

Avaliação de eventos de milho transgênico produzidos por biobalística ou *Agrobacterium tumefaciens*

Kátia F. Pôssa¹, Newton P. Carneiro², Ubiraci G. de P.Lana², Valdenia L. da Silva³, Maíra de F. Pereira⁴, Monalisa H. Carneiro², Claudia T. Guimarães², Jurandir V. Magalhães² e Andréa A. Carneiro²

¹ Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil, E-mail: katiapossa@hotmail.com

² Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35.701-970, Sete Lagoas, MG, Brasil. E-mails: newtonc@cnpms.embrapa.br, ubiraci@cnpms.embrapa.br, monalisacarneiro@yahoo.com.br, claudia@cnpms.embrapa.br, jurandir@cnpms.embrapa.br, andreac@cnpms.embrapa.br

³ Centro Universitário de Sete Lagoas, MG, Brasil, E-mail: valdenialopes@yahoo.com.br

⁴ Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, Brasil, E-mail: mairabiotec@yahoo.com.br

Palavras-chave: PCR em tempo real, Southern blot, transformação genética, *Zea mays*.

Introdução

A biotecnologia moderna está identificando um grande número de genes passíveis de serem utilizados para a melhoria do milho e as técnicas de transformação genética de plantas podem ser empregadas para inserir estes genes no genoma deste cereal criando novas variedades com características agronômicas e nutricionais de interesse. A transformação genética do milho, considerada por algum tempo recalcitrante, tornou-se, atualmente, um procedimento de rotina para vários genótipos na maioria dos laboratórios públicos e privados que trabalham com esta cultura.

Os principais métodos de produção de plantas transgênicas de milho são a *Agrobacterium tumefaciens* e a biobalística. Na transformação via bombardeamento de partículas ou biobalística, micropartículas de metal cobertas com o gene de interesse são aceleradas em direção às células-alvo, utilizando equipamentos conhecidos como “gen gun” ou canhão gênico (SANFORD et al., 1987; SANDFORD, 1988), com velocidades suficientes para penetrar a parede celular e não causar a morte da célula. O bombardeamento de células vegetais com DNA de interesse foi desenvolvido no final dos anos 80 para manipular o genoma de plantas recalcitrantes à transformação via *Agrobacterium*, dentre as quais estavam incluídos os cereais (KLEIN et al., 1987, 1988; TAYLOR; FAUQUET, 2002).

As principais vantagens do bombardeamento estão relacionadas com a utilização de vetores simples e de fácil manipulação, além da possibilidade da inserção de mais de um gene de interesse nas células de maneira eficiente (CHEN et al., 1998; WU et al., 2002). Embora seja considerado um método de transformação bastante eficiente para o milho, uma possível desvantagem é a ocorrência de múltiplas cópias do transgene e de complexos padrões de integração suscetíveis ao silenciamento da expressão gênica nas gerações futuras (WANG; FRAME, 2004).

A transformação por *A. tumefaciens* é uma metodologia utilizada rotineiramente para transformar dicotiledôneas e recentemente foi adaptada para plantas monocotiledôneas (HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996; TINGAY et al., 1997; FRAME et al., 2000). *Agrobacterium* é uma bactéria de solo capaz de causar tumores vegetais na região da infecção. Estes tumores resultam da transferência do T-DNA presente no plasmídeo Ti para a célula vegetal. Em



processos biotecnológicos de transferência gênica, os genes endógenos do T-DNA causadores de tumor são substituídos por genes exógenos de interesse.

A. tumefaciens constitui um excelente sistema de introdução de genes em células vegetais uma vez que produz transformantes com poucas cópias do transgene e a integração do T-DNA é um processo relativamente preciso. A região do DNA a ser transferida está definida pelas sequências flanqueadoras, extremidades direita e esquerda. Ocasionalmente reordenações são produzidas, mas na maioria das vezes a região é inserida intacta no genoma da planta. Normalmente, os T-DNA integrados mostram mapas genéticos consistentes e segregação adequados. Ademais, os caracteres introduzidos por esta via têm se mostrado estáveis durante muitas gerações de cruzamentos. Esta estabilidade é crítica quando se pretende comercializar as plantas transgênicas geradas (HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996). Em compensação, a eficiência da transformação de milho via *Agrobacterium* com vetores padrões ainda é baixa quando comparada com a biobalística. Em adição, grande número de eventos produzidos por *Agrobacterium* apresentam no genoma, além do T-DNA contendo os genes de interesse, sequências estruturais do vetor binário, indesejáveis na planta final (KONONOV et al., 1997; SHOU et al., 2004). Além do mais, a transformação mediada por *Agrobacterium* ainda é um método genótipo-dependente sendo que apenas um número reduzido de genótipos de milho foi transformado por este método.

Neste trabalho, eventos de milho transgênico contendo o gene *SbMATE*, produzidos através da transformação via *Agrobacterium* ou biobalística, foram comparados utilizando as técnicas de Southern blot e PCR em tempo real. É esperado que a expressão do gene *SbMATE* (MAGALHÃES et al., 2007) inserido aumente a tolerância do milho ao estresse de alumínio quando plantas são cultivadas em solos ácidos, como por exemplo, o Cerrado brasileiro.

O milho utilizado para a transformação foi o genótipo híbrido Hi II cultivado em casas de vegetação do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, situada no município de Sete Lagoas-MG.

A construção gênica utilizada *Ubi::SbMATE::NOS* contém o gene *SbMATE* (MAGALHÃES et al., 2007) sob o controle do promotor constitutivo da Ubiquitina (CHRISTENSEN et al., 1992) e do terminador NOS (Figura 1), clonado nos sítios de *EcoRI* e *HindIII* dos vetores binário pTF101 (PAZ et al., 2004) e pCAMBIA 3301 para a transformação de milho via *A. tumefaciens* EHA101 e biobalística, respectivamente.

A transformação de embriões imaturos de milho HiII por *A. tumefaciens* foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Frame et al. (2002) e a transformação via biobalística segundo o protocolo descrito por Carneiro et al. (2004). Foram geradas oito plantas a partir de um evento transgênico via *Agrobacterium* e 140 plantas provenientes de 46 eventos diferentes via biobalística. A eficiência de transformação foi de 0,3% para *Agrobacterium* e 1,7% para o bombardeamento de partículas. A eficiência da transformação utilizando o bombardeamento de partículas foi similar a de 1,9% obtida por Frame et al. (2000) transformando calos embriogênicos de Hi II com partículas de ouro de 1,0 µm. Entretanto, foi inferior a 7,1% comunicada por Shou et al. (2004) utilizando partículas de ouro de 0,6 µm. A transformação de milho via biobalística no presente trabalho foi realizada com partículas de tungstênio de tamanhos variados, uma mistura contendo partículas de até 10 µm. Conforme demonstrado por Frame et al. (2000), o tamanho da partícula utilizada no bombardeamento é um dos fatores responsáveis pela recuperação de clones transgênicos. A redução do tamanho da partícula serve para minimizar o ferimento causado nas células alvo e, conseqüentemente, melhorar a regeneração celular e a eficiência de produção de plantas transgênicas. Para a transformação de milho Hi II mediada por *Agrobacterium*, a frequência obtida neste trabalho foi baixa quando considerada a faixa de 1,1% a 22,2% apresentada por



Frame et al. (2002). Em comparação com o bombardeamento de partículas, a eficiência de produção de eventos transgênicos via *Agrobacterium* ainda é uma limitação em vários laboratórios.

O número de cópias do transgene presentes em sementes T1 de alguns dos eventos gerados via bombardeamento de partículas e *Agrobacterium*, estimado através da técnica de Southern blot, foi comparado. Para tanto, 20 µg de DNA total (SAGHAI-MAROOOF et al., 1984) foi digerido com *Hind*III e os fragmentos separados em gel de agarose 0,8% utilizando tampão TAE (90 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0). Após a eletroforese, o DNA foi transferido por capilaridade para uma membrana de nitrocelulose Hybond N⁺ (Amersham / Inglaterra) de acordo com protocolo descrito em Sambrook et al. (1989). Após 24 horas de transferência, a membrana foi seca por 2 horas à 80°C para a fixação do DNA. A sonda foi preparada a partir da digestão da construção *Ubi::SbMATE::NOS* com a enzima *Eco*RI, a qual gera um fragmento de 2,4 Kb. Em seguida, marcada e hibridizada à membrana utilizando o kit AlkPhos Direct Labelling Reagents (GE Healthcare Amersham) segundo recomendações do fabricante.

A enzima *Hind*III possui apenas um sítio de restrição na construção, portanto o número de cópias do transgene foi estimado contando o número de bandas hibridizadas com a sonda *SbMATE* (Figura 1). Os resultados mostraram que tanto na transformação por *Agrobacterium* quanto por biobalística foram encontradas plantas contendo um baixo número de cópias do transgene. Também observou-se que na transformação utilizando a biobalística um dos eventos possui no mínimo 10 cópias do transgene (Figura 2). Shou et al. (2004), analisando eventos gerados por biobalística e *Agrobacterium*, também mostraram que de 12 eventos derivados de biobalística apenas dois tinham até cinco cópias do transgene, sendo que os demais continham mais de 10 cópias. Em contraste, a maioria dos eventos derivados de *Agrobacterium* continha menos de três cópias. Resultados semelhantes foram descritos por Dai et al. (2001), onde plantas transgênicas de arroz produzidas via bombardeamento de partículas apresentaram mais de 3 cópias do transgene. Já a maioria das plantas derivadas de *Agrobacterium* tinham 1 ou 2 cópias do transgene. Normalmente, os métodos de transformação direta resultam na integração de cópias múltiplas do transgene (PAWLOWSKI; SOMERS, 1996; KOHLI et al., 1998; DAI et al., 2001), enquanto que a maioria dos eventos gerados a partir de *Agrobacterium* apresentam um baixo número de cópias (SMITH; HOOD, 1995).

A quantificação da expressão do gene *SbMATE* foi realizada pela técnica de PCR em tempo real utilizando o equipamento ABI7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, USA). O RNA total foi extraído de amostras de folha de plantas individuais com o kit “RNeasy Plant Mini” (Quiagen, Valencia, USA) e tratado com DNase I (Quiagen, Valencia, USA). A reação de transcrição reversa foi realizada com o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcriptase” (Applied Biosystems, Foster City, USA). Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados utilizando Sybr Green com primers específicos para os genes *SbMATE* e β -*actina* (controle endógeno) desenhados pelo software Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, USA). Os ensaios foram realizados utilizando-se três repetições técnicas. Foi detectada uma expressiva variação na quantidade de transcritos para o gene *SbMATE* produzidos entre os diferentes eventos transgênicos, sendo que plantas derivadas da transformação mediada por *Agrobacterium* apresentaram níveis de expressão superiores em relação às plantas provenientes da biobalística (Figura 3). Dai et al. (2001) e Shou et al. (2004) obtiveram resultados semelhantes, maior expressão gênica nos eventos gerados via *Agrobacterium tumefaciens* quando comparados com o bombardeamento de partículas.



Comparando-se o número de cópias e a expressão gênica neste experimento, encontrou-se uma correlação inversa. Eventos com um baixo número de cópias, independente do tipo de procedimento de transformação utilizado, apresentaram uma maior quantidade de transcritos para o gene *SbMATE* do que o evento com alto número de cópias. Não existe uma correlação clara entre a expressão do transgene e o número de cópias presentes na planta (DEAN et al., 1988; HOBBS et al., 1993). Sabe-se que múltiplas cópias do transgene geralmente provocam a cossupressão ou silenciamento gênico (VAUCHERET et al., 1998). E de acordo com Hobbs et al. (1993) o número de cópias do transgene pode estar positiva ou negativamente relacionado com a expressão.

Conclusões

Comparando-se as plantas produzidas através dos diferentes métodos de transformação genéticos mais utilizados para o milho, pode-se concluir que: (i) Tanto a transformação via *A. tumefaciens* quanto o bombardeamento de partículas foram capazes de gerar eventos com um baixo número de cópias no genoma; (ii) Plantas derivadas do bombardeamento de partículas podem conter um número elevado de cópias do transgene; (iii) As plantas produzidas via *A. tumefaciens* apresentaram uma maior expressão do transgene.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à McKnight Foundation pelo auxílio financeiro.

Referências

CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 44 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 32).

CHEN, L.; MARMEY, P.; TAYLOR, N.; BRIZARD, J. P.; ESPINOZA, S.; D'CRUZ, P.; HUET, H.; ZHANG, S.; DE KOCHCO, A.; BEACHY, R.; FAUQUET, C. Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, p. 1060-1064, 1998.

CHRISTENSEN, A. H.; SHARROCK, R. A.; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 18, p. 675-689, 1992.

DAI, S.; ZHENG, P.; MARMEY, P.; ZHANG, S.; TIAN, W.; CHEN, S.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 7, p. 25-33, 2001.



DEAN, C.; JONES, J.; FAVREAU, M.; DUNSMUIR, P.; HEDBROOK, J. Influence of flanking sequences on variability in expression levels of an introduced gene in transgenic tobacco plants. **Nucleic Acids Research**, London, v. 16, p. 9267-9283, 1988.

FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T.; PEGG, S-E.; LI, B.; NETTLETON, D.; PEI, P.; WANG, K. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 129, p. 13-22, 2002.

FRAME, B.; ZHANG, H.; COCCIOLONE, S.; SIDORENKO, L.; DIETRICH, C.; PEGG, S.; ZHEN, S.; SCHNABLE, P.; WANG, K. Production of transgenic maize from bombarded Type II callus: effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, London, v. 36, p. 21-29, 2000.

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 for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 6, p. 271-282, 1994.

HOBBS, S. L. A.; WARKENTIN, T. D.; DELONG, C. M. O. Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 21, p. 17-26, 1993.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, p. 745-750, 1996.

KLEIN, T.; GRADIZIEL, T.; FROMM, M.; SANDFORD, J. Factors influencing gene delivery into *zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. **Bio/Technology**, v. 6, p. 559-563, 1988.

KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, London, v. 6117, p. 70-73, 1987.

KOHLI, A.; LEECH, M.; VAIN, P.; LAURIE, D. A.; CHRISTOU, P. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 7203-7208, 1998.

KONONOV, M.; BASSUNER, B.; GELVIN, S. Integration of T-DNA binary vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. **Plant Journal for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 11, p. 945-957, 1997.

MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y. H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A.; SHAFF, J.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A



gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, p. 1156-1161, 2007.

PAWLOWSKI, W. P.; SOMERS, D. A. Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 6, p.17-30, 1996.

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**, Wageningen, v. 136, p. 167-179, 2004.

SAGHAI-MARROF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, p. 1477-1481, 1984.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANFORD, J. The biolistic process. **Trends Biotechnology**, Amsterdam, v. 6, p. 299-302, 1988.

SANFORD, J.; KLEIN, T.; WOLF, E.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using particle bombardment process. **Particulate Science Technology**, Philadelphia, v. 5, p. 27-37, 1987.

SHOU, H.; FRAME, B. R.; WHITHAM, S. A.; WANG, K. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 13, p. 201-208, 2004.

SMITH, R. H.; HOOD, E. H. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 301-309, 1995.

TAYLOR, N. J.; FAUQUET, C. M. Particle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. **DNA and Cell Biology**, New York, v. 21, p. 963-977, 2002.

TINGAY, S.; MCELROY, D.; KALLA, R.; FIEG, S.; WANG, M.; THORNTON, S.; BRETTELL, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. **Plant Journal**, v. 11, n. 6, p. 1369-1376, 1997.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J. B.; MOURRAIN P.; PALAUQUI, J. C.; VERNHETTES, S. Transgene-induced gene silencing in plants. **Plant Journal**, v. 16, n. 6, p. 651-659, 1998.

WANG, K.; FRAME, B. Maize transformation. In: CURTIS, I. S. (Ed.). **Transgenic crops of world**: essential protocols. Dordrecht: Kluwer, 2004. p. 45-62.



WU, L.; NANDI, S.; CHEN, L.; RODRIGUEZ, R. L.; HUANG, N. Expression and inheritance of nine transgenes in rice. **Transgenic Research**, Philadelphia, v. 11, p. 533-541, 2002.



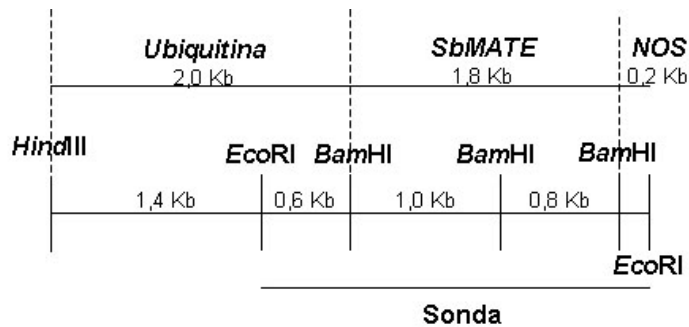


Figura 1: Construção gênica *Ubi::SbMATE::NOS* utilizada para a transformação de milho.

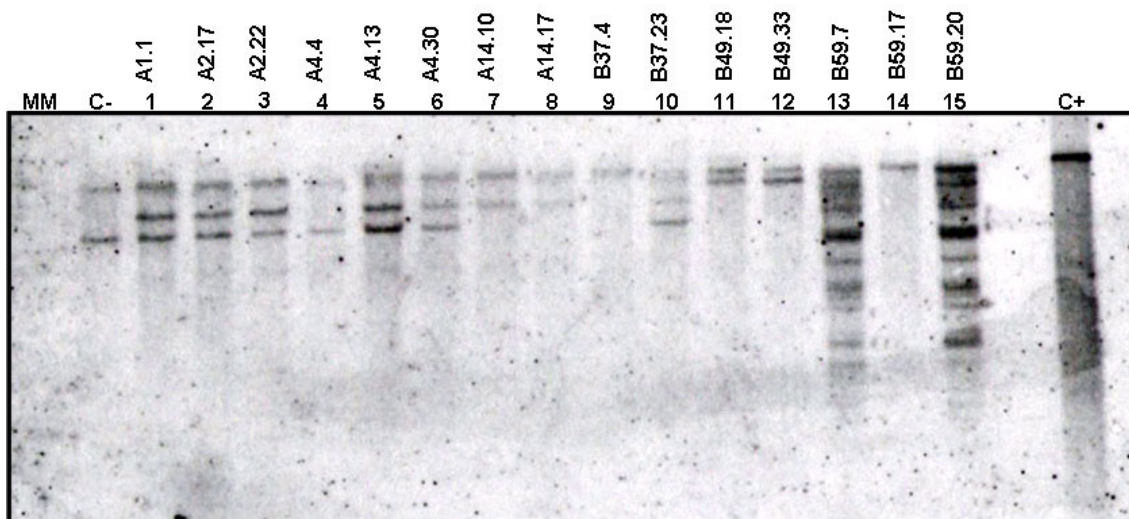


Figura 2: Análise de Southern blot de plantas de milho transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* e bombardeamento de partículas. MM: Marcador Molecular; C-: DNA genômico de milho HiII não transgênico; 1 a 8: Plantas T1 derivadas de transformação via *A. tumefaciens*; 9 a 15: Plantas T1 derivadas de transformação via bombardeamento de partículas.



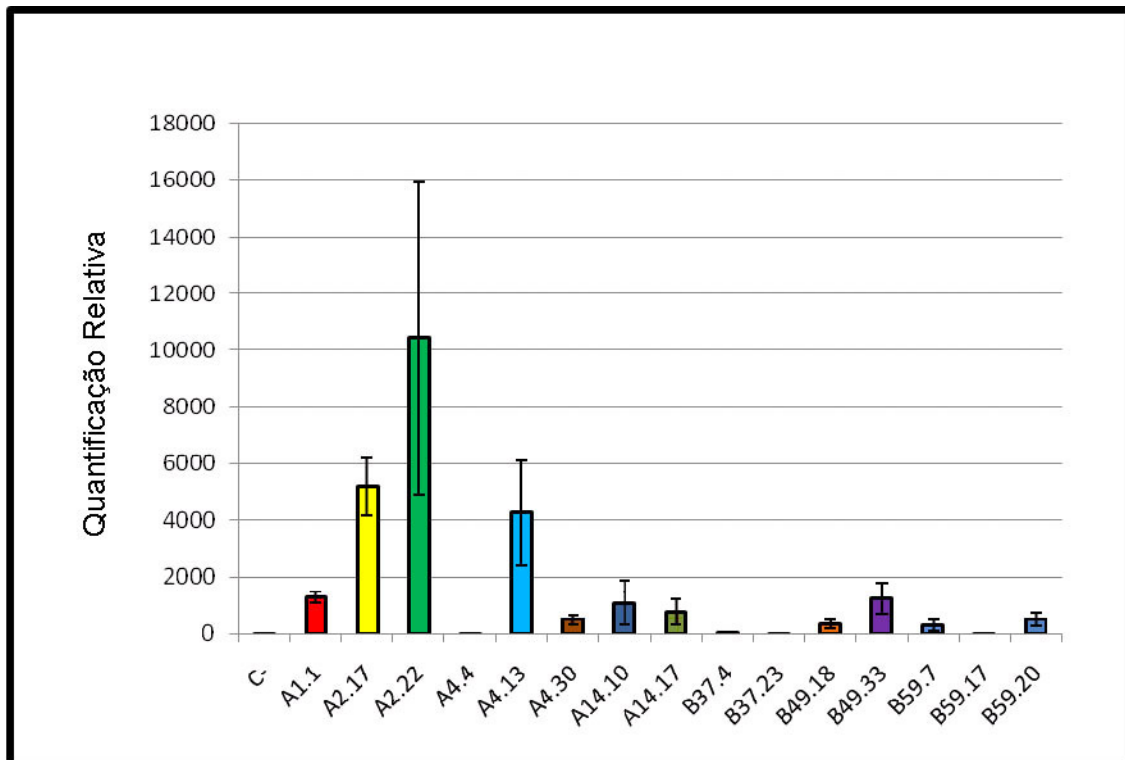


Figura 3: Quantificação relativa da transcrição do gene *SbMA TE*

em plantas de milho transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* e bombardeamento de partículas. C-: Milho HiII não transgênico; A: Plantas T1 derivadas de transformação via *A. tumefaciens*; B: Plantas T1 derivadas de transformação via bombardeamento de partículas.

