

Transgenia: desafios no estabelecimento da técnica em trigo

Elene Yamazaki Lau¹, Ernandes Manfro², Eduardo André Roesler³, Liane Balvedi Poersch-Bortolon⁴, Sandra Maria Mansur Scagliusi¹ e Magali Ferrari Grando⁵

¹Pesquisador, Centro Nacional de Pesquisa de Trigo - CNPT (Embrapa Trigo), Rodovia BR 285, km 294, CEP 99001-970, Passo Fundo - RS. E-mail: elene.yamazaki-lau@embrapa.br. ²Doutorando em Fitotecnia, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre, RS. ³Estudante de Agronomia, FAMV, UPF, Passo Fundo, RS, 99052-900. ⁴Doutoranda, PPPG em Genética e Biologia Molecular, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS. ⁵Professora titular, FAMV, UPF, Passo Fundo, RS, 99052-900.

A transgenia permite transferir genes entre diferentes espécies utilizando as técnicas da engenharia genética, de forma pontual, aumentando o *pool* gênico da espécie. Além de ser utilizado diretamente para inserção de novas e estratégicas características para uso na agricultura, é também importante para o estudo da função de genes e indução de mutações. Dentre os métodos existentes, há uma tendência ao uso de *Agrobacterium tumefaciens* por apresentar vantagens tal como o padrão simples de inserção e baixo número de cópias do transgene (Bhalla et al., 2005). O primeiro relato de transformação genética de trigo utilizando *A. tumefaciens* ocorreu em 1997 (Cheng et al., 1997), mas sua aplicação ainda não é trivial e nem de alta eficiência para muitas instituições. A maioria dos trabalhos relata eficiência de transformação inferior a 5% (Cheng et al., 2004; Jones et al., 2005). Apenas a Japan Tobacco divulga a eficiência média de transformação de 50-60% (Ishida et al., 2013).

São descritos muitos fatores que afetam esse método, dentre os quais o genótipo das plantas, tipo de explantes (material vegetal colocado *in vitro*), estirpe de *A. tumefaciens*, vetores binários, condições de inoculação e cocultivo (Cheng et al., 2004), assim como o estado fisiológico das plantas doadoras e o manuseio dos embriões (Ishida et al., 2013). Esses últimos autores também

afirmam que um protocolo desenvolvido em um laboratório frequentemente não funciona em outro. Portanto, para que haja a transferência gênica e a geração de uma planta transgênica é necessário que todos esses fatores estejam em uma combinação favorável e essas condições podem variar de local para local.

A Embrapa Trigo iniciou oficialmente os esforços no estabelecimento do protocolo de transformação genética em 2011, partindo da identificação de genótipos nacionais que respondam *in vitro* (capacidade de indução de calos embriogênicos e regeneração dos embriões somáticos), até a etapa de transformação em si.

Em primeiro momento foram testados diferentes genótipos de trigo, sendo seis (BRS 264, BR 18 Terena, MGS1-aliança, MGS3-Brilhante, PF 020037, PF 020062) com características adequadas para o cultivo no Cerrado, um controle sabidamente responsivo *in vitro* e para transformação genética, Bobwhite, além de Fielder e Pavon 76. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, 21°C/15°C (dia/noite), com aproximadamente 95 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os tipos de explantes testados foram embriões imaturos (protocolos de Wu et al. (2009) e Hu et al. (2003)), embriões maduros (protocolos de Ding et al. (2009) e Patnaik e Khurana (2003)) e micrósporos isolados (protocolo de Eudes e Amundsen (2005)). Para embriões imaturos, depois de identificados os genótipos responsivos e o melhor protocolo base, foram realizados testes com diferentes combinações de reguladores de crescimento e adição de 5 μM de CuSO_4 , visando melhorar a taxa de geração de novas plântulas.

Os experimentos de transformação genética com *A. tumefaciens* foram realizados principalmente com embriões imaturos, utilizando o protocolo de Wu et al. (2009). Vários fatores foram testados, sendo alguns deles: genótipo das plantas (Bobwhite, Fielder, PF 020037 e BR 18 Terena) e das bactérias (AGL1, LBA4404, EHA105), tipos de vetores (p7UG-AB, pAL154/pAL156 e pAL154/p7UG-AB) e dias de manutenção das espigas na geladeira antes da retirada do embrião imaturo. Outros fatores foram testados durante a inoculação (uso de diferentes espalhantes adesivos - Silwet L77 e Pluronic F68, choque de temperatura e centrifugação dos explantes, inoculação do

embrião imaturo conectado à semente, aplicação de vácuo durante a inoculação); e durante o cocultivo (concentração de acetosiringona, pH do meio de cultura, temperatura). Os resultados de maior relevância para o desenvolvimento do protocolo de transformação genética serão a seguir apresentados.

Quanto à resposta *in vitro* utilizando embriões imaturos, foram identificados dois genótipos, sendo eles PF 020037 e BR 18 Terena. O protocolo proposto por Wu et al. (2009) mostrou-se mais eficiente na quantidade de plântulas produzidas. A adição de CuSO_4 no meio de indução de calos foi favorável para a regeneração e o uso de 1 mg/L de 2,4-D e retirada do Picloram nesse mesmo meio aumentou a eficiência de regeneração de BR18 Terena. A eficiência de regeneração utilizando os embriões maduros foi inferior ao apresentado por embriões imaturos. A existência de fungos nas sementes de onde os embriões maduros foram utilizados provocou a perda de muitos explantes. Com relação aos micrósporos isolados, os genótipos mais responsivos em regenerar plantas verdes foram Pavon 76 e PF 020037 e podem ser adequados para uso em transformação genética.

Os experimentos de transformação genética *per se* foram iniciados utilizando embriões imaturos, com a cultivar Bobwhite, juntamente com os dois melhores genótipos identificados. Em primeiro momento, na adaptação do protocolo de indução/regeneração de embriões somáticos com o processo de transformação, houve problemas com a perda da regeneração inclusive no controle sem bactéria e também houve crescimento excessivo de *A. tumefaciens*. A eficiência de transformação transiente, visualizada por coloração histoquímica da atividade do gene *uidA/GUS* (células e tecidos transformados ficam azuis), apresentou-se extremamente baixa ou inexistente, especialmente em Bobwhite. A resposta do genótipo Fielder também foi menor quando comparado aos materiais brasileiros. Os genótipos BR 18 Terena e PF 020037 foram sistematicamente mais eficientes para transformação transiente.

O problema do supercrescimento de *A. tumefaciens* foi reduzido com a retirada do excesso de líquido após a inoculação dos explantes e o uso do biocida PPM (Plant Preservative Mixture). A retirada do líquido também

recuperou a capacidade de regeneração. Outros fatores que permitiram melhorias na expressão transiente de GUS foram o uso de vetor binário em combinação com vetor contendo genes *vir* adicionais, ajuste do pH $\leq 5,5$ no meio de cultura de inoculação/cocultivo e da temperatura de cocultivo entre 22 °C e 25 °C. Atualmente, cerca de 80% dos explantes apresentam sítios com células transformadas. No entanto, essa eficiência de transformação ainda não tem sido suficiente para obter plantas transgênicas.

Uma dificuldade foi obter plantas doadoras de boa qualidade regularmente em condições de cultivo em câmara de crescimento e pela ocorrência de doenças, principalmente oídio. Outro problema foi pressupor que a cultivar Bobwhite apresentaria boa eficiência de transformação e ter dispendido esforços buscando identificar os fatores que poderiam estar interferindo no processo nesse genótipo. Provavelmente Bobwhite não esteja adaptado às condições de cultivo utilizadas, produzindo explantes pouco responsivos a alguma etapa da transferência/expressão gênica, embora responda bem *in vitro*.

Até o momento, as melhorias obtidas foram conquistadas pela identificação e resolução de problemas que resultam em pequenos e cumulativos aumentos na eficiência de transformação. Ainda não foi identificado nenhum fator que produza um salto ao processo. No entanto, ainda há várias possibilidades a serem avaliadas, tanto nas etapas *in vitro* quanto na obtenção de plantas doadoras fisiologicamente mais adequadas.

Referências bibliográficas

BHALLA, P.L.; OTTENHOF, H.H.; SINGH, M.B. Wheat transformation – an update of recent progress. **Euphytica**, v.149, n.3, p.353-366, jun. 2006.

CHENG, M.; FRY J.E.; PANG, S.; ZHOU, H.; HIRONAKA, C.M.; DUNCAN D.R.; CONNER, T.W.; WAN, Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, v. 115, n.3, p.971–980, nov. 1997.

CHENG, M.; LOWE, B. A.; SPENCER, T. M.; YE, X. D.; ARMSTRONG, C. L. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 40, n.1, p. 31–45, jan-fev. 2004.

DING, L.; LI, S.; GAO, J.; WANG, Y.; YANG, G.; HE, G. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. **Molecular Biology Reports**, v. 36, n. 1, p. 29-36, jan. 2009.

EUDES, F.; AMUNDSEN, E. Isolated microspore culture of Canadian 6x triticale cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, n. 3, p. 233-241, set. 2005.

HU, T.; METZ, S.; CHAY, C.; ZHOU, H. P.; BIEST, N.; CHEN, G.; CHENG, M.; FENG, X.; RADIONENKO, M.; LU, F.; FRY, J. *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. **Plant Cell Reports**, v. 21, n. 10, p. 1010-1019. 2003.

ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, Y. High efficiency wheat transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The Society for *In Vitro* Biology, **In vitro Biology Meeting Abstract Issue**, P-33, 15-19 jun, Providence, Rhode Island, USA. 2013.

JONES, H.D.; DOHERTY, A.; WU, H. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. **Plant Methods**, London, 1:5, 2005. doi: 10.1186/1746-4811-1-5

PATNAIK, D.; VISHNUDASAN, D.; KHURANA, P. *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. **Current Science**, v. 91, n. 3, p. 307-317, ago. 2006.

Tabela 1 – Genótipos de trigo utilizados para indução e regeneração de embriões somáticos e transformação genética mediada por *A. tumefaciens*

Cultivar	Resposta <i>in vitro</i>			Expressão transiente	
	EI	EM	MIC	% explantes GUS+ (com pontos azuis)	Pontos azuis/ explante
Bobwhite SH 9826	+++	++	*	7	0,1
Fielder	NT	NT	NT	65	1,8
Pavon 76	NT	NT	***	NT	NT
BR 18 Terena	+++	+	*	75	6,1
PF 020037	+++	NT	*	81	5,6
PF 020062	+	NT	0	NT	NT
BRS 264	+	NT	NT	NT	NT
MGS1-Aliança	+	+	*	NT	NT
MGS3-Brilhante	+	NT	*	NT	NT

EI – embriões imaturos; EM – embriões maduros; MIC – micrósporos isolados; NT – não testado; + (1~14% de calos com regeneração, 0,01~0,2 brotações / explante inicial); ++ (15~44% de calos com regeneração, 0,2~0,4 brotações / explante inicial); +++ (45~65% de calos com regeneração, 3~5 brotações / explante inicial); * (0,1~2 plantas verdes / espiga); *** (6~10 plantas verdes / espiga).