de células com diferentes suscetibilidades na rota de formação de calos até a indução e desenvolvimento de

embriões somáticos.

Nesse contexto, vale ressaltar o efeito indutor de embriogênese causado pelo 2,4-D na cultivar estudada. Segundo Michalczuk *et al.* (1992), a retirada do 2,4-D do meio favorece a embriogênese somática à medida que desativa a rota metabólica da síntese do ácido indolacético (AIA) a partir do triptofano, ativando a síntese do AIA pela rota independente deste aminoácido. Em mandioca, Matsumoto *et al.* (1991) observaram a formação de calos a partir do cultivo de folhas jovens em meio contendo 2,4-D, com desenvolvimento posterior de embriões somáticos num segundo estágio de cultura, sem o 2,4-D. Outro fator, indicado pelos autores como responsável pelo desenvolvimento dos embriões somáticos, foi o AG₃ na concentração de 1 mg.L⁻¹. Da mesma forma, Melo (2002) obteve formação de embriões somáticos nas cultivares Mcol-1468 e MBRA235 de mandioca, utilizando 1 mg.L⁻¹ de AG₃. Por outro lado, no presente trabalho, verificou-se que a formação de embriões ocorreu com a utilização de BAP isoladamente ou associado com AG₃. Assim, a citocinina BAP parece ter influência no desenvolvimento de embriões para a cultivar Trouxinha, possivelmente devido ao estímulo no processo de divisão celular, favorecido por essa classe de regulador de crescimento.

Finalmente, o protocolo obtido neste trabalho poderá ser útil como base para o desenvolvimento de outras técnicas, como a produção de sementes sintéticas (Guerra *et al.*, 1999) ou como suporte em técnicas de transformação genética mediante a utilização de vetores biológicos (Sluys, 1999) ou biobalísticos (Lacorte *et al.*, 1999), cujo emprego tem resultado em importantes avanços para a agricultura (Vasil, 1996).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIASI, L.A. 2002. Reguladores de crescimento vegetal. In: Wachowicz, C.M.; Carvalho, R.I.N. (eds.). Fisiologia Vegetal: Produção e Pós-colheita. Curitiba: Editora Champagnat, p.63-94.
- DAVIES, P.J. 1995. Plant hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, 2nd Edition. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 833p.
- ESKES, A.B.; VARGA, A.; STARITSKY, G.; BRUINSMA, J. 1974. Callus growth and rooting of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) stem segments cultured *in vitro*. Acta Botanica Neerlandica, 23: 315-320.
- FUKUDA, C. 1993. Doenças da mandioca. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA). Instruções práticas para o cultivo da mandioca. Cruz das Almas, p.53-56.
- FUKUDA, W.M.G.; COSTA, I.R.S.; VILARINHOS, A.D.; OLIVEIRA, R.P. 1996. Diversidade genética e manejo de germoplasma de mandioca. In: Banco de Germoplasma de Mandioca: Manejo, conservação e caracterização. Embrapa: Série Documentos 86:10-32.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. 1999. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. v.2. Brasília: Embrapa SPI, p.533-568.
- JIMENEZ, V.M.; BANGERTH, F.B. 2001. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. Physiologia Plantarum, 111: 389-395.

LACORTE, C.; ARAGÃO, F.J.L.; VAINSTEIN, M.H.; RECH, E.L. 1999. Biobalística. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. v.2. Brasília: Embrapa SPI, p.761-781.

MATSUMOTO, K.; CABRAL, G.B.; TEIXEIRA, J.B.; RECH, E.L. 1991. Embriogênese somática a partir de folhas imaturas de mandioca *in vitro*. Revista Brasileira de Fisiologia, 3: 107-110.

MELO, N.F. 2002. Somatic embryogenesis and ploidy stability in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars regenerated by *in vitro* culture of young leaves. Cytologia, 67: in press.

MICHALCZUK, L.; BANDURSKI, R.S.; COOKE, T.J.; COHEN, J.D. 1992. Regulation of indole-5-acetic acid biosynthesis in carrot cell culture. Plant Physiology, 100: 1346-1353.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

NASSAR, N.M.A. 2000. Cassava, *Manihot esculenta* Crantz, genetics resources: their collection, evolution and manipulation. Advances in Agronomy, 69: 179-230.

OLIVEIRA, R.P., GOMES, T.S.; VILARINHOS, A.D. 2000. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 35: 2329-2334.

PARKE, D. Tissue culture of cassava on chemically defined media. 1978. Physiologia Plantarum, 42: 195-201.

PERES, L.E.P. 2002. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, n.25: 44-48.

ROCA, W.M. 1984. Cassava. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (eds.) Handbook of plant cell culture: Crop species. New York: Macmillan, p.269-301.

SLUYS, M.A.V. 1999. Agrobacterium: um vetor genético natural para transformação em plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. v.2. Brasília: Embrapa SPI, p.737-759.

SMITH, M.K.; BIGGS, B.J.; SCOTT, K.J. 1986. *In vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 6: 221-228.

SZABADOS, L.; HOYOS, R.; ROCA, W. 1987. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. Plant Cell Reports, 6: 248-251.

TAYLOR, N.J.; EDWARDS, M.; KIERNAN, R.J.; DAVEY, C.D.M.; BLAKESLEY, D.; HENSHAW, G.G. 1996. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Nature Biotechnology, 14: 726-730.

TILQUIN, J.P. 1979. Plant regeneration from stem callus of cassava. Canadian Journal of Botany, 57: 1761-1763.

VASIL, I.K. 1996. Milestones in crop biotechnology - Transgenic cassava and *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. Nature Biotechnology, 14: 702-703.