

# Transformação Genética de Milho via *Agrobacterium tumefaciens*<sup>1</sup>

*Thiago Henrique Leite*<sup>2</sup>, *Andréa Almeida Carneiro*<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Trabalho financiado pelo FAPEMIG

<sup>2</sup> Estudante do Curso de Engenharia Ambiental da UNIFEMM, Bolsista PIBIC do Convênio FAPEMIG - Embrapa

<sup>3</sup> Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

## **Introdução**

Originário do México, o milho evoluiu de uma gramínea selvagem (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) para uma espécie domesticada altamente produtiva devido a intervenção humana. Entre os anos de 1976 e 2010, a produtividade do milho no Brasil aumentou mais de 200%, sendo que a área utilizada para o plantio cresceu apenas 18% (CONAB, 2012). Estes resultados foram devidos em grande parte a rigorosos programas de seleção e melhoramento de cultivares.

Enquanto os programas tradicionais de melhoramento continuam exercendo um papel fundamental na melhoria das características agrônômicas do milho, tecnologias recentes, geradas em função dos enormes progressos alcançados pela biologia molecular e celular nos últimos anos, permitem que novas ferramentas sejam agregadas a estes programas no desenvolvimento de novas cultivares com maiores rendimentos agrícolas, constituição nutricional diferenciada e tolerantes a diferentes estresses bióticos e abióticos.

A biotecnologia está gerando um grande número de genes passíveis de serem utilizados para a melhoria genética do milho, e as técnicas de transformação de plantas poderão ser empregadas para alterar a funcionalidade *in vivo* destes genes via complementação, superexpressão ou silenciamento. Progressos expressivos foram conseguidos no desenvolvimento da tecnologia de transformação genética de milho na última década. A transformação genética do milho, considerada por algum tempo recalcitrante, tornou-se, atualmente, um procedimento de rotina para vários genótipos na maioria dos laboratórios públicos e privados trabalhando com esta cultura (GORDON KAMM et al., 1990; FRAME et al., 2002; ISHIDA et al., 2007).

Durante vários anos a transformação de monocotiledôneas via *Agrobacterium* tinha uma eficiência muito baixa, entretanto, recentemente, este cenário está mudando, e esta metodologia de transferência gênica tem se tornado o método de escolha para este grupo de plantas (ISHIDA et al., 1996). Este método de transformação utiliza um sistema natural de transferência de genes desenvolvido pela *Agrobacterium*. Esta bactéria encontrada no solo é capaz de causar tumores em vegetais na região da infecção. Estes tumores resultam da presença do plasmídeo Ti ou plasmídeo indutor de tumor na célula bacteriana. O plasmídeo Ti é uma molécula circular grande (200 a 800 kb) de DNA fita dupla que pode se replicar independentemente do genoma da *Agrobacterium tumefaciens* (GELVIN, 2003). Localizado no plasmídeo Ti se encontram duas regiões importantes para a transferência de genes da bactéria para a planta, a região do T-DNA e a região *vir*. As regiões dos T-DNAs de plasmídeos selvagens contêm genes que comandam a produção de opinas e hormônios, tais como auxina e citocinina, pela célula vegetal. As opinas são aminoácidos utilizados apenas pela *Agrobacterium* como fonte de carbono e nitrogênio, enquanto os hormônios são responsáveis pela indução de tumores em vegetais. O T-DNA tem, aproximadamente, entre 10 e 30 Kb e suas extremidades são delimitados por duas sequências de 25 pb altamente homólogas, denominados extremidades direita e esquerda. A *Agrobacterium* selvagem transfere o seu T-DNA através das membranas das células vegetais e o incorpora no DNA genômico da planta. O processamento do T-DNA e sua transferência para a célula vegetal é devido em grande parte a atividade de virulência das proteínas codificadas na região *vir* (GELVIN, 2003).

Para viabilizar a utilização da *Agrobacterium* em processos biotecnológicos de transferência de genes para plantas é necessário que os genes endógenos do T-DNA causadores de tumor sejam inativados e que os genes exógenos GDI e GMS sejam inseridos entre as extremidades direita e esquerda do T-DNA. O plasmídeo recombinante resultante é novamente colocado na *Agrobacterium* para ser transferido para células vegetais (GELVIN, 2003). Tecidos ou células transformados podem ser utilizados para regeneração de plantas transgênicas (HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996).

Por ser muito grande, o plasmídeo Ti é difícil de ser manipulado, portanto, foram criados os vetores binários (BEVAN, 1984), os quais são menores e capazes de multiplicar tanto em *Agrobacterium* como em *E. coli* e fáceis de manipular em laboratório. Estes vetores possuem um T-DNA artificial, no qual diferentes transgenes

podem ser inseridos e uma origem de replicação compatível com o Ti na *Agrobacterium*. Os vetores binários são introduzidos em *Agrobacterium* desarmadas, ou seja, em *Agrobacterium* que carregam plasmídeos Ti que tiveram a região do T-DNA removida. O Ti de *Agrobacterium* desarmadas ainda possui a região de virulência (*vir*), sendo seus genes capazes de agir *in trans* para transferir o T-DNA recombinante do vetor binário (GELVIN, 2003).

O primeiro protocolo de transformação de milho mediada por *Agrobacterium* com alta eficiência foi relatado em 1996 por um grupo de pesquisadores da Japan Tobacco Inc. (ISHIDA et al., 1996). Eles foram capazes de infectar embriões imaturos de milho A188 utilizando vetores superbinários (pSB131 ou pTOK233) (ISHIDA et al. 1996). O plasmídeo superbinário desenvolvido por Komari (1990) contém uma cópia extra dos genes de virulência *virB*, *virC* e *virG*. Trabalhos subsequentes mostraram que a transformação de milho mediada por *Agrobacterium* também era possível com a utilização de vetores padrões (FRAME et al., 2002). Para o milho a técnica de *Agrobacterium* foi relatada resultar em alta eficiência com alto número de eventos contendo apenas uma ou um baixo número de cópias do transgene no genoma quando comparado com a biobalística (ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 2001; GORDON-KAMM et al., 1990; FRAME et al., 2002; LUPOTTO et al., 2004; HUANG; WEI, 2005; ISHIDA et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer condições para uma melhor infecção dos embriões imaturos de milho por *Agrobacterium tumefaciens*. Os resultados mostraram que a otimização do protocolo de infecção resultou em um aumento da eficiência de transformação de milho HiII.

### ***Material e Métodos***

**Construção gênica:** Foi utilizada a construção gênica pTF102. Esta construção contém o gene repórter GUS sob o controle do promotor 35S e o marcador de seleção é o gene bar. A expressão do gene GUS ( $\beta$ -glucuronidase) foi analisada por ensaios histoquímicos (JEFFERSON et al., 1987). Utilizou-se um estereoscópio da marca Zeiss Stemi SV 11 para visualização da expressão de GUS (Zeiss, São Paulo, SP, Brasil).

**Parâmetros testados durante a infecção de embriões imaturos de milho com *Agrobacterium tumefaciens*:** (i) período de estocagem das espigas de milho a 4 °C antes da transformação (1 e 2 dias); (ii) Tempo de permanência dos embriões imaturos de

milho em meio de infecção durante o período de coleta (30 e 120 min.); (iii) Tempo de permanência dos embriões em cocultivo com *Agrobacterium tumefaciens* a 19 °C; (iv) Tamanho do embrião imaturo utilizado (>1,5 mm e <2,0 mm).

*Transformação utilizando Agrobacterium tumefaciens:* A transformação foi realizada de acordo com Frame et al. (2002) e Vega et al. (2008). *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 foi plaqueada em meio YEP contendo canamicina (50 mg/l) e espectinomicina (50 mg/l) e mantida por 5 dias a 19 °C. No dia da transformação, a *Agrobacterium* foi ressuspensa em meio de infecção suplementado com acetoseringona até atingir uma OD550 = 0,3-0,4 e incubada a 150 rpm, 23 °C por 2 h.

*Infecção de embriões imaturos de milho:* Para a infecção, 50 embriões imaturos de milho foram coletados em 1 mL de meio de infecção acrescido de acetoseringona utilizando tubos eppendorf. Momentos antes da infecção, os embriões foram lavados duas vezes em novo meio de infecção. Em seguida, foi adicionado 1 mL da cultura bacteriana e incubado por 5 min.

*Cocultivo:* Após a infecção, os embriões, com o escutelo voltado para cima, foram transferidos para meio de cocultivo e incubados a 20 °C por 5 dias. Após o período de cocultivo as análises de detecção da expressão do gene GUS foram realizadas.

*Repouso:* Em seguida, os embriões foram transferidos para o meio de repouso a 28 °C (escuro) por 7 dias.

*Seleção de eventos transformados:* Após sete dias no meio de repouso, os embriões foram transferidos para o meio de seleção I contendo 1,5 mg/L de bialaphos por 2 semanas. Em seguida, os calos foram transferidos para meio de seleção II contendo 3,0 mg/L de bialaphos a cada 2 semanas, até o aparecimento de calos brancos, friáveis, saudáveis e com crescimento rápido.

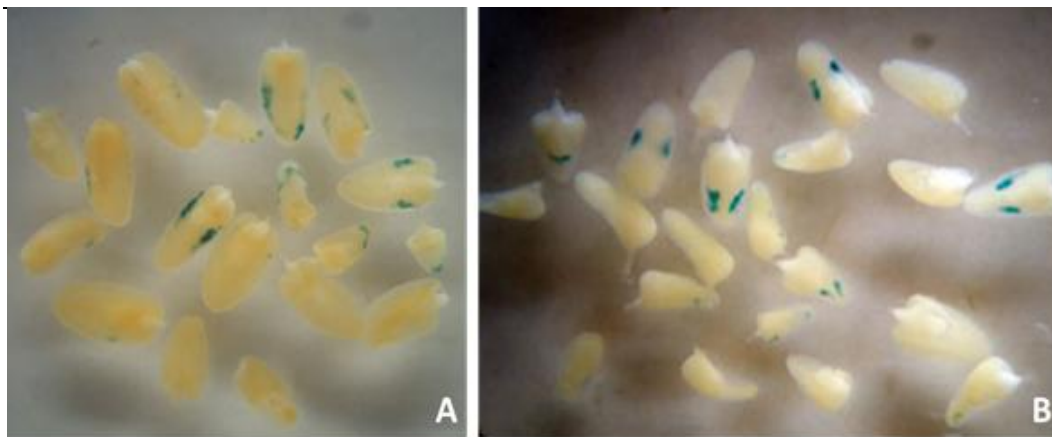
*Regeneração das plantas transgênicas:* Calos resistentes ao bialaphos foram transferidos para placas contendo meio de regeneração e incubados a 25 °C até a maturação. Embriões maduros foram transferidos para meio de germinação.

## **Resultados e Discussão**

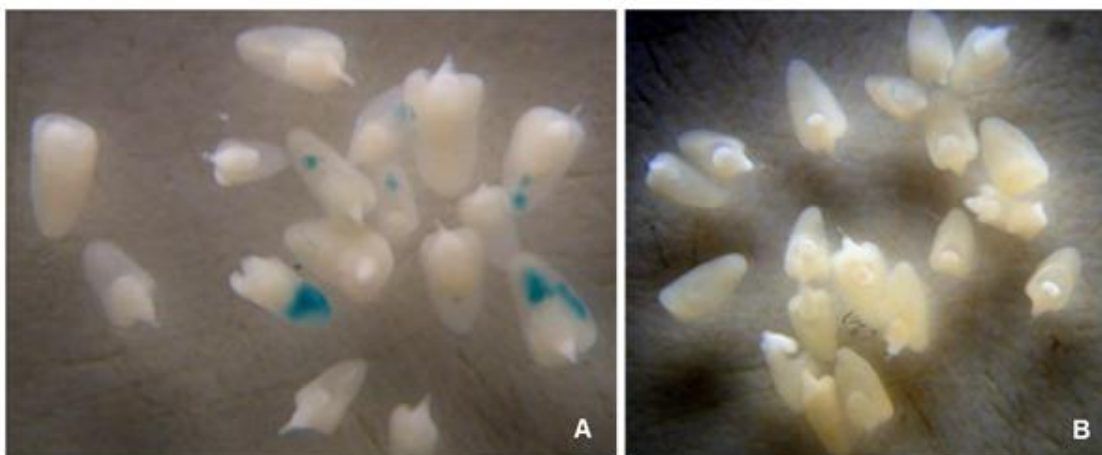
O gene repórter GUS direcionado pelo promotor constitutivo viral 35S foi utilizado na otimização da infecção dos embriões imaturos de milho pela *Agrobacterium tumefaciens* EHA101. O primeiro teste realizado foi para verificar se a estocagem das espigas de milho por um dia a 4 °C influenciava a taxa de infecção dos

embriões. Na Figura 1, pode-se observar, através das manchas azuis, que não existe diferença na qualidade da infecção quando as espigas são estocadas por 24 h a 4 °C quando comparadas com espigas frescas. O tempo de permanência dos embriões em meio de coleta (meio de infecção sem *Agrobacterium*) parece influenciar na qualidade da infecção pois o menor tempo neste meio (30 min.) apresentou o melhor resultado (Figura 2). Maior quantidade de manchas azuis foi detectada quando os embriões permaneceram no meio de coleta por apenas 30 min. quando comparados com embriões mantidos neste meio por 120 min. Outro fator que parece ter influência no processo de infecção dos embriões pela *Agrobacterium* é o estágio evolutivo destes. Embriões de até 2 mm de comprimento apresentaram níveis de infecção pela *Agrobacterium* maiores do que aqueles com mais de 2 mm (Figura 3). Outro parâmetro testado foi o tempo em que o embrião de milho permaneceu em contato com a *Agrobacterium*. Nossos resultados mostraram que após sete dias de cocultivo a infecção foi melhor do que após 3 dias (Figura 3). Portanto, na transformação genética de embriões de milho HiII via *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 estão sendo adotados os parâmetros estabelecidos neste estudo. Isto é, embriões de milho com até 2 mm de comprimento, frescos ou estocados a 4 °C, por até 24 h são utilizados como explantes para a transformação genética. O período de contato entre a bactéria e os embriões é de sete dias.

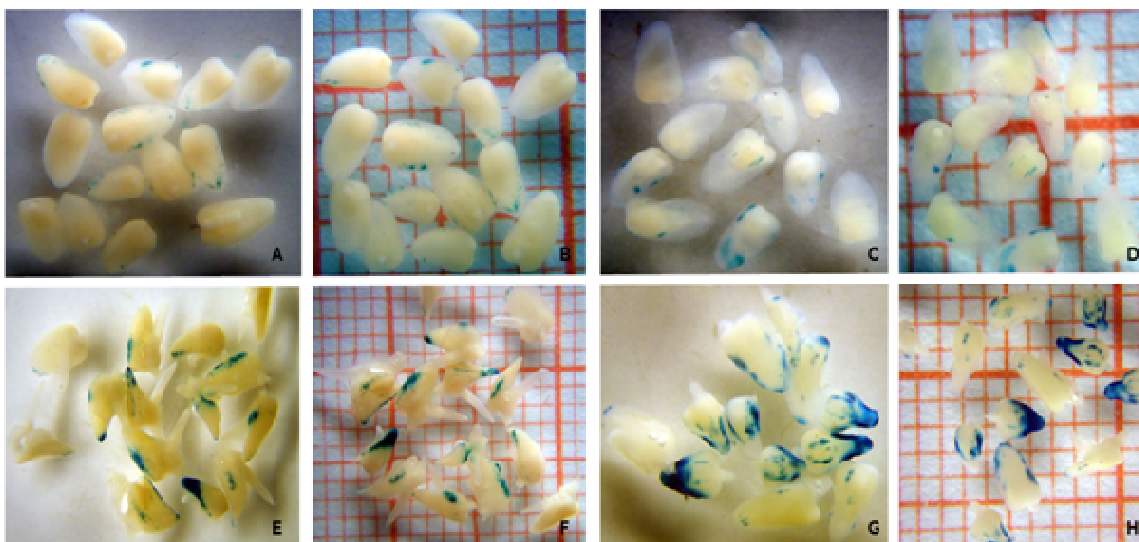
Utilizando este protocolo para transformação de milho com construções gênicas contendo diferentes genes de interesse, por exemplo, *dreb2A*, *cry*, *AltSB*, tem-se obtido uma frequência de transformação da ordem de 1,5%.



**Figura 1:** Tempo de estocagem das espigas de milho a 4 °C antes da transformação usando *Agrobacterium tumefaciens*. (a) Espigas mantidas por 1 dia a 4 °C; (b) espigas mantidas por 2 dias a 4 °C.



**Figura 2: Tempo de permanência dos embriões imaturos de Hill em meio de infecção sem *Agrobacterium*.** (A) 30 min. em meio de infecção (MI + AS) ; (B) 120 min. em meio de infecção (MI + AS). Ambos os tratamentos foram seguidos de lavagem com MI + AS e 15 min. de infecção com *Agrobacterium* (O.D.<sub>600</sub> ~ 0,3), no escuro.



**Figura 3: Tempo de permanência e tamanho dos embriões em cocultivo com *Agrobacterium tumefaciens* à 19°C.** (A e B) 3 dias de cocultivo, embriões entre 2,5 a 3 mm de comprimento; (C e D) 3 dias de cocultivo, embriões com 2 mm de comprimento; (E e F) 7 dias de cocultivo, embriões entre 2,5 a 3 mm de comprimento; (G e H) 7 dias de cocultivo, embriões com 2 mm de comprimento. Embriões foram infectados durante 15 min. no escuro OD<sub>550</sub> entre 0,3 e 0,4.

### ***Agradecimentos***

À FAPEMIG e Embrapa pelo apoio.

### ***Referências***

BEVAN, M. W. Binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors for plant transformation. **Nucleic Acids Research**, London, v. 12, p. 8711-8721, 1984.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 2 dez. 2012.

FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R. K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T. M.; PEGG, E. K.; LI, B.; NETTLETON, D. S.; PEI, D.; WANG, K. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 129, p. 13-22, 2002.

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

GORDON-KAMM, W. J.; SPENCER, T. M.; MANGANO, M. L.; ADAMS, T. R.; DAINES, R. J.; START, W. G.; O'BRIEN, J. V.; CHAMBERS, S. A.; ADAMS JR., W. R.; WILLETTS, N. G.; RICHE, T. B.; MACKAY, C. J.; KRUEGER, R. W.; KAUSCH, A. P.; LEMAUX, P. G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 2, p. 603-618, 1990.

HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHO, T. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of boundaries of the T-DNA. **Plant Journal**, v. 6, p. 271-282, 1994.

HUANG, X.; WEI, Z. Successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of maize elite inbred lines. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 187-200, 2005.

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

ISHIDA, V.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 6, p. 745-750, 1996.

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

KOMARI, T. Transformation of callus cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. **Plant Cell Reports**, New York, v. 9, p. 303-306, 1990.

LUPOTTO, E.; CONTI, E.; REALI, A.; LANZANOVA, C.; BALDONI, E.; ALLEGRI, L. Improving in vitro culture and regeneration conditions for *Agrobacterium*-mediated maize transformation. **Maydica**, Bergamo, v. 49, p. 221-229, 2004.

VEGA, J. M.; YU, W.; KENNON, A. R.; CHEN, X.; ZHANG, Z. J. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, p. 297-305, 2008.

ZHAO, Z.-Y.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L.; HONDRED, D.; BOND, D.; SCHROEDER, S.; RUDERT, M.; PIERCE, D. High throughput genetic transformation of maize mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 8, p. 323-333, 2001.