

104

**Circular  
Técnica****Sete Lagoas, MG  
Dezembro, 2008****Autores**

Maria José Vilaça de  
Vasconcelos  
Farmac., PhD, Biologia  
Molecular. Embrapa  
Milho e Sorgo. Cx. P.  
151. 35701-970 Sete  
Lagoas, MG  
mjose@cnpms.embrapa.br



## Otimização de transformação genética de embriões imaturos de milho por SAAT

O milho (*Zea mays* L.) é uma importante espécie cultivada em todo o mundo e uma importante fonte de alimento devido à diversidade de formas de utilização, sendo o cereal mais consumido no planeta. É reconhecido como uma das fontes estratégicas de alimentos que permitem à sociedade moderna produzir grandes quantidades de proteína e energia, essenciais para a nutrição humana e a de animais domésticos.

A transformação genética de cereais, principalmente de milho, tem crescido muito e um grande desafio refere-se à eficiência de transformação genética. O ajuste de metodologias eficientes tem aumentado e a demanda de protocolos que superem esta barreira também. O desenvolvimento de estratégias adequadas para superar limitações genotípicas de regeneração e transformação de milho, permitindo utilizar genótipos de milho tropical de alta performance agrônômica mas pobres em respostas a cultura tecidos, é essencial a este programa de manipulação genética. Um exemplo de eficiência em transformação genética é o uso da linhagem A188, com adaptação ao clima temperado e muito usada em experimentos de transformação genética mediada por *Agrobacteria*; mas esta linhagem não apresenta características agrônômicas favoráveis ao clima tropical, o que dificulta o seu uso no desenvolvimento de transgênicos nos trópicos

Várias características podem alterar a expressividade dos genes que controlam a indução da embriogênese somática e a regeneração de plantas; entre elas, podemos destacar o estágio de desenvolvimento e o estado fisiológico do explante no momento da excisão, interações específicas entre o genótipo e condições de cultivo da planta doadora e as estações do ano (Prioli E Silva, 1989), a capacidade de transformação das plantas mediadas por *Agrobacteria*. Dessa forma, até as plantas ou os genótipos considerados altamente recalcitrantes podem chegar à morfogênese quando se usa explantes de plantas que cresceram sob condições ótimas e que estejam em adequado estágio de desenvolvimento associado a uma metodologia adequada de transformação genética.

O desenvolvimento ou a adaptação de um protocolo que aumente a eficiência de transformação em linhagens tropicais de milho é de grande importância para o desenvolvimento desta tecnologia nestas regiões. O desenvolvimento das técnicas de transformação genética para cereais tem sido relativamente baixo, principalmente em consequência da sua limitada susceptibilidade à *Agrobacterium* e à baixa capacidade de regeneração de plantas férteis a partir de protoplastos (Rhodes et al., 1988). A utilização de transformação genética via ultrassom e *Agrobacterium* - SAAT (Sonication Assisted *Agrobacterium* mediated Transformation), descrita por Trick e Finer (1997), consistindo no tratamento de tecidos vegetais com ultrassom antes ou durante a inoculação desses tecidos com *Agrobacterium*.

A sonicação permite que a *Agrobacterium* atinja as células mais internas do tecido vegetal por criar pequenas e uniformes fissuras e canais através dos quais transferem seu DNA para o genoma das plantas. Várias espécies que apresentavam baixas frequências de transformação com outros métodos de introdução de DNA exógeno tiveram a eficiência do processo aumentada quando foram tratadas com SAAT (Trick & Finer, 1997). Foi obtido sucesso com essa técnica em monocotiledôneas (*Triticum aestivum* e *Zea mays*), em dicotiledôneas (*Glycine max* e *Vigna unguiculata*) e na gimnosperma (*Picea glauca*). Monocotiledôneas e certos tecidos de dicotiledôneas não são muito receptivos à transformação mediada por *Agrobacterium*.

Tanto a bactéria quanto o tecido-alvo a ser transformado podem ser manipulados para que se obtenha um aumento na eficiência de transformação nestas plantas (Frame et al., 2006). Dentre eles, pode-se citar o uso de compostos fenólicos como acetoseringona, indutor de transferência do T-DNA (Stachel et al., 1985), modificações no vetor binário da agrobactéria (Hiei et al., 1994; Ishida et al., 1996), adição de anti-oxidantes no meio de co-cultivo (Perl et al., 1996) e fermento (Stachel et al., 1985; Horsh et al., 1985; Bidney et al., 1992).

Pouco explorado tem sido o uso de sonicação para ferir e modificar o tecido a ser transformado, tanto com DNA isolado (Joersbo e Brunstedt, 1990, 1992; Zhang et al., 1991), quanto com *Agrobacterium* (Trick e Finer, 1997). No trabalho pioneiro, utilizando SAAT, os autores relataram o uso de tecido foliar de caupi, embriões imaturos de *Zea mays*, sementes de *Triticum aestivum* e *Picea glauca* como explantes iniciais para a aplicação de pulsos de ultrassom. Como uma alternativa para aumentar a eficiência de transformação genética do milho, foram avaliados neste trabalho o efeito do pré-aquecimento do explante-alvo (embriões imaturos) e o uso de

sonicação na transformação genética de milho tropical mediada por *Agrobacterium* - SAAT.

A metodologia de SAAT descrita por Trick e Finer (1997) foi modificada como descrito a seguir: linhagens de milho com 10 a 15 dias após a fecundação foram desinfestadas superficialmente por imersão em 70% etanol, seguido de incubação por 40min em solução de 2,5% de hipoclorito de sódio e lavagens três vezes com água deionizada estéril. Embriões medindo aproximadamente 1 a 1,5mm de comprimento foram extraídos com o auxílio de uma pinça e inoculados em meio de cultura contendo os sais básicos de Chu et al. (1975) suplementado com 2,9 g/L de prolina, 3% (p/v) de sacarose, 5 mg/L de tiamina, 2 mg/L de glicina, 100 mg/L de casaminoácidos, 100mg/L de inositol, 30 µM de dicamba e 100 µM de acetoseringona. O eixo embrionário foi inoculado em contato com o meio. Em seguida, foram incubadas à temperatura de 25°C por dois dias na ausência de luz. Após este período, os embriões foram submetidos ao tratamento SAAT com a *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Foi utilizado para transformação genética do milho o plasmídeo pCAMBIA C2, contendo região codificante para resistência a kanamicina e higromicina.

As bactérias foram crescidas em meio LB com kanamicina por 16h a 27°C, centrifugada a 1500g por 5 min e ressuspensas em meio de cultura contendo os sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 3% (p/v) de sacarose. A suspensão bacteriana foi diluída a OD<sub>600</sub> entre 0,5-0,6 com o mesmo meio líquido. Os embriões foram transferidos para tubos de microcentrífuga de capacidade de 1,5 mL, sendo em seguida adicionado 1 mL da suspensão bacteriana e submetidos a diferentes tratamentos térmicos (Banho Maria) e de ultrassom utilizando um sonicador Fisherbrand FS5 e controle de tempo por um cronômetro digital, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1.** Tratamentos utilizados nos experimentos

Tratamentos	Descrição do tratamento
01	Embriões + <i>Agrobacterium</i> + sonicação por 30seg
02	Embriões + pré-tratamento a 37°C por 2,5min + <i>Agrobacterium</i> + sonicação por 30seg + resfriamento em gelo por 1min
03	Embriões + pré-tratamento a 37°C por 5min + <i>Agrobacterium</i> + sonicação por 30seg + resfriamento em gelo por 1min
04	Embriões + pré-tratamento a 37°C por 10min + <i>Agrobacterium</i> + sonicação por 30seg + resfriamento em gelo por 1min
05	Controle A (ausência de sonicação)

Após os tratamentos, os embriões foram transferidos para o meio de cultura contendo os sais básicos de Chu et al. (1975), suplementado com 3% (p/v) de sacarose, 30 mM de Dicamba e 100 mM de acetoseringona. Após dois dias, os embriões foram lavados com água destilada autoclavada, secos em papel de filtro estéril e transferidos para meio de Chu et al. (1975) suplementado com 300 mg/L de Timentin. Após dois dias adicionais no meio com antibiótico, os embriões foram analisados para a atividade de GUS de acordo com Jefferson (1987). Duas semanas após, os embriões foram transferidos para o mesmo meio descrito acima, suplementado com 10mg/L de higromicina.

Em todos os embriões analisados, o tratamento com SAAT teve a maior frequência de expressão transiente de GUS (Tabela 2). A maioria dos embriões inoculados com *Agrobacterium* foram positivos para GUS e muito baixos ou nulos quando inoculados com *Agrobacterium* e sem SAAT. Aplicando-se pulsos de ultrassom, a expressão aumentou. De maneira geral, a extensão dos ferimentos tornou-se maior à medida em que a duração do pulso de ultrassom aumentou. Acredita-se que o aumento significativo na expressão do gene repórter obtido em tecidos tratados com SAAT seja consequência dos ferimentos resultantes dos poros promovidos pelo ultrassom (Trick & Finer, 1997).

O melhor tratamento, segundo dados de expressão transiente, foi o tratamento em que os embriões tiveram o pré-tratamento a 37°C por 5 min com *Agrobacterium* e sonicação por 30seg e, em seguida, resfriamento em gelo por 1 min. O aquecimento antes da submissão dos embriões à técnica do SAAT provavelmente tornou a parede e a membrana celular mais permeáveis, favorecendo a transformação. O tratamento de pré-aquecimento mais drástico a 10 min afetou negativamente a eficiência de transformação para expressão transiente, quando comparados com os outros tratamentos. Calos e folhas das plantas supostamente transgênicas foram coletados e os testes histoquímicos confirmaram a presença do gene GUS. Para cada tratamento, foram colocadas plantas para enraizamento nos diferentes tratamentos e aclimatadas e levadas para casa de vegetação.

Os calos embriogênicos formados foram transferidos para meio de regeneração contendo os sais básicos de Chu et al. (1975), suplementados com 2% (p/v) de sacarose, 1 mg/L de BAP e 0,5mg/L de ácido indol butírico, 300 mg/L de Timentin e 5mg/L de higromicina para evitar a formação de regenerantes "escape" (não transformados). As condições de cultivo foram de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa em torno de  $36 \mu\text{moles m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

**Tabela 2.** Expressão transiente, porcentagem de formação de embriões somáticos e regeneração de plantas de milho (L048) transformados pelo método SAAT

Tratamento	X-gluc (%)	Embriões somáticos (%)	Regeneração (%)
Trat. 1 C2	54,5	42,5	17,6
Trat. 2 C2	62,5	31,0	21,4
Trat. 3 C2	87,5	40,0	25,0
Trat 4 C2	37,5	38,5	23,5
Trat. 5 Controle	0,0 a 5%	75,0	38,0

Com aproximadamente 10 cm de altura, os regenerantes foram individualizados e transferidos para meio de enraizamento contendo os sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962) na metade da concentração dos sais, suplementado com 1,5% (p/v) de sacarose e 1 mg/L de ANA (ácido naftaleno acético). Após o processo de enraizamento, as plantas foram retiradas da condição *in vitro* e as raízes foram lavadas e plantadas em vasos plásticos contendo a mistura solo-vermiculita na proporção 1:1. Em seguida, foram conduzidas à casa de vegetação para o processo de aclimação, onde foram irrigadas conforme as necessidades.

### Conclusão

Como conclusão deste trabalho, pode-se inferir que a técnica de SAAT consiste em uma alternativa para a transformação de plantas, uma vez que os microporos produzidos por ultrassom fazem com que a *Agrobacterium* atinja eficientemente os tecidos mais profundos da epiderme, aumentando a frequência de eventos de transformação. SAAT é um método de baixo custo e que pode melhorar significativamente a eficiência da transformação de *Agrobacterium* em espécies com baixa eficiência em transformação mediada por *Agrobacterium*. Neste trabalho, o melhor tratamento foi obtido quando os embriões passaram por um período de pré-aquecimento de 5 min antes de ser submetido ao SAAT.

Modelo de protocolo para SAAT e expressão transiente de GUS para milho tropical

1. Crescer a *Agrobacterium* contendo o plasmídeo de interesse por uma noite à temperatura ambiente (27°C) em LBS (10 g/L Triptona, 5 g/L extrato levedura, 5 g/L de sacarose, 5 g/L de cloreto de sódio) com antibiótico agitação a 150 rpm.
2. Centrifugar a *Agrobacterium* a 1500g durante 10 min e lavar o precipitado por duas vezes com D40 médio (sais MS, vitaminas B5, 40 mg/L 2,4-D; 6% de sacarose, pH 7,0). Depois da segunda lavagem, diluir a *Agrobacterium* à densidade ótica de 0,5-0,6 a 600 nm.
3. Extrair os embriões imaturos de sementes de milho esterilizadas superficialmente (embriões com 1-1,5mm de comprimento) e colocá-los em meio de cultura com os sais básicos de Chu et al. (1975), suplementados com 2% (p/v) de sacarose, + 0,2% Gelrite - embriões foram colhidos até o suficiente para o tratamento de SAAT .
4. Cerca de 10 embriões foram colocados em um tubo 1,5 mL microcentrífuga, submetidos ou não ao tratamento térmico, juntamente com 0,5 mL da suspensão *Agrobacterium*. Sonicar os embriões por 30seg.
5. Cerca de 5min após SAAT tratamento, inocular os embriões com *Agrobacterium* - foi removido por blotting sobre um papel filtro estéril.

6. Coletar os embriões imaturos colocados em meio contendo sais básicos de Chu et al. (1975), suplementados com 2% (p/v) de sacarose, 1 mg/L de BAP e 0,5mg/L de ácido indol butírico, 300 mg/L de Timentin e 5 mg/L de higromicina + 0,2% Gelrite por dois dias e submetê-los a testes de GUS para verificar a expressão transiente (GUS).

### Literatura consultada

- BECHTOLD, N.; ELLIS, J.; PELLETIER, G. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. Les Comptes rendus de l'Académie des sciences. Sciences de la vie, Paris, v. 316, p. 1194-1199, 1993
- BIDNEY, D.; SCELONGE, C.; MARTICH, J.; BURRUS, M.; SIMS, I.; HUFFMAN, G. Micro projectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Molecular Biology, Dordrecht, v. 18, p. 301-313, 1992
- BOHOROVA, N. E.; LUNA, B.; BRITO, R. M.; HUERTA, L. D.; HOISINGTON, D. A. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude, and highland maize inbreds. Maydica, Bergamo, v. 40, p. 275-281, 1995
- CABOCHE, M. Liposome-mediated transfer of nuclei acids in plant protoplasts. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v. 79, p. 173-176, 1990
- CARVALHO, C. H. S.; BOHOROVA, N.; BORDALLO, P. N.; ABREU, L. L.; VALICENTE, F. H.; BRESSAN, W.; PAIVA, E. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. Plant Cell Reports, New York, v. 17, p. 73-76, 1997
- CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSÜ, C.; YIN, K. C.; CHU, C. Y.; BI, F. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Scientia Sinica, Peking, v. 18, p. 659-668, 1975
- D'HALLUIN, K.; BONNE, E.; BOSSUT, M.; DE EUCKELEER, M.; LEEMANS, J. Transgenic maize plants by tissue electroporation. Plant Cell, Rockville, v. 4, p. 1495-1505, 1992
- FRAME, B. R.; MC MURRAY, J. N.; FONGER, T. N.; MAIN, M. L.; TAYLOR, K. W.; TORNEY, F. J.; PAZ, M. M.; WANG, K. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. Plant Cell Reports, New York, v. 25, p. 1024-1034, 2006
- FROMM, M.; TAYLOR, L. P.; WLBO, V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 82, p. 5824-5828, 1985
- HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant Journal, Oxford, v. 6, p. 271-282, 1994
- HORSH, R. B.; FRY, J. E.; HOFFMAN, N. L.; EICHOLTZ, D.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. A simple and general method for transferring genes into plants. Sciences, New York, v. 227, p. 1229-1231, 1985
- ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated *Agrobacterium tumefaciens*. Nature Biotechnology, New York, v. 14, p. 745-750, 1996
- JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, 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
- JOERSBO, M.; BRUNSTEDT, J. Sonication: a new method for gene transfer to plants. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v. 85, p. 230-234, 1992
- KAEPLER, H. F.; GU, W.; SOMMERS, D. A.; RINES, H. W.; COCKBURN, A. F. Silicon carbide-mediated DNA delivery into plant cells. Plant Cell Reports, New York, v. 9, 415-418, 1990
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962

PERL, A.; LOTAN, O.; ABU-ABIED, M.; HOLLAND, D. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated system for grape (*Vitis vinifera* L.): The role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. *Nature Biotechnology*, New York, v. 14, p. 624-628, 1996

RHODES, C. A.; PIERCE, D. A.; METTLER, I. J.; MASCARENHAS, D.; DETMER, J. J. Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Sciences*, New York, v. 240, p. 204-207, 1988

SANFORD, J.C. The biolistic process. *Trends Biotechnology*, 6: 299-302, 1988

STACHEL, S. E.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYNSKI, P. Identification of signal molecules produced by wounded plant cells with activate the T-DNA transfer process in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, London, v. 318, p. 624-629, 1985

TRICK, H. N.; FINER, J. J.; SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Research*, Dordrecht, v. 6, p. 329-336, 1997

**Circular  
Técnica, 104**

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Milho e Sorgo**  
Endereço: Rod. MG 424 km 45 - Caixa Postal 151  
Fone: (31) 3027-1100  
Fax: (31) 3027-1188  
E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

1ª edição  
1ª impressão (2008): 200 exemplares

**Comitê de  
publicações**

**Presidente:** Antônio Álvaro Corsetti Purcino  
**Secretário-Executivo:** Paulo César Magalhães  
**Membros:** Andrea Almeida Carneiro, Carlos Roberto Casela, Cláudia T. Guimarães, Clenio Araujo, Flavia França Teixeira, Jurandir Vieira Magalhães

**Expediente**

**Revisão de texto:** Clenio Araujo  
**Editoração eletrônica:** Tânia Mara Assunção Barbosa



ERROR: undefined  
OFFENDING COMMAND: DeleteMe

STACK: