



## **TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MILHO POR *Agrobacterium tumefaciens***

Nicole Gomes **Camilo**<sup>1</sup>; Ana Paula **Ribeiro**<sup>2</sup>; Viviane C. H. **Silva**<sup>3</sup>; Ricardo A. **Dante**<sup>4</sup>; Isabel R. **Gerhardt**<sup>5</sup>; Juliana E. T. **Yassitepe**<sup>6</sup>; Fernanda R. **Fernandes**<sup>7</sup>; Paulo **Arruda**<sup>8</sup>; Paulo C. De Luca<sup>9</sup>;  
Geraldo Magela de Almeida **Cançado**<sup>10</sup>

**Nº 19608**

**RESUMO** – A biotecnologia é uma importante ferramenta que propicia ganhos de produtividade na agricultura, ao mesmo tempo em que pode reduzir o ritmo de exploração de novas áreas agricultáveis e aumentar a utilização de áreas degradadas, o que gera dividendos positivos para o meio ambiente e para a sociedade. O objetivo deste trabalho é otimizar a transformação genética de milho para a geração de eventos com desempenho superior em condições de seca e calor. A modificação genética de milho via *Agrobacterium tumefaciens* ocorre como parte de “pipeline” de transformação continuado e em larga escala, utilizando embriões imaturos extraídos de genótipos de milho responsivos ao processo de transformação. Dentre os poucos genótipos de milho responsivos ao processo de transformação e embriogênese somática, destacam-se o híbrido *Hi-II* e a linhagem B104, ambos de origem temperada, que estão sendo utilizados no presente trabalho. O desenvolvimento de uma rotina de transformação genética em larga escala exige o desenvolvimento de protocolos eficientes. Uma vez obtidos os eventos transgênicos de milho, os mesmos são analisados e caracterizados quanto ao efeito da inserção do transgene de interesse nas plantas cultivadas na presença da condição desejada, neste caso especificamente, o estresse hídrico e de calor. O presente trabalho, descreve o processo de transformação genética de milho e os resultados obtidos até o momento.

**Palavras-chaves:** OGM, *Zea mays*, biotecnologia.

1 Bolsista Embrapa: Graduação em Ciências Biológicas, UniCesumar, Sumaré-SP, nicole\_gomes.camilo@hotmail.com.

2-3 Pós-doutorado Fapesp/Unicamp/GCCRC, Campinas –SP.

4-7 Pesquisador Embrapa Informática Agropecuária, GCCRC, Campinas-SP.

8 Pangeia Biotech, Campinas-SP.

9 Professor Unicamp, CBMEG / Unicamp, Campinas-SP.

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



**ABSTRACT** – *Biotechnology is an important tool that might provide yield increase for agricultural products as well as the promotion of sustainable practices such as the reduction the expansion of agriculture by improving the use of degraded areas and reducing the agricultural expansion to native forests and conservation areas. Therefore, the broad adoption of this technology by farmers should help agriculture to generate positive dividends for the environment and for society. The aim of this work is the protocol optimization for maize genetic transformation to produce elite events with better performance during drought and heat stress in the field. Genetic modification of maize via *Agrobacterium tumefaciens* is the method of choice for a large-scale and continuous transformation pipeline and during this process, immature embryos extracted from maize genotypes with better response to transformation are continuously used. Among the few genotypes responsive to the transformation process and somatic embryogenesis, the Hi-II hybrid and the B104 lineage, both of temperate origin, are being used in the present work. That's because the development of a large-scale genetic transformation routine requires the development of efficient protocols. Once the transgenic maize events have been obtained, they are analyzed and characterized for the effect of the transgene insertion when in the presence of a specific condition, in this case, drought and heat stress. The present work describes the process of genetic transformation of maize and the results obtained so far.*

**Keywords:** OGM, *Zea mays*, biotechnology.

## **1 INTRODUÇÃO**

O uso de ferramentas da biotecnologia, como a produção de plantas transgênicas, pode oferecer alternativas para a redução do tempo de obtenção de novos genótipos. A utilização da transformação genética descrita neste trabalho, relata a estratégia adotada no projeto do Centro de Pesquisa em Genômica Aplicada as Mudanças Climáticas (GCCRC – Genomics for Climate Change Research Center) financiado pela FAPESP e que tem como propósito a validação de genes previamente descobertos e identificados pela equipe envolvida no GCCRC (UMiP GenClima e CBMEG-Unicamp), e também a elucidação dos processos moleculares que fazem com que as plantas geneticamente modificadas sejam mais tolerantes aos diversos estresses abióticos.



A identificação de genes potencialmente envolvidos com a resposta de plantas as condições de estresses associados a superexpressão dos mesmos em uma cultura de interesse agrônomo como o milho (*Zea mays*) pode ser uma estratégia eficiente para gerar genótipos mais tolerantes e resistentes para ambientes restritivos de cultivo. A modificação genética de milho via *Agrobacterium tumefaciens* é realizada corriqueiramente por empresas de biotecnologia produtoras de sementes. Portanto, o uso de um “pipeline” de transformação continuado e em larga escala, utilizando embriões imaturos de genótipos de milho de melhor resposta à transformação, tais como o híbrido *Hi-II* e a linhagem B104, já é um modelo validado e consolidado na iniciativa privada. Neste trabalho, descreve-se o desenvolvimento de uma rotina de transformação genética em larga escala, bem como a otimização de protocolos para progressos expressivos na geração de eventos de milho, em uma parceria entre a Embrapa e Unicamp. Os eventos transgênicos, na medida que são gerados, são analisados e caracterizados no que refere ao efeito da inserção do transgene de interesse na presença dos estresses alvo do estudo, em um processo denominado fenotipagem. Portanto, as informações e produtos gerados neste projeto, utilizando ferramentas biotecnológicas, irão contribuir para a compreensão e elucidação dos processos genéticos de plantas envolvidos na resposta aos diversos estresses abióticos. Espera-se ainda, contribuir com a geração de ativos biotecnológicos que porventura possam ser aplicados no processo produtivo da agricultura.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

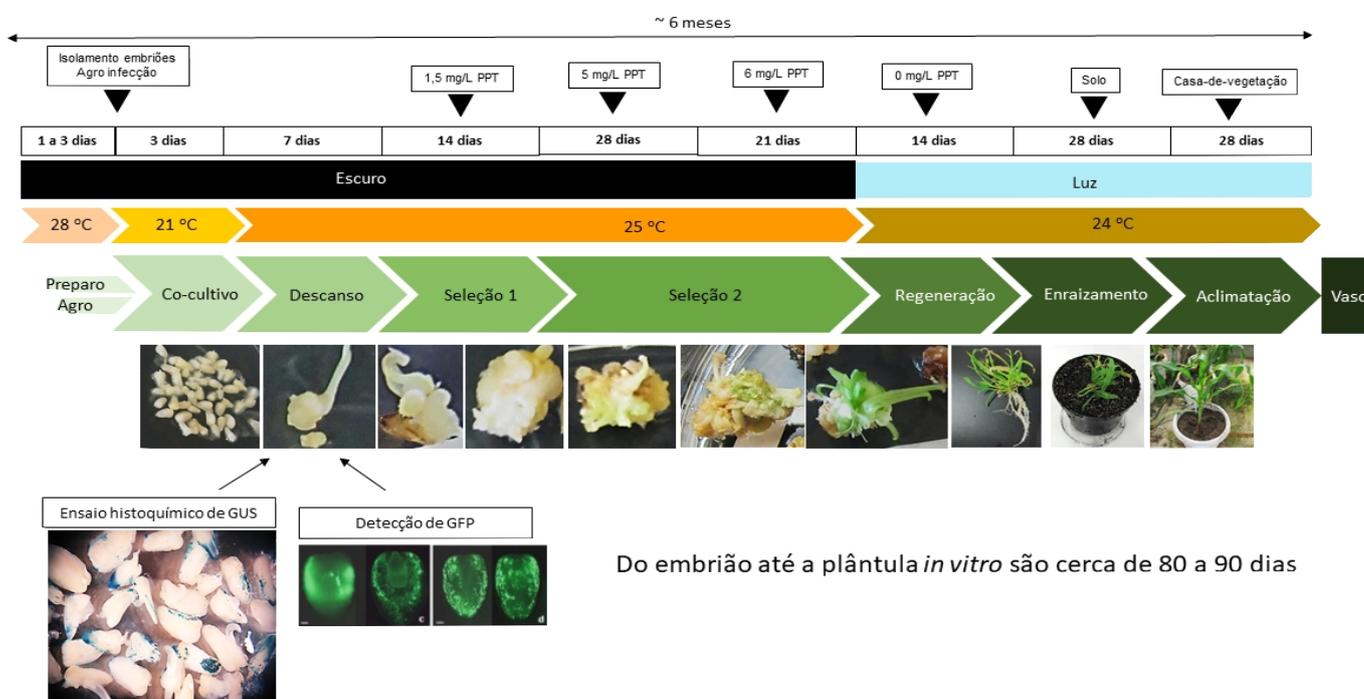
O processo de transformação genética de milho via *Agrobacterium tumefaciens* utiliza embriões imaturos com 12 dias após a polinização, extraídos de genótipos de milho responsivos (Cho et al., 2014; Frame et al., 2002; Sidorov & Duncan, 2009). O híbrido de milho *Hi-II* e a linhagem B104 foram escolhidos pois os embriões desses genótipos são menos recalcitrantes ao processo de transformação genética e mais propensos para a produção de calos embriogênicos friáveis do tipo II, considerados os mais adequados para regeneração de plântulas. A Figura 1 ilustra os principais passos envolvidos em um protocolo padrão de transformação genética do híbrido de milho *Hi-II* (Frame et al., 2002) com adaptações e modificações para melhora de eficiência. Um dos objetivos principais



**13º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC  
2019**  
**30 e 31 de julho de 2019 - Campinas, São Paulo**  
**ISBN: 978-85-7029-149-3**

desta etapa é implantar uma escala rotineira de transformação genética, para haver um progresso expressivo na geração de eventos. Após a obtenção dos eventos no processo de transformação genética, os mesmos passarão por análise/caracterização molecular para confirmação da inserção do transgene, o padrão de expressão gênica e para determinar o número de cópias no evento. Conforme ilustrado na Figura 1, o protocolo adotado essencialmente se difere pouco do protocolo padrão descrito por Cho *et al* em 2014. A seleção é feita utilizando como agente seletivo o herbicida fosfinotricina (PPT) em doses crescentes ao longo do processo.

Embora não seja obrigatória para realização do processo de transformação com genes candidatos (genes de interesse), a verificação da taxa de eficiência ao longo do processo pode ser facilmente acessada pelo uso de genes repórteres, tais como o gene da  $\beta$ -glucuronidase (GUS) e o gene da green fluorescent protein (GFP) e é uma prática corriqueira. Geralmente se dá preferência pela utilização da GFP, pois sua detecção é feita *in vivo* no tecido transformado, enquanto que a utilização do GUS exige um teste histoquímico que é destrutivo.



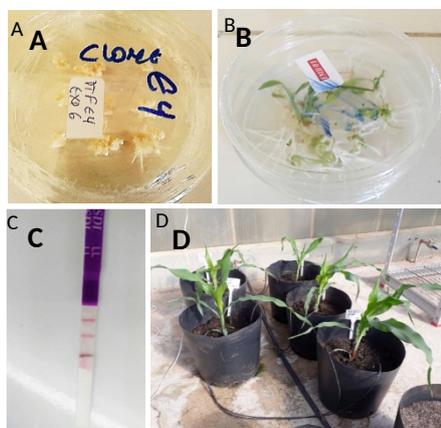
Produção embriões + obtenção eventos + colheita de espigas a partir de  $T_0 = 6$  meses

**Figura 1.** Processo de transformação genética de embriões de milho via *A. tumefaciens* indicando: o tempo desde o início do processo até a obtenção das plantas T<sub>0</sub> aclimatadas em casa-de-vegetação; as diferentes etapas que envolvem desde introdução, passando pela seleção e regeneração até a aclimação; e as condições ambientais requeridas para cada etapa do processo.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicam que a resposta do milho ao processo de transformação genética por *A. tumefaciens* é do tipo genótipo-específica, ou seja, apenas alguns poucos genótipos de milho apresentam resposta positiva, tanto para o processo de infecção pela bactéria como para embriogênese somática *in vitro*. Essa característica torna o processo mais difícil, além de exigir, após a obtenção do evento, a introgressão do transgene no germoplasma de interesse agrônomo, via sucessivos retrocruzamentos. Adicionalmente, mesmo para os poucos genótipos responsivos, a frequência de transformação é influenciada pela qualidade fisiológica do embrião, podendo o mesmo ser afetado por questões de nutrição, sazonalidade e presença de pragas e doenças nas plantas produtoras de embriões, mesmo quando são cultivadas em ambiente protegido.

A Figura 2 ilustra a obtenção de eventos positivos de milho *Hi-II*. No momento que as plântulas são transferidas do ambiente *in vitro* para o substrato para aclimação, uma pequena amostra de folha é coletada para verificar a presença da proteína do gene de seleção. No caso, o gene *bar*, que confere tolerância ao herbicida PPT (Finale®). As plantas positivas são então cultivadas em casa-de-vegetação para serem cruzadas com outros genótipos e gerarem as sementes da geração T<sub>1</sub>.



**Figura 2** – Obtenção de evento transgênico de milho: A) calos embriogênicos em fase final de seleção em meio com herbicida Finale®; B) plântulas de milho antes da aclimação em solo; C) Teste com fita



**13º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC  
2019  
30 e 31 de julho de 2019 - Campinas, São Paulo  
ISBN: 978-85-7029-149-3**

diagnóstico indicando que o evento é positivo (banda gerada pela presença da enzima do gene de seleção bar); D) Plantas T<sub>0</sub> aclimatadas em casa-de-vegetação.

Os próximos passos incluem a genotipagem molecular das plantas (RT-PCR com iniciadores específicos para amplificação do transgene); bioensaios com pincelamento de herbicida Finale<sup>®</sup> nas folhas das plantas (Figura 3); e por último início do processo de retrocruzamento do evento com o genótipo recorrente de interesse.



**Figura 3** – Identificação de plantas geneticamente modificadas de milho tolerantes ao herbicida utilizado na seleção de eventos. No caso, foi pincelado o herbicida Finale® em uma região delimitada da folha para observar a reação de necrose que ocorre nas plantas que não são tolerantes ao herbicida (controles negativos).

#### 4 CONCLUSÃO

A transformação genética em larga escala de milho já é praticada há décadas pelas grandes empresas privadas de biotecnologia. A maioria delas aperfeiçoou seus processos internamente, criando novos protocolos e desenvolvendo seu próprio germoplasma com melhor resposta à transformação genética. Já o foco acadêmico priorizou trabalhar em projetos pontuais com um ou poucos genes, utilizando espécies modelos tal como *Arabidopsis thaliana* ou genótipos de plantas cultivadas com baixo valor agrônômico. O presente projeto, demonstra que é possível implementar no sistema público, um processo continuado e de larga escala, semelhante ao que ocorre nas empresas privadas, otimizando a avaliação de um número maior de genes em culturas de interesse comercial.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a EMBRAPA, CNPq e FAPESP pelas bolsas concedidas.



## **6 REFERÊNCIAS**

M. J. Cho et al., *Agrobacterium*-mediated high-frequency transformation of an elite commercial maize (*Zea mays* L.) inbred line. *Plant Cell Rep.* 33, 1767-1777 (2014).

B. R. Frame et al., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiol.* 129, 13-22 (2002).

V. Sidorov, D. Duncan, *Agrobacterium*-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods Mol. Biol.* 526, 47-58 (2009).