



TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR *Agrobacterium tumefaciens*

Talita **Heleodoro**¹; Iuri de Camargo de Oliveira **Silva**²; Ricardo Augusto **Dante**³; Isabel Rodrigues **Gerhardt**⁴; Juliana Erika Teixeira **Yassitepe**⁵; Joice Machado **Bariani**⁶; Paulo César **de-Lucca**⁷; Paulo **Arruda**⁸; Geraldo Magela de Almeida **Cançado**⁹

Nº 18606

RESUMO – A utilização das técnicas de modificação genética de plantas já são aplicadas comercialmente na agricultura há cerca de três décadas. No entanto, culturas como a cana-de-açúcar ainda se beneficiam pouco desta tecnologia. O presente trabalho descreve o processo de transformação genética de cana-de-açúcar, utilizando como vetor de transformação a *Agrobacterium tumefaciens*. Dentre as vantagens que se destacam nesse procedimento, podemos citar: simplicidade do procedimento; geração de eventos positivos com menor número de cópias do transgene de interesse; e integração do transgene em regiões mais ativas do genoma, características essas que favorecem o sucesso na obtenção de plantas geneticamente modificadas efetivamente funcionais e estáveis.

Palavras-chaves: *Saccharum* ssp, gene *bar*, OGM, biotecnologia vegetal

1 Autor, Bolsista da Embrapa Informática Agropecuária: Graduação em Biologia, PUCC, Campinas-SP; talitahleodoro@gmail.com

2 Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biologia, PUCC, Campinas-SP.

3-6 Pesquisador da Embrapa Informática Agropecuária, Campinas-SP.

7 Pangeia Biotech, Campinas-SP.

8 Professor do Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas-SP.

9 Orientador: Pesquisador da Embrapa Informática Agropecuária, Campinas-SP; geraldo.cancado@embrapa.br



ABSTRACT – *The use of techniques of genetic modification in plants has been applied commercially in agriculture for about three decades ago. However, crops such as sugarcane still get almost no benefit from this technology. The present work describes an efficient method for genetic modification of sugarcane using Agrobacterium tumefaciens. Among the advantages that stand out in this technique, we can highlight: easiness of performing; generation of positive events with fewer copies of the target gene; and integration of the target gene in active regions of genome. All of these characteristics that benefits the generation of genetically modified plants with better stability and effectiveness.*

Keywords: *Saccharum ssp, bar gene; GMO; plant biotechnology*

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar representa, desde o início da colonização do Brasil, uma importante fonte de alimentos, como o açúcar, a rapadura e a cachaça. Os subprodutos do seu processamento são usados para a produção de ração para a alimentação animal e papel (STUPIELLO, 1987). Todo etanol brasileiro é produzido a partir da cana-de-açúcar (CONAB, 2018). Atualmente, o Brasil é o maior exportador de etanol e o segundo maior produtor do mundo, após os Estados Unidos. Além disso, vale salientar a importância da produção de energia elétrica, gerada a partir da queima do bagaço proveniente da extração do caldo. A produção da cana-de-açúcar no Brasil está concentrada principalmente nas regiões Centro-Sul e Nordeste e ocupa uma área de aproximadamente 8 milhões de hectares.

Em espécies de importância comercial, procura-se obter a maior produtividade possível dentro de um curto espaço de tempo aliado à preservação do meio ambiente. Diante disso, a transformação genética de plantas se mostra uma alternativa atrativa para a obtenção de variedades de cana-de-açúcar que gerem produtos de maneira mais eficaz. O sucesso da transformação genética está diretamente associado a cultura de tecidos de plantas e ao processo de transformação empregado (MARTINS et al., 2015). Um dos principais processos de modificação genética é a biobalística, que embora eficiente, apresenta como desvantagem a inserção de várias cópias do gene de interesse de forma completamente aleatória no genoma, o que pode causar alterações indesejadas no fenótipo da variedade transformada. Já o processo de modificação por *Agrobacterium tumefaciens*, por fazer uso de um sistema biológico que co-evoluiu com seu



hospedeiro no sentido de otimizar a transferência do DNA do patógeno para a planta (OOMS et al., 1981), geralmente produz eventos com menor número de cópias do gene de interesse, inseridas de forma estável em regiões mais ativas do genoma no que se refere a atividade de expressão gênica. No presente trabalho, foi utilizada a cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* para gerar eventos de cana na variedade SP 80-3280.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As etapas envolvidas no processo de transformação genética de cana utilizando *A. tumefaciens* estão detalhados no esquema na Figura 1. O processo se inicia com a coleta de ponteiros de colmos de cana-de-açúcar com idade variando entre 4 a 6 meses. Os ponteiros foram levados para o laboratório para serem desinfestados com solução de hipoclorito 1% e em seguida, a região central do colmo, denominada de “palmito”, foi isolada e seccionada perpendicularmente em discos de 1 mm de espessura. Os discos foram transferidos para meio de indução de calogênese (composição do meio) e mantidos na ausência de luminosidade. Após 45 a 60 dias, os calos foram colhidos e transferidos para solução de infecção (meio MS ½ força; 200 µM de acetoseringona; pH 5.7) contendo *A. tumefaciens*, cepa EHA 105, já contendo o cassete de expressão de interesse no vetor binário. Após a infecção, os calos foram transferidos para o meio de co-cultivo (meio MS c/ vitaminas; 200 µM acetoseringona; 1,5 mg/L 2,4-D; 30 g/L sacarose; 1% phytigel) e mantidos no escuro a 21 °C por 3 dias para permitir a infecção das células do tecido. Posteriormente foram transferidos para o meio de descanso (meio MS c/ vitaminas; 200 µM acetoseringona; 1,5 mg/L 2,4-D; 30 g/L sacarose; 0,3% Gelrite; 150 mg/L Timentin). Após uma semana, os calos foram transferidos para o meio de seleção (meio MS c/ vitaminas; 200 µM acetoseringona; 1,5 mg/L 2,4-D; 30 g/L sacarose; 0,3% Gelrite; 100 mg/L Myo-inositol; 150 mg/L Timentin) contendo o agente de seleção para o gene *bar*, que neste caso é o herbicida glufosinato de amônio nas concentrações de 1,5; 3 e 6 mg/L sucessivamente. Os calos foram mantidos inicialmente no escuro a 28 °C e nas etapas finais foram expostos a penumbra para estimular a diferenciação celular. Após dois ou três ciclos de seleção no herbicida, os calos que sobreviveram na presença do herbicida e que iniciaram a diferenciação, foram transferidos para um frasco contendo meio de cultura (meio MS c/ vitaminas; 30 g/L sacarose; 0,3% Gelrite; 100 mg/L Myo-inositol) para estimular a emissão da parte aérea e das raízes. As plântulas recuperadas foram então testadas para a presença do gene de seleção utilizando fita de detecção (Romer TraitChek™ LL Strip Test; Figura 2) e as plantas que apresentaram a banda confirmando a atividade do gene

bar foram transferidas para solo para aclimação em casa de vegetação com temperatura, luminosidade e umidade relativa controlada (Figura 3).

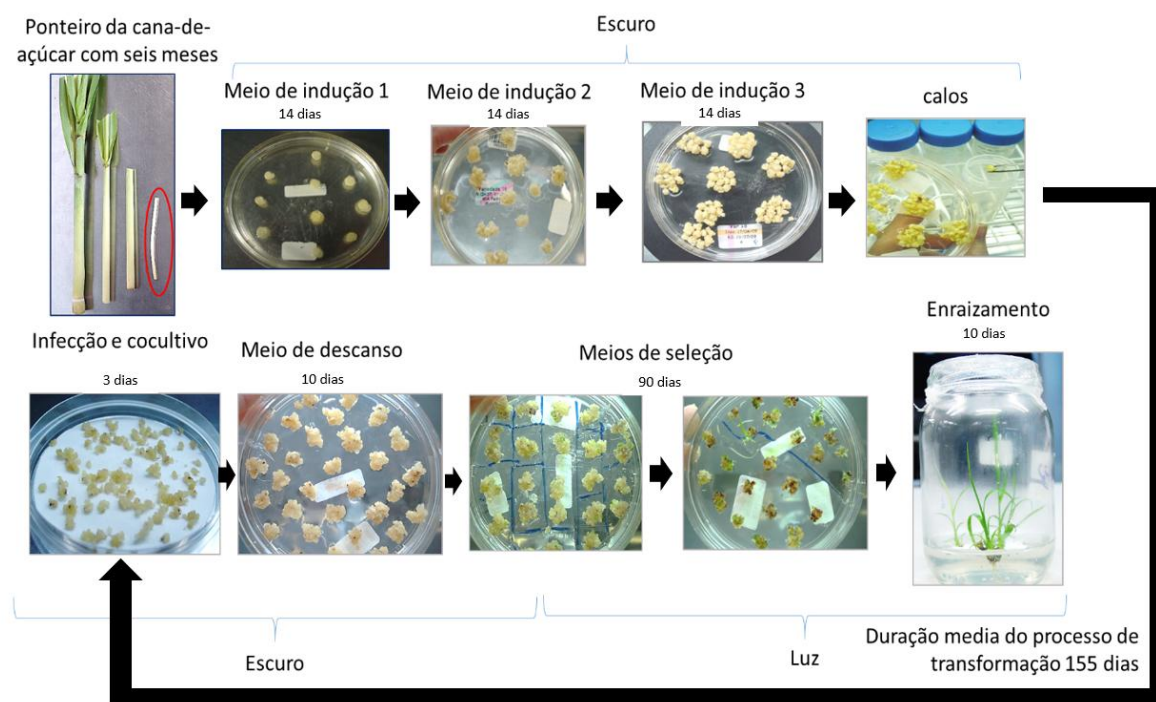


Figura 1 – Etapas sucessivas do processo de transformação genética de cana-de-açúcar utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.

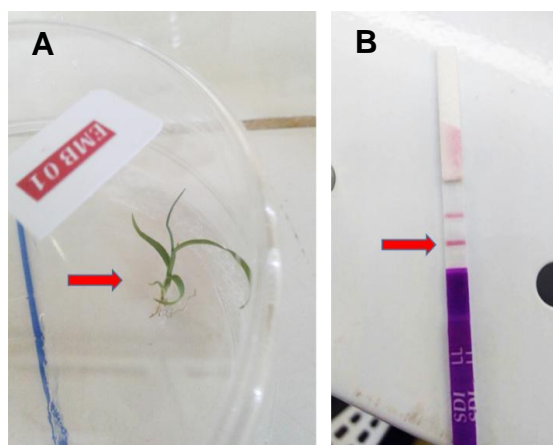


Figura 2 – Obtenção de plântulas geneticamente modificadas de cana-de-açúcar. A) Evento positivo; B) Confirmação da presença do transgene em fita teste



Figura 3 – Etapa final do processo de obtenção de plantas transgênicas - Aclimação de eventos positivos de cana-de-açúcar (plantas com cerca de três semanas de idade) cultivados casa de vegetação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os experimentos de transformação genética de cana, foram utilizados dois cassetes de transformação no vetor binário pTF101.1. Cada um dos cassetes possuía um gene alvo (gene #01 e gene #02, cujos resultados não serão apresentados ou considerados nas discussões do presente trabalho), sob controle do promotor de actina de arroz (actin-1), além do cassete com o gene de seleção *bar* dirigido pelo promotor CaMV35S duplo. Para o conjunto dos dois genes, foram obtidos um total de 33 eventos positivos, obtidos em dois experimentos de transformação independentes, sendo um experimento para cada uma das construções. Os eventos foram inicialmente identificados com fitas teste para detecção da proteína do gene *bar* (Figura 2) e posteriormente por bioensaios na casa de vegetação com a aplicação tópica do herbicida glufosinato de amônio (200 mg/mL) em setores delimitados da lâmina foliar (superfície abaxial e adaxial). Após 3 dias, as plantas controle apresentaram clorose na região de aplicação do herbicida

que posteriormente evoluíram para lesões necróticas, enquanto que os eventos positivos permaneceram saudáveis (Figura 4). Durante esta etapa, também foram coletadas amostras de tecido em folhas jovens para cada um dos eventos, para extração de DNA genômico e confirmação da presença do gene *bar* por PCR convencional (Figura 5) conforme protocolo descrito por Zhou et al. (2016).



Figura 4 – Bioensaio com pincelamento do herbicida glifosinato de amônio em regiões delimitadas da folha. Os sintomas de clorose com posterior necrose do tecido da lâmina foliar foram detectados apenas nas plantas controle 3 dias após a aplicação.

Os resultados obtidos indicam que o processo de transformação por *A. tumefaciens* na variedade de cana-de-açúcar SP 80-3280 foi muito eficiente, gerando eventos positivos na quantidade e qualidade suficientes para o planejamento e montagem de desenhos experimentais visando validação da atividade dos genes alvo no fenótipo da variedade utilizada. Após a aclimação das plantas R_0 (regeneração zero), os colmos foram cortados e as gemas utilizadas para gerar as plantas R_1 e multiplicar os eventos. No momento, as plantas R_1 estão sendo avaliadas em experimentos controlados em casa de vegetação na Embrapa Agroenergia, para avaliar a resposta dos genes alvo para a característica de interesse.

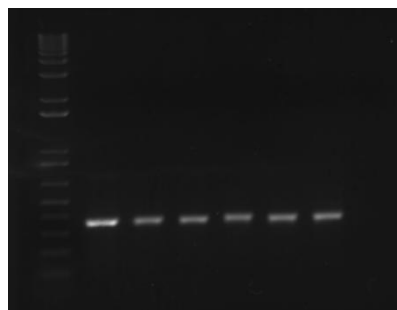


Figura 5 – Confirmação da presença do gene *bar* no DNA genômico extraído de folhas dos eventos positivos de cana-de-açúcar detectados via PCR com iniciadores específicos para amplificação do gene *bar*. Onde: MM) Marcador de peso molecular 1 Kbp (Invitrogen); C+) Controle positivo; E1 a E5) Eventos positivos de cana-de-açúcar; C-) Controle negativo.

4. CONCLUSÃO

O processo de transformação genética de cana-de-açúcar, variedade SP 80-3280, utilizando a cepa EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens* mostrou-se eficiente e gerou número adequado de eventos positivos para validação dos genes de interesse que serão avaliados em experimentos futuros.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a EMBRAPA e ao CNPq pelas bolsas concedidas. Os autores agradecem a empresa Pangeia Biotech pelo suporte na obtenção dos resultados apresentados.

6. REFERÊNCIAS

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar safra 2018/2019, primeiro levantamento, maio/2018. Brasília, DF: Conab, 2018.

MARTINS, P.K.; RIBEIRO, A. P.; CUNHA, B.A.D.B. et al. A simple and highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for *Setaria viridis*. **Biotechnology Reports** 6:41-44. 2015

OOMS, G.; HOOYKAAS, P. J.; MOOLENAAR, G.; SCHILPEROORT, R. A. Grown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti plasmids; analysis of T-DNA functions. **Gene** 14(1-2): 33-50. 1981



12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018
01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-145-5

STUPIELLO, J. P. A cana-de-açúcar como matéria-prima. In: PARANHOS, S. B. (Ed.). Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 187-259

ZHOU, D.; WANG, C.; LI, Z.; *et al.* Detection of *bar* transgenic sugarcane with a rapid and visual loop-mediated isothermal amplification assay. **Frontiers in Plant Science**. 7: 279, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00279>