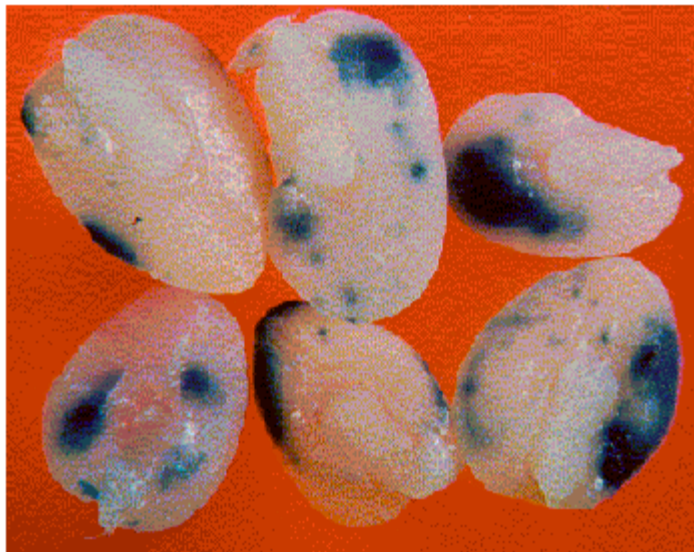


**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MILHO TROPICAL (*Zea mays* L.) MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*.** Maria José Vilaça de Vasconcelos<sup>1</sup>; Marcelo Antonioli Fontes<sup>2</sup>; Maurício Schusterschitz Antunes<sup>3</sup>; Edilson Paiva<sup>1</sup>; Fernando Hercos Valicente<sup>1</sup> & Maurício Antônio Lopes<sup>1</sup>. <sup>1</sup> Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo - Núcleo de Biologia Aplicada - C.P. 151 - 35701-970. Sete Lagoas - MG. <sup>2</sup> Bolsista Pronex, Embrapa Milho e Sorgo. <sup>3</sup> Estudante de doutorado Purdue University

Palavras-chave: Transformação genética, Milho tropical, *Agrobacterium*, *Zea mays* L.

A obtenção de plantas transgênicas pelo uso de *Agrobacterium tumefaciens* baseia-se na capacidade única dessas bactérias de transferir seqüências específicas de DNA para o genoma vegetal. O processo de infecção de células vegetais pela *Agrobacterium* tem sido intensamente estudado, podendo ser considerado um dos sistemas de interação planta-patógeno melhor caracterizado em nível molecular (Hooykass & Schilperoort, 1992; Winans, 1992; Brasileiro, 1993). Essa metodologia de transferência de genes tem a grande vantagem de poder transferir segmentos de DNA relativamente grandes com pequenos rearranjos e integração de baixo número de cópias do gene dentro do cromossomo das plantas. A aplicação de transformação genética mediada por *Agrobacterium* até pouco tempo estava limitada à maioria das plantas dicotiledôneas, devido ao fato de a maioria das monocotiledôneas e gimnospermas não serem infectadas naturalmente por essa bactéria ou apresentarem pouca suscetibilidade a *Agrobacterium* (Binns & Tomashow, 1988; DeCleene, 1985); hoje, porém, vários laboratórios já transformam, de maneira eficiente, diversas espécies que antes não eram infectadas por *Agrobacterium*, como por exemplo, aspargo (Byterbier et al. 1987), arroz (Raineri et al. 1990; Chan et al. 1992; Hiei et al. 1994; Aldemita & Hodges, 1996) e mais, recentemente, o milho (Ishida et al. 1996). O sucesso desses laboratórios se deve ao fato de a transformação de plantas mediada por *Agrobacterium* ser um processo simples e bastante eficiente, no que diz respeito à regeneração de plantas transgênicas férteis. A Embrapa Milho e Sorgo vem desenvolvendo trabalhos no sentido de adaptar metodologias de transformação genética de milho utilizando a cepa LBA 4404 (pTOK233) de *Agrobacterium tumefaciens* (Hiei et al. 1994), que tem a capacidade de infectar gramíneas. O vetor superbinário pTOK 233 possui o gene para resistência ao antibiótico Higromicina e o gene repórter uidA, que codifica para a enzima  $\beta$ -glucuronidase, contendo um intron (GUS-Intron). Os genes estão sob controle do promotor constitutivo CaMV35S. Desta forma, foi possível transformar embriões imaturos de milho. Através do ensaio histoquímico de GUS ajustaram-se os protocolos de transformação, tornando-se possível otimizar os parâmetros que determinam a eficiência de infecção e transferência do plasmídeo pela bactéria. Na Figura 1, pode-se observar o resultado da expressão transiente do gene da  $\beta$ -glucuronidase (GUS), em embriões imaturos de milho, 24 horas após o co-cultivo com *Agrobacterium*. Embriões plaqueados no meio N<sub>6</sub>GAs (Aldemita & Hodges, 1996), com o escutelo voltado para cima, e co-cultivados com a bactéria durante três dias, permitiram que a agrobactéria infectasse até 95% dos embriões. Esse resultado não permite inferências a respeito da eficiência de integração dos genes ao genoma dos embriões, mas garante, que a transferência desses genes para os embriões, mediada pela agrobactéria, é eficiente. Os meios de cultura utilizados para o cultivo dos explantes transformados tiveram composição idêntica àquela descrita por Carvalho et al. (1997), suplementado com Cefotaxima (250 mg L<sup>-1</sup>), para eliminação da bactéria. Embriões plaqueados em meio de cultura sem glicose e “acetosyringone” não foram infectados eficientemente pela agrobactéria, permitindo a expressão de GUS em apenas 10% dos embriões, quando esse meio continha nitrato de prata,

e em 57% dos embriões, quando o meio não continha nitrato de prata. Segundo Carvalho (comunicação pessoal), a prata exerce efeito inibitório sobre o crescimento da agrobactéria, o que pôde ser confirmado por este experimento. Experimentos visando testar o método de infecção demonstraram que a inoculação da agrobactéria via fermento dos embriões não foi eficiente em permitir a infecção pela bactéria. Observou-se efeito marcante do genótipo sobre a eficiência de transformação pela bactéria. Houve diferença significativa entre a porcentagem de embriões expressando GUS, das linhagens L-273 (95%) e L-398 (22%). Alguns genótipos testados posteriormente para se verificar seus efeitos sobre a eficiência de transformação resultaram em completa ausência de infecção dos embriões pela bactéria, mantidas sob as mesmas condições de transformação. Embriões dos genótipos eficientemente transformados pela agrobactéria foram transferidos para meio de seleção contendo o antibiótico Higromicina B, em concentrações crescentes, e encontram-se atualmente em processo de indução da regeneração de plantas.



**FIGURA 1** - Expressão transiente do gene GUS em embrião imaturo da linhagem de milho L-273, transformados por *Agrobacterium tumefaciens*.

### **Bibliografia**

- Aldemita, R. R.; Hodges, T. K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *japonica* and *indica* rice varieties. **Planta**, 199: 612-617. 1996.
- Binns, A. N.; Tomashow, M. F. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plant. **Annual Review of Microbiology**, 42: 575-606. 1988.
- Brasileiro, A. C. M. Biologia de *Agrobacterium* sp. **ABCTP Notícias**, 20: 2-6.1993.
- Byterbier, B.; Deboeck, F.; Greve, H. D.; Van Montagu, M.; Hernalsteens, J. P. T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plant of the monocotyledon *Asparagus officinalis*. **Proceedings of National Academic Science USA**, 84: 5345-5349. 1987.

- 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**, 171: 73-76. 1997.
- Chan, M. T.; Lee, T.M.; Chang, H. H. Transformation of Indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Physiology**, 33: 577-583. 1992.
- DeCleene, M. The susceptibility of monocotyledons to *Agrobacterium tumefaciens*. **Phytopathology**. Z, 113: 81-89. 1985.
- 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**, 14: 745-750. 1996.
- 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. **The Plant Journal**, 6: 271-282. 1994.
- Hooykass, P. J .J.; Schilperoort, R. A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. **Plant Molecular Biology**, 19: 15-38. 1992.
- Raineri, D. M.; Bottino, P.; Gordon, M. P.; Nester. E. W. *Agrobacterium* mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.) **Bio/Technology**, 8: 33-38. 1990.
- Winans, S. C. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. **Microbiology. Review**, 56: 12-31. 1992.