

Transformação genética de milho Hill com o gene *crycnpms222* de *Bacillus thuringiensis*

Kamila Ellen Souza de Oliveira⁽¹⁾; Meire de Cassia Alves⁽²⁾; Beatriz de Almeida Barros⁽²⁾; Newton Portilho Carneiro⁽³⁾; Fernando Hercos Valicente⁽³⁾; Andréa Almeida Carneiro⁽³⁾

⁽¹⁾ Graduanda em Engenharia Agrônoma, Universidade Federal de São João Del-Rei, Sete Lagoas, MG; E-mail: kamila.ellen.s@gmail.com; ⁽²⁾ Analista de pesquisa e desenvolvimento, Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), Sete Lagoas, MG; ⁽³⁾ Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), Sete Lagoas-MG.

RESUMO: A adoção de técnicas de engenharia genética possibilitou, nos últimos anos, avanços significativos nos sistemas agrícolas de produção e a redução de perdas econômicas causadas pelo ataque de insetos fitófagos. Entretanto, os prejuízos econômicos ocasionados por pragas como a *Spodoptera frugiperda*, ainda afetam consideravelmente a cultura do milho, o segundo cereal de maior importância no Brasil em termos de semeadura e produção de grãos. Considerando os danos causados pelos insetos-praga e a necessidade de utilização de métodos mais seguros e ecologicamente viáveis, a adoção de plantas geneticamente modificadas (OGMs) expressando toxinas da bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* (*Bt*), consolidou-se no mundo como uma poderosa ferramenta nos programas de sanidade vegetal. As toxinas produzidas por *Bt* provêm de proteínas denominadas cry, que tem ação inseticida para diversas ordens de insetos. Diante do exposto, a utilização de plantas transgênicas de milho expressando genes *Bt* tóxicos a insetos, apresenta inúmeras vantagens, como a redução de aplicações de agentes de controle químico, além da resistência durante todo o ciclo de produção do milho, sendo também uma opção econômica, segura e de efeito não poluente ao meio ambiente. Com base no exposto, este trabalho teve como objetivo a montagem do cassete de expressão 35S::*crycnpms222*::Nos (gene da bactéria *B. thuringiensis*) e a transformação genética de embriões zigóticos imaturos de milho Hill via *Agrobacterium tumefaciens*. Após seleções subsequentes em cultura de tecidos, calos transgênicos de milho foram obtidos com uma eficiência média de 2% e plantas estão em processo de regeneração.

Termos de indexação: *Agrobacterium tumefaciens*; *Bacillus thuringiensis*; cultura de tecidos.

INTRODUÇÃO

Os danos causados por insetos-praga nas lavouras em todo o mundo já atingiram níveis mais elevados que aqueles causados por doenças e patógenos. Dezenas de espécies de insetos estão associadas à cultura do milho, entre elas a *Spodoptera frugiperda*, conhecida como lagarta-do-cartucho e responsável por perdas de até 34% nas lavouras.

Os prejuízos econômicos e ambientais provocados por insetos-praga e pelo uso indiscriminado de inseticidas químicos foram consideravelmente reduzidos após a descoberta, no início do século XX, de uma bactéria de poder entomopatogênico, denominada de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Capalho et al., 2005).

O maior avanço na utilização de *B. thuringiensis* tem sido a transformação de diversas cultivares visando a expressão das toxinas *Bt*. A partir dos anos 80, foram obtidas as primeiras plantas transgênicas por meio da incorporação dos genes codificadores das proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* na cultura do tabaco e do tomate (Oeller et al., 1991; Dias, 1992). Desde 1996, a importância comercial destas cultivares transformadas tem crescido de forma considerável, levando-as a ocuparem mundialmente o segundo lugar entre as plantas geneticamente modificadas com maior emprego e distribuição (Crickmore, 2006).

Mais de 70 classes de proteínas inseticidas, denominadas proteínas cry, de *B. thuringiensis* já foram caracterizadas (Crickmore, 2014). Nesse contexto, a proteína isolada pela Embrapa MS *crycnpms222* apresenta relevância por ser potencialmente tóxica a insetos das ordens Hemiptera, Lepidoptera e Diptera, que incluem importantes pragas da cultura do milho (Frankenhuyzen, 2009).

Dentre as técnicas de transformação genética de plantas, a transformação via *Agrobacterium tumefaciens* destaca-se por apresentar maior precisão na integração do T-DNA, poucas cópias do transgene são inseridas no genoma da planta e os

caracteres introduzidos por esta via têm se mostrado estáveis durante muitas gerações de cruzamento (Ishida et al., 1996).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi a clonagem do gene *crycnpms222* em um vetor binário e a utilização do cassete de expressão *35S::crycnpms222::Nos* para transformar embriões imaturos do milho Hill via *Agrobacterium tumefaciens*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, MG.

Clonagem molecular. O gene *crycnpms222* controlado pelo promotor *CaMV35S* duplicado, presente no vetor pCambia 1305.1, foi subclonado no vetor binário pTF101.1. O marcador de seleção de planta deste vetor é o gene *bar*, que confere tolerância a herbicidas do grupo fosfinotricina. Para a subclonagem, inicialmente foi realizada a clivagem do plasmídeo pCambia 1305.1 com as enzimas *HindIII* e *EcoRI* para a retirada do cassete de expressão *dCaMV35S::crycnpms222::NOS*. Em seguida, foi realizada a ligação da construção de interesse no vetor de transformação pTF101.1.

Choque térmico foi utilizado para introduzir o cassete gênico *dCaMV35S::crycnpms222::NOS* + pTF101.1 em *E. coli*. Após a confirmação da clonagem molecular por meio das análises de restrição e sequenciamento do gene *crycnpms222*, o vetor de transformação foi inserido em *Agrobacterium tumefaciens*, via eletroporação.

Transformação genética do milho: O processo de transformação genética foi baseado no protocolo desenvolvido por Frame et al. (2002). Embriões zigóticos imaturos de milho de aproximadamente 2,0 mm foram utilizados como explante no processo de transformação. A bactéria *Agrobacterium tumefaciens* carregando o gene *crycnpms222* de *Bt* (Plasmídeo pTF101.1) foi utilizada como vetor de transferência do gene de interesse. Após a infecção, os embriões zigóticos foram transferidos para o meio de co-cultivo, onde permaneceram durante cinco dias para que ocorresse a transferência do cassete gênico da bactéria para os explantes vegetais e a integração deste no genoma vegetal. Posteriormente, os embriões foram cultivados em meio de repouso e após 15 dias, os calos em desenvolvimento iniciaram o processo de seleção. Foram realizadas transferências dos calos em desenvolvimento a cada 15 dias, para meio de cultura de tecidos durante 60 dias. O agente de seleção utilizado no meio de cultura foi o herbicida Biolaphos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene *crycnpms222* presente no cassete de expressão *dCaMV35S::crycnpms222::NOS* foi subclonado no vetor binário pTF101.1 (Figura 1)

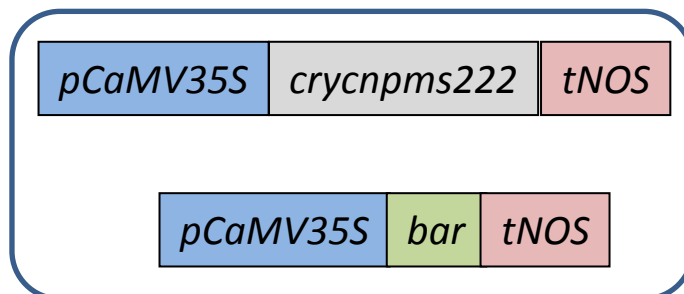


Figura 1. Construções gênicas clonadas no vetor binário pTF101. Gene promotor: *CaMV35S*; Gene terminador: *NOS*; Gene de seleção: *bar*.

A reação de clivagem do DNA plasmidial extraído das colônias de *E. coli* contendo o cassete de expressão de interesse foi analisado via eletroforese em gel de agarose (Figura 2). As amostras 11 e 12 foram selecionadas para o sequenciamento, por apresentarem DNA plasmidial mais concentrado.

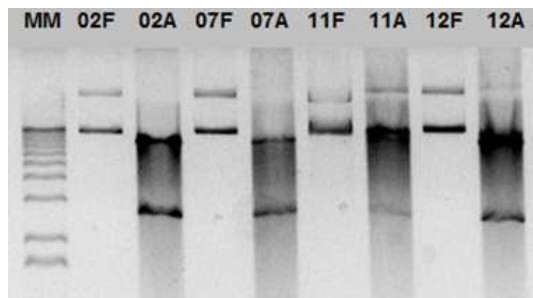


Figura 2. Padrão de clivagem do DNA plasmidial das colônias transformadas de *E. coli*. (MM): 1Kb Plus Lader (Invitrogen®); 02F, 07F, 11F e 12F: DNA plasmidial não clivado com enzima de restrição; 02A, 07A, 11A e 12A: DNA plasmidial após a reação de clivagem com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Hind III*.

O sequenciamento do vetor pTF101.1 foi realizado após a transformação da bactéria *E. coli* para confirmar a presença do gene *crycnpms222* e conseqüentemente, a eficiência da clonagem molecular (Figura 3).

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
1099	1099	100%	0.0	99%	EU109565.1
462	462	98%	1e-126	81%	GQ332538.1

Figura 3. Resultado do sequenciamento das colônias de *E. coli*. O *E value* indica a probabilidade do gene não estar inserido na plasmídeo.

A etapa final do experimento foi a transformação dos embriões imaturos de milho via *Agrobacterium* e o cultivo dos calos transgênicos em cultura de tecidos, sob seleção (Figura 4).

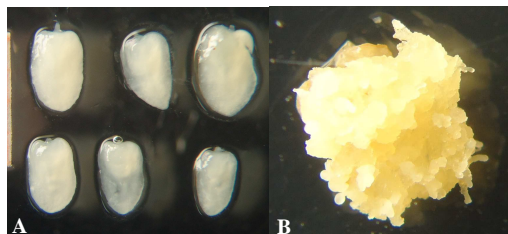


Figura 4. (A) Embriões imaturos de milho Hill utilizados na transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*; (B) Calo embriogênico de milho após seleção.

Foram realizados 05 experimentos de transformação com 300 embriões imaturos cada. Já foram selecionados 06 calos tolerantes ao herbicida Biolaphos. A eficiência média de transformação no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Milho e Sorgo é de cerca de 2%. Espera-se gerar aproximadamente 15 eventos transgênicos. A toxicidade desses eventos será avaliada por meio do bioensaio seletivo utilizando lagartas das ordens Hemiptera, Lepidoptera e Diptera.

CONCLUSÕES

A clonagem molecular utilizando a construção gênica *35S::crycpms222::NOS* e a transformação genética de milho Hill via *Agrobacterium tumefaciens* foram eficientes na geração de eventos transgênicos.

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA, Fapemig e CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

CAPALHO, D. M. F.; VILAS-BOAS, G. T.; ARANTES, O. M. N.; SUZUKI, M. T. *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, nº 32, p. 78-86, 2005.

CRICKMORE, N. Beyond the spore-past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. **Journal of Applied Microbiology, Oxford**, v.101, p.616-619, 2006.

CRICKMORE, N. Disponível em: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html > Acesso em 19 de maio de 2014.

DIAS, J. M. C. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p.2759-76, 1992.

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.

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.

OELLER P.W.; LU, M.W.; TAYLOR, L.P.; PIKE, D.A.; Theologis, A. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. **Science**, vol.254, p.437-439, 1991.



XXX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global"