

Influência de diferentes meios de cultura na transformação genética de milho tropical

Rafaeli Aparecida Vieira de Souza⁽²⁾; Meire de Cassia Alves⁽¹⁾; Beatriz de Almeida Barros⁽¹⁾; Newton Portilho Carneiro⁽¹⁾; Aluizio Borém⁽²⁾; Andréa Almeida Carneiro⁽¹⁾

⁽¹⁾ Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 285, Sete Lagoas, MG, Brasil. E-mail: meire.alves@embrapa.br. ⁽²⁾ Universidade Federal de Viçosa, CEP: 36570-900, Viçosa, MG

RESUMO: A eficiência da transformação genética de milho via *Agrobacterium tumefaciens* é influenciada por vários parâmetros. Este estudo teve como objetivo testar a eficiência de duas metodologias na geração de eventos transgênicos da linhagem elite tropical L3. Embriões imaturos foram transformados utilizando *A. tumefaciens* carregando o vetor binário pTF102 que contém os genes *uidA* e *bar*. A principal diferença entre os dois processos de transformação foi a concentração de sais N6 utilizada nos meios de infecção e co-cultivo (100% ou 50%). Análises histoquímicas mostraram que a expressão do gene *gus* foi mais intensa nos embriões cultivados nos meios de cultura com a concentração de sais reduzida (50%), mas esta concentração foi menos eficiente para a regeneração de plantas. A taxa de eventos transgênicos produzidos foi 3% e 1,1% para 100% e 50% da concentração de sais de N6, respectivamente.

Termos de indexação: *Zea mays*; *Agrobacterium tumefaciens*; transgênico.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais cultivado no mundo. No Brasil, a produção de milho para a safra 2015/2016 foi de 79,95 milhões de toneladas cultivadas em 15,6 milhões de hectares (CONAB, 2016), consolidando o país como o terceiro maior produtor mundial. Entretanto, há poucos estudos voltados para a produção de milho geneticamente modificado a partir de linhagens tropicais.

A principal limitação para a aplicação da tecnologia de transformação genética é a seleção de germoplasma tropical responsivo à regeneração em cultura de tecidos e à infecção via *Agrobacterium tumefaciens*. A transformação e a regeneração são altamente influenciadas pelo tipo de explante utilizado e pela composição do meio de cultura (Armstrong; Green, 1985; Bohorova et al. 1995). Embriões zigóticos imaturos são os tipos de explantes com maior eficiência de regeneração, mais responsivos à transformação genética e com

maior capacidade de geração de plantas transgênicas (Frame et al, 2002; Vega et al, 2008).

Os sais N6 (Chu et al, 1975) e MS (Murashige; Skoog, 1962) são amplamente utilizados no cultivo *in vitro* e na transformação genética de milho (Ishida et al., 1996; Frame et al., 2002; Vega et al., 2008). Calos embriogênicos são normalmente formados quando embriões imaturos são cultivados em meios de cultura suplementados com auxinas, como o 2,4-D ou Dicamba (Armstrong; Green, 1985; Frame et al, 2002). A concentração de sais no meio de cultura é um importante fator capaz de influenciar a eficiência da transformação genética. A seleção de genótipos de milho para obter plantas transgênicas baseia-se na capacidade de regeneração *in vitro* e eficiência de infecção via *Agrobacterium*. Um genótipo ideal para a produção de plantas transgênicas comerciais também deve ter uma alta performance agrônômica.

O objetivo deste estudo foi verificar a influência de diferentes meios de cultura de tecido na transformação genética, via *Agrobacterium tumefaciens*, da linhagem tropical L3 da Embrapa Milho e Sorgo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e preparo da *Agrobacterium tumefaciens*

Embriões imaturos entre 1,8 e 2,0 mm foram isolados da linhagem de milho tropical L3 pertencente a Embrapa Milho e Sorgo e utilizados nos experimentos de transformação. Foram usados 250 embriões por tratamento.

A *Agrobacterium tumefaciens* utilizada foi a estirpe desarmada EHA 101 contendo o vetor binário pTF102 (Paz et al., 2004). Este plasmídeo contém o gene marcador de seleção *bar* e o gene repórter *uidA* (*gus*), ambos controlados pelo promotor CaMV35S. Duas horas antes da infecção dos embriões com a *Agrobacterium*, esta foi ressuspensa, separadamente, em dois meios de infecção distintos - Infecção I e Infecção II (N6 sais e vitaminas, 68,4 g L⁻¹ sacarose, 36 g L⁻¹ glicose, 0,7 g L⁻¹ prolina, 0,25 g L⁻¹ cefotaxima, 1,5 mg L⁻¹

2,4D, 100 $\mu\text{M L}^{-1}$ acetoseringona e 3 g L^{-1} Phytigel, pH 5,2), até obter uma OD_{550} entre 0,3 e 0,4. A diferença entre os meios I e II foi a concentração de sais presentes, sendo esta 100 e 50%, respectivamente. As soluções bacterianas foram incubadas a 22°C, sob agitação de 100 rpm.

Transformação genética de embriões da linhagem L3 via *Agrobacterium tumefaciens*

O processo de transformação genética ocorreu de acordo com Frame et al. (2002) e Vega et al. (2008), com algumas modificações. Após a infecção embriões imaturos foram transferidos para meio de co-cultivo I e II (N6 sais e vitaminas, 30 g L^{-1} sacarose, 0,7 g L^{-1} prolina, 0,25 g L^{-1} cefotaxima, 1,5 mg L^{-1} , 2,4-D, 100 $\mu\text{M L}^{-1}$ acetoseringona, 0,85 mg L^{-1} nitrato de prata, 3 mg L^{-1} L-cisteína e 3 g L^{-1} Phytigel, pH 5,8) contendo 100% e 50% da concentração de sais N, respectivamente. Os demais meios utilizados durante as fases de seleção, maturação e germinação estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Meios de cultura utilizados na transformação genética de embriões de milho tropical via *Agrobacterium tumefaciens*.

Meios	Composição
Repouso	Meio N6 sais e vitaminas contendo (30 g L^{-1} de sacarose + 0,7 g L^{-1} prolina + 0,5 g L^{-1} MES + 0,85 mg L^{-1} nitrato de prata + 0,25 g L^{-1} cefotaxima + 10 mg L^{-1} 2,4D e 3 g L^{-1} Phytigel, pH 5,8)
Seleção I	Meio N6 sais e vitaminas + 30 g L^{-1} de sacarose + 0,7 g L^{-1} prolina + 0,5 g L^{-1} MES + 0,25 g L^{-1} cefotaxima + 10 mg L^{-1} 2,4D + 1,5 mg L^{-1} de Finale® e 3 g L^{-1} e Phytigel, pH 5,8)
Seleção II	Seleção I com 3,0 mg L^{-1} de Finale®
Maturação	MS sais e vitaminas + 60 g L^{-1} sacarose + 3 g L^{-1} phytigel e pH 5,8
Germinação	MS sais e vitaminas + 30 g L^{-1} sacarose + 3 g L^{-1} phytigel e pH 5,8

A etapa de seleção iniciou com a transferência dos calos para o meio de Seleção I (N6 sais e vitaminas; 30 g/L sacarose, 0,7 g/L prolina, 0,5 g/L MES; 0,25 g/L cefotaxina; 10 mg/L 2,4-D; 3 g/L phytigel) suplementado com 1,5 mg/L do herbicida Bialaphos® e mantidos a 28°C, no escuro, por duas semanas.

Calos embriogênicos selecionados foram transferidos para o meio de Seleção II suplementado com 3,0 mg/L do herbicida Bialaphos® e mantidos a 28°C, no escuro, por duas semanas.

Em seguida, os calos selecionados foram transferidos para o meio de Maturação (MS sais e vitaminas; 60 g/l sacarose; 1,25 mg/L CuSO_4 , 3 g/L fitagel) e mantidos por três a quatro semanas, a

28°C, no escuro. Embriões maturados foram transferidos para meio de Germinação (MS sais e vitaminas; 30 g/l sacarose; 3 g/L fitagel) por duas semanas. Plântulas com cerca de 5,0 cm de comprimento e com um sistema radicular desenvolvido foram aclimatadas em casa de vegetação e tratadas com 500 mg/L do herbicida Finale® para seleção dos eventos transgênicos a partir da expressão do gene de resistência *bar*.

Análise histoquímica do gene *gus*

A expressão do gene repórter *gus* foi verificada por meio do ensaio histoquímico (Jefferson et al. 1987) em 25 embriões após o período de co-cultivo e em 10 calos embriogênicos depois da etapa de seleção. A presença ou ausência da coloração azul nos embriões e nos calos foi identificada utilizando o estereoscópio da Zeiss, Axio Zoom.V16.

Análise molecular dos eventos transgênicos

A presença da construção genética foi verificada por análise de PCR usando o DNA genômico das folhas dos eventos transgênicos (Saghai-Maroo et al., 1984). Foi utilizado o par de primer para detectar o gene *bar*, o qual amplificou um fragmento de 407 pb.

Análise estatística

As duas metodologias testadas foram avaliadas por meio da comparação da porcentagem de embriões e calos GUS positivos. Também foi verificado o número de calos transgênicos e o número de eventos obtidos. Para a análise de variância foi utilizado o software R (R Core Team) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene repórter *uidA (gus)* foi utilizado para comparar a eficiência de transformação de embriões imaturos de milho da linhagem tropical L3, via *Agrobacterium tumefaciens*. Geralmente, condições que permitem uma alta expressão do gene repórter após o período de co-cultivo são associadas com a alta frequência de produção de eventos transgênicos (Vega et al., 2008).

Após o co-cultivo com a *Agrobacterium*, mais de 70% dos explantes de L3 foram infectados, apresentando expressão transiente do gene *gus*, independentemente do meio de cultura utilizado. Um elevado número de embriões expressou o gene *gus* no tratamento que utilizou a concentração padrão de sais N6 (100%) nos meios de infecção e co-cultivo em comparação ao tratamento com baixa concentração de sais N6 (50%). Entretanto, o

ensaio histoquímico revelou que a expressão do gene foi mais intensa nos embriões cultivados nos meios de cultura com a concentração de sais reduzida (50%) (Figura 1A e 1B).

Após a etapa de seleção, um elevado número de calos expressando o gene *gus* foi verificado para o Tratamento I (100%), confirmando que a concentração padrão de sais N6 foi mais eficiente na transformação da linhagem de milho L3. A maioria dos embriões que foram mantidos no meio de cultura com baixa concentração de sais N6 apresentou um baixo desenvolvimento. Vega et al. (2008) relataram que apesar da baixa concentração de sais (10%) aumentar a eficiência da transformação de explantes de milho Hill, o desenvolvimento embriogênico dos explantes foi reduzido.

Um total de 106 calos que sobreviveram ao meio de Seleção II cresceu rapidamente, apresentando aspecto friável (Figura 1D e 1E). Desse total, 61 calos foram cultivados no Tratamento I e 45 calos foram cultivados no Tratamento II. Todos os calos foram transferidos para o meio de maturação. A maturação ocorreu dentro de um período de 20 a 45 dias, independente do tratamento que foi utilizado. Apenas 42,62% dos calos cultivados no Tratamento I e 20% dos calos cultivados no Tratamento II regeneraram e maturaram. Os calos maturados foram transferidos para o meio de germinação e posteriormente, as plântulas foram aclimatadas em casa de vegetação (Figura 1G, 1H e 1I). A integração do transgene foi confirmada por meio de aplicação de herbicida nas plântulas da geração T1 (Figura 1I).

Em relação ao ensaio histoquímico após o período de co-cultivo, 89,66% dos embriões gerados a partir do Tratamento 1 e 74% dos embriões do Tratamento 2 foram positivos. Após a etapa de Seleção, 53% dos calos produzidos a partir do Tratamento 1 e 24,66% dos calos gerados do Tratamento 2 foram positivos no ensaio histoquímico. A eficiência de transformação foi de 3% para o Tratamento 1 e 1,1% para o Tratamento 2, o que também foi verificado pelo ensaio histoquímico. O número de plantas transgênicas obtidas foi superior no Tratamento 1, que utilizou a concentração padrão de sais N6. A baixa concentração de sais N6 pode não ter sido efetiva para a produção de plantas transgênicas por causa da baixa eficácia de formação e desenvolvimento dos calos embriogênicos neste Tratamento.

A análise de PCR foi realizada em todos os 35 eventos que foram gerados a partir dos Tratamentos 1 e 2. A amplificação do gene *bar* presente no vetor binário pTF102 foi verificada em todos os eventos transgênicos (Figura 2A). As análises de PCR em Tempo Real (qPCR) confirmaram a expressão dos genes *uidA* e *bar* (Figura 2B). Como observado para a maioria das plantas transgênicas geradas a partir

da transformação via *Agro. tumefaciens*, um baixo número de cópias dos transgenes estava presente nos eventos produzidos (Figura 2C).

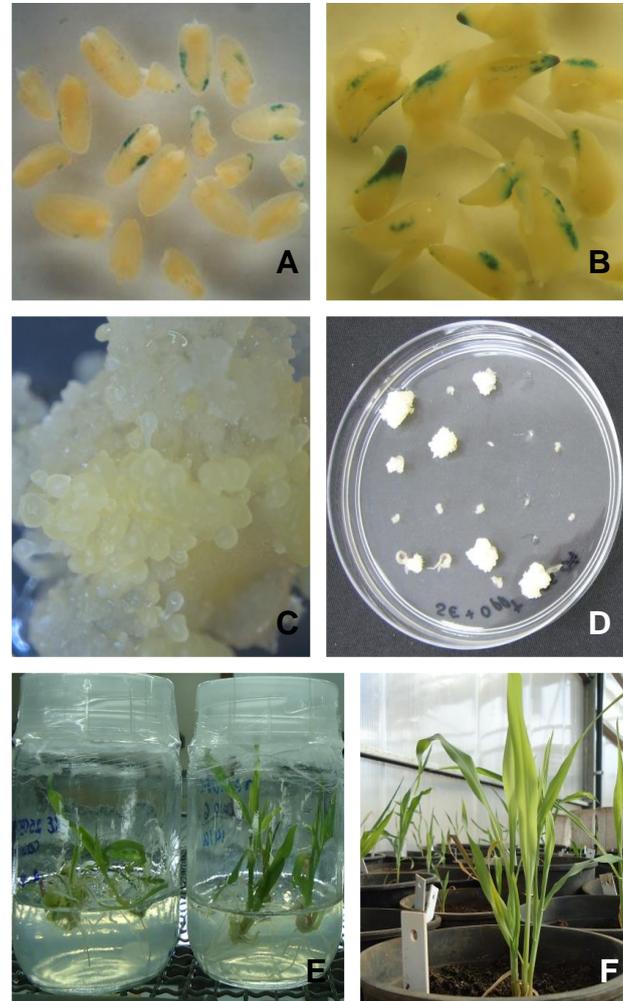


Figura 1: Transformação genética de milho L3. (A-B) Histoquímica do gene *gus*; (A) Infecção com 100% e (B) 50% de N6 sais; (C) Calo embriogênico de L3; (D) Calos transgênicos em seleção; (E) Planta transgênica no meio de germinação; (F) Plantas em casa de vegetação.

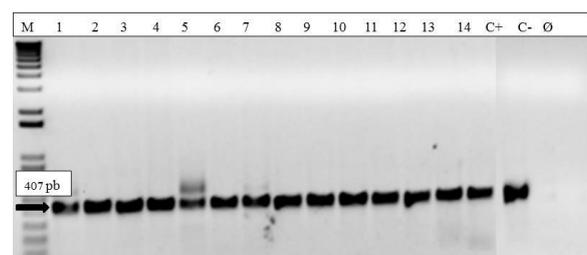


Figura 2: Análise de PCR dos eventos transgênicos. (A) Amplificação do DNA genômico de

14 eventos; (M) Marcador molecular 1 kb; (1 a 9) plantas transgênicas geradas utilizando o Tratamento 1; (10 a 14) plantas transgênicas geradas utilizando o Tratamento 2; (P) vetor pTF102; (N) milho não transgênico; (Ø) branco da reação.

CONCLUSÕES

A transformação da linhagem de milho L3 via *Agrobacterium tumefaciens* foi possível ainda que tenha apresentado uma baixa eficiência.

O Tratamento I, onde a concentração de sais foi de 100%, foi mais eficiente na produção de eventos transgênicos que o Tratamento II que apresentava 50% da concentração de sais.

Portanto, a concentração de sais no meio de cultura influenciou diretamente no processo de transformação genética e na geração de plantas transgênicas.

AGRADECIMENTOS

EMBRAPA, Fapemig e CNPq.

REFERÊNCIAS

Armstrong, C.L.; Green, C.E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164:207-214. 1985.

Barros, B. A.; Guimarães, C.T.; Lana, U. G. P.; Pôssa, K.F.; Andrade, L.C.S.S.; Silva, V.L.; Lopes, F.A.; Carneiro, A. A.; Carneiro, N.P. Estimativa do número de inserções de transgene em milho por PCR quantitativo (qPCR). *Circular Técnica* 164. Embrapa Milho e Sorgo. 2011.

Bohorova, N.E.; Luna, B.; Brito, R.M.; Huerta, L.D.; Hoisington, D.A. Regeneration potential of tropical, subtropical, mid altitude, and highland maize inbreds. *Maydica* 40: 275-281. 1995.

Chu, C.C.; Wang, C.C.; Sun, C.S.; Hsu, C.; Yin, K.C.; Chu, C.Y. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. *Scientia Sinica* 16: 659-668. 1975.

CONAB - Companhia nacional de abastecimento. Safra 2015/2016. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_05_10_09_03_26_boletim_graos_maio_2016.pdf>.

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.

Ingham, D.J.; Beer, S.; Money, S.; Hansen, G. Quantitative real-time assay for determining transgene copy number in transformed plants. *BioTechniques* 31: 132-140. 2001.

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* 6: 745-750. 1996.

Jefferson, R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 387-405. 1987.

Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis de relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Method* 25: 402-408. 2001.

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497. 1962.

Olhoft, P.M.; Somers, D.A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Reporter* 20: 706-711. 2001.

Paz, M.M.; Shou, H.; Guo, Z.; Zhang, Z.; Banerjee, A.K.; Wang, K. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica* 136: 167-179. 2004.

Saghai-Marouf, M.A.; Soliman, K.M.; Jorgensen, R.A.; Allard, R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings National Academy of Science of the United States of America* 81: 8014-8018. 1984.

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 Reporter* 27: 297-305. 2008.,



XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Milho e Sorgo: inovações,
mercados e segurança alimentar"
