

Transformação genética de embriões imaturos de milho tropical via *Agrobacterium tumefaciens*

Rafaeli Aparecida Vieira de Souza⁽¹⁾; Emanuele Taís Souza Silva⁽²⁾; Meire de Cássia Alves⁽³⁾; Amanda Naiê⁽²⁾; Newton Portilho Carneiro⁽⁵⁾; Aluizio Borém⁽⁴⁾; Andréa Almeida Carneiro⁽⁵⁾.

⁽¹⁾ Estudante de doutorado; Universidade Federal de Viçosa; Viçosa; Minas Gerais; rafaeli.souza@ufv.br; ⁽²⁾ Bolsista da Embrapa Milho e Sorgo; ⁽³⁾ Analista da Embrapa Milho e Sorgo; ⁽⁴⁾ Professor do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa; ⁽⁵⁾ Pesquisador Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO: A eficiência na transformação genética de linhagens de milho tropical é influenciada por vários parâmetros. Buscar metodologias que aumentem a frequência de transformação é primordial. O nosso objetivo foi avaliar duas metodologias de infecção de explantes de linhagem de milho tropical L3 com *Agrobacterium tumefaciens* visando a sua transformação genética. A transformação dos embriões zigóticos foi realizada via *A. tumefaciens* EHA101, portadora do plasmídeo binário pTF102 que contem os cassetes gênicos *P35S::gus::T35S* e *P35S::bar::Tvsp*. As duas metodologias testadas, apresentam diferenças nos meios de infecção e co-cultivo. Os meios de infecção utilizados diferem na concentração de sais e vitaminas do meio N6 (CHU et al., 1975). Também MES e nitrato de prata foram adicionados apenas na etapa de infecção quando o segundo método foi utilizado. No meio de co-cultivo, o Método I apresenta apenas o antioxidante L-cisteína, e o Método II a combinação de L-cisteína + DDT (Dithiothreitol). A expressão transiente foi avaliada, por testes histoquímicos de GUS (β -glucuronidase), após o co-cultivo, o repouso e o período de seleção para verificar a eficiência da infecção. A eficiência de transformação foi medida através da contagem de plântulas regeneradas e aclimatizadas em casa de vegetação. Os resultados obtidos revelam que a metodologia I é a mais indicada para a transformação da linhagem tropical de milho L3.

Termos de indexação: linhagem L3, *Agrobacterium tumefaciens*, regeneração de plantas.

INTRODUÇÃO

O milho representa uma importante fonte de energia para a alimentação humana e animal e a engenharia genética tem sido empregada para complementar o melhoramento genético desta espécie. Atualmente, o sistema mais estudado para introdução de genes exógenos em milho é via *Agrobacterium tumefaciens*, o qual é bastante

complexo, mas apresenta inúmeras vantagens sobre o sistema de introdução por bombardeamento de genes (FRAME et al., 2002; 2011). No entanto há necessidade de melhorar a eficiência de transformação genética de linhagens de milho tropical testando diferentes protocolos.

Para o milho híbrido Hi-II a diminuição em 50% da concentração dos sais utilizados no meio N6 e o uso de agentes antioxidantes como cisteína e DDT favoreceram o processo de transferência do T-DNA durante o estágio de co-cultivo, aumentando a frequência de eventos transformados (Vega et al., 2008). Para a linhagem tropical L3, ainda não existem informações sobre o uso dessa combinação de antioxidantes no aumento da frequência de transformação.

O objetivo desse trabalho foi avaliar duas metodologias de transformação genética via *A. tumefaciens* em embriões imaturos da linhagem de milho tropical L3, visando padronização da transformação genética dessa linhagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Sementes da linhagem L3 foram plantadas em casa de vegetação para a obtenção do material vegetal. Os embriões imaturos de milho tropical foram colhidos 12 dias após a polinização, com aproximadamente 1,5 a 2,0 mm de comprimento. Para assepsia, as espigas de milho foram mergulhadas em uma solução de 50% hipoclorito de sódio e água destilada com 2 gotas de detergente comercial, em agitação por 20 minutos. Em seguida, as mesmas passaram por tríplex lavagem com água destilada autoclavada, em câmara de fluxo laminar.

Agrobacterium tumefaciens

Foi utilizada a estirpe desarmada de *A. tumefaciens* EHA101 contendo o plasmídeo binário pTF102 (*P35S::gus::T35S* e *P35S::bar::Tvsp*).

Preparo da *A. tumefaciens*

Adicionou-se 100µM de acetoseringona (AS) a 5mL de meio de infecção (Meio A, **Tabela 1**) em tubos de 50 mL. Em seguida, inoculou-se com auxílio de alça de platina esterilizada em câmara de fluxo laminar, *A. tumefaciens* EHA 101, até atingir uma O.D550 de 0,3 a 0,4. Posteriormente, o tubo foi incubado horizontalmente em shaker a temperatura de 22°C a 100 rpm, por 2 horas.

Transformação de embriões zigóticos de L3

Foram avaliadas duas metodologias para transformação genética, os métodos testados possuem diferenças no meio de infecção e no meio de co-cultivo (**Tabela 1**). O meio de infecção e de co-cultivo do Método I possui o dobro da concentração de sais de N6 do que Método II. Já o Método II possui dois antioxidantes, a L-cisteína e o DDT (Dithiothreitol), enquanto que o método I possui somente L-cisteína (3 mg/L). O Método II possui MES em ambos os meios e o Método I não. Apresentam também diferenças na quantidade de vitaminas e nitrato de prata.

Foram utilizados 250 embriões zigóticos para cada metodologia testada. Os embriões foram acondicionados em tubos Eppendorf de 1,5 ml contendo 1,0 ml de meio de infecção (**Tabela 1**) suplementado com 100 µM AS, inicialmente sem *Agrobacterium*. Em seguida, o meio de infecção foi retirado, os embriões lavados em mais 1 ml desse mesmo meio e foi adicionado 1mL da suspensão de *Agrobacterium* contendo o plasmídeo pTF102. Os tubos foram gentilmente invertidos 20 vezes e incubados por 5 minutos no escuro. Após a infecção, os embriões foram transferidos para o meio de co-cultivo (Meio B, **Tabela 1**) e o excesso de *Agrobacterium* foi retirado com auxílio de uma pipeta.

Os embriões transformados foram orientados com o eixo embrionário em contato com o meio de co-cultivo. As placas foram fechadas com fita micropore e incubadas no escuro a 20°C durante 5 dias. Após o período de co-cultivo, os embriões foram transferidos para o meio de repouso (Meio C, **Tabela 2**), e incubados a 28°C no escuro por sete dias. Depois desse período os embriões foram transferidos por 30 dias para o meio de seleção I (Meio D1), sendo subcultivados a cada 15 dias. Posteriormente, os calos foram transferidos para o meio de seleção II (Meio D2) por 15 dias. Após esse

período de seleção os calos que continuaram crescendo foram transferidos para o meio de maturação (Meio E) e após 30 dias para o meio de germinação (Meio F). Os meios D1, D2, E e F estão descritos na Tabela 2. As plântulas formadas foram transferidas para vasos em casa de vegetação

Tabela 1. Meios de infecção e co-cultivo utilizados na transformação da linhagem tropical L3.

Meio de infecção (A)	Unid/L	Método I	Método II
N6 sais	g	4,0	2,0
2,4D	mg	1,5	1,5
Sacarose	g	68,4	68,4
Glicose	g	36	36
Prolina	g	0,7	0,7
MES	g	-	0,5
pH		5,2	5,2
N6 vitaminas (1000x)	ml	1,0	0,5
Nitrato de prata	mg	-	0,85

Meio de co-cultivo (B)	Unid/L	Método I	Método II
N6 sais	g	4,0	2,0
2,4D	mg	1,5	1,5
Sacarose	g	30	30
Prolina	g	0,7	0,7
MES	g	-	0,5
pH		5,8	5,8
Phytigel	g	3,0	3,0
N6 vitaminas (1000x)	ml	1,0	1,0
Nitrato de prata	mg	0,85	0,85
Acetoseringona	µM	1,0	1,0
L-cisteína	mg	3,0	4,0
DDT	g	-	0,15

*N6 (CHU et al., 1975)

** Método I - Frame et al. (2002)

*** Método II - Vega et al. (2008)

Tabela 2. Meios de cultivo utilizados na transformação da linhagem tropical L3.

Meios de cultivo	Unid/L	Concentrações					
		C	D1	D2	E	F	
N6 Sais	g	4,0	4,0	4,0	-	-	
MS Sais	g	-	-	-	4,3	4,3	
Sacarose	g	30	30	30	60	30	
L- Prolina	g	0,7	0,7	0,7	-	-	
MES	g	0,5	0,5	0,5	-	-	
pH		5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	
Phytigel	g	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	
N6 vit, 1000x	ml	1,0	1,0	1,0	-	-	
MS vit, 1000x	ml	-	-	-	1,0	1,0	
Nitrato de prata	mg	0,85	-	-	-	-	
Cefotaxima	g	0,25	0,25	0,25	-	-	
Biolaphos	mg	-	1,5	3,0	-	-	

*N6 (CHU et al., 1975);

**MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

Delineamento e análise estatística

As avaliações realizadas foram: (i) número de embriões GUS positivos após o período de co-cultivo, de repouso e da seleção II; (ii) número de eventos transgênicos obtidos e aclimatizados em casa de vegetação. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, utilizando-se o software

Sisvar 5.0 (Ferreira, 2000) para fazer a análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão do gene *gus* foi avaliada em três etapas diferentes dos procedimentos: (i) após o período de co-cultivo; (ii) após o repouso e, (iii) após a seleção (Tabela 3). A expressão transitante de GUS obtida após os períodos de co-cultivo e repouso foram maiores para o método I do que para o método II. O mesmo resultado foi obtido para a expressão de 15 calos aleatórios testados após o período de seleção.

Tabela 3. Expressão do gene *gus* em milho tropical L3, infectados com *A. tumefaciens* EHA 101:pTF102, com dois métodos.

Tratamento	Número de embriões GUS positivos	
	Método I	Método II
Após co-cultivo	18/25 (72%)	0/25 (0%)
Após repouso	21/25 (84%)	6/25 (24%)
Após Seleção II	9/15 (60%)	4/15 (26%)

Os calos do tipo II obtidos apresentavam aspecto macio, friáveis, coloração amarela clara, sendo altamente embriogênicos conforme mostra a **Figura 1B**. Os calos provenientes do Método I apresentaram maior sobrevivência em comparação com o Método II após o período de seleção.

A maturação de calos de ambos os tratamentos foi desuniforme, ocorreu entre 20 e 45 dias independente do método utilizado. Calos maduros tem o aspecto esbranquiçado e opaco.

Os calos maduros foram transferidos para o meio de germinação. As plântulas obtidas foram aclimatizadas em casa de vegetação até atingirem aproximadamente 10 cm de comprimento (**Figura 1F**). Após três semanas em casa de vegetação foi aplicado o herbicida biolaphos para confirmar a resistência das plantas devido à presença do cassete gênico *P35S::bar::Tvsp*.

O número de eventos transgênicos foi maior para o Método I em comparação com o Método II conforme descrito na Tabela 4.

Para a linhagem tropical L3, a baixa concentração de sais no meio N6 e o uso de agentes antioxidantes combinados, a cisteína e o DDT não foram eficientes no processo de transferência do T-DNA durante o estágio de co-cultivo, pois a frequência de eventos transformados foi inferior ao Método I.

Tabela 4. Número de eventos obtidos com as metodologias utilizadas na transformação de L3.

Metodologia utilizada	Número de embriões	Eventos transgênicos obtidos	Frequência de transformação (%)
Método I	200	21	10,5 a
Método II	200	1	0,5 b

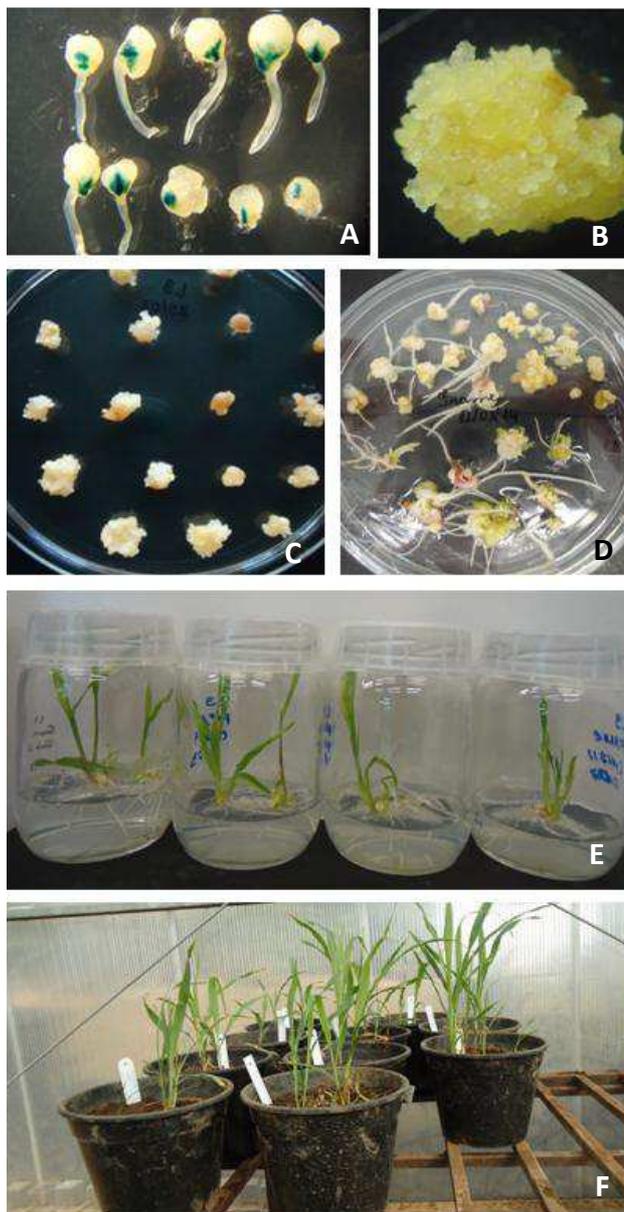


Figura 1. Etapas no processo de transformação, (A) teste *gus* realizado em embriões após o período de repouso; (B) calo embriogênico; (C) calos em meio de seleção II; (D) calos no meio de maturação; (E) plantas no meio de germinação; (F) plantas aclimatizadas em casa de vegetação.

CONCLUSÕES

A eficiência de transformação genética via *A. tumefaciens* em linhagens de milho tropical, depende de vários fatores, dentre eles a interação entre a bactéria e o material vegetal utilizado e também as condições *in vitro*.

O método I testado nesse trabalho foi o mais eficiente na transformação da linhagem L3. Novos trabalhos devem ser realizados visando ajustar outros fatores relacionados às condições *in vitro*, para aumentar a eficiência de transformação via *A. tumefaciens* em embriões zigóticos de linhagens de milho tropical.

REFERÊNCIAS

CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; CHU, C. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. **Scientia Sinica**, [S.l.], v. 16, p. 659-668, 1975.

FERREIRA, D. F. **Sisvar 5.0: sistema de análise estatística**. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

FRAME, B.; MAIN, M.; SCHICK, R.; WANG, K. Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos. In: THORPE, A.; YEUNG, E. C. **Plant Embryo Culture: Methods and Protocols**, Methods in Molecular Biology, v. 710, p. 327-341, 2011.

FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHICKWAMBA, 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**, v. 129, p. 13-22, 2002.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in high plants. **Embo Journal**, [S.l.], v. 6, p. 3901-3907, 1987

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant physiology**, Bethesda, v. 15, p. 473-497, 1962.

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**, Berlin, v. 27, p. 297-305, 2008.