

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**ESTRESSES DE TEMPERATURA E
CONCENTRAÇÕES DE ACETOSIRINGONA NA
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MILHO VIA
*Agrobacterium tumefaciens***

TIAGO TEIXEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Produção e Proteção de Plantas.

Passo Fundo, maio de 2016

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**ESTRESSES DE TEMPERATURA E
CONCENTRAÇÕES DE ACETOSIRINGONA NA
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MILHO VIA
*Agrobacterium tumefaciens***

TIAGO TEIXEIRA

Orientadora: Dra. Magali Ferrari Grando

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Produção e Proteção de Plantas.

Passo Fundo, maio de 2016

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

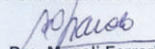
"ESTRESSES DE TEMPERATURA E CONCENTRAÇÕES DE ACETOSIRINGONA NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MILHO VIA *Agrobacterium tumefaciens*"

Elaborada por

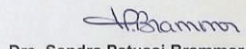
Tiago Teixeira

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Agronomia – Produção e Proteção de Plantas

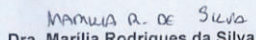
Aprovada em: 06/05/2016
Pela Comissão Examinadora



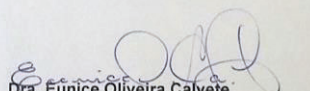
Dra. Magali Ferrari Grandó
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora



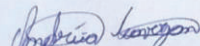
Dra. Sandra Patussi Brammer
Embrapa Trigo



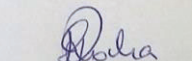
Dra. Marília Rodrigues da Silva
FAMV



Dra. Eúnice Oliveira Calvete
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia



Dra. Andréia Caverzan
FAMV



Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV

CIP – Catalogação na Publicação

T266i Teixeira, Tiago
Estresses de temperatura e concentrações de acetosiringona
na transformação genética de milho via *Agrobacterium*
tumefaciens / Tiago Teixeira. – 2016.
119 f. ; 25 cm.

Orientadora: Dra. Magali Ferrari Grando.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de
Passo Fundo, 2016.

1. Milho. 2. Engenharia genética vegetal. 3. *Agrobacterium*
tumefaciens. I. Grando, Magali Ferrari, orientadora. II.
Título.

CDU: 633.15

Catálogo: Bibliotecário Luís Diego Dias de S. da Silva – CRB 10/2241

BIOGRAFIA DO AUTOR

Tiago Teixeira é natural de Sertão-RS, nascido em 26/08/1991. Fez o curso Técnico em Agropecuária, pelo Instituto Federal do Rio Grande Do Sul, campus Sertão. É Bacharel em Ciências Biológicas, formado em 2014 pela Universidade de Passo Fundo. No mesmo ano ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo, realizando seu trabalho de dissertação em estudos de condições de infecção e de cocultivo na transformação genética de embriões imaturos de genótipos de milho via *Agrobacterium tumefaciens* para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo Dom da vida e por ter me proporcionado todos estes momentos e experiências.

À minha família e amigos muito em especial à minha mãe Lucelena e pelo apoio incondicional nesta jornada.

À Professora Magali Ferrari Grando, minha orientadora, pela dedicação, confiança, orientação, conhecimentos transmitidos e, sobretudo, pela amizade, compreensão e apoio em todos os momentos desta caminhada;

À Universidade de Passo Fundo e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo, pela oportunidade para a realização do curso;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelos conhecimentos transmitidos e amizade

À FAPERGS e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Ao programa de Apoio aos Polos Tecnológicos pelo apoio financeiro ao projeto;

A grande família e eternos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF, em especial a professora Engenheira Agrônoma Dra. Lizete Augustin, Engenheira Agrônoma Msc. Marilei Suzin, Clarício Machado dos Santos, pela colaboração, orientações, disponibilidade, grande amizade e apoio em todos os momentos desta jornada. A Engenheira Agrônoma Dra Marília Rodrigues pelas orientações, ensinamentos e auxílio na condução dos experimentos e pela amizade formada;

Aos estagiários do Laboratório Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF. Lucas Canalli Fossatti, Bruna Santos, Matheus Abreu, William Merlini, Daiane Comarella. E às estudantes de Agronomia Letícia Formighieri, Natália Crestani e Caroline Ceolin, pelo auxílio prestado na condução dos experimentos.

Aos colegas de curso em especial à Cassia Ceccon e Dielli Didone, pela grande amizade formada e boas lembranças dos momentos em que passamos juntos.

A todos que estiveram envolvidos neste trabalho de forma direta ou indireta;

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas	X
Lista de Figuras	XII
RESUMO	16
ABSTRACT	18
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 Aspectos botânicos e importância do Milho	25
2.2 Melhoramento genético e plantas geneticamente modificadas	26
2.3 Métodos de transformação genética	27
2.4 Transformação de milho via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
2.5 Fatores que afetam a transformação com <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	33
2.5.1 Efeito genotípico na transformação por <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	34
2.5.2 Compostos fenólicos	36
2.5.3 Tratamentos de estresse físico na etapa de infecção	37
2.6 Etapas da transformação genética via <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	39
2.6.1 Etapa de Infecção	40
2.6.2 Etapa de Cocultivo	40
2.6.3 Etapa de Descanso	42
2.6.4 Etapa de Seleção	42
2.7 Genes repórteres e marcadores	43
CAPÍTULO I - ESTRESSES FÍSICOS NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS IMATUROS DE GENÓTIPOS MILHO VIA <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	46
RESUMO	46
ABSTRACT	47
1 INTRODUÇÃO	49
2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 Local	55
2.2 Material vegetal	55
2.3 Obtenção dos explantes	55
2.4 Estirpe da agrobactéria, plasmídeo e cultivo bacteriano	56
2.5 Etapas da transformação genética	58

	Página
2.5.1 Etapa de Infecção	59
2.5.2 Etapa de Cocultivo	60
2.5.3 Etapa de Descanso	61
2.5.4 Etapa de Seleção	61
2.6 Delineamento experimental e análise estatística	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1 Experimento 1	63
3.2 Experimento 2	74
4 CONCLUSÕES	80
CAPÍTULO II - CONCENTRAÇÕES DE ACETOSIRINGONA NA INFECCÃO E COCULTIVO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS IMATUROS DE MILHO COM <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	82
RESUMO	82
ABSTRACT	83
1 INTRODUÇÃO	85
2 MATERIAL E MÉTODOS	88
2.1 Local e material vegetal	88
2.2 Etapa de infecção dos embriões	89
2.2,1 Etapa de Cocultivo	90
2.2,2 Etapa de descanso	90
2.3 Tratamentos, delineamentos e análises estatísticas	2
2.3.1 Experimento 1 (concentração de acetosiringona no meio de infecção)	92
2.3.2 Experimento 2 (concentração de acetosiringona no meio de infecção e no mio de cocultivo)	92
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
3.1 Experimento 1.....	93
3.2 Experimento 2	97
4 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	106

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela		Página
1	Origem dos genótipos de milho utilizados nos experimentos FAMV, Passo Fundo, 2015.....	55
2	Composição dos meios utilizados para o crescimento das bactérias, cultura de tecidos e transformação das plantas FAMV, Passo Fundo, 2015.....	59
3	Expressão transiente do gene <i>uidA</i> em embriões imaturos de milho e frequência de calos resistentes a hebicida de dois genótipos submetidos a diferentes condições de infecção com agrobactéria. FAMV Passo Fundo, 2016.....	64
4	Valores de P obtidos pelo F teste para as variáveis analisadas. FAMV, Passo Fundo, 2016.....	65
5	Expressão transiente do gene <i>uidA</i> , sobrevivência dos embriões e frequência de calos resistentes obtidos a partir de embriões imaturos de milho do genótipo Hi-II submetidos a diferentes condições de infecção FAMV, Passo Fundo, 2015.....	74

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela		Página
1	Composição dos meios utilizados para o crescimento das bactérias, cultura de tecidos e transformação das plantas. FAMV, Passo Fundo, 2015.....	91
2	Esquema com os tratamentos e concentrações de acetosiringona utilizada nos ensaios I e II nos meios de infecção e cocultivo. FAMV, Passo Fundo, 2015.....	93
3	Expressão transiente do gene <i>uidA</i> em embriões imaturos de milho do genótipo Hi-II submetidos a diferentes concentrações de acetosiringona durante a infecção com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . FAMV, Passo Fundo, 2016.....	94
4	Expressão transiente do gene <i>uidA</i> em embriões imaturos de milho da variedade BR451 submetidos a diferentes concentrações de acetosiringona durante a infecção com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . FAMV, Passo Fundo, 2016.....	95
5	Valores de P obtidos pelo F teste para as variáveis analisadas. FAMV, Passo Fundo, 2016.....	98
6	Expressão transiente do gene <i>uidA</i> em embriões imaturos de milho de dois genótipos submetidos a diferentes concentrações de acetosiringona durante a infecção e cocultivo com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . FAMV, Passo Fundo, 2016.....	90

**LISTA DE FIGURAS
REVISÃO DE LITERATURA**

Figura		Página
1	Mapa funcional de um plasmídeo Ti: T-DNA (segmento de DNA que é transferido para a célula vegetal); auxinas, citocininas e opinas (genes responsáveis pela indução do tumor e nutrição da bactéria na planta); bordas esquerda e direita (sinalização de onde ocorre o corte do T-DNA); região <i>vir</i> (genes responsáveis pelo corte e transferência do T-DNA); origem de replicação (funções ligadas a replicação, manutenção e estabilidade do plasmídeo Ti dentro da bactéria). Fonte: adaptado de ZHU et al., (2000).....	29
2	Ilustração esquemática da transformação genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . O processo de transformação é constituído por nove grandes passos e começa com o reconhecimento e fixação das <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , para as células do hospedeiro (1), a detecção de sinais específicos da planta é reconhecido pelos componentes de transdução de sinal VirA VirG da agrobactéria (2). Após a ativação dos genes da região <i>vir</i> (3), uma cópia móvel do T-DNA é gerada pelo complexo de proteínas VirD1 e VirD2 (4) e entregue pelo VirD2 no citoplasma da célula hospedeira o complexo de DNA (complexo fita-T) (5), sendo importado e integrado no genoma do hospedeiro (6, 7, 8). Fonte: Tzefira & Citovsky, (2006).....	31
3	Sistema binário: o vetor binário, contendo o gene de interesse entre as extremidades do T-DNA, se mantém em uma linhagem desarmada de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> de forma independente do plasmídeo Ti desarmado, cujos oncogenes foram eliminados e a região <i>vir</i> mantida. Fonte: Brasileiro & Lacorte, (1998).....	32

Figura		Página
4	Esquema generalizado das diferentes etapas de transformação de plantas por cocultura com uma linhagem desarmada de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> em embriões zigóticos imaturos de milho. Fonte: Laboratório de Biotecnologia Vegetal-UPF.....	40

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura		Página
1	Vetor binário padrão desenvolvido pela Iowa State University contendo a região do T-DNA do pTF102. Borda direita (LB); Borda esquerda (RB); <i>bar</i> , gene da fosfinotricina acetiltransferase; <i>gus-int</i> , gene da B-glucuronidase contendo um íntron; P35S promotor CaMV 35S; TEV, intensificador transcricional do vírus de tabaco etch translational; Tvsp, terminador da proteína de reserva vegetativa da soja; T35S, CaMV 35S terminator; H, <i>Hind</i> III. Fonte: Frame et al. (2002).....	57
2	Número de pontos azuis por embrião dos genótipos de milho submetidos a transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Barras indicam desvio padrão médio. FAMV, Passo Fundo, 2016.....	66

Figura		Página
3	Média do número de pontos azuis por embrião de milho submetidos a diferentes temperaturas de infecção com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Barras indicam desvio padrão médio. FAMV Passo Fundo, 2016.....	69
4	Aspecto dos embriões zigóticos imaturos infectados com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> após teste histoquímico de GUS evidenciando a área do escutelo, em torno do eixo embrionário corado de azul. FAMV Passo Fundo, 2016.....	72
5	Embriões submetidos ao teste histoquímico de Gus indicando a área onde o T-DNA foi inserido. A) tratamento 1: embriões expostos ao estresse físico; B) tratamento 2: embriões infectados sem aplicação de estresse; C) controle negativo: embriões não infectados com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . FAMV, Passo Fundo, 2016.....	75
6	Sobrevivência dos embriões no cultivo em meio de descanso 10 dias após a infecção A) tratamento 1: embriões expostos ao estresse antes da infecção; B) tratamento 2: embriões infectados sem aplicação de estresse. FAMV, Passo Fundo, 2015.....	77

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura		Página
1	Aspecto dos embriões imaturos do genótipo Hi-II submetidos ao Teste de GUS: A) Embriões do controle não infectado com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ; B) Embriões infectados com 0 μM de acetosiringona; C) Embriões infectados com 600 μM de acetosiringona. FAMV, Passo Fundo, 2015.....	96
2	Teste de GUS em embriões imaturos do genótipo BR 451 de milho A) Aspecto dos embriões do controle negativo não infectado com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ; B) Aspecto dos embriões infectados com 0 μM de acetosiringona; C) Embriões infectados com 600 μM de acetosiringona. FAMV, Passo Fundo, 2015.....	97
3	Aspecto dos embriões infectados e cocultivados em diferentes concentrações de acetosiringona na presença de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . A) 0 μM ; B) 100 μM ; C) 200 μM ; D) 400 μM ; E) 600 μM ; F) Aspecto dos embriões dentro de tubos Eppendorf. FAMV, Passo Fundo, 2015.....	100
4	Acréscimo da área corada de azul em embriões submetidos a diferentes concentrações de acetosiringona na infecção e cocultivo com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro. FAMV, Passo Fundo, 2016.....	101

**ESTRESSES DE TEMPERATURA E CONCENTRAÇÕES DE
ACETOSIRINGONA NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE
MILHO VIA *Agrobacterium tumefaciens***

TIAGO TEIXEIRA¹

RESUMO - Para estabelecer a técnica de transformação genética de plantas via *Agrobacterium tumefaciens*, um dos pontos críticos é ajustar os fatores que influenciam a transformação, tais como genótipo da planta e condições de infecção e cocultivo dos explantes, aplicando estratégias que possam aumentar as frequências de transferência do T-DNA como aplicação de estresses antes e durante a infecção dos explantes com a agrobactéria e ajuste da concentração de compostos fenólicos nos meios de infecção e cocultivo. Dessa forma, este trabalho objetivou adequar um protocolo de transformação genética de milho via *A. tumefaciens* para dois genótipos de milho. O primeiro capítulo deste trabalho avalia o efeito da submissão dos embriões imaturos do híbrido Hi-II e da variedade brasileira BR 451 a diferentes condições de infecção com a *A. tumefaciens* EHA101:pTF101, a qual carrega os genes *bar* e *uidA* sob controle do promotor CaMV35S. No primeiro experimento os embriões foram submetidos a diferentes temperaturas de infecção (43 °C e temperatura ambiente). No segundo experimento foi aplicado um estresse combinado (46 °C por 3 minutos, resfriamento em gelo por 1 minuto, centrifugação a 12.000 rpm a 4 °C por 10 minutos) antes da infecção com *A.*

¹ Biólogo, mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF,

tumefaciens. No segundo capítulo são descritos os experimentos referentes ao efeito de diferentes concentrações de acetosiringona no meio de infecção (experimento 1) e a suplementação das mesmas concentrações no meio de infecção e também no cocultivo (experimento 2). As concentrações utilizadas foram de 0 μM (controle), 100 μM , 200 μM , 400 μM e 600 μM . A frequência de transformação transiente foi avaliada através do teste histoquímico de GUS, o qual que evidencia a expressão do gene repórter uidA no tecido vegetal transformado. A frequência de transformação estável foi obtida através da expressão do gene marcador bar. Houve efeito positivo da alta temperatura no aumento da intensidade na expressão do gene repórter uidA. O estresse combinado aplicado antes da infecção gerou mortalidade de aproximadamente 50% dos embriões, reduzindo a eficiência de transformação do genótipo Hi-II. A acetosiringona é de extrema importância no cocultivo para a transferência do T-DNA. O genótipo Hi-II foi afetado pela concentração de AS aplicados somente na fase de infecção, enquanto o genótipo BR 451 não sofreu influência. A concentração de AS aplicada na infecção e no cocultivo influenciou a transformação transiente dos dois genótipos e a dose de 400 μM de AS mostrou-se mais eficiente para a transformação de embriões imaturos de milho dos genótipos Hi-II e BR451. A variedade BR 451 mostrou capacidade de ser transformada mesmo que com frequências inferiores ao híbrido Hi-II.

Palavras-chave: Engenharia genética, transformação genética transiente, transformação genética estável, Hi-II, BR 451, *Zea mays*

**TEMPERATURE STRESS AND ACETOSYRINGONE
CONCENTRATIONS IN MAIZE GENETIC
TRANSFORMATION BY *Agrobacterium tumefaciens***

TIAGO TEIXEIRA

ABSTRACT - To establish the technique of plant genetic transformation by *A. tumefaciens*, one of the critical points is to adjust the factors affecting the transformation, such as plant genotype and conditions of infection and co-culture of the explants by applying strategies that can increase the frequency of the T-DNA transference, such as the stress application before and during the explant infection with agrobacteria and adjustment of the phenolic compound concentration in the infection and co-culture media. Therefore, this work aimed at adjusting a protocol of genetic transformation by *A. tumefaciens* for two maize genotypes. The first chapter of this work evaluate the effect of different infection conditions applied to immature embryos of the Hi-II hybrid and the BR451 Brazilian variety with *A. tumefaciens* EHA101:pTF101, carrying the bar and uidA genes under control of CaMV35S promoter. In the first experiment the embryos were submitted to different temperatures of infection (43 °C and room temperature). In the second experiment was applied a combined stress (46 °C per 3 minutes, cooling in ice per 1 minute, centrifugation 12.000 rpm at 4°C per 10 minutes) before the infection with *A. tumefaciens*. In the second chapter are described the experiments referring to the effect of different concentration of acetosyringone in the infection medium (Assay 1) and the same

concentration supplemented in the infection and also in the co-culture media (Assay 2). The tested acetosyringone concentrations were: 0 μM (control), 100 μM , 200 μM , 400 μM and 600 μM . The transient transformation frequency was evaluated by the GUS histochemical assay, which shows the uidA report gene expression in the plant transformed tissue. The frequency of stable transformation was evaluated through the expression of the bar marker gene. There was positive effect of the high temperature in the intensity of the uidA reporter gene. Combined stress applied before the infection resulted in approximately 50% mortality of embryos, reducing the efficiency of transformation of the Hi-II genotype. Acetosyringone is of extreme importance in the co-culture for the transference of the T-DNA. The Hi-II genotype was affected by the concentration when applied only in infection phase, while genotype BR 451 was not influenced by that. The acetosyringone concentrations applied to the infection and co-culture media influenced the transient transformation of the two genotypes and the dose of 400 μM of revealed to be more efficient for the transient transformation of immature embryos of HiII and BR451maize of genotypes. The variety BR 451 showed capacity of being transformed, but in a lower frequency compared to the Hi-II hybrid.

Keywords: genetic engineering, transient genetic transformation, stable genetic transformation, Hi-II, BR 451, *Zea mays*.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais cultivados mundialmente, representando aproximadamente 30% dos grãos produzidos no mundo (IBGE, 2015). A área plantada em 2015/2016 no Brasil está estimada em 15,4 milhões de hectares representando 27% da área cultivada. A produção estimada para a safra é de 84,65 milhões de toneladas representando 40,51% da produção total de grãos do país. O Rio Grande do Sul ocupa o terceiro lugar na produção de milho do país com 15% da produção, ficando apenas atrás do estado do Paraná (17,9%) e Mato Grosso (24,4%) (CONAB, 2016).

O milho movimenta anualmente em torno de 40 bilhões de dólares (JAMES, 2014). Trata-se de uma das principais culturas cultivadas e consumidas no mundo, servindo de alimento tanto para o homem como para os animais, sendo uma das principais fontes energéticas para a alimentação e também um alimento básico para muitas populações (JAMES, 2010).

Novas variedades de milho vêm sendo produzidas a partir de técnicas de melhoramento, visando melhoria das características agronômicas, nutricionais, sanitárias e adaptação a diferentes ambientes e estresses ambientais. Os cenários desfavoráveis como escassez de água e terras agricultáveis, uma população em constante expansão, os estresses bióticos e abióticos, a grande demanda por qualidade e quantidade, são fatores que exercem pressão para uma resposta mais rápida do melhoramento genético (HUANG & WEI, 2004).

A biotecnologia juntamente com a engenharia genética é de suma importância para o desenvolvimento de cultivares com características melhoradas (HUANG & WEI, 2005). As técnicas de biotecnologia possibilitam aos melhoristas de plantas o acesso a maiores fontes de variabilidade genética para o desenvolvimento de novas cultivares com características agronômicas e nutricionais melhoradas. (HUANG & WEI, 2005; CARNEIRO et al., 2009).

Além de genes de tolerância a herbicidas e insetos, estão sendo transferidos para o milho novos genes que conferem tolerância à seca, frio, salinidade e alumínio, melhoria do valor nutricional e biofortificação, produção de diferentes compostos de valor industrial e biofarmacêutico, produção de etanol e indução da macho esterilidade (GIDDINGS et al., 2000; CARNEIRO et al., 2004; GRANDO et al., 2005; KIM et al., 2007; NELSON et al., 2007; RAMESSAR et al., 2008; POSSA et al., 2009; KIM et al., 2012.).

Plantas de milho geneticamente modificadas foram produzidas inicialmente pelo emprego da técnica de bombardeamento (GORDON-KAMM et al., 1990). Porém, a técnica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tem sido preferida para esse fim por ser uma alternativa mais eficiente, visto que este método permite a integração do gene exógeno em regiões transcricionalmente ativas do genoma, assim como a introdução de baixo número de cópias que serão integradas no genoma da planta com raros rearranjos (ISHIDA et al., 2007). Pesquisas têm demonstrado que a *A. tumefaciens* é capaz de, *in vitro*, infectar e transferir genes para diferentes genótipos de milho (FRAME et al., 2002; 2006; 2011; ISHIDA et al., 2007; OMER et al., 2013; QUE et al 2014, HIEI et al., 2014).

O protocolo clássico de transformação genética via *A. tumefaciens* é composto pela infecção, onde o explante é colocado em contato com a bactéria; seguida pela etapa de cocultivo dos explantes com a agrobactéria por 2 a 3 dias em meio sólido, eliminação de bactéria pela utilização de antibióticos específicos utilizados na fase de descanso e, por fim, a seleção dos tecidos transformados em meio de cultura contendo agentes seletivos seguido da regeneração de plantas. A utilização deste método de transferência de genes no milho exige algumas modificações e ajustes na metodologia em cada etapa da transformação de acordo com as condições de cada laboratório (FRAME et al., 2002; 2006; DANILOVA & DOLGIKH, 2004).

Diversos trabalhos têm sido realizados visando aperfeiçoar as condições de cultivo *in vitro* e adequar as estratégias de transformação, pois estas são fundamentais para obtenção de plantas de milho geneticamente modificadas. Tratamentos de estresses impostos ao explante têm demonstrado eficiente colaboração no aumento da eficiência de transformação em espécies monocotiledôneas (CHENG et al., 2004).

Tratamentos utilizados para induzir estresse nos explantes com o objetivo de melhorar a eficiência de transformação, como a elevação da temperatura antes ou durante a infecção dos embriões e o tratamento de estresse físico antes da infecção tem resultado no aumento da frequência de transformação em genótipos de milho (ISHIDA et al., 2007).

A utilização de compostos fenólicos adicionados ao meio de cultura tem como função intensificar a sinalização celular para a indução da expressão de genes *vir*, os quais estão presentes no

plasmídeo Ti da agrobactéria e são responsáveis pela excisão e transferência do T-DNA da bactéria para o genoma vegetal da célula hospedeira. As plantas dicotiledôneas, hospedeiros naturais da agrobactéria, produzem naturalmente compostos fenólicos liberadas de ferimentos mecânicos, os quais ativam região *vir* e conseqüentemente a transferência de genes. Em monocotiledôneas acredita-se que alguns sinais e/ou moléculas indutoras não são ativas de maneira suficiente, sendo assim a adição de fenólicos sintéticos como a acetosiringona (AS) são capazes de ativar os genes *vir* e aumentar a eficiência de transformação (STACHEL et al., 1995; McCULLEN & BINNS, 2006).

O uso de AS é observado na maioria dos protocolos de transformação genética. Porém, os níveis de concentração são variáveis e em milho não foram encontrados na literatura relatos de experimentos demonstrando qual a concentração adequada de AS deve ser utilizada, sendo que os protocolos atuais são baseados em outras culturas como trigo e arroz (MANFROI, 2014).

Outro fator que influencia a eficiência do processo de transformação é o genótipo, o qual está ligado principalmente a capacidade que o genótipo possui de interagir com a *A. tumefaciens*, além da capacidade de resposta *in vitro*. O híbrido americano Hi-II é o genótipo de milho mais utilizado mundialmente na transformação genética, pois possui alta capacidade de ser transformado pela *A. tumefaciens* e alta capacidade de regenerar plantas pelo processo de cultivo *in vitro* (ISHIDA et al., 2007).

Por outro lado, grupos de pesquisa buscam genótipos alternativo que sejam eficientes na transformação genética de milho e

que apresentem características agronômicas superiores ao Hi-II que possui pobres características agronomicas. A variedade brasileira de milho BR451 demonstra capacidade de transformação e regeneração de plantas *in vitro*, além de apresentar boas características agronômicas e alta concentração de proteínas. Porém há a necessidade de adaptação dos protocolos rotineiros para que este genótipo possa ser utilizado na produção de milho geneticamente modificado de forma mais eficiente (PETRILLO et al., 2008; SILVA, 2013; DIDONÉ, 2015).

Dessa forma, visando emprego da tecnologia de transformação genética em milho há necessidade de adaptar e otimizar a infecção de embriões imaturos de milho a partir do genótipo modelo Hi-II no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF, bem como avaliar o uso da variedade brasileira BR451 na transformação genética de milho. Nesse contexto, os objetivos específicos foram os seguintes:

a) Verificar se o estresse de alta temperatura durante a infecção de embriões zigóticos imaturos de milho do genótipo Hi-II e da variedade BR451 com *A. tumefaciens* proporciona melhorias nas frequências de transformação genética transiente e estável;

b) verificar se o tratamento com estresse físico antes da infecção de embriões de milho do genótipo Hi-II com *A. tumefaciens* afeta a sobrevivência dos embriões e as frequências de transformação genética transiente e estável;

c) verificar se diferentes concentrações de acetosiringona no meio de infecção e no meio de cocultivo de embriões imaturos de milho com *A. tumefaciens* altera a frequência de transformação transiente, avaliada pela expressão do gene repórter *uidA*.

d) verificar a capacidade de transformação genética da variedade BR 451 visando ser utilizada como genótipo alternativo ao híbrido Hi-II.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos botânicos e importância do Milho

O milho é uma gramínea da família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. É taxonomicamente identificado como *Zea mays* L. spp. *mays*, para distinguir do seu parente silvestre mais próximo, o teosinto (*Zea mexicana* L.), ambos com $2n = 2x = 20$ cromossomos (PATERNIANI & CAMPOS, 1999).

É nativo do México, e se originou a partir do teosinto (PATERNIANI & CAMPOS, 1999). Trata-se de uma planta herbácea, monóica com duas inflorescências independentes e diferentes, Por ser anual, completa seu ciclo em quatro a cinco meses (PONS & BRESOLIN, 1981). É alógama com praticamente 100% de reprodução cruzada (PATERNIANI & CAMPOS, 1999).

O milho é considerado uma das principais “commodities” agrícolas, visto que anualmente são cultivados cerca de 170 milhões de hectares, os quais contribuem para a produção de aproximadamente 900 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2015; USDA, 2014) movimentando um mercado de aproximadamente 40 bilhões de dólares anuais (JAMES, 2014). Também ganha importância devido a sua diversidade de aplicações que vai desde a alimentação humana a animal e é matéria-prima de diversificados complexos agroindustriais,

exercendo um importante papel social e econômico (HUANG & WEI, 2004).

No Brasil, em termos econômicos, o milho é uma das culturas mais importantes para a agricultura sendo que ocupa aproximadamente 27% da área dcultivada, em um cenário mundial de produção de milho o Brasil ocupa o terceiro lugar (13%) na produção mundial, atrás somente dos Estados Unidos (40%) e China (20%).

2.2 Melhoramento genético e plantas geneticamente modificadas de milho

O melhoramento genético vem produzindo genótipos de milho visando melhoria das características agronômicas, nutricionais, sanitárias, adaptação a diferentes ambientes e estresses bióticos e abióticos. Porém, a escassez de recursos naturais como água e terras agricultáveis, o crescente aumento da população, os estresses ambientais, a grande demanda por qualidade e produtividade são fatores que exigem rapidez na resposta do melhoramento genético (HUANG & WEI, 2004).

Na cultura do milho, a produção de plantas geneticamente modificadas tem possibilitado aos programas de melhoramento de plantas o acesso a novas fontes de variabilidade genética para o desenvolvimento de cultivares superiores. As barreiras reprodutivas que impedem a transferência de características desejadas para as plantas de interesse podem ser superadas pelas técnicas de biotecnologia, possibilitando assim a inserção de genes encontrado em

espécies distantes e até mesmo de reinos diferentes (CARNEIRO et al., 2004).

A produção de milho transgênico foi relatada pela primeira vez no início da década de 90 (GORDON-KAMM et al., 1990; FROMM et al., 1990; WALTERS et al., 1992). Desde então, genes cuja exploração através de métodos tradicionais de melhoramento é inviável, têm sido introduzidos via transformação genética (KOZIEL et al., ARMSTRONG et al. apud SANTOS-SEREJO & AGUIAR-PERECIN, 2000; FRAME et al., 2006, 2011; OMBORI et al., 2013).

A engenharia genética é útil na obtenção de plantas geneticamente modificadas com diferentes objetivos: alimentos mais nutritivos, estáveis ao armazenamento, mais saudáveis, com melhoramento da produção, tolerância a estresses bióticos e abióticos, possibilitando o uso de áreas marginais, redução do impacto ambiental, obtenção de fármacos e vacinas a partir de plantas transgênicas (VALOIS, 2001).

2.3 Métodos de transformação genética

As técnicas para obtenção de plantas transgênicas vêm sendo desenvolvidas e aperfeiçoadas ao longo dos anos. Alguns métodos já estão mais estabelecidos como por exemplo o método mediado pela *A. tumefaciens*, que é um eficiente vetor na engenharia genética de plantas, principalmente de dicotiledôneas. Outras técnicas de transferência de genes que podem ser aplicadas em dicotiledôneas e monocotiledôneas são conhecidos como métodos diretos de transformação, permitindo a introdução de DNA exógeno da célula

vegetal por meio de mecanismos químicos ou físicos, entre eles estão a eletroporação, a biobalística e a microinjeção (CARNEIRO et al., 2004).

2.4 Transformação de milho via *Agrobacterium tumefaciens*

As primeiras plantas férteis de milho geneticamente modificado foram produzidas utilizando o método de bombardeamento de genes (GORDON-KAMM et al., 1990), uma vez que até então as técnicas utilizando *A. tumefaciens* eram consideradas inviáveis para monocotiledôneas, pois estas não eram naturalmente infectados por este patógeno (ISHIDA et al., 2007).

As primeiras monocotiledôneas a receberem um transgene via *A. tumefaciens* foram obtidas por Hiei et al. (1994). Esses pesquisadores mostraram que isso era possível de modo altamente eficiente em arroz. Estudos posteriores mostraram a possibilidade de transformar com eficiência via *A. tumefaciens* culturas como o milho (ISHIDA et al., 1996), trigo (CHENG et al., 1997), cevada (TINGAY et al., 1997) e sorgo (ZHAO et al., 1998). O sucesso da transferência de genes em embriões imaturos zigóticos de milho mediado via *A. tumefaciens* foi posteriormente relatado por vários outros autores (LUPOTTO et al., 1998; ZHAO et al., 1998; ZHAO et al. 2001; FRAME et al., 2002; FRAME et al., 2006; VEGA et al., 2008; OMBORI, 2013).

A *A. tumefaciens* é uma bactéria de solo, capaz de naturalmente infectar, transferir e integrar parte do seu DNA o T-DNA, no genoma nuclear de células vegetais de maneira natural,

através de ferimentos presentes na planta que realizam a sinalização para a entrada da *A. tumefaciens* (SHEN et al., 1993).

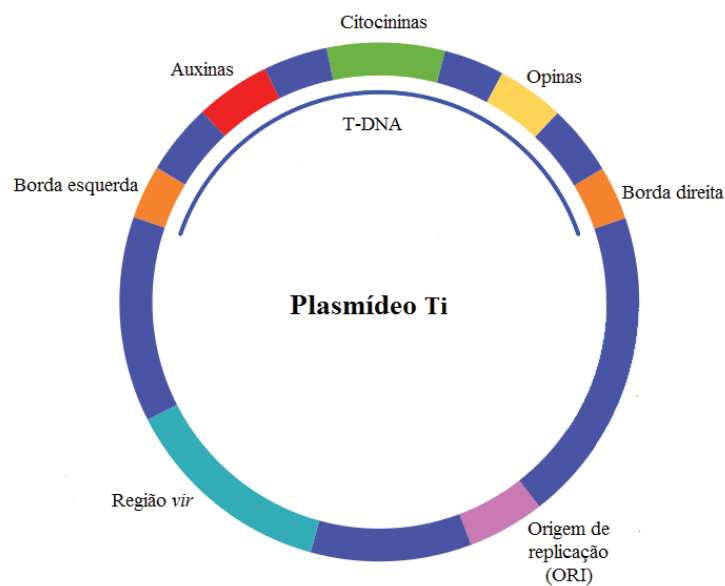


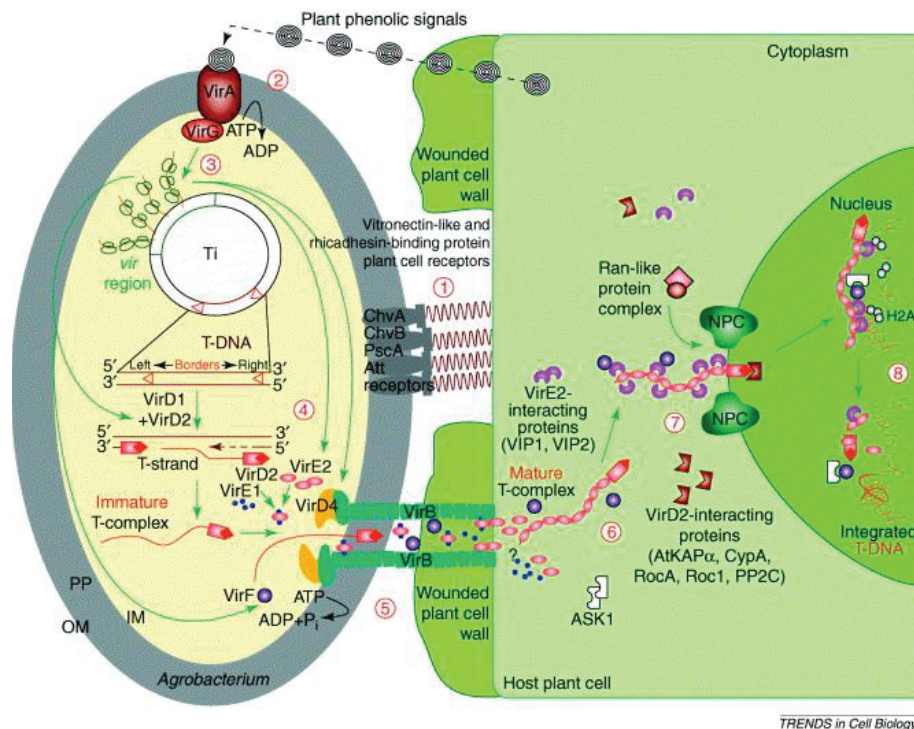
Figura 1. Mapa funcional de um plasmídeo Ti: T-DNA (segmento de DNA que é transferido para a célula vegetal); auxinas, citocininas e opinas (genes responsáveis pela indução do tumor e nutrição da bactéria na planta); bordas esquerda e direita (sinalização de onde ocorre o corte do T-DNA); região *vir* (genes responsáveis pelo corte e transferência do T-DNA); origem de replicação (funções ligadas a replicação, manutenção e estabilidade do plasmídeo Ti dentro da bactéria). Fonte: adaptado de ZHU et al., (2000).

Estudos indicam que a transformação do milho mediada por *A. tumefaciens* pode ser uma alternativa melhor do que a biobalística na inserção de transgenes em milho, sendo uma técnica que pode ser adotada como rotina para obtenção plantas de milho geneticamente modificadas (FRAME et al., 2002).

A. tumefaciens é portadora de um plasmídeo Ti (Figura 1) o qual contém genes que tornam a bactéria capaz de infectar células vegetais e causam um tumor conhecido como galha da coroa.

O mecanismo de transferência de T-DNA engloba uma série de genes de virulência (*vir*) do plasmídeo Ti que possui o T-DNA (Figura 2). Estes genes *vir* são induzidos por sinais químicos liberados por células injuriadas da planta (CHILTON, 1993).

O processo de infecção inicia-se pelo reconhecimento e fixação da bactéria ao tecido vegetal ferido. Compostos fenólicos e açúcares liberados pelo meio extracelular vegetal são reconhecidos pelo sistema de sensores VirA/VirG. Na sequência ocorre a ativação da região *vir* do plasmídeo Ti e ligação da bactéria com a célula hospedeira. A Fita-T (molécula de DNA linear fita simples obtida do T-DNA) é excisada a partir do T-DNA (fita dupla de DNA) pelas proteínas VirD1 e VirD2, e exportada, ligada com a proteína VirD2 para dentro do citoplasma da célula vegetal. Na célula hospedeira, a Fita-T ligada a VirD2 é empacotada por moléculas de VirE2 e importada pelo núcleo por um processo ativo realizado pela maquinaria da célula hospedeira. Uma vez no núcleo, a Fita-T é integrada no genoma por mecanismos ainda pouco conhecidos (TZFIRA & CITOVSKY, 2002; 2006).



TRENDS in Cell Biology

Figura 2. Ilustração esquemática da transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. O processo de transformação é constituído por nove grandes passos e começa com o reconhecimento e fixação das *Agrobacterium tumefaciens*, para as células do hospedeiro (1), a detecção de sinais específicos da planta é reconhecido pelos componentes de transdução de sinal VirA VirG da agrobactéria (2). Após a ativação dos genes da região *vir* (3), uma cópia móvel do T-DNA é gerada pelo complexo de proteínas VirD1 e VirD2 (4) e entregue pelo VirD2 no citoplasma da célula hospedeira o complexo de DNA (complexo fita-T) (5), sendo importado e integrado no genoma do hospedeiro (6, 7, 8). Fonte: Tzefira & Citovsky (2006).

Para utilizar o sistema natural de transferência de genes da agrobactéria para a transformação de plantas em laboratório são sintetizados vetores baseados no plasmídeo Ti. Para construção de um vetor são retirados os genes de indução de tumor e produção de opinas e adicionado os genes de interesse. Desta maneira a agrobactéria

insere o gene de interesse na célula vegetal utilizando o sistema natural da agrobacteria.

Devido ao seu grande tamanho (em torno de 200 kpb) o plasmídeo Ti é de difícil manuseio *in vitro*. Portanto, vetores alternativos contendo a região T integral ou parcial foram construídos a partir dos plasmídeos da agrobactéria. Estes vetores menores tem o tamanho aproximado de 10kb, podendo ser agrupado em vetores co-integrados e vetores binários (KLEE et al. apud SLUYS, 1999).

A Figura 3 ilustra a *A. tumefaciens* contendo o sistema de vetor binário, ou seja, contendo o plasmídeo Ti desarmado (somente a região *vir* que promove a transferência do T-DNA) e o plasmídeo adicional portando a região do T-DNA (DNA que será transferido para a planta).

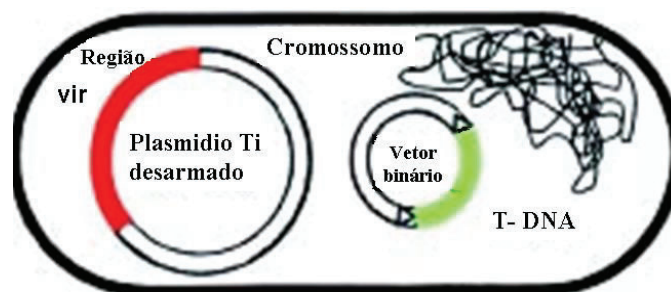


Figura 3. Sistema binário: o vetor binário, contendo o gene de interesse entre as extremidades do T-DNA, se mantém em uma linhagem desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* de forma independente do plasmídeo Ti desarmado, cujos oncogenes foram eliminados e a região *vir* mantida. Fonte: Brasileiro & Lacorte (1998).

Os métodos mais conhecidos para produzir milho transgênico são a biobalística e método mediado por *A. tumefaciens*. Pelo método de *A. tumefaciens* é possível introduzir baixo número de cópias dos transgenes nos cromossomos vegetais, geralmente uma ou duas (HIEI

et al., 1994; ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 1998; 2001; SHOU et al., 2004; RIBAS et al., 2006; ISHIDA et al., 2007). Isto é positivo pois a inserção de cópias em excesso de genes pode levar a uma instabilidade da expressão dos transgenes ou ainda ao silenciamento gênico devido aos rearranjos do DNA e as respostas de defesa da célula vegetal (KLAEPER et al., 2001; VEGA et al., 2008).

Outras vantagens da utilização de *A. tumefaciens* para produção de plantas geneticamente modificadas são o padrão de inserção simples, integração mais precisa, rearranjos raros e maiores níveis de expressão do transgene já que os genes são inseridos em regiões transcricionalmente mais ativas (ZHAO et al., 1998; SHOU et al., 2004; ZHANG et al., 2005; VEGA et al., 2008); segmentos relativamente grandes de T-DNA podem ser integrados no genoma da planta (> que 10KB) (HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 1998; ISHIDA et al., 2007), além disso os genes seguem padrão de herança mendeliana (ISHIDA et al., 1996; FRAME et al., 2002; SHOU et al., 2004; ISHIDA et al., 2007).

2.5 Fatores que afetam a transformação com *Agrobacterium tumefaciens*

Vários parâmetros incluindo estirpe de *A. tumefaciens*, genótipo de milho, explante, composição do meio de cultura e temperaturas empregadas em diferentes etapas do processo afetam a eficiência da transferência de T-DNA quando plasmídeos não superbinários são utilizados (KAEPLER et al., 2001). Além desses fatores, o pH dos meios, o tempo de cocultivo, concentração da

agrobactéria, estresses aplicados durante a infecção afetam a transferência de genes e sobrevivência dos tecidos vegetais ao longo do processo de transformação (FRAME et al., 2002; HUANG & WEI, 2005; ISHIDA, 2007). Isso demonstra a complexidade do processo e a quantidade de variáveis a serem ajustadas em um protocolo de transformação.

2.5.1 Efeito genotípico na transformação por *Agrobacterium tumefaciens*

A eficiência da transformação genética em milho via *A. tumefaciens* é fortemente influenciada pelo genótipo do explante receptor do gene. Esta influência está relacionada à resposta do material genético ao cultivo *in vitro* e à capacidade de interação do tecido com *A. tumefaciens* pois as células do explante do genótipo utilizado devem ter a capacidade de ser infectadas pela agrobactéria, receber o T-DNA e regenerar plantas transgênicas através da cultura de tecidos (SHRAWAT & LÖRZ, 2006).

O híbrido Hi-II, tem sido largamente utilizado para a transformação do milho em inúmeros laboratórios (LUPOTTO et al., 1998; ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; SHOU et al., 2004; VEGA et al., 2008, OMBORI et al., 2013; SILVA et al., 2013; DIDONÉ, 2015). A principal vantagem do híbrido Hi-II é sua alta capacidade de interação com agrobactéria, alta frequência de indução de calos embriogênicos tipo II, sendo este friável, com crescimento rápido e altamente embriogênico (ARMSTRONG & GREEN, 1985).

Além do híbrido Hi-II, a linhagem A188 que é um dos genitores do Hi-II tem sido utilizada para a transformação genética via *A. tumefaciens*, pois esta linhagem é bem adaptada a cultura de tecidos (ISHIDA et al., 1996, DANILOVA & DOLGIKH, 2004). Apesar de um número limitado de linhagens terem sido transformadas (HUANG & WEI, 2005), várias linhagens recalcitrantes cruzadas com A188 geraram híbridos que puderam ser transformados, por exemplo A188 × R91 (DANILOVA & DOLGIKH, 2004), W117 x A188, W59E x A188, A554 x A188, W153R x A188 e H99 x A188 (ISHIDA et al., 1996).

Os resultados de Ishida et al. (2007) evidenciam a diferença genotípica na eficiência de transformação de milho, variando de 51,7% no genótipo A188 a 7,9% no genótipo H99, utilizando o mesmo plasmídeo pSB131.

Alguns grupos de pesquisa têm utilizado genótipos incluindo variedades comerciais como alternativas ao híbrido Hi-II (FRAME et al., 2006; 2011; CARNEIRO et al., 2009; SILVA, 2013; DIDONÉ, 2015). A variedade de milho BR 451 da Embrapa Milho e Sorgo (GUIMARÃES et al., 2004) tem demonstrado ser uma alternativa de genótipo para a transformação genética de milho, devido a sua capacidade ser infectada por *A. tumefaciens*, produção de calos embriogênicos e regeneração de plantas *in vitro*, podendo ser uma alternativa brasileira ao híbrido americano Hi-II (SILVA, 2013). Outro fator de importância são as características agronômicas relevantes desta variedade pois a mesma apresenta precocidade, resistência ao acamamento e alta qualidade proteica, além de ter adaptação a diversas regiões do país (GUIMARÃES et al., 2004), o

que lhe confere vantagem sobre o híbrido Hi-II. No entanto, para a utilização de genótipos alternativos em transformação genética são necessários ajustes nos protocolos de transformação (PETRILLO et al., 2008; SILVA et al., 2013).

2.5.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são os principais sinalizadores para indução dos genes *vir* em agrobactéria. A identificação de fenóis com essa capacidade foi primeiramente demonstrada durante a análise de exsudatos de raízes e protoplastos de folhas, ao quais continham altos níveis de acetosiringona (STACHEL et al., 1985). A partir disso, fenóis sintéticos, como AS e hidroacetosiringona, foram sintetizados e demonstraram alta atividade de indução da região *vir* em testes realizados na ausência de plantas (McCULLEN & BINNS, 2006). Em espécies, dicotiledôneas a quantidade de compostos fenólicos produzidos pelas plantas é suficiente para induzir a região *vir*. No entanto, em espécies monocotiledôneas, a quantidade destes compostos pode ser insuficiente e a indução da região *vir* pode ser aumentada pela adição de AS nos meios de cultura (BRASILEIRO & DUSI, 1999).

Naturalmente, as plantas monocotiledôneas não são infectadas por *A. tumefaciens*. Em monocotiledôneas determinados sinais das moléculas indutoras da região *vir* na *A. tumefaciens* não são suficientemente ativas. Foi demonstrado que a indução da região *vir* com exsudatos de plantas dicotiledôneas ou substâncias sintéticas fenólicas, como a acetosiringona, aumentam a eficiência de

transformação em cereais (DEKEYSER et al., STACHEL apud DANILOVA & DOLGIKH, 2004). A maioria, se não a totalidade dos protocolos de transformação genética de monocotiledôneas, adiciona nos meios de cultura a AS, mesmo que em diferentes níveis (WU et al., 2003).

O efeito positivo da adição de acetosiringona no aumento da eficiência na transformação de algumas culturas de milho foi também demonstrada por Ishida et al. (1996), Sairam et al. (2003), Lupotto et al. (1998) e Wang et al. (2007).

2.5.3 Tratamentos de estresse físico na etapa de infecção

Tratamentos físicos aplicados aos explantes antes ou durante a etapa de infecção pode representar uma boa estratégia para promover a transferência de T-DNA para o genoma em explantes receptores. Embora a adição de elementos fenólicos nos meios de cultivo seja rotineiramente utilizada para induzir os genes *vir* e promover melhoria nas frequências de transformação, os ferimentos nos tecidos do explante podem levar à um aumento no número e distribuição de células com expressão do gene *uidA*, produzindo não apenas novos sítios de fixação de bactérias, mas também promovendo a indução da síntese endógena indutores de genes *vir* da bactéria (SANTARÉM, 2000).

Na transformação genética de milho, tratamentos físicos como bombardeamento, ultrassom, infiltração à vácuo, choque de temperatura e tratamentos de estresses combinados ou um pré-tratamento antes da infecção aplicados em embriões imaturos com a

agrobactéria promoveram maiores frequências de transformação transiente bem como a regeneração de plantas transgênicas (VALDEZ-ORTIZ & MEDINA-GODOY, 2007; ISHIDA et al., 2007).

Para algumas culturas, como cevada e trigo, o ferimento feito no embrião imaturo pode influenciar na transformação via *A. tumefaciens* e na geração de plantas transgênicas (WU et al., 2003). Entre os tratamentos físicos utilizados, a infiltração a vácuo pode ser uma alternativa visando o aumento da transformação via *A. tumefaciens* em inflorescências de trigo (AMOAHA et al., 2001). Esse tratamento também promoveu maior expressão transiente do gene *uidA* em embriões de milho (WANG et al., 2007).

Outro tratamento físico que pode ser utilizado na transformação via *A. tumefaciens* é uso de ultrassom ou SAAT (Sonication Assisted Agrobacterium Transformation). Trick & Finer (1997) utilizaram o ultrassom antes ou durante a infecção de embriões imaturos de milho e trigo pela agrobactéria, sendo que os pulsos variaram de dois a cem segundos utilizando a estirpe EHA105 com o plasmídeo pIG121Hm ou Vec035. O SAAT pode ser uma técnica alternativa de transformação, pois nos microferimentos gerados pelos pulsos do ultrassom, a agrobactéria pode atingir tecidos epidérmicos e subepidérmicos aumentando a frequência de transformação (SANTARÉM, 2000).

Outro tratamento físico que pode ser utilizado na etapa de infecção é a temperatura. A aplicação de alta temperatura (46 C por três minutos) durante o processo de infecção de embriões imaturos de milho com a *A. tumefaciens* demonstrou aumento na eficiência de

transformação quando comparado a infecção em temperatura ambiente (25 °C) (ISHIDA et al. 2007). Para Gurel et al. (2009) um tratamento com alta temperatura (37 °C por 3 min) em sorgo, demonstrou melhora na transformação genética.

2.6 Etapas da transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

A metodologia de transformação genética mediada por *A. tumefaciens* em milho, pode ser dividido em 5 etapas sequenciais: infecção e cocultivo do explante com a bactéria, descanso (eliminação da *A. tumefaciens* por antibióticos), seleção (seleção dos tecidos transformados em meio de cultura contendo agente seletivo) e finalmente a regeneração de plantas (Figura 4).

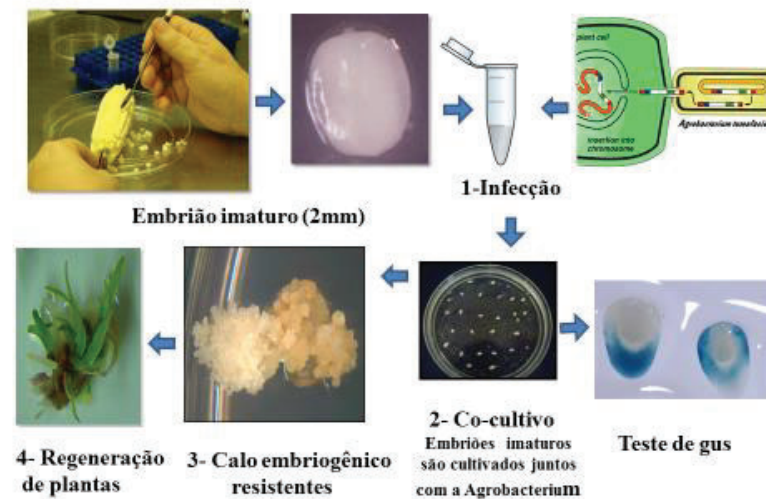


Figura 4. Esquema generalizado das diferentes etapas de transformação de plantas por cocultivação com uma linhagem desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* em embriões zigóticos imaturos de milho.

2.6.1 Etapa de infecção

Na etapa da infecção, os embriões zigóticos imaturos são colocados em contato com a estirpe desarmada de *A. tumefaciens*. O tempo de infecção pode variar de 5 a 20 minutos (ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; HUANG & WEI, 2005, FRAME et al., 2006; LEE et al., 2007; VEGA et al., 2008; OMBORI, 2013).

2.6.2 Período de cocultivo

Após a infecção, o explante é transferido para um meio de cultura semi-sólido sem a presença do agente seletivo para que ocorra a transferência do T-DNA da *A. tumefaciens* para a célula vegetal. Um

período de três dias de cocultivo tem sido utilizado para milho (ISHIDA et al.,1996; ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; SAIRAM et al., 2003; HUNG & WEI, 2005; FRAME et al., 2006; ISHIDA et al., 2007 e VEGA et al., 2008).

Além da extensão do período de cocultivo, a temperatura utilizada nesta fase tem influência na eficiência da transformação. Huang & Wei (2005) testaram diferentes temperaturas durante o período de cocultivo (19 a 28 °C) sendo que a temperatura mais adequada foi 22 °C, e níveis inferiores de expressão de GUS foram observados utilizandoas temperaturas de 19 e 28 °C. Outros autores utilizaram a temperatura de 25 °C durante esta etapa (ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 2001; ISHIDA et al., 2007; VEGA et al., 2008). Para Frame et al. (2011) a temperatura de 20 °C no período de cocultivo é utilizada como rotina nos ensaios de transformação genética de milho e tem demonstrado ser eficiente.

Outro fator a ser considerado é o pH. Huang & Wei (2005) testaram a influência do pH durante o período de cocultivo, sendo que o pH 5,4 produziu maior frequência de calos transformados resistentes a fosfotricina (PPT) comparados com os pHs (5,0; 5,2; 5,6; 5,8 e 6,0), verificaram ainda que a inclusão do surfactante Tween 20 teve efeito positivo sobre a expressão transitória do gene *uidA* e a produção de calos resistentes PPT. Já, Vega et al. (2008), que publicaram um protocolo otimizado para transformação de milho utilizaram pH 5,2 no meio de cocultivo. Outro protocolo publicado e que tem altas frequências de transformação usa pH 5,8 no meio de cocultivo, este protocolo também é utilizados por diversos centros de pesquisa que

trabalham com transformação genética de embriões de milho (FRAME et al., 2011).

2.6.3 Período de descanso

Após o cocultivo os explantes são transferidos para meio de descanso onde não são adicionados agentes seletivos, mas suplementados com antibióticos para eliminar a agrobactéria. Além disso, este período serve para a recuperação das células vegetais dos explantes que sofreram com a infecção da *A. tumefaciens*. Essa etapa varia de quatro a oito dias (ZHAO et al., 2001; ISHIDA et al. 2007; VEGA et al., 2008). Frame et al. (2011) que desenvolveram um protocolo padrão de muitas pesquisas de transformação genética de milho via *A. tumefaciens*, utilizam um período de sete dias de cocultivo, este tempo tem se mostrado eficiente na eliminação da agrobactéria e na recuperação dos tecidos infectados.

Nessa etapa a eliminação da agrobactéria deve ser realizada de forma eficiente. Geralmente, se utiliza os antibioticos carbenicilina ou, cefotaxima e vancomicina para este fim (HEI et al., 1994; LUPOTTO et al., 1998; ZHAO et al., 2001; SAIRAM et al., 2003; DANILOVA & DOLGIKH, 2004; FRAME et al., 2011).

2.6.4 Período de seleção

Os tecidos submetidos à transformação genética devem passar por um processo de seleção que permita que somente as células transformadas se multipliquem e deem origem a plantas modificadas

geneticamente. Para plantas monocotiledôneas geralmente tem-se utilizado o gene *bar* como marcador e o herbicida fosfinotricina (ppt) e glufosinato de amônio (Bialaphos®, Basta®) como agentes seletivos (FRAME et al., 2002, 2006 e 2011; LEE et al., 2007; VEGA et al., 2008).

2.7 Genes repórteres e marcadores

Durante o processo de otimização da transformação genética, são utilizados vetores que carregam um gene marcador de seleção e um gene repórter. Genes repórteres são genes que permitem a visualização do evento de transformação genética por expressarem uma enzima ou proteína detectável por testes específicos (CARNEIRO et al., 2004).

Genes utilizados como repórteres são os genes *lucA* da luciferase II (detectado com luminômetro), o gene *cat* da cloranfenicol acetinase (detectados com radioisótopos) e o gene *gfp* (green fluorescence protein) que foi isolado de *Aequorea victoria* e expressa uma proteína na cor verde fluorescente quando em contato com luz ultravioleta. Esse último permite uma análise não destrutiva, podendo ser visualizada em células vivas (BRASILEIRO & DUCI, 1999). No entanto, o gene mais amplamente usado é o gene *UidA* (*gus*) que foi isolado de *Escherichia coli* (JEFFERSON et al., 1987), pois, além de não necessitar de radioatividade e equipamentos específicos, ele apresenta vantagens como simplicidade, rapidez e versatilidade de métodos de detecção da atividade enzimática (LACORTE, 1998).

O gene *UidA* codifica para a enzima β -glucuronidase, que na presença de seu substrato X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide), produz um dímero de cor azul índico, facilitando a visualização das células que receberam o gene. A expressão do gene *uidA* pode ser detectada horas após o episódio de transformação sendo útil desta forma na determinação da frequência de transformação transiente.

O gene *uidA* é amplamente utilizado para monitorar experimentos de transformação em milho via agrobactéria sendo, explorada a interação direta ente *A. tumefaciens* e células de milho usando o gene da β -glucoronidase. Esse gene contém um íntron que, por impedir sua expressão em bactéria, representa a marcação de células vegetais transformadas (SHEN et al., 1993).

Para seleção de tecidos e plantas transformadas os genes marcadores são de extrema importância. Genes marcadores são genes que determinam resistência a antibióticos ou herbicidas, sendo que a seleção é realizada na presença dos agentes seletivos correspondentes (LACORTE, 1998).

O gene marcador *bar* (DEBLOCK et al., 1987) clonado de *Streptomyces hygroscopicus*, codifica para a fosfinotricina acetiltransferase (PAT), que confere resistência ao herbicida PPT (fosfinotricina), auxilia na seleção de calos transgênicos, pois somente os tecidos transformados sobrevivem quando cultivados em meio de cultura contendo o herbicida glufosinato de amônio (agente ativo fosfinotricina). Plantas completas são regeneradas a partir dos calos resistentes ao herbicida. Esse agente seletivo é aplicado nas folhas de plantas adultas para confirmação da resistência obtida na

transformação. Outro gene utilizado como marcador é o gene *nptII* (Neomicin fosfotransferase II) que confere resistência ao antibiótico canamicina e neomicina (BRASILEIRO & DUCI, 1999).

CAPÍTULO I

ESTRESSES FÍSICOS NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS IMATUROS DE GENÓTIPOS MILHO VIA *Agrobacterium tumefaciens*

TIAGO TEIXEIRA¹

RESUMO - A produção de plantas geneticamente modificadas representa um grande avanço para a agricultura, principalmente por ampliar a variabilidade genética disponível para o melhoramento. A metodologia mais utilizada para transformação genética de plantas é via *A. tumefaciens*. A utilização desse método de transferência de genes no milho exige algumas modificações e ajustes nas condições em cada etapa da transformação de acordo com as condições de cada laboratório. Alguns tratamentos de estresses impostos ao explante têm resultado no aumento da eficiência de transformação. Nesse contexto, este estudo teve como objetivos verificar se estresses impostos ao embrião durante e antes da infecção proporcionam melhora da frequência de transformação transiente, e verificar a capacidade da variedade BR 451 ser utilizada como genótipo alternativo ao híbrido de milho Hi-II. Embriões imaturos de dois genótipos de milho (Hi-II e BR 451) foram submetidos a diferentes condições infecção. No primeiro experimento os embriões foram submetidos a diferentes temperaturas de infecção (43°C e temperatura ambiente). No segundo

¹ Biólogo, mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF.

experimento foi aplicado um estresse (46°C por três minutos, resfriamento em gelo por 1 minuto, centrifugação a 20000g (12210 rpm) a 4°C por dez minutos) antes da infecção com *A. tumefaciens*. Os resultados demonstraram o efeito positivo da alta temperatura no aumento da intensidade na expressão do gene repórter uidA. Os estresses aplicados antes da infecção geraram mortalidade de aproximadamente 50% dos embriões, reduzindo a eficiência de transformação do genótipo Hi-II. A variedade BR 451 mostrou capacidade de ser transformada mesmo que com frequências inferiores ao híbrido Hi-II.

Palavras-chave: Choque de temperatura, genótipo alternativo BR 451, transformação transiente, frequência de transformação genética.

**PHYSICAL STRESSES IN THE GENETIC
TRANSFORMATION OF IMMATURE ZYGOTIC EMBRYOS
OF MAIZE GENOTYPES BY *Agrobacterium tumefaciens***

TIAGO TEIXEIRA

ABSTRACT - The production of genetically modified plants represents a great advancement for agriculture, mainly because of enlarging the available genetic variability for the crop breeding. The most used methodology for plant genetic transformation is the *A. tumefaciens* method. The use of this method for genes transfer in maize demands some modifications and adjustments in the conditions

at each transformation stage in accordance with the conditions of each laboratory. Some treatments of stresses imposed to the explant have been demonstrated increasing in the efficiency of transformation. In this context, this study aimed at verifying if stresses imposed to the embryo during and before the infection provide improvement in the frequency of transformation, and also verifying the capacity of BR 451 maize variety being used as alternative genotype to the Hi-II hybrid maize. Immature embryos of two maize genotypes (Hi-II and BR 451) were subjected to different conditions of infection. In the first experiment the embryos were subjected to different temperatures of infection (43°C and room temperature). In the second experiment there was stress (46°C for 3 minutes, cooling in ice for 1 minute, centrifugation to 20000g (12210 rpm) at 4°C for 10 minutes) before the infection with *A. tumefaciens*. The results demonstrated the positive effect of the high temperature in maize embryos, due to the increase of the intensity in the expression of the reporter gene uidA. The stress applied before the infection resulted in mortality of approximately 50% of the embryos, reducing the efficiency of transformation of the genotype Hi-II. The genotype BR 451 showed capacity of being transformed even with lower frequencies compared to the hybrid Hi-II.

Keywords: temperature shock, alternative genotype BR 451, transient transformation, genetic transformation frequency.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de milho (*Zea mays* L.) é de grande importância na produção mundial de grãos, sendo que 13% da área agricultável no mundo é ocupada com o cultivo desta espécie (USDA, 2014). O milho é uma das principais fontes de nutrientes para a alimentação humana e animal, sendo considerado a cultura de maior importância nos países industrializados e em muitos países em desenvolvimento (HUANG & WEI, 2005).

O melhoramento genético do milho vem sendo amplamente estudado. Aliadas ao melhoramento, as técnicas de biotecnologia e engenharia genética representam importante instrumento para aumentar a variabilidade genética disponível, uma vez que o fluxo gênico é independente de barreiras reprodutivas. Através das técnicas de biotecnologia foi possível identificar um grande número de genes passíveis de serem utilizados para a melhoria de características agrônomicas e nutricionais do milho (HUANG & WEI, 2005; CARNEIRO et al., 2009).

A primeira liberação de cultivar comercial de milho geneticamente modificado ocorreu na metade dos anos 90, onde estas plantas possuíam a característica de resistência a insetos graças a inserção do gene *cry* (*bt*). A partir deste evento o milho tem se tornado a espécie alvo mais importante da inovação biotecnológica, sendo a cultura que apresenta maior número de novos eventos de plantas geneticamente modificadas liberadas comercialmente (QUE et al., 2014).

Além de genes de tolerância a herbicidas e insetos estão sendo transferidos para o milho novos genes que conferem tolerância à seca, frio, salinidade e alumínio, melhoria do valor nutricional e biofortificação, produção de diferentes compostos de valor industrial e biofarmacêutico, produção de etanol e indução da macho esterilidade (GIDDINGS et al., 2000; CARNEIRO et al., 2004; GRANDO et al., 2005; MA et al., 2005; LAW et al., 2006; AL-ABED et al. 2007; KIM et al., 2007; NELSON et al., 2007; RAMESSAR et al., 2008; POSSA et al., 2009; KIM et al., 2012; ISAAA, 2014).

As primeiras plantas transgênicas férteis de milho, foram obtidas pelo método de bombardeamento de genes. Isto se deve ao fato de a obtenção de plantas transgênicas via *A. tumefaciens* ser de difícil manipulação, pois plantas monocotiledôneas não são hospedeiros naturais de *A. tumefaciens* (GORDON-KAMM et al., 1990).

Porém, vários grupos de pesquisa já demonstraram a possibilidade de produzir plantas geneticamente modificadas, de maneira eficiente, em diversas espécies monocotiledôneas mediados por *A. tumefaciens*. Estes grupos relatam que a transformação foi possível devido ao uso de linhagens bacterianas mais adequadas, uso de genótipos responsivos e explantes apropriados (HIEI et al., 2014). Entre os primeiros relatos da obtenção de plantas monocotiledôneas transgênicas viáveis obtidas pela transformação via *A. tumefaciens* estão o arroz (HIEI et al. 1994), milho (ISHIDA et al., 1996), trigo (CHENG et al., 1997), cevada (TINGAY et al., 1997), sorgo (ZHAO et al., 2000) e milheto (JHA et al., 2011).

Em milho, pesquisas com o aprimoramento das técnicas possibilitou que a *A. tumefaciens* fosse capaz de, *in vitro*, infectar e transferir genes para genótipos de milho por diferentes grupos de pesquisa (ISHIDA et al., 1996; 2007; FRAME et al. 2002, 2006, 2011; HUANG & WEI, 2005; VEGA et al., 2008; CARNEIRO et al., 2009; OMBORI 2013).

No Brasil o cultivo de milho transgênico corresponde a 83% do milho cultivado, sendo que todos os eventos transgênicos foram produzidos por grandes empresas multinacionais. Embora a Embrapa Milho e Sorgo realize e lidere as pesquisas com transformação genética de milho no país, já tendo relatado a produção de plantas transgênicas pelos métodos de biobalística e *A. tumefaciens* (CARNEIRO et al., 2000; 2009). O Brasil ainda não possui nenhum evento de milho transgênico liberado comercialmente.

O método de transformação por *A. tumefaciens* permite a integração do gene exógeno em regiões transcricionalmente ativas do genoma. Ocorre também a introdução de baixo número de cópias que serão integradas no genoma da planta com raros rearranjos favorecendo a transmissão e expressão do gene para a progênie (ISHIDA et al., 2007). Outra vantagem desta metodologia de transferência de genes é que fragmentos de DNA relativamente grandes podem ser transferidos para o genoma vegetal (ZHAO et al., 1998).

O protocolo clássico de transformação genética via *A. tumefaciens* é composto pela infecção, onde o explante é colocado em contato com a bactéria; seguida pela etapa de cocultivo dos explantes com *A. tumefaciens*; após ocorre a eliminação de *A. tumefaciens* por

antibióticos específicos na etapa de descanso e por fim a seleção dos tecidos transformados em meio de cultura contendo agentes seletivos seguido da regeneração de plantas. A utilização deste método transferência de genes no milho exige algumas modificações e ajustes na metodologia em cada etapa da transformação de acordo com as condições de cada laboratório (FRAME et al., 2002; 2006; DANILOVA & DOLGIKH, 2004).

Diversos trabalhos têm sido realizados no âmbito de otimizar as condições de cultivo *in vitro*, e adequar as estratégias de transformação pois estas são fundamentais para obtenção de plantas de milho geneticamente modificadas. Alguns parâmetros e etapas de protocolos vem sendo ajustados como, o período de crescimento da agrobactéria de três dias a 20 °C no escuro, a concentração bacteriana de OD₅₅₀=0,30 a 0,40, o tempo infecção de cinco minutos e temperatura de cocultivo de 20 °C (FRAME et al., 2011).

Outros trabalhos de ajustes foram realizados na fase de cocultivo como a utilização de baixas temperaturas no cocultivo (19 e 22 °C) que comparadas com 25 °C favoreceram a transformação (LEE et al., 2007) e também a redução da temperatura no cocultivo de 23 °C para 20 °C na presença do antioxidante L-cisteína (400 ml.L⁻¹), elevaram a frequência de transformação em milho (FRAME et al., 2002).

A utilização de tratamento de temperatura tem sido utilizado para induzir estresses físico e melhorar a eficiência de transformação durante a etapa de infecção. A aplicação de alta temperatura (46 °C por três minutos) durante o processo de infecção de embriões imaturos de milho com a *A. tumefaciens* demonstrou maior eficiência de

transformação quando comparado a infecção em temperatura ambiente (ISHIDA et al., 2007). Um tratamento similar aplicado em explantes de sorgo, demonstrou aumento na transformação genética quando submetidos a uma temperatura elevada de 37 °C por três minutos durante a infecção (GUREL et al., 2009).

A eficiência da transformação genética em milho via *A. tumefaciens* também é fortemente influenciada pelo genótipo que se está utilizando. Esta influência está relacionada às características de cultivo *in vitro* e a capacidade de interação com *A. tumefaciens* pois as células do explante do genótipo utilizado devem ter a propriedade de ser infectadas pela agrobactéria, receber o T-DNA e regenerar plantas transgênicas através do cultivo *in vitro* (SHRAWAT & LÖRZ, 2006).

O híbrido americano Hi-II, originado a partir das linhagens genitoras A188 e B73, têm sido amplamente utilizado e serve como modelo para a transformação do milho em inúmeros laboratórios (LUPOTTO et al., 1998; ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; 2006, 2011; CARVALHO et al., 2004; SHOU et al., 2004; VEGA et al., 2008, DENG et al., 2009). A principal vantagem do híbrido Hi-II é sua alta eficiência de ser infectado pela agrobactéria e frequência de indução de calos embriogênicos tipo II, que é o tipo de calo que melhor responde a regeneração de plantas *in vitro* (ARMSTRONG & GREEN, 1985; ARMSTRONG et al., 1991).

Alguns grupos de pesquisa têm utilizado genótipos comerciais como alternativas ao híbrido Hi-II (FRAME et al., 2006; 2011; CARNEIRO et al., 2009). A variedade de milho BR 451 da Embrapa Milho e Sorgo (GUIMARÃES et al., 2004) tem demonstrado ter capacidade de ser infectada por *A. tumefaciens*, produção de calos

embriogênicos e regeneração de plantas *in vitro*, podendo ser uma alternativa brasileira ao híbrido americano Hi-II (SILVA, 2013). Outras características relevantes desta variedade é que a mesma apresenta precocidade, resistência ao acamamento e alta qualidade proteica além de ter adaptação a diversas regiões do país (GUIMARÃES et al., 2004), o que lhe confere vantagem sobre o híbrido Hi-II que é conhecido por ter pobres características agronomicas. No entanto, para a utilização de genótipos alternativos em transformação genética são necessários ajustes nos protocolos de transformação (PETRILLO et al., 2008; SILVA et al., 2013).

Dessa forma os objetivos desse trabalho foram:

- a) verificar se o estresse de alta temperatura durante a infecção de embriões de milho do genótipo Hi-II e da variedade BR451 com *A. tumefaciens* proporcionam melhora nas frequências de transformação genética transiente e estável;
- b) verificar se o tratamento com estresse físico antes da infecção de embriões de milho do genótipo Hi-II com *A. tumefaciens* afetam a sobrevivência dos embriões e as frequências de transformação genética transiente e estável;
- c) verificar a capacidade de transformação genética da variedade BR 451 para ser utilizada como genótipo alternativo ao híbrido Hi-II.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

Os experimentos foram desenvolvidos no telado, casa de vegetação e Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo – RS, no período de março de 2013 a dezembro de 2015.

2.2 Material vegetal

Para a realização dos experimentos foram utilizados dois genótipos de milho, o híbrido Hi-II e a variedade de polinização aberta BR 451 (Tabela 1). O híbrido foi obtido através do cruzamento entre linhagens puras A188 e B73.

Tabela 1 - Origem dos genótipos de milho utilizados nos experimentos FAMV Passo Fundo, 2015.

Genótipo	Origem
Híbrido Hi-II (A 188 x B 73)	Universidade de Minnessota - EUA
Variedade BR 451	Embrapa Milho e Sorgo - Brasil

2.3 Obtenção dos explantes

Os explantes utilizados nos experimentos foram embriões zigóticos imaturos, obtidos a partir das sementes fl do híbrido Hi-II cultivadas no telado e autopolinizadas de maneira controlada.

As espigas foram coletadas em torno de 10 a 12 dias após a polinização. Foi realizada a assepsia das espigas com álcool 70%

durante 5 minutos e hipoclorito de sodio 1% (água sanitária comercial 50%) durante 20 minutos, seguido de três lavagens com água destilada esterilizada. Posteriormente, sob ambiente asséptico, os embriões imaturos (1,8 a 2,0mm de comprimento) foram retirados das espigas com auxílio de espátula esterilizada.

2.4 Estirpe da agrobactéria, plasmídeo e cultivo bacteriano

Foi utilizada a estirpe desarmada de *A. tumefaciens* EHA 101 contendo o plasmídeo binário padrão pTF102 (Figura 1), cedido pela Dra. Kan Wang da “Iowa State University” mediante acordo de transferência de material. Este vetor plasmidial contém dois genes: o gene marcador *bar* e o gene repórter *uidA* (*gus*), ambos sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S. O gene repórter *uidA* é utilizado para acessar a eficiência de transformação transiente pelo teste histoquímico de GUS para detecção da cor azul, mediante reação enzimática e contém um íntron para evitar sua expressão em bactérias. O gene *bar* confere resistência ao herbicida Bialaphos® (fosfínotricina) é utilizado para a seleção dos tecidos transformados, mediante utilização de agentes seletivos em meio de cultura.

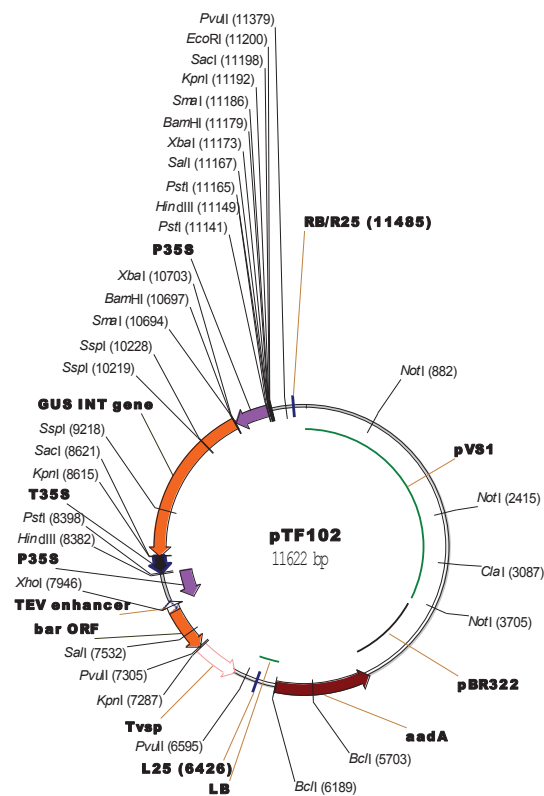


Figura 1. Vetor binário padrão desenvolvido pela Iowa State University contendo a região do T-DNA do pTF102. Borda direita (LB); Borda esquerda (RB); *bar*, gene da fosfinotricina acetiltransferase; *gus-int*, gene da B-glucuronidase contendo um íntron; P35S promotor CaMV 35S; TEV, intensificador transcricional do vírus de tabaco etch translational; Tvsp, terminador da proteína de reserva vegetativa da soja; T35S, CaMV 35S terminator; H, *Hind* III. Fonte: Frame et al. (2002).

As bactérias contendo o plasmídeo foram obtidas de estoque de glicerol 50% e cultivadas durante 2 dias a 28 °C em uma placa de Petri contendo o meio YEP sólido (Tabela 2) suplementado com os seguintes antibióticos: 100 mg. L⁻¹ de espectinomicina e 50 g.L⁻¹ de

canamicina, sendo esta considerada a placa mãe. Colônias obtidas desta placa mãe foram inoculadas em outra placa de Petri suplementada com os mesmos antibióticos e adição 100 μ M de acetosiringona, sendo cultivadas por três dias a 19 °C. Duas alças de platina carregadas com esta cultura foram suspendidas em 5mL de meio de infecção (meio InfAS, Tabela 2) suplementado com 100 μ M de acetosiringona. As bactérias foram incubadas em um agitador horizontal em uma plataforma a 100 rpm em temperatura ambiente (25°C) por 2 horas, para ativação do TDNA. Foi realizado o ajuste da concentração bacteriana através da leitura ótica mediante uso de espectrofotômetro. A concentração foi ajustada adicionando o meio de infecção até que a OD atingisse de 0,3 a 0,4 (FRAME et al., 2011).

2.5 Etapas da transformação genética

O processo de transformação genética seguiu o protocolo proposto por Frame et al. (2011). O protocolo foi constituído de quatro etapas sequenciais: infecção, cocultivo, descanso e seleção. Em cada etapa do protocolo são utilizados diferentes meios de culturas. Na tabela 2 constam os meios de cultura utilizados em cada etapa da transformação, bem como os meios utilizados para o cultivo da bactéria.

Tabela 2 - Composição dos meios utilizados para o crescimento das bactérias, cultura de tecidos e transformação das plantas FAMV, Passo Fundo, 2015

Cultura de bactérias	
YEP	10 g.L ⁻¹ de peptona, 5 g. L ⁻¹ de NaCl, 10 g. L ⁻¹ de extrato de levedura, 8,0 g.L ⁻¹ de ágar, pH 7,0.
Infecção	
Inf	Sais N6 (CHU et al., 1975); vitaminas N6 (0,5 mg. L ⁻¹ de tiamina HCl, 2 mg. L ⁻¹ de glicina, 0,5 mg. L ⁻¹ de piridoxina HCL, 0,5 mg. L ⁻¹ de ácido nicotínico; 100 mg. L ⁻¹ de caseína hidrolisada; 0,7 g.L ⁻¹ de L-prolina; 2,0 mg. L ⁻¹ de 2,4D; 68,5 g.L ⁻¹ de sacarose, 36 g.L ⁻¹ de glicose, pH 5,2.
InfAS	Meio Inf suplementado com 100 µM acetosiringona.
Cocultivo	
CM	InfAS sem glicose; sacarose reduzida para 30 g.L ⁻¹ e adicionado de 0,5 g.L ⁻¹ de MES; 10 µM nitrato de prata; 8,0 g.L ⁻¹ de Agar; pH 5,8.
Descanso	
DM	CM sem acetosiringona adicionado de 100 mg. L ⁻¹ cefotaxima e 100 mg. L ⁻¹ de vancomicina, pH 5,8.
Seleção	
SM	CM sem acetosiringona suplementado com 100 mg. L ⁻¹ de cefotaxima; 100 mg. L ⁻¹ vancomicina e 1,5 mg. L ⁻¹ de fosfotricina (Bialaphos®).
SM2	Mesmo do SM, suplementado com 3 mg. L ⁻¹ de fosfotricina (Bialaphos®).

2.5.1 Etapa de infecção

Na etapa da infecção, os embriões foram colocados em contato com a estirpe desarmada de *A. tumefaciens* EHA 101 contendo o

plasmídeo binário PTF102 que possui o gene marcador *bar* e gene repórter *uidA*.

Dois experimentos foram realizados na etapa de infecção. O experimento I foi composto de dois tratamentos: T1- aplicação de estresse de temperatura elevada 43 °C durante a infecção dos explantes por 5 minutos, e T2- explantes submetidos a infecção em temperatura ambiente (25 °C) por 5 minutos. Os tratamentos foram aplicados para os dois genótipos (híbrido Hi-II e variedade BR451).

O experimento II foi composto por dois tratamentos de infecção com *A. tumefaciens*: T1- pré tratamento dos explantes, composto pelos seguintes procedimentos 46 °C por 3 min, seguido pelo resfriamento em gelo por 1 min, centrifugação a 20,000g a 4 °C por 10 min conforme descrito por Ishida et al. (2007) seguido de infecção por 5 minutos em temperatura ambiente e T2 - infecção por 5 minutos a temperatura ambiente (25 °C) (FRAME et al., 2011). Os tratamentos foram realizados apenas para o genótipo Hi-II.

2.5.2 Etapa de cocultivo

Após a infecção os explantes foram cocultivados com a *A. tumefaciens* durante três dias, a 20 °C no escuro. Nessa etapa foi avaliado a frequência de transformação transiente de cada tratamento empregando o teste histoquímico para o gene *uidA*. A expressão do gene *uidA* nos tecidos transgênicos foi detectada pela observação de sua expressão através do teste histoquímico para β -glucuronidase (GUS – enzima codificada pelo gene *uidA*). Essa proteína com função enzimática, na presença do substrato X-gluc, produz um dímero de cor

azul índigo que possibilita a visualização e a contagem dos eventos de transformação. O teste foi realizado de acordo com o protocolo de Jefferson et al. (1987).

Para tal, cinco dias após a infecção, uma amostra de 10 embriões de cada uma das 15 repetições foi incubada em solução X-gluc por 16 horas a 37 °C. Após a incubação foram realizadas análises onde foram avaliados dois parâmetros para estimar o nível de transformação transiente: frequência de embriões Gus positivos (embriões que apresentavam pontos azuis) e número de pontos azuis ou percentagem da área corada pelo teste histoquímico por embrião. A percentagem da área azul foi obtida através de fotografia em estéreo microscópio Zeiss Dtemi DV 4, que foram medidas no software Zen 2 Blue Edition.

2.5.3 Etapa de descanso

Os embriões foram transferidos para a etapa de descanso (meio DM tabela 2) suplementado com 100 mg. L⁻¹ de cefotaxima e 100 mg.L⁻¹ de vancomicina para eliminação da *A. tumefaciens*. As placas de Petri foram vedadas com fita porosa e mantidas no escuro a 28 °C durante sete dias.

2.5.4 Etapa de seleção

Após o período de descanso, os explantes passaram para a etapa de seleção de calos resistentes ao herbicida Bialaphos. Estas

culturas foram transferidas para os meios de seleção SM (Tabela 2) e mantidas por três semanas no escuro a 28 °C. Posteriormente as culturas foram transferidas para o meio SM2 (Tabela2) por aproximadamente quatro meses, sendo subcultivadas a cada três semanas para renovação do meio nutritivo, até a obtenção de calos embriogênicos resistentes ao herbicida Bialaphos®.

A frequência de calos resistente ao herbicida foi acessada pelo número de calos resistentes ao Bialaphos obtidos no final do período de seleção (cinco meses após a transformação) em relação ao número total de explantes inoculados.

2.6 Delineamento experimental e análise estatística

Experimento 1: o delineamento experimental foi completamente casualizado, com 15 repetições para o híbrido Hi-II e para a variedade BR451. A repetição constou de uma placa de Petri contendo 30 embriões. Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA em sistema fatorial (2 genótipos x 2 tratamentos de infecção) seguido do teste de comparação de medias de Duncan a 5% de probabilidade de erro. Os dados da variável porcentagem de calos embriogênicos foram transformados pelo fórmula de arco seno ($=\text{ASEN}(\sqrt{((\text{VALOR} + 0,5) / 100)}) * 57,2958$).

Experimento 2: o delineamento experimental foi completamente casualizado, com 12 repetições para o híbrido Hi-II. As unidades experimentais foram uma placa de Petri contendo trinta embriões. Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA seguido do

teste de comparação de médias de Duncan a 5% de probabilidade de erro. Os dados das variáveis área do embrião corada, sobrevivência dos embriões e porcentagem de calos resistentes foram transformados pelo método de arco seno ($=\text{ASEN} (\sqrt{ ((\text{VALOR} + 0,5) / 100))} * 57,2958)$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento 1

Visando investigar o efeito do tratamento de temperatura durante a infecção de embriões imaturos de dois genótipos de milho com agrobactéria foi avaliada a frequência de transformação transiente do gene *uidA* e a formação de calos resistentes ao agente seletivo. Não foi observado interação significativa entre os fatores analisados (genótipo x temperatura de infecção) para nenhuma das variáveis observadas.

Os pontos azuis encontrados nos embriões representam o local onde o gene repórter foi inserido no embrião. A contabilização destes pontos representa uma maneira de medir a transformação transiente obtida.

Os embriões dos diferentes genótipos expostos a diferentes condições de infecção não apresentaram diferença significativa em relação a frequência de embriões que apresentaram pontos azuis. Em média 97% dos embriões apresentaram pontos azuis sendo que este índice variou de 93,3 a 100% (Tabela 3). Índices assim podem ser considerados altos e satisfatórios. Trabalhos anteriores realizados no

Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Passo Fundo obtiveram índices em torno de 25% (DIDONE, 2015) e 31% (SILVA, 2013), quando submetidos as condições de temperatura ambiente durante a infecção dos embriões.

Tabela 3 – Expressão transiente do gene *uidA* em embriões imaturos de milho e frequência de calos resistentes a hebicida de dois genótipos submetidos a diferentes condições de infecção com agrobactéria. FAMV, Passo Fundo, 2016

Genótipo	Tratamento	Embriões com pontos azuis (%)	Nº pontos/embrião	Calos resistentes (%)
Hi-II	TA	93,3	13,0	3,7
	43°C	94,7	14,2	3,8
Média		94	13,6	3,75
BR 451	TA	100	7,5	2,3
	43°C	100	12,7	1,7
Media		100	10,1	2,0
Média geral		97	11,9	2,9
C. V.		8,77%	50,31%	58,39%

TA= temperatura ambiente (25 °C)

Embora não tenha sido observado diferença na frequência de embriões GUS positivo, o número de pontos por embrião foi influenciado tanto pelo genótipo quanto pela temperatura de infecção, não sendo observada interação entre estes fatores (Tabela 4).

Tabela 4: Valores de P obtidos pelo F teste para as variáveis analisadas. FAMV, Passo Fundo, 2016

Fonte de variação	Valores de P		
	Embriões com pontos azuis (%)	Nº pontos/embrião	Calos resistentes (%)
Genótipo	0,0712 ^{ns}	0,0275*	0,0623 ^{ns}
Temperatura	1,0 ^{ns}	0,0440*	0,8643 ^{ns}
Interação	0,5423 ^{ns}	0,1876 ^{ns}	0,7211 ^{ns}
C.V.%	8,77%	50,31%	58,39%

^{ns} Não significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste de ANOVA

*Significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste de ANOVA.

A frequência de embriões que apresentam pontos azuis é uma medida que representa a percentagem de transformação transiente, e prova da ocorrência da transferência do T-DNA da *A. tumefaciens* para as células do embrião de milho. O número médio de pontos azuis encontrados no embrião representa a intensidade da transformação genética transiente. Cada ponto é considerado um sitio de inserção do T-DNA da agrobactéria no embrião. Nesse contexto, torna-se uma variável que melhor representa a expressão da transformação transiente (JEFFERSON et al., 1987).

O genótipo Hi-II foi mais responsivo a transformação genética quando não levamos em conta a temperatura em que foi realizada a infecção com *A. tumefaciens* visto que a expressão transiente revelada pelo teste histoquímico de Gus mostra que o híbrido Hi-II apresentou média de número de pontos maior que a variedade BR451 (Figura 2).

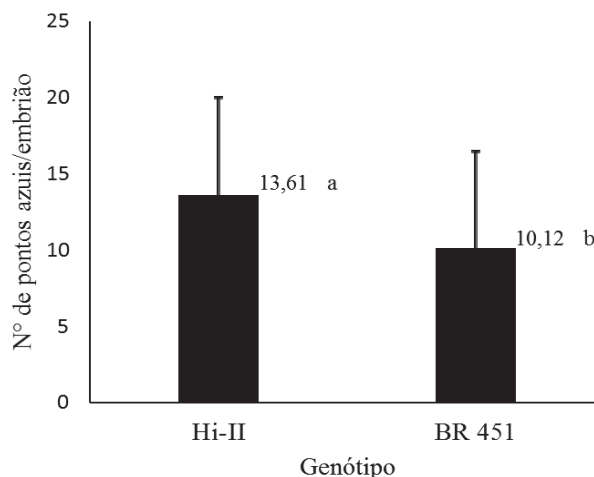


Figura 2. Número de pontos azuis por embrião dos genótipos de milho submetidos a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Barras indicam desvio padrão médio. FAMV, Passo Fundo, 2016.

A influência do genótipo quanto à eficiência de transformação de milho está relacionada principalmente às características do explante interagir com a *A. tumefaciens* pois as células do explante utilizado devem ter a propriedade de ser infectadas pela agrobactéria, receber o T-DNA, integralizar o T-DNA no genoma da célula vegetal para somente assim regenerar plantas transgênicas através do cultivo *in vitro* (SHRAWAT & LÖRZ, 2006).

O híbrido Hi-II, obtido das linhagens A188 e B73, têm sido largamente utilizados para a transformação do milho em inúmeros laboratórios (LUPOTTO et al., 1998; ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; 2006, 2011; SHOU et al., 2004; VEGA et al., 2008, DENG et al., 2009). A principal vantagem do híbrido Hi-II é sua alta frequência de indução de calos embriogênicos do tipo II (ARMSTRONG & GREEN, 1985; ARMSTRONG et al., 1991). A

alta eficiência de transformação em Hi-II tem acelerado a pesquisa da biotecnologia vegetal e produção comercial de plantas transformadas de milho.

No Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF, o híbrido Hi-II tem se destacado apresentando frequências de transformação melhores que outros genótipos, incluindo a variedade BR 451. O genótipo Hi-II obteve o dobro de embriões Gus positivo (34%) quando comparado com a com a variedade BR451 (12,7%), assim como o número de pontos azuis encontrados nos embriões foi superior no genótipo Hi-II (9,3 pontos por embrião) do que o BR 451 (3,7 pontos por embrião) (SILVA, 2013). A frequência de transformação transiente de embriões do genótipo BR 451 (43,3%) também foi menor quando comparado ao observado para o Hi-II (71,8%). O número de pontos de transformação também foi menor para o BR 451 (11,7%) quando comparado ao Hi-II (14,6%) (DIDONE, 2015).

A influência do genótipo na capacidade de transformação com a *A. tumefaciens* tem sido abordada pela literatura como sendo a principal limitação para produção de plantas geneticamente modificadas pelo método via *A. tumefaciens* (HUANG & WEI, 2005; FRAME et al., 2011; OMER et al., 2013; HIEI et al., 2013). A diferença genotípica pode ser explicada pela compatibilidade entre o genótipo e a bactéria empregada na transformação (OMBORI et al., 2013).

O processo de transformação via *A. tumefaciens* depende de diversos fatores como sinais moleculares e químicos que fazem o reconhecimento entre a célula vegetal pela *A. tumefaciens*. A capacidade que a célula vegetal tem de produzir estes sinais influencia

no potencial que a estirpe da agrobactéria tem de infectar e transferir o T-DNA para a célula hospedeira (MCCULLEN & BINNS, 2006). A sinalização molecular e química que permite que a agrobactéria infecte e insira o T-DNA no genoma da célula hospedeira é regulada pelo ligamento e desligamento de genes, sendo fortemente influenciado pelo genótipo da planta (TZFIRA et al., 2004).

Segundo Ombori et al. (2013), a sensibilidade de células de vegetais a linhagens bacterianas é atribuída a diferenças na sua conexão com a célula vegetal ou ainda na maquinaria de transferência do T-DNA codificado pela bactéria ou célula vegetal (OMBORI et al., 2013).

Utilizar genótipos alternativos ao híbrido Hi-II e que possuem características de interesse agrônomico e que sejam responsivos a transformação genética e regeneração de plantas seria um passo importante para o uso desta tecnologia em milho (ISHIDA et al., 2007). A variedade BR 451 apresenta capacidade de resposta *in vitro* (CARVALHO et al., 1997) podendo ser uma alternativa viável ao híbrido americano Hi-II. Agronomicamente essa variedade apresenta precocidade, resistência ao acamamento, alta qualidade proteica e adaptação a diversas regiões do país (GUIMARÃES et al., 2004).

Quando leva-se em conta apenas a temperatura de infecção, sem considerar o genótipo como um fator, pode-se observar diferença entre os tratamentos adotados no número de pontos azuis por embrião. A infecção realizada na temperatura de 43°C induziu um acréscimo no número de pontos azuis por embrião se confrontado com a infecção realizada em temperatura ambiente (Figura 3).

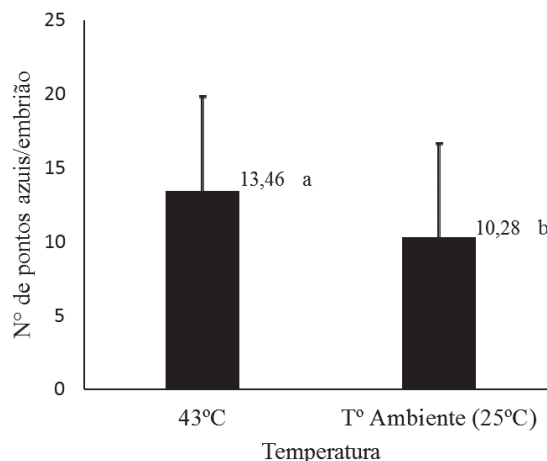


Figura 3. Média do número de pontos azuis por embrião de milho submetidos a diferentes temperaturas de infecção com *Agrobacterium tumefaciens*. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Barras indicam desvio padrão médio. FAMV, Passo Fundo, 2016.

A temperatura de 43 °C usada durante a etapa de infecção dos embriões induziu maior intensidade da transformação transiente obtida da expressão do gene *uidA*. Houve aumento no número de sítios encontrados no embrião. Este aumento demonstra o efeito positivo da alta temperatura na transformação genética durante a infecção.

Ishida et al. (2007) obtiveram sucesso no emprego de alta temperatura (46 °C por 3 min) durante a infecção de embriões imaturos de milho, as frequências de transformação passaram de 5% para 50% de calos que originaram plantas transgênicas, para a linhagem A188, para as linhagens H99, W177 e A634, que eram recalcitrantes à transformação passaram a ter frequência de transformação de 10%, 20% e 20% respectivamente. O choque de temperatura durante a infecção (37 °C por três minutos) também gerou resultados positivos na transformação de embriões imaturos de sorgo,

elevando a frequência de transformação de 2,6 para 7,6. (GUREL et al., 2009). Embora estes autores avaliaram a frequência de calos embriogênicos que produziram plantas transgênicas, nossos resultados, obtidos a partir da transformação transiente, são um indicativo de como será a transformação estável em nossos experimentos.

Efeito da alta temperatura na infecção de embriões de milho do genótipo Hi-II foi relatado por Silva (2013). A frequência de transformação transiente foi melhorada quando os embriões foram submetidos a uma temperatura de 40 °C durante a infecção. Dos embriões infectados sobre a alta temperatura 50% apresentaram pontos azuis, enquanto que aqueles infectados a temperatura ambiente apenas 31% foram Gus positivos. O mesmo aconteceu para o número de pontos azuis por embrião que passou de sete quando infectados a temperatura ambiente, para 15 pontos por embrião com o uso de alta temperatura.

Tratamentos que causam algum estresse no explante inicial podem facilitar a transferência do T-DNA da *A. tumefaciens* para o genoma vegetal por favorecer interação bactéria/célula vegetal (ISHIDA et al., 1996; DANILOVA & DOLGIKH, 2004; ISHIDA et al., 2007; VALDEZ-ORTIZ et al., 2007; WANG et al., 2007; GUREL et al., 2009). A alta temperatura pode favorecer o processo de transformação, por tornar a parede celular mais permeável, permitindo uma melhor aderência da *A. tumefaciens* na célula vegetal e facilitando a transferência do T-DNA (ISHIDA et al., 2007). Outra explicação possível se deve ao fato de que a infecção por agrobactéria induz a expressão de genes da planta necessários para a transformação

e ao mesmo tempo, reprime genes de resposta de defesa do hospedeiro (HWANG & GELVIN, 2004). Estresses de alta temperatura poderiam reduzir a resposta de defesa do tecido vegetal à infecção bacteriana ou ainda estimular a expressão de genes para proteínas que auxiliam na ativação da região *vir* da bactéria tornando-a mais apta a realizar a transformação genética (VEENA et al., 2003).

Vários genes de virulência já foram identificados como envolvidos nas diferentes fases do processo de interação da *A. tumefaciens* e a planta. As funções desses genes de virulência da bactéria em maior parte já têm suas funções bem caracterizadas, porém o papel que as proteínas do hospedeiro exercem na infecção da agrobactéria são praticamente desconhecidas (TZFIRA & CITOVSKY, 2002).

O processo de transformação genética compreende oito etapas distintas: (1) sinais fenólicos específicos dos hospedeiros são reconhecidos pela *A. tumefaciens* mediadas por receptores específicos (VirA) (2) sinais específicos (VirG) detectam o reconhecimento dos sinais da planta (VirA). (3) VirG mediada por transdução de sinal ativa genes *Vir*; (4) corte do T-DNA; (5) geração do complexo transportador VirB - VirD4, e transporte de T-DNA e proteínas Vir para o citoplasma da célula hospedeira; (6) Maturação do complexo T-DNA; (7) importação nuclear de complexo T-DNA facilitada por proteínas da célula hospedeira; (8) transporte intranuclear do complexo T-DNA e a integração do T-DNA no genoma da célula hospedeira mediada por VirD2 e / ou VirE2 e por fatores do hospedeiro (TZFIRA & CITOVSKY, 2002; 2006).

Acredita-se que de alguma forma o estresse de alta temperatura possa alterar os perfis de expressão dos genes envolvidos nas etapas do processo de infecção da agrobactéria com a célula vegetal, facilitando assim a transformação genética.

Outro fator importante para a produção de plantas geneticamente modificadas é o local do embrião onde os genes são inseridos. Preferencialmente os sítios de transformação devem ser observados na porção basal do embrião. Esta região é mais competente para a formação de calos embriogênicos e conseqüentemente a regeneração de plantas transgênicas (FRAME et al., 2002; ISHIDA et al., 2007).

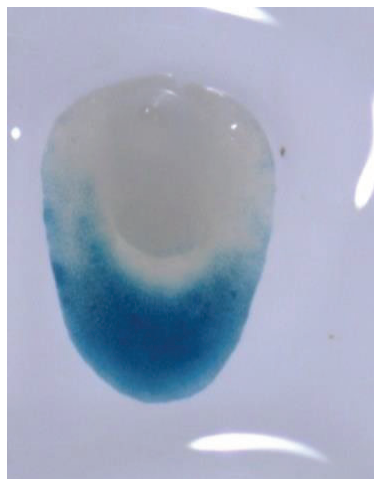


Figura 4. Aspecto dos embriões zigóticos imaturos infectados com *Agrobacterium tumefaciens* após teste histoquímico de GUS evidenciando a área do escutelo, em torno do eixo embrionário corado de azul. FAMV Passo Fundo, 2016.

Pode-se observar no presente trabalho que os pontos azuis estavam concentrados em sua maioria na região basal do embrião,

indicando melhor possibilidade de gerar calos embriogênicos (Figura 4).

Os dois tratamentos de temperatura empregadas durante a infecção dos embriões com *A. tumefaciens* e os dois genótipos utilizados não influenciaram na frequência de calos embriogênicos resistentes ao herbicida Bialaphos®. Não houve interação entre os tratamentos e os genótipos (Tabela 4).

Embora não tenha ocorrido significância na frequência de calos resistentes, podemos considerar dentro do esperado as frequências obtidas de 3,75% para genótipo Hi-II e de 2% para a BR451, e com uma frequência média de 2,9% (Tabela 3). Porém, os resultados obtidos nesse experimento poderiam ser mais elevados visto que na literatura, para o genótipo Hi-II, as frequências giram em torno de 5% podendo chegar a até 8% (FRAME et al., 2002; 2006; GRANDO et al., 2011).

A porcentagem de calos embriogênicos resistentes ao herbicida Bialaphos® corresponde a frequência de embriões submetidos à infecção com agrobactéria que foram capazes de sobreviver e se desenvolver na presença do agente seletivo devido a expressão do gene *bar*. A frequência de calos resistentes é uma forma de estimar e obter uma medida da transformação estável, pois os calos são formados depois de alguns meses de cultivo, requerendo que o gene esteja inserido no genoma de forma estável.

Os calos embriogênicos são de grande importância, pois é o tecido usado para o processo de regeneração de plantas transgênicas, o mesmo é originado de um processo de embriogênese somática indireta

(LU et al., 1982; VASIL et al., 1984; ARMSTRONG & GREEN, 1985; ARMSTRONG, 1994; ISHIDA et al., 1996; FRAME et al, 2006; ISHIDA et al., 2007; VEGA et al., 2008).

3.2 Experimento 2

Neste experimento foi aplicada uma sequência de estresses consecutivos nos embriões antes da infecção. Após a aplicação desses tratamentos os embriões foram infectados com *A. tumefaciens* durante cinco minutos. Para a realização desse ensaio foram utilizados embriões imaturos do híbrido de milho Hi-II.

Tabela 5 – Expressão transiente do gene *uidA*, sobrevivência dos embriões e frequência de calos resistentes obtidos a partir de embriões imaturos de milho do genótipo Hi-II submetidos a diferentes condições de infecção FAMV, Passo Fundo, 2015

Tratamento	Embriões com pontos azuis (%)	Área do embrião corada (%)	Sobrevivência dos embriões (%)	Calos resistentes ao herbicida (%)
S/ estresse	100	25,93	95,6 a	0,52 a
C/ estresse	100	24,71	54,5 b	0,28 b
Média	100	25,32	75,05	0,55
C.V(%)	0	56,2	32,77	49,31
Valor de p	-	0,9876 ^{ns}	0,0371*	0,0398*

Medias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

* significativo pelo teste e ANOVA a 5% de probabilidade de erro

^{ns} não significativo pelo teste e ANOVA a 5% de probabilidade de erro.

O pré-tratamento com estresse não resultou em efeito significativo na transformação transiente do gene *uidA*, tanto para

número de embriões Gus positivos quanto para percentagem de área do embrião corada no teste histoquímico (Tabela 5).

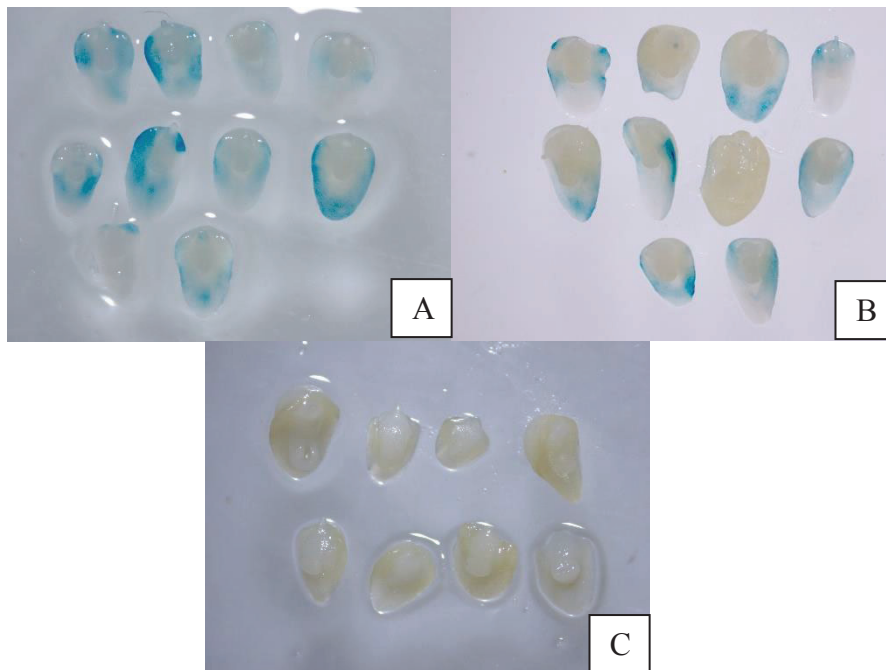


Figura 5. Embriões submetidos ao teste histoquímico de Gus indicando a área onde o T-DNA foi inserido. A) tratamento 1: embriões expostos ao estresse físico; B) tratamento 2: embriões infectados sem aplicação de estresse; C) controle negativo: embriões não infectados com *Agrobacterium tumefaciens*. FAMV, Passo Fundo, 2016.

A frequência de embriões que mostraram sítios de transformação transiente foi alta e atingiu 100% nos dois tratamentos, além disso cada embrião apresentou em torno de 25% da área corada com a cor azul (Figura 5). Esses resultados mostram o avanço pelo Laboratório de Biotecnologia da UPF que em trabalhos anteriores possuía frequências de embriões Gus positivo inferiores com frequência de 20% (DIDONE, 2015) e 22% (SILVA, 2013). O mesmo

ocorre para a intensidade da transformação transiente, que foi elevada da presença de apenas alguns pontos obtidos em trabalhos anteriores (SILVA, 2013; DIDONE, 2015) para áreas completamente azuis (média de 25% da área do embrião corada) encontradas nos nossos experimentos (Figura 5).

Genes repórter são genes utilizados para visualizar o evento da transformação através da expressão de proteínas e enzimas detectáveis através de testes histoquímicos como é o caso do gene *uidA* (*gus*) ou mediante condições de luminosidade específica como para o gene *gfp*. Esses genes são inseridos juntamente com o gene de interesse e indicam o local onde o T-DNA foi inserido no explante (CARNEIRO et al., 2004). O número de embriões que apresentam pontos azuis representa a percentagem de transformação transiente, prova da transferência do T-DNA da *A. tumefaciens* para as células do embrião de milho (JEFFERSON et al., 1987). Além disso, quanto maior a área do embrião corada maior o número de células do embrião que tiveram inserção do T-DNA da agrobactéria. A expressão do gene *uidA* nos tecidos transgênicos foi detectada pela ação da β -glucuronidase. Esta proteína com função enzimática, na presença do substrato X-gluc, produz um dímero de cor azul índigo que possibilita a visualização dos eventos de transformação (JEFFERSON et al., 1987).

Atualmente o sistema mais estudado para introdução de genes exógenos em milho é via *A. tumefaciens*, no entanto o principal desafio para estabelecer esta técnica é superar a baixa eficiência de transformação. Em parte, a baixa eficiência está relacionada à característica recalcitrante do milho e de outras monocotiledôneas à infecção por *A. tumefaciens* (JONES et al., 2005). Todavia, a eficácia

também é afetada por outros fatores, tais como: genótipo, tipo de explante, estirpe de *A. tumefaciens*, pH do meio de cultura, condições de cocultivo e concentração de compostos fenólicos no meio de cultura (CHENG et al., 2004).

O estresse utilizado neste experimento reduziu a capacidade de sobrevivência dos embriões em relação aos embriões não submetidos ao pré-tratamento (Figura 6). Os embriões expostos ao estresse tiveram frequência de 54,5% de sobrevivência, enquanto os embriões que não sofreram estresse, o índice de sobrevivência foi de 95,6% (Tabela 5). A redução na sobrevivência dos embriões expostos ao estresse físico diminui a eficiência de transformação.

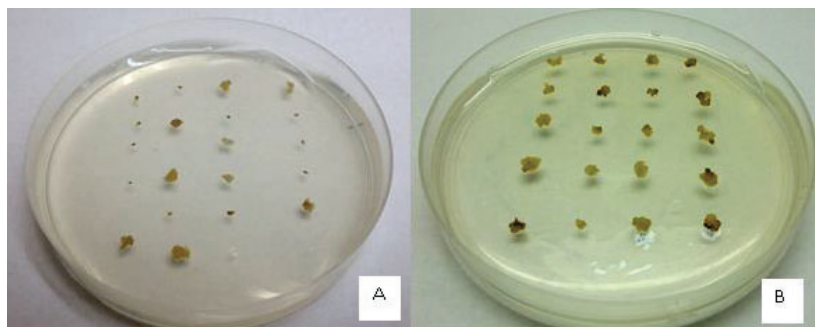


Figura 6. Sobrevivência dos embriões no cultivo em meio de descanso 10 dias após a infecção A) tratamento 1: embriões expostos ao estresse antes da infecção; B) tratamento 2: embriões infectados sem aplicação de estresse. FAMV, Passo Fundo, 2015.

Tecidos de milho apresentam alta sensibilidade a danos mecânicos ocasionados por estresses físicos. Esta alta sensibilidade pode influenciar negativamente a capacidade de geração de calos embriogênicos e até mesmo prejudicar a regeneração de plantas em estádios subsequentes (DANILOVA & DOLGIKH, 2005).

Para o sucesso da produção de plantas transgênicas em monocotiledôneas, genes exógenos devem ser entregues a células indiferenciadas, ou em diferenciação que se dividem ativamente e que são capazes de regenerar plantas. No milho, o material mais utilizado é o embrião zigótico imaturo em protocolos de transformação utilizando o método de bombardeamento de partículas ou via *A. tumefaciens* o gene é entregue a embriões imaturos ou calos embriogênicos obtidos a partir dos mesmos (ISHIDA et al., 2007). Assim, os principais determinantes de uma transformação bem sucedida é a resposta de embriões imaturos em cultura de tecidos, os tipos de células que crescem a partir de embriões imaturos e características subsequentes no desenvolvimento e regeneração.

O pré- tratamento com estresse físico reduziu a frequência de calos resistentes ao herbicida (Tabela 5). Os embriões que não foram submetidos ao estresse apresentaram frequência de 0,52% enquanto os embriões estressados a frequência baixou para 0,28%. Essa diferença se deve a baixa sobrevivência dos embriões que passaram pelo estresse.

Os calos resistentes indicam a frequência de transformação estável. Esta resistência ocorre devido a expressão do gene *bar* o que condiciona que os calos transformados sobrevivam ao agente seletivo (herbicida Bialaphos®) adicionado ao meio de cultura.

A frequência de calos embriogênicos do genótipo de milho Hi-II, obtida neste experimento, mesmo na ausência do estresse foi muito abaixo do esperado para este mesmo genótipo. Frequências consideradas satisfatória ficam entre 5 a 8% (FRAME et al., 2002; 2006; GRANDO et al., 2011). A alta pressão de seleção empregada

neste experimento pode explicar as baixas frequência, bem como pode indicar que a transformação estável realmente não foi eficiente e que o T-DNA não foi integrado ao genoma da célula vegetal.

Os tecidos submetidos à transformação devem passar por um processo de seleção que permita que somente as células transformadas se multipliquem e deem origem a plantas modificadas geneticamente, para isso são utilizados genes marcadores. Genes marcadores, ou de seleção, são genes que conferem resistência a antibióticos ou herbicidas, sendo que a seleção é realizada na presença dos agentes seletivos correspondentes (BRASILEIRO & DUCI, 1999).

O gene marcador *bar* isolado de *Streptomyces hygroscopicus*, codifica para a fosfínotricina acetiltransferase (PAT), que confere resistência ao herbicida PPT (fosfínotricina) (BRASILEIRO & DUCI, 1999) e auxilia na seleção de calos transgênicos, pois o herbicida impede o crescimento de tecidos não transformados e permite a seleção de tecidos portadores do gene. Assim, a seleção com marcador *bar* evita que plantas não transgênicas sejam regeneradas (CHENG et al., 2004).

O mesmo tipo de estresse aplicado nesse experimento foi usado em genótipos de milho com eficiência. Sendo que esse tratamento elevou em média 16,57% a frequência de transformação estável de quatro genótipos de milho (A 188, H99, W177 e A634). Embora o híbrido Hi-II não tenha sido utilizado neste experimento, um de seus progenitores, a linhagem A188, obteve elevação de até 35% na eficiência de transformação quando houve aplicação do estresse físico (ISHIDA et al., 2007). Os resultados deste experimento mostram que o estresse não é benéfico para o híbrido Hi-II. Isso

sugere que o genótipo tem influência na resposta ao estresse e há a necessidade de adaptação das condições de infecção para cada genótipo.

Há relatos de diversos estresses que podem favorecer a transformação genética de milho quando utilizados na etapa de infecção de embriões e também de outros explantes. Já foram relatados que tratamentos como vortex e choque de temperatura na infecção de calos embriogênicos favorecem a transformação em milho (VALDEZ-ORTIZ et al., 2007; SILVA, 2013). Outro tratamento físico que tem mostrado efeito positivo é a infecção com a aplicação de vácuo que melhorou a transformação transiente de 17,6% para 28,9% em embriões imaturos de milho (VALDEZ-ORTIZ et al., 2007).

4 CONCLUSÕES

A elevada temperatura (43 °C) aplicada na infecção de embriões imaturos de milho com agrobactéria favorece a transformação transiente observada pelo número de pontos azuis por embrião, em decorrência da introdução e expressão do gene repórter *uidA*.

Os embriões imaturos do genótipo Hi-II apresentam maior capacidade de serem transformados pela agrobactéria em comparação a variedade BR 451.

A combinação de estresse (46 °C por 3 min, seguido pelo resfriamento em gelo por 1 min, centrifugação a 20,000g a 4 °C por 10 min) imposto aos embriões imaturos do genótipo Hi-II de milho antes da etapa de infecção com a agrobactéria reduz a eficiência de

transformação devido a redução da sobrevivência dos embriões imaturos.

A variedade BR 451, apesar de obter menor capacidade de ser transformada, é uma alternativa viável para ser utilizada na obtenção de plantas geneticamente modificadas e pode ser considerada um genótipo alternativo ao híbrido Hi-II.

CAPÍTULO II

CONCENTRAÇÕES DE ACETOSIRINGONA NA INFECÇÃO E COCULTIVO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS IMATUROS DE MILHO COM *Agrobacterium tumefaciens*

TIAGO TEIXEIRA¹

RESUMO - Para estabelecer a técnica de transformação genética de plantas via *A. tumefaciens*, o ponto crítico é ajustar os fatores que afetam a transformação. Os compostos fenólicos são os principais sinalizadores para indução dos genes vir de Agrobactéria, o que por sua vez, são responsáveis pelo corte e transferência do TDNA para o genoma vegetal. Acredita-se que determinados sinais das moléculas indutoras da região vir da *A. tumefaciens* não são suficientemente ativas em monocotiledôneas, sendo necessário a indução da região vir com substâncias sintéticas fenólicas, como a acetosiringona (AS), o que resulta num aumento da eficiência de transformação em cereais. Desta maneira o objetivo deste trabalho foi verificar se diferentes concentrações de acetosiringona na infecção e no cocultivo de embriões imaturos de genótipos de milho com *A. tumefaciens* altera a intensidade da transformação transiente observada pela expressão do gene reporter uidA. Cinco tratamentos constituídos de diferentes concentrações de acetosiringona no meio de infecção foram testados no ensaio 1 e no ensaio 2 as mesmas concentrações foram aplicadas

¹ Biólogo, mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração “Produção Vegetal”

também no meio de cocultivo. As concentrações utilizadas foram de 0 μM (controle), 100 μM (dose usual segundo o protocolo de Frame et al. (2011)), 200 μM , 400 μM e 600 μM . para avaliar a frequências de transformação transiente foi realizado o teste histoquímico de GUS que evidencia a expressão do gene uidA. Os resultados mostraram que a AS é de extrema importância no cocultivo para a transferência do T-DNA. No experimento 1 o genótipo Hi-II foi afetado pela concentração de AS enquanto o genótipo BR 451 não mostrou efeito. No experimento 2 a concentração de AS influenciou a transformação transiente dos dois genótipos e a dose de 400 μM de AS mostrou-se mais eficiente para a transformação de embriões imaturos de milho dos genótipos Hi-II e BR451.

Palavras-chave – compostos fenólicos, transformação genética, genótipo alternativo BR 451, GUS, uidA, *Zea mays*.

**ACETOSYRINGONE CONCENTRATIONS ON INFECTION
AND COCULTURE OF ZYGOTIC IMMATURE MAIZE
EMBRYOS WITH *Agrobacterium tumefaciens***

ABSTRACT - To establish the technique of plant genetic transformation by *A. tumefaciens*, the critical point is to adjust the factors affecting the transformation. The phenolic compounds are main signals for the genes induction via agrobacterium. These genes are responsible for The T-DNA excision and transference for the plant genome. It is believed that certain inducing molecules signs for the

activation of *A. tumefaciens* vir region are not sufficiently active in monocotyledonous, being necessary the induction of the vir region with synthetic phenolic compounds such as acetosyringone (AS), resulting in increased efficiency in cereals transformation. Therefore, the objective of this study was to verify if different concentrations of acetosyringone in the infection and in the co-cultivation of immature maize embryos with *A. tumefaciens* affect the intensity of transient transformation accessed by the reporter uidA gene expression assay. Five treatments of different concentrations of AS in the infection medium were evaluated in the experiment t 1. In the experiment 2 the same concentrations were applied also to the co-cultivation medium. The concentrations used were 0 μM (control), 100 μM (usual dose according to the Frame et al. (2011) protocol), 200 μM , 400 μM and 600 μM . To evaluate the frequency of transient transformation it was carried out the histochemical GUS assay that indicate the uidA reporter gene expression. The results showed that AS is of extreme importance when added to the co-cultivation medium. In the experiment 1 the Hi-II genotype was affected by the AS concentration, while the genotype Br 451 did not. The AS concentration added to the co-cultivation medium (experiment 2) influenced the transient transformation of the two genotypes and the dose of 400 μM AS was more efficient to increase the transformation of immature embryos of the two test genotypes Hi-II and BR451.

Keywords: phenolic compounds, genetic transformation, alternative genotype BR 451, GUS, uidA, *Zea mays*.

1 INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais cultivados mundialmente, representando aproximadamente 30% dos grãos produzidos no mundo (IBGE, 2015). Essa cultura tem grande destaque econômico e social, uma vez que apresenta grande diversidade de utilização, que vai desde a alimentação humana e animal até a indústria de alta tecnologia.

A maior demanda de alimentos se faz necessário pelo aumento expansivo da população mundial e a escassez de água e de terras agricultáveis. O milho, assim como qualquer outra cultura, está sujeita à interferência de diversos fatores que podem limitar sua produtividade.

Devido a larga importância sócio econômica, grandes investimentos têm sido aplicados no seu melhoramento genético. Nas últimas duas décadas o melhoramento através da engenharia genética tem sido cada vez mais presente no cenário do melhoramento genético.

O embrião zigótico imaturo tem sido o explante mais amplamente utilizado para transformação genética de milho (FRAME et al., 2002; 2006; 2011; HUANG & WEI, 2005; VEGA et al., 2008; ISHIDA et al., 2007; 2014; OMER et al., 2013), visto que o mesmo apresenta grande número de células jovens e competentes para a embriogênese, além de alto potencial regenerativo (HUANG & WEI, 2004).

A engenharia genética representa uma ferramenta da biotecnologia para auxiliar a obtenção de cultivares adaptadas para suprir as necessidades dos programas de melhoramento, no que diz

respeito ao aumento da variabilidade genética. Assim, a biotecnologia permite a produção de plantas geneticamente modificadas, contendo no genoma do milho, genes que conferem tolerância a diferentes estresses bióticos e abióticos, bem como melhora da qualidade nutricional e melhora no rendimento da cultura.

Atualmente o sistema mais estudado para introdução de genes exógenos em milho é via *A. tumefaciens*. No entanto, o principal desafio para estabelecer essa técnica é superar a baixa eficiência de transformação. Em parte, a baixa eficiência está relacionada à característica recalcitrante do milho e de outras monocotiledôneas à infecção por *A. tumefaciens* (JONES et al., 2005). Todavia, a eficácia da transformação de plantas por esse método também é afetada por outros fatores, tais como: genótipo, tipo de explante, estirpe de *Agrobacterium*, pH do meio de cultura, condições de cocultivo e concentração de compostos fenólicos no meio de cultura (CHENG et al., 2004).

O processo de transformação via *A. tumefaciens* depende de diversos fatores como sinais moleculares e químicos que fazem o reconhecimento entre a célula vegetal e a *A. tumefaciens*. A capacidade que a célula vegetal tem de produzir estes sinais químicos específicos para a bactéria influencia no potencial que a estirpe da agrobactéria tem de infectar e transferir o T-DNA para a célula da planta (MCCULLEN & BINNS, 2006). A sinalização molecular e química que permite que a agrobactéria infecte e insira o T-DNA no genoma da célula hospedeira é regulada pelo ligamento e desligamento de genes, sendo fortemente influenciado pelo genótipo da planta (TZFIRA et al., 2004).

A sinalização molecular envolve vários genes de virulência que já foram identificados como envolvidos nas diferentes fases do processo de interação da *A. tumefaciens* e a célula vegetal. Estes genes são responsáveis por produzir proteínas específicas que irão reconhecer sinais da célula vegetal e irão facilitar o processo de transferência do T-DNA da bactéria para a planta (TZFIRA et al., 2004).

Os compostos fenólicos são os principais sinalizadores para indução dos genes *vir* em agrobactéria. A identificação de fenóis com essa capacidade foi primeiramente demonstrada durante a análise de 28 exsudatos de raízes e protoplastos de folhas, ao quais continham altos níveis de acetosiringona (STACHEL et al., 1985). A partir disso, fenóis sintéticos, como acetosiringona e hidroacetosiringona, foram sintetizados e demonstraram alta atividade de indução das regiões *vir* mesmo em testes realizados na ausência de plantas (McCULLEN & BINNS, 2006).

Acredita-se que determinados sinais das moléculas indutoras da região *vir* na *A. tumefaciens* não são suficientemente ativas em monocotiledôneas, sendo demonstrado que a indução da região *vir* com substâncias sintéticas fenólicas, como a acetosiringona, aumentam a eficiência de transformação em cereais (DANILOVA & DOLGIKH, 2004). Contudo, o nível de requerimento é variável entre os protocolos já descritos, indicando a necessidade de maiores estudos visando desenvolver uma metodologia padrão de transformação.

A maioria dos protocolos de transformação genética de monocotiledôneas, utiliza AS nos meios de cultura, mesmo que em diferentes níveis. Em trigo, a omissão de AS diminuiu drasticamente a

expressão transiente de GUS, diminuindo a probabilidade de regenerar plantas transformadas (WU et al., 2003). Estudando diferentes concentrações de AS no cocultivo de embriões de trigo, Manfroi (2014) relatou que a concentração de AS afeta a transformação transiente dos embriões submetidos a infecção com *A. tumefaciens*. Em milho não há relatos de experimentos que avaliaram o efeito da concentração de AS na infecção e cocultivo de embriões infectados com agrobactéria.

O objetivo deste trabalho foi verificar se diferentes concentrações de acetosiringona na infecção e no cocultivo de embriões imaturos de genótipos de milho com *A. tumefaciens* alteram a intensidade da transformação transiente observada pela expressão do gene reporter *uidA*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e material vegetal

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, casa de vegetação e telado da Universidade de Passo Fundo.

Para a realização do experimento foram utilizados dois genótipos de milho: um híbrido americano modelo em transformação genética, oriundo do cruzamento das linhagens A188 e B73, desenvolvido pela Universidade de Minnessota (Hi-II) e a variedade brasileira desenvolvida pela Embrapa Milho e Sorgo (BR 451).

As plantas foram cultivadas em telado e casa de vegetação e polinizadas de forma manual para produção dos embriões, os quais foram utilizados como explante. Em torno de 10 a 12 dias após a polinização as espigas foram coletadas. Foi realizada a assepsia das espigas com álcool 70% durante 5 minutos e hipoclorito de sódio 6% durante 20 minutos, seguido de três lavagens com água destilada esterilizada. Posteriormente, sob ambiente asséptico, os embriões imaturos (1,8 a 2,0 mm de comprimento) foram obtidos das espigas.

2.2 Etapa de infecção dos embriões

Na etapa da infecção, os embriões foram colocados em contato com a estirpe desarmada de *A. tumefaciens* EHA 101 contendo o plasmídeo binário PTF102 (ver capítulo 1 figura 1), que possui o gene marcador *bar* e gene repórter *uidA* sob o controle do promotor CaMv35S. O gene repórter *uidA* é utilizado para acessar a eficiência de transformação transiente pelo teste histoquímico de GUS para detecção da cor azul, mediante reação enzimática e este gene contém um íntron para evitar sua expressão em bactérias. As bactérias contendo o plasmídeo foram obtidas de estoque de glicerol 50% e cultivadas em meio YEP (Tabela 1) suplementado com 100 mg L⁻¹ de espectinomicina e 50 g.L⁻¹ de canamicina por dois dias a 28 °C. Posteriormente, a partir dessa cultura foram as bactérias foram cultivadas em YEP contendo os antibióticos e também 100µM de acetosiringona. Duas alças de platina carregadas com essa cultura foram suspendidas em 5ml de meio de infecção (meio InfAS, tabela 2)

suplementado com 100 μ M de acetosiringona e a densidade ajustada para uma OD de 0,3 a 0,4. Os embriões foram então infectados com esta solução de *A. tumefaciens*.

2.2.1 Etapa de cocultivo

Após a infecção os explantes foram cocultivados com a *A. tumefaciens* durante três dias, a 20 °C e no escuro no meio de cocultivo (Tabela 1).

2.2.2 Etapa de descanso

Os embriões foram transferidos para o meio de descanso (Tabela 1) suplementado com 100 mg L⁻¹ de cefotaxima e 100 mg.L⁻¹ de vancomicina para eliminação da *A. tumefaciens*. As placas de Petri foram vedadas com fita porosa e mantidas no escuro a 28 °C durante 7 dias. Dois dias após a transferência para o meio de descanso (5 dias após a infecção) foi realizada a avaliação da frequência de transformação transiente de cada tratamento empregando o teste histoquímico de GUS para verificar a presença do gene *uidA*.

A expressão do gene *uidA* nos tecidos transgênicos foi detectada pela observação de sua expressão através do teste histoquímico para β -glucuronidase (GUS – enzima codificada pelo gene *uidA*) em uma amostra de dez embriões por repetição. Essa proteína com função enzimática, na presença do substrato X-gluc, produz um dímero de cor azul índigo que possibilita a visualização e a

contagem dos eventos de transformação. O teste foi realizado de acordo com o protocolo de Jefferson et al. (1987).

Cinco dias após a infecção, os embriões foram incubados em solução X-gluc por 16 horas a 37 °C. Após a incubação foram avaliados dois parâmetros para estimar o nível de transformação transiente: número de embriões Gus positivos e número de pontos azuis por embrião ou área do embrião corada de azul. A percentagem da área azul foi obtida através de fotografia em estereó microscópio Zeiss Dtemi DV 4, que foram medidas no software Zen 2 Blue Edition.

Tabela 1. Composição dos meios utilizados para o crescimento das bactérias, cultura de tecidos e transformação das plantas. FAMV Passo Fundo, 2015

Cultura de bactérias	
YEP	10 g.L ⁻¹ de peptona, 5 g. L ⁻¹ de NaCl, 10 g. L ⁻¹ de extrato de levedura, 8,0 g.L ⁻¹ de ágar, pH 7,0.
Infecção	
Inf	Sais N6 (CHU et al., 1975); vitaminas N6 (0,5 mg.L ⁻¹ de tiamina HCl, 2 mg/L ⁻¹ de glicina, 0,5 mg.L ⁻¹ de piridoxina HCL, 0,5 mg.L ⁻¹ de ácido nicotínico; 100 mg.L ⁻¹ de caseína hidrolisada; 0,7 g.L ⁻¹ de L-prolina; 2,0 mg.L ⁻¹ de 2,4D; 68,5 g.L ⁻¹ de sacarose, 36 g.L ⁻¹ de glicose, pH 5,2.
InfAS	Meio Inf suplementado com acetosiringona.
Cocultivo	
CM	InfAS sem glicose; sacarose reduzida para 30 g.L ⁻¹ e adicionado de 0,5 g.L ⁻¹ de MES; 10 µM nitrato de prata; 8,0 g.L ⁻¹ de ágar; pH 5,8 suplementado com acetosiringona
Descanso	
DM	CM sem acetosiringona adicionado de 100 mg.L ⁻¹ cefotaxima e 50 mg. L ⁻¹ de vancomicina, pH 5,8.

2.3 Tratamentos, delineamentos e análises estatísticas

Foram realizados dois experimentos distintos para avaliar o efeito da acetosiringona na transformação genética de embriões de milho via *A. tumefaciens*.

2.3.1 Experimento 1: Concentração de acetosiringona no meio de infecção

Cinco tratamentos constituídos de diferentes concentrações de acetosiringona no meio de infecção (Tabela 1) foram testados. As concentrações utilizadas foram de 0 μM (controle), 100 μM (dose usual segundo o protocolo de Frame et al. (2011), 200 μM , 400 μM e 600 μM (Tabela 2). Após a infecção os explantes foram transferidos para o meio de cocultivo (Tabela 1) contendo 100 μM de acetosiringona onde permaneceram durante cinco dias, a 20 °C e no escuro.

O delineamento experimental foi completamente casualizado, com seis repetições para o híbrido Hi-II e dez repetições para a variedade BR451. A unidades experimental foi uma placa de Petri contendo trinta embriões. Os dados coletados foram submetidos à ANOVA seguida do teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

2.3.2 Experimento 2 - concentração de acetosiringona no meio de infecção e no meio de cocultivo

Os embriões foram submetidos aos mesmos tratamentos de infecção do experimento I e após a infecção os embriões foram

transferidos para o meio de cocultivo contendo as mesmas concentrações de acetosiringona da fase de infecção (Tabela 2).

Tabela 2. Esquema com os tratamentos e concentrações de acetosiringona utilizada nos experimentos I e II nos meios de infecção e cocultivo FAMV, Passo Fundo, 2015

Experimento		T1	T2	T3	T4	T5
		μM de acetosiringona				
I	Infecção	0	100	200	400	600
	Cocultivo	100	100	100	100	100
II	Infecção	0	100	200	400	600
	Cocultivo	0	100	200	400	600

O delineamento experimental foi completamente casualizado, com 17 repetições para o híbrido Hi-II e para a variedade BR451. A unidade experimental foi composta por uma placa de Petri contendo trinta embriões imaturos. Os dados coletados foram submetidos à ANOVA seguida do teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento 1

Neste experimento testamos cinco doses de acetosiringona, estas concentrações foram aplicadas somente durante a fase de infecção dos embriões. Em consenso majoritário os protocolos de transformação genética de monocotiledôneas utilizam a acetosiringona na fase de cocultivo dos embriões. Neste experimento a concentração

de acetosiringona usada no cocultivo foi de 100 μ M para todos os embriões. Essa concentração é rotineiramente utilizada por Frame et al. (2011), esse protocolo é utilizado como base para transformação genética de milho do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo.

A elevação da concentração de acetosiringona durante a infecção dos embriões com *A. tumefaciens* não alterou a frequência de embriões Gus positivo para o híbrido Hi-II, sendo que, em média, 97,3% dos embriões apresentaram pontos azuis (Tabela 3).

Tabela 3. Expressão transiente do gene *uidA* em embriões imaturos de milho do genótipo Hi-II submetidos a diferentes concentrações de acetosiringona durante a infecção com *Agrobacterium tumefaciens*. FAMV, Passo Fundo, 2016

Tratamento μ M de AS	Frequência de embriões com pontos azuis (%)	Número de pontos por embrião
0	93,3	8,8 b
100	96,6	19,4 a b
200	96,6	13,3 a b
400	100	14,9 a b
600	100	26,7 a
Média	97,3	16,6
C.V	7,118%	54,923%
Valor de P	0,4402 ^{ns}	0,0257 *

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro. ^{ns} Não significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste de ANOVA. *Significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste de ANOVA

Da mesma forma, as diferentes concentrações de acetosiringona não afetaram a frequência de embriões com pontos azuis para a variedade BR451. A frequência média para BR451 foi de 74,4% (Tabela 4).

Tabela 4: Expressão transiente do gene *uidA* em embriões imaturos de milho da variedade BR451 submetidos a diferentes concentrações de acetosiringona durante a infecção com *Agrobacterium tumefaciens*. FAMV, Passo Fundo, 2016

Tratamento μM de AS	Frequência de embriões com pontos azuis (%)	Número de pontos por embrião
0	80	10,9
100	74	8,7
200	48	4,7
400	80	8,7
600	90	10,3
Média	74,4	8,6
C.V	54,209%	68,433%
Valor de P	0,2063 ^{ns}	0,5792 ^{ns}

^{ns} Não significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste de ANOVA

A alta frequência média de embriões expressando o gene *uidA* obtida no experimento, tanto para o genótipo Hi-II quanto para a variedade BR 451, demonstraram uma alta eficiência de transformação transiente e reporta que o T-DNA da *A. tumefaciens* foi transferido para as células de embriões dos dois genótipos.

Quando avalia-se o número de pontos por embrião é possível verificar o efeito da concentração de acetosiringona sobre o genótipo Hi-II (Tabela 3). A concentração de 600 μM (média de 26,7 pontos por embrião) revelou-se mais eficiente que a concentração de 0 μM (8,8 pontos por embrião), porém não se diferenciou das concentrações de 100 μM , 200 μM e 400 μM . Tendo em vista que utilizar 600 μM é mais eficiente do que utilizar 0 μM e a utilização de 100 μM é tão eficiente quanto a concentração de 600 μM , e levando em consideração os custos operacionais, a concentração de 100 μM é a que propicia mais vantagens para a utilização de forma rotineira na

transformação genética de milho. A figura 1 demonstra aspectos dos embriões observados nos tratamentos contrastantes.

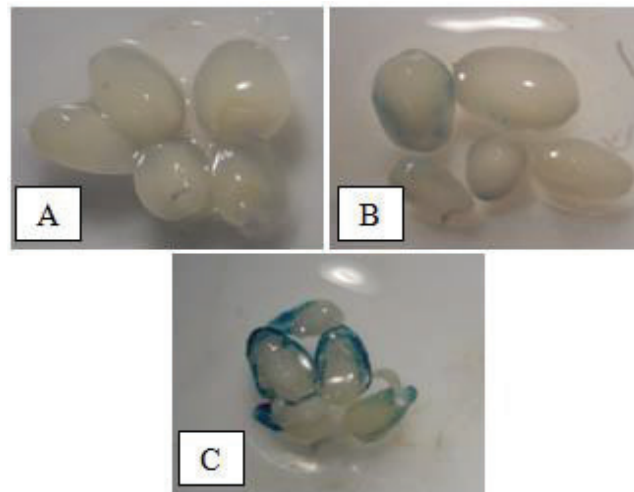


Figura 1. Aspecto dos embriões imaturos do genótipo Hi-II submetidos ao Teste de GUS: A) Embriões do controle não infectado com *Agrobacterium tumefaciens*; B) Embriões infectados com 0 μM de acetosiringona; C) Embriões infectados com 600 μM de acetosiringona. FAMV, Passo Fundo, 2015.

Para a variedade de milho BR 451, as concentrações de acetosiringona durante a infecção dos embriões imaturos com *A. tumefaciens* não influenciou no número de pontos azuis (Tabela 4). A média de pontos azuis encontrada foi de 8,6 pontos por embrião (Figura 2).

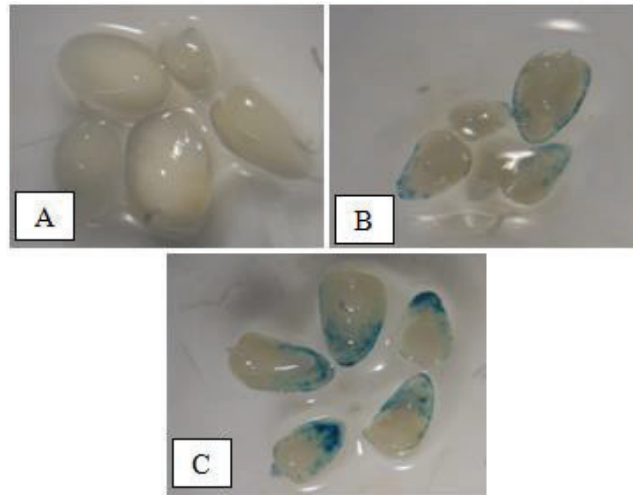


Figura 2. Teste de GUS em embriões imaturos do genótipo BR 451 de milho A) Aspecto dos embriões do controle negativo não infectado com *Agrobacterium tumefaciens*; B) Aspecto dos embriões infectados com 0 μM de acetosiringona; C) Embriões infectados com 600 μM de acetosiringona. FAMV, Passo Fundo, 2015.

Outro aspecto importante a ser destacado é o fato de que mesmo na ausência de acetosiringona durante a infecção houve a expressão transitória, indicando que ocorreu a transferência do T-DNA. Uma explicação pode ser o uso de 100 μM de acetosiringona no período de cocultivo, subsequente a infecção, momento em que ocorre a transferência do T-DNA da bactéria para o genoma vegetal, tenha auxiliado, proporcionando a sinalização necessária para a ativação e dos genes *vir* e transporte do T-DNA.

3.2 Experimento 2

Visando entender a influência da acetosiringona nas frequências de transformação transitória testamos as concentrações de

acetosiringona na etapa de infecção e também na etapa de cocultivo dos embriões.

Não houve interação entre os fatores analisados (genótipo X concentrações de AS) para nenhuma das variáveis (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de P obtidos pelo F teste para as variáveis analisadas. FAMV, Passo Fundo, 2016

Fonte de variação	Valores de P	
	Embriões com pontos azuis (%)	Nº pontos/embrião
Genótipo	0,0886 ^{ns}	0,1566 ^{ns}
Acetosiringona	0,0007 [*]	0,0026 [*]
Interação	0,7253 ^{ns}	0,0712 ^{ns}
C.V.%	8,77%	32,93%

^{ns} Não significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste de ANOVA.

^{*}Significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste de ANOVA

A frequência de embriões com pontos azuis foi maior quando comparado com a infecção e cocultivo sem a acetosiringona. O tratamento com 0 μ M de acetosiringona foi inferior ao demais tratamentos, com frequência de 0%, enquanto a média foi de 76,1% dos embriões apresentaram área do embrião corada para os genótipos Hi-II e BR451 (Tabela 6).

A ausência de pontos azuis no tratamento sem acetosiringona demonstram a importância da utilização deste composto fenólico na etapa de infecção e cocultivo de embriões de milho. Desse modo entende-se que a acetosiringona exerce papel fundamental na transformação genética de embriões de milho via *A. tumefaciens* sendo um elemento indispensável para o sucesso da produção de plantas de milho geneticamente modificadas.

Tabela 6 - Expressão transiente do gene *uidA* em embriões imaturos de milho de dois genótipos submetidos a diferentes concentrações de acetosiringona durante a infecção e cocultivo com *Agrobacterium tumefaciens*. FAMV, Passo Fundo, 2016

Tratamento μM de AS	Frequência de embriões com pontos azuis (%)			Área do embrião corada de azul (%)		
	Hi-II	BR451	Média	Hi-II	BR451	Média
0	0	0	0	0	0	0
100	94,7	92,3	93,5	25,5	20,1	22,8
200	97,1	95,8	96,5	33,7	22,9	28,3
400	97,6	95,8	96,7	46,7	31,1	38,9
600	98,2	91,7	94,9	48,5	30,0	39,2
Média	77,2	75,1		30,9	20,8	
Média	76,1			25,8		
C.V. %	5,99	15,58		16,76	24,50	

A elevação da concentração de acetosiringona no meio de infecção e de cocultivo elevou a expressão do gene *uidA*. As concentrações de 400 μM (38,9% da área corada de azul) e 600 μM (39,2% da área corada de azul) foram estatisticamente superiores aos demais tratamentos e iguais entre si para o genótipo Hi-II e variedade BR451 (Tabela 5). Sendo a concentração de 400 μM a mais indicada para ser utilizada na infecção e cocultivo de embriões do genótipo Hi-II.

Quando compara-se o tratamento sem acetosiringona e o que emprega 400 μM no meio de cultura, elevamos a transformação transiente de 0 para 38,9% de área corada. Se contrastada com a concentração do protocolo original de 100 μM passamos de 22,8 para 38,3% um ganho de 15,5% na área do embrião corada de azul. O acréscimo na intensidade da transformação de acordo com a elevação

da concentração de acetosiringona pode ser observado na figura 3, bem como está demonstrado através de gráfico na figura 5.

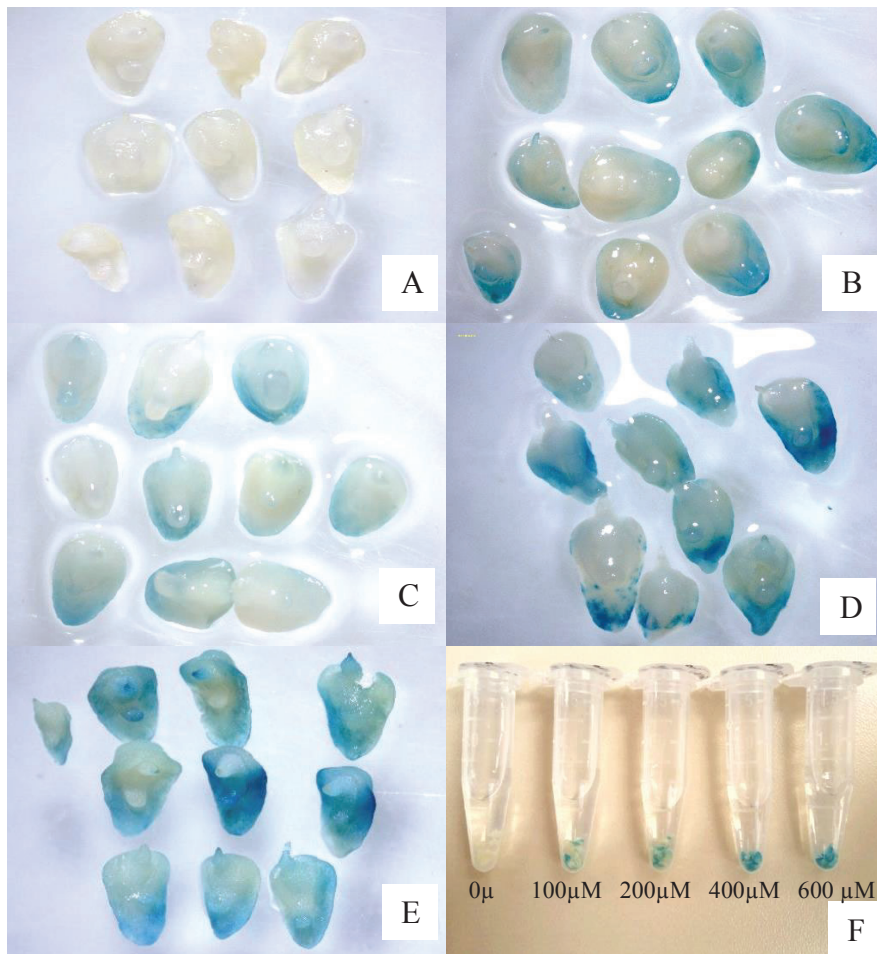


Figura 3. Aspecto dos embriões infectados e cocultivados em diferentes concentrações de acetosiringona na presença de *A. tumefaciens*. A) 0 μM ; B) 100 μM ; C) 200 μM ; D) 400 μM ; E) 600 μM ; F) Aspecto dos embriões dentro de tubos Eppendorf. FAMV, Passo Fundo, 2015.

A área do embrião corada aumentou a medida que a concentração de acetosiringona foi elevada no meio de infecção e

cocultivo. Porém, a partir da concentração de 400 μ M, o aumento da concentração não refletiu em aumento da área corada, ou seja, concentração acima de 400 μ M de acetosiringona não mostram acréscimo na transformação transiente de milho (Figura 4).

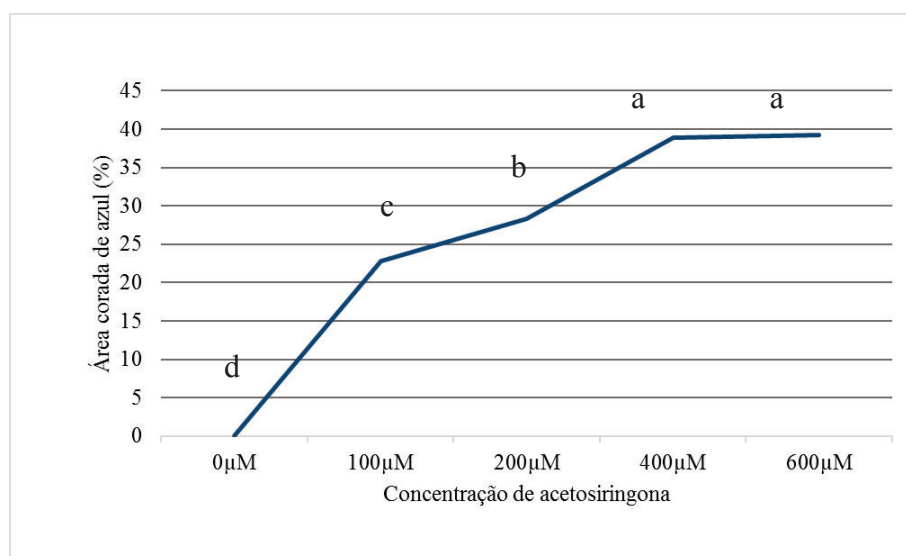


Figura 4. Acréscimo da área corada de azul em embriões submetidos a diferentes concentrações de acetosiringona na infecção e cocultivo com *A. tumefaciens*. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro. FAMV, Passo Fundo, 2016.

Diversos fatores presentes no cocultivo podem ser cruciais para a transferência e integração de genes para o genoma da célula vegetal, dentre eles os mais conhecidos são concentração de nutrientes, pH, temperatura, período, presença e concentração de acetosiringona (HENSEL et al., 2009). Além desses, o genótipo da planta, o tipo de explantes, a estirpe de *A. tumefaciens*, plasmídeos e a eliminação da *A. tumefaciens* após o período de cocultivo também

interferem na eficiência de transformação (ALIMOHAMMADI & BAGHERIEH-NAJJAR, 2009).

Outro fator que afeta a transformação de monocotiledôneas em geral, quando comparado com dicotiledôneas, são as diferenças na estrutura química da parede celular, que inibem a ligação com a bactéria e falham na indução da região *vir* do plasmídeo, pois liberam menor quantidade de compostos fenólicos. Estas características não são encontradas em células de dicotiledôneas, que são hospedeiras naturais de *A. tumefaciens* (SOOD et al., 2011). Em algumas espécies, principalmente dicotiledôneas a quantidade de compostos fenólicos produzidos pelas plantas é suficiente para induzir a região *vir*. No entanto, em outras espécies monocotiledôneas, a quantidade destes compostos pode ser insuficiente e a indução pode ser aumentada pela adição de acetosiringona (BRASILEIRO & DUSI, 1999).

Os pontos azuis observados nos embriões indicam o local onde o TDNA da *A. tumefaciens* foi inserido durante a transformação. Em trigo, no primeiro relato de obtenção de plantas transgênicas, Cheng et al. (1997) citaram como ponto crucial a suplementação de acetosiringona no meio de infecção e cocultivo. Da mesma maneira, Wu et al. (2003) verificaram que a transferência de T-DNA foi drasticamente reduzida na ausência de acetosiringona no meio de infecção e cocultivo. Neste mesmo trabalho os autores observam que o efeito da ausência de acetosiringona foi mais acentuado em algumas cultivares e menos em outras. Isso sugere que a concentração de acetosiringona necessária no meio pode variar de acordo com o genótipo.

Os resultados do presente estudo mostram que não houve efeito do genótipo sobre a transformação transiente em embriões zigóticos imaturos de dos genótipos de milho Hi-II e da variedade BR 451. A capacidade de ser infectada por *A. tumefaciens*, demonstrada pela variedade BR451, chegando a resultados muito parecidos com o genótipo modelo Hi-II, indicam sua capacidade de ser utilizado alternativamente ao híbrido Hi-II.

Para Manfroí (2014), existem combinações específicas de temperatura de cocultivo, concentração de acetosiringona e pH do meio de inoculação e cocultivo que promovem maior transferência de T-DNA da *A. tumefaciens* para as células de embriões imaturos da linhagem de trigo PF 020037, dentre elas: pH 5,0 – 25 °C – 400 µM de acetosiringona, pH 5,4 – 22 °C – 400 µM de acetosiringona e pH 5,0 – 22 °C – 200 µM de acetosiringona. O uso da concentração de 400 µM de AS no meio de inoculação e cocultivo denotou uma tendência a resultados superiores em relação à concentração 200 µM de acetosiringona

Substâncias adicionadas ao meio de cultura que induzem a região *vir* da agrobactéria como a acetosiringona mostrou ter efeito positivo na maioria dos protocolos de transformação de cereais (HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996; TINGAY et al., 1997; ZHAO et al., 2000; SAIRAM et al., 2003; DANILOVA & DOLGIKH, 2004; WANG et al., 2007). A função dos fenóis na ativação dos genes *vir* em *A. tumefaciens* parece estar clara. Evidências genéticas suportam a ideia de que os fenóis interagem diretamente com VirA, (GAO & LYNN, 2005; McCULLEN & BINNS, 2006).

A percepção dos fenóis como a AS é possível devido a expressão do gene *virA* que produz uma proteína de membrana e recebe os sinais fenólicos da célula hospedeira. Ao reconhecer a sinalização dos fenóis *vir A* ocorre o ligamento de genes que estão localizados na região *Vir* do plasmídeo Ti e estes genes realizam o corte, transporte de inserção do T-DNA no genoma do hospedeiro. (TZFIRA et al., 2004).

Em milho, Frame et al. (2011) utilizaram a concentração de 100 μM no meio de infecção e cocultivo, este protocolo é utilizado como padrão para realizar transformação genética de em diversos centros de pesquisa, inclusive em nosso laboratório. Não há informações de como os autores concluíram ser essa a melhor concentração a ser utilizada em protocolos de transferência de genes em milho. Porém, no presente trabalho a concentração de 400 μM induziu melhores níveis de transformação transiente para o genótipo Hi-II e para a variedade BR451.

4 CONCLUSÕES

O genótipo Hi-II responde a alteração da concentração de acetosiringona na fase de infecção. Já a variedade BR 451 não sofre influência da concentração de acetosiringona na infecção.

Na ausência da acetosiringona no meio de infecção e no meio de cocultivo não ocorre transformação genética de embriões de milho do genótipo Hi-II e da variedade BR 451.

O genótipo Hi-II e a variedade BR 451 respondem positivamente ao aumento da concentração de acetosiringona na infecção e cocultivo.

A concentração de 400 μM de acetosiringona aumenta a frequência de transformação genética transiente do híbrido Hi-II e da variedade BR 451.

A variedade brasileira BR 451 apresenta capacidade de ser transformada e pode ser usada como um genótipo alternativo ao híbrido Hi-II na transformação genética via *A. tumefaciens*.

REFERÊNCIAS

AL-ABED, D.; MADASAMY, P.; TALLA, R.; GOLDMAN, S.; RUDRABHATLA, S. Genetic Engineering of Maize with the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3. Gene Using Split-Seed Explants. *Crop Science*, Madison, v. 47, p. 2390-2402, 2007.

ALIMOHAMMADI, M.; BAGHERIEH-NAJJAR, M. B. Agrobacterium-mediated transformation of plants: Basic principles and influencing factors. *African Journal of Biotechnology*. Lagos, v. 8, n. 20, p. 5142-5148, 2009.

AMOAHA, B. K.; WU, H.; SPARKS, C.; JONES, H. D. Factors influencing Agrobacterium-mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 52, n. 358, p. 1135-1142, 2001.

ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. L. Development and availability of germoplasm with high type II culture formation response. *Maize Genetics and Cooperation Newsletter*, [S.I.], v. 65, p. 92-93, 1991.

ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta*, Berlin, v. 164, p. 207-214, 1985.

ARMSTRONG, C. L.; Regeneration of plants from somatic cell cultures: Application in vitro genetic manipulation. In: FREELING, M.; WALLBOT, V. *The Maize Handbook*. New York: Springer Verlag, 1994. p. 663-671.

ARMSTRONG, C.L. The first decade of maize transformation: a review and future perspective. *Maydica*, [S.I.], v.44, p.101-109, 1999.
AYERS, N. M.; PARK, W. D. Genetic transformation of rice. *Plant Science*, Madison, v. 13, p. 219-239, 1994.

BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L., S., BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília:Embrapa-SPI-Embrapa-CNPQ. v.2, p. 354. 1999.

BRASILEIRO, A. C.; CARNEIRO, V. T. C. Manual de transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998, 309 p.

BRASILEIRO, A. C. M Co-cultura com linhagens desarmadas de *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A.C.M E CARNEIRO, V. T. C. Manual de transformação genética de plantas. Brasília Embrapa SNPI/embrapa Cenargen, 1998. p. 309.

CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P. CARVALHO, C. H. S.; VASCONCELOS, M. J. V. PAIVA, E.; LOPES, M.A. Milho transgênico. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, n.15, p. 42-46, 2000.

CARNEIRO, A.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. Transformação Genética de Milho Utilizando o Bombardeamento de Partículas. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo MG. Documentos, 32, 2004. 44p.

CARNEIRO, A. A.; PINTO, G. T. DA C.; PÔSSA, K. F.; PEREIRA, M.DE F.; VASCONCELOS, M. J. V.; CARNEIRO, N. P. Transformação genética de embriões zigótico da linhagem de milho tropical L3 mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Sete Lagoas: Embrapa milho e sorgo, 2009. (Circular técnica, 132).

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*, Berlin, v. 17, p. 73-76, 1997.

CARVALHO, C. H. S.; ZEHR, U. B.; GUNARATANA, N.; ANDERSON, J.; KONONOWICZ, H. H.; HODGES, T. K.; AXTELL, J. D. *Agrobacterium*-mediated transformation of sorgum: factors that affect transformation efficiency. *Genetic and Molecular Biology*, v. 27, p.259-269, 2004.

CHENG, M.; LOWE, B. A.; SPENCER, T. M.; Y. E. X.; ARMSTRONG, C. L. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In vitro Cell Developmental Biology Plant*. v. 40, p.31-45, 2004.

CHILTON, M. D. *Agrobacterium* gene transfer: Progress on a “poor man’s vector for maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 90. p. 3119-3120, 1993.

CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C. ; CHU, C. Y. Establishment of an efficient medium for rice anther culture through comparative experiments on the nitrogen source. *Scientia Sinica*, [S.I.], v.16, p. 659-668, 1975.

CIB, Conselho Nacional de Biosegurança. Boletim informativo: Milho, 2015. Disponível em: <<http://www.cib.com.br/>>. Acesso em: 10 dezembro de 2015.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira: grãos. Brasília, 2015. (Levantamento, 3).

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira: grãos. Brasília, 2016. (Levantamento, 1).

CONTI, E.; LANZANOVA, C.; BALDONI, E.; ALLEGRI, L.; LUPOTTO, E. Improving *in vitro* culture and transformation conditions in *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. *Maize Genetics Coop. Newsletter*, n. 77, p. 8-9, 2003.

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

DANILOVA S. A.; DOLGIKH. Y. I. Optimization of agrobacterial (*Agrobacterium tumefaciens*) transformation of maize embryogenic

callus. *Russian Journal of Plant Physiology*, Moscou, v. 52, n.4, p. 535-541, 2005.

DANILOVA, S. A.; DOLGIKH, Y. I. The Stimulatory Effect of the Antibiotic Cefotaxime on Plant Regeneration in Maize Tissue Culture *Russian Journal of Plant Physiology*, Moscou, v. 51, n. 4, p. 559-62, 2004.

DEBLOCK, M.; BOTTERMAN, J.; VANDEWIELE, M.; DOCK, J.; THOEN, C.; GOSSELÉ, V.; RAO, N.; MOVVA, C.; THOMPSON, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *Embo Journal*, [S.l.], v.6, p. 2513-2518, 1987.

DIDONÉ, D. A. Regeneração *in vitro* e condições de co-cultivo na transformação de embriões imaturos de milho via *Agrobacterium tumefaciens*. 2015. Dissertação de mestrado (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade de Passo Fundo, 2015.

FRAME, B. R.; MCMURRAY, J. M.; FONGER, T. M.; MAIN, M. L.; TAYLOR, K.W. TORNEY, F. J.; PAZ, M. M.; WANG, K. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. *Plant Cell Reports, Genetic Transformation e Hybridization*, Ames, v..25, p.1024-1034, 2006.

FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R. K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T. M.; PEGG, S. E. K.; LI, B.; NETTLETON, D. S.; PEI, D.; WANG, K. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Maize Embryos Using a Standard Binary Vector System Breakthrough Technologies. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 129, p.13-22, 2002.

FRAME, B.; MAIN, M.; SCHICK, R.; WANG, K. Genetic transformation using maize immature zygotic embryos. in: Thorpe, a.; Yeung, e. c. *Plant Embryo Culture: methods and protocols, methods in molecular biology* [S.L.], V. 710, P. 327-341, 2011.

FROMM, M. E.; MORRISH, F.; ARMSTRONG, C.; WILLIAMS, R.; THOMAS, J.; KLEIN, T. M. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/technology*, New York, v. 8, p. 833-839, 1990.

GAO, R.; LYNN, G. D.; Environmental pH Sensing: Resolving the VirA/VirG Two-component system inputs for *Agrobacterium* pathogenesis. *Journal of bacteriology*, Washington, v. 187, n. 6, p. 1822-1829, 2005.

GIDDINGS, G.; ALLISON, G.; BROOKS, D.; CARTER, A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*, [S.I.], v. 18, p. 1151-1155, 2000.

GORDON-KAMM, W.; SPINCER, T. M.; MANGANO, M. L.; ANDANS, T. R. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *The Plant Cell*, Rockville, v. 2, p. 603-618, 1990.

GRANDO, M. F.; FRAME, B. R.; WANG, K. Transformação Genética de Embriões Zigóticos Imaturos do Híbrido Hi-II no Setor de Transformação de plantas da Iowa State University, Ames, EUA. In: 6 Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2011, Búzios-RJ. 6 Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2011.

GRANDO, M. F.; SMITH, R. L.; MOREIRA, C.; SCULLY, B. T.; SHATTERS, R. Developmental changes in abundance of the VSPb protein following nuclear transformation of maize with the Soybean vspb cDNA. *BMC Plant Biology*, EUA, v. 5, n. 3, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A.; Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética em plantas*. Brasília: Embrapa - SPI, v. 1, p. 183-260, 1998.

GUIMARÃES, P. E. DE O.; PARENTONI, S. N.; PACHECO, C. A. P.; PAES, M. C. D.; VASCONCELOS, M. J. V.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGNAVACA, R.; LOPES, M. A.; SANTOS, M. X.; GAMA, E. E. G.; MEIRELLES, W. F. BR 451 – Milho de alta qualidade proteica. Comunicado Técnico, 111. Sete Lagoas, MG, 2004

GUREL, S.; GUREL, E.; KAUR, R.; WONG, J.; MENG, L.; TAN, H.; LEMAUX, P. G. Efficient, reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum using heat treatment of immature embryos. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 28, n. 3, p. 429-444, 2009.

HE, D. G.; YANG, Y. M.; BERTARAM, J.; SCORR, K. J. The histological development of the regenerative tissue derived from immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*, Ireland, v. 68, p. 103-111, 1990.

HENSEL, G.; KASTNER, C.; OLESZCZUK, S.; RIECHEN, J.; KUMLEHN, J. *Agrobacterium*- Mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale and maize. *International Journal of Plant Genomics*, New York, n. 1, p. 1-9, 2009.

HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUBO, T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 35. p.205-218, 1997.

HIEI, Y., OHTA, S., KOMARI, T., AND KUMASHIRO, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*, England, v. 6, p. 271–282.

HIEI, Y.; KOMARI, T.; ISHIDA, Y.; SAITO, H. Development of *Agrobacterium*-mediated transformation method for monocotyledonous plants. *Breeding Research*, [S.l.], v. 2, p. 205–213. 2000.

HUANG, X. Q.; WEI, Z. M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 22, p.793-800, 2004.

HUANG, X. Q.; WEI, Z. M. Successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of maize elite inbred lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [S.l.], v. 83. p. 187-200, 2005.

HWANG, H-H.; GELVIN, S. B. Plant Proteins That Interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *The Plant Cell* [S.l.], v. 16, n.11, p. 3148-3167, 2004.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium* mediated transformation of maize. *Nature Protocols*, [S.l.], v.2, n.7. p.1614-1621, 2007.

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

ISHIDA, Y.; TSUNASHIMA, M.; HIEI, Y.; KOMARI, T. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos, in *Agrobacterium Protocols: Vol. 1, Methods in Molecular Biology*, v. 1223, p. 189–198. 2014.

(ISAAA), International Service For The Acquisition Of Agri-Biotech Applications 2014. Disponível em:<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=237>. Acesso em: 20 de dezembro de 2015.

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/gm crops: 2010. ISAAA Brief, N. 39, ISAAA: Ithaca, New York, 2010.

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/gm crops: 2014. ISAAA Brief, N. 44, ISAAA: Ithaca, New York, 2014.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in high plants. *Embo Journal*, [S.l.], v. 6, p.3901-3907, 1987.

JHA, P.; SHASHI, R. A.; AGNIHOTRI, P. K.; KULKARNI, V. M.; BHAT, V. Efficient *Agrobacterium*- mediated transformation of *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. Using shoot apices as explants source. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* Dordrecht, v. 107, p. 501–512. 2011.

JONES, H. D.; DOHERTY, A.; WU, H. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Plant Methods*, London, v. 1, p. 1-9, 2005.

JONES, H. D. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *Journal of Cereal Science*, London, v. 41, n. 2, p. 137-147, 2005.

KAEPLER, H.; AKULA, C.; AKULA, A.; KAEPER, S. M.; CHADLER, V.; SIDORENKO, L.; NAPOLI, C.; JORGENSEN, R. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize optimization of parameters for utilization of nonsuperbinary vectors. In: PLANTE ANIMAL GENOME CONFERENCE, 9, San Diego, 2001.

KIM, H. A.; KWON, S. Y.; YOO, H. S.; YANG, M. S.; CHOI, P. S. Development of transgenic maize using immature embryos of Hi-II genotype as a vaccine candidate. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, Adelaide, v. 8, n. 1, p. 21-25, 2012.

KIM, H. A.; UTOMO, S. D.; KWON, S. Y.; MIN, S. R.; KIM, J. S.; YOO, H. S.; CHOI, P. S. The development of herbicide-resistant maize: stable *Agrobacterium*-mediated transformation of maize using explants of type II embryogenic calli. *Plant Biotechnology Reports* [S.l.], v. 3, v. 4, p. 277 - 283, 2007.

LACORTE, C. β -Glucuronidase (GUS). In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília Embrapa SNPI/Embrapa Cenergem, 1998, p. 309.

LAW, R. D. ; RUSSELL, D. A.; THOMPSON, L. C.; SCHROEDER, S. C.; MIDDLE, C. M.; TREMAINE, M. T.; JURY, T. P.; DELANNAY, X.; SLATER, S. C. Biochemical limitations to high-level expression of humanized monoclonal antibodies in transgenic

maize seed endosperm. *Biochemical Biophysics Acta*, [S.l.], v. 1760, p. 1434-1444, 2006.

LEE, B. L.; KENNON, A. R.; CHEN, X.; JUNG, T. W.; AHN, B. O.; LEE, J. Y.; ZHANG, Z. J. Recovery of transgenic events from two highly recalcitrant maize (*Zea mays* L.) genotypes using *Agrobacterium*-mediated standart-binary-vector transformation. *Maydica*, [S.I.], v. 52, p. 457-469. 2007.

LUPOTTO, E.; REALI, A; PASSERA, S.; CHAN, M. T. Maize transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. 1998 Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu./mnl/72/67lupottp.html>>. Acesso em: 4 jul. 2015.

MA, J. K.; DRAKE, P. M. W.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, [S.I.], v. 4, p. 794-805, 2005.

MANFROI, E. Adequação de protocolo para transformação genética de trigo (*Triticum aestivum*) via *Agrobacterium tumefaciens*. 2014. Dissertação de mestrado (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade de Passo Fundo, 2014.

McCULLEN, A. C.; BINNS, A. N. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annual Review Cell Development Biology*, Palo Alto, v. 22, p. 101-127, 2006.

NELSON, E.; REPETTI, P. P.; ADAMS, T.R.; CREELMAN, R. A.; WU, J.; WARNER, D. C.; ANSTROM, D. C.; BENSON, R. J.; CASTIGLIONI, P. P.; DONNARUMMO, M. G.; HINCHEY, B. S.; KUMIMOTO, R. W.; MASZLE, D. R.; CANALES, R.D.; KROLIKOWSKI, K. A.; DOTSON, S. B.; GUTTERSON, N.; RATCLIFFE, O. J.; HEARD, J. E. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, v. 104, n. 42, p. 16450 - 16455, 2007.

OMBORI, O., MUOMA, J., AND MACHUKA, J. Agrobacterium-mediated genetic transformation of selected tropical inbred and hybrid maize (*Zea mays* L.) lines. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* Dordrecht, v.113, p. 11–23. 2013.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa, [s.n.], 1999. p. 429-485.

PETRILLO, C. P.; CARNEIRO, N. P.; PURCINO, A. A. C.; CARVALHO, C. H. S.; ALVES, J. D.; CARNEIRO, A. A. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. *Pesquisa Agropecuária brasileira*, Brasília, v.43, n.3, p.371-378, 2008.

PONS, A.; BRESOLIN, M. A cultura do milho. *Trigo e Soja*. Porto Alegre, n. 57, p. 6-31, 1981.

PÔSSA, K. F.; CARNEIRO, M. H.; PEREIRA, M. F.; LANA, U. G. P.; CARNEIRO, N. P.; MAGALHÃES, J. V.; GUIMARÃES, C. T.; CARNEIRO, A. A. Transformação genética de milho com o gene de tolerância ao alumínio SbMATE isolado de sorgo. In: Congresso Brasileiro de Genética, 55, 2009, Águas de Lindóia, Anais... Águas de Lindóia, 2009.

QUE, Q.; ELUMALAI, S.; LI, X.; ZHONG, H.; NALAPALLI, S.; SCHWEINER, M.; FEI, X.; NUCCIO, M.; KELLIHER, X.; GU, W.; CHEN, Z.; CHILTON, M-D. M. Maize transformation technology development for commercial event generation. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, p. 379. 2014

RAMESSAR, K.; SABALZA, M.; CAPELL, T.; CHRISTOU P. Maize plants: An ideal production platform for effective and safe molecular pharming. *Plant Science*, Ireland, v. 174, p. 409-419, 2008.

RASHID, H.; YOKOI, S.; TORIYAMA, K.; HINATA, K. Transgenic plant production mediated by Agrobacterium in Indica rice. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 15, n. 10, p. 727-730, 1996.

RIBAS, A. F.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Production of Herbicide-Resistant Coffee Plants (*Coffea canephora* P.) via *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation. *Brazilian Archives of Biology and Tecnology*, [S.I.], v. 49, n. 1, p. 11-19, 2006.

SANTARÉM, E. R. SAAT: Transformação de plantas mediada por ultra-som e *Agrobacterium*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 725-730, 2000.

SAIRAM, R.V.; PARANI, M.; FRANKLIN, G., Z.; SMITH, L. B.; MACDOUGALL, J.; WILBER, C.; SHEIKHI, H.; KASHIKAR, N.; MEEKER, K.; AL-ABED, D.; BERRY, K.; VIERLING, R.; GOLDMAN, S.L. Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation. *Genome*, [S. I.], v. 46, p. 323-329, 2003.

SHEN, W.H.; ESCUDERO, J.; SCHLAPPI, M.; RAMOS, C.; HOHN, B. KOUKOLÍKOVÁ-NICOLA, Z. T-DNA transfer to maize cells: Histochemical investigation of β -glucuronidase activity in maize tissues. *Plant biology*, USA, v.90, p.1488-1492, 1993.

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

SHRAWAT, A. K.; LORZ, H. “*Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers”. *Plant Biotechnology Journal*, Malden, v. 4, n. 6, p. 575–603, 2006.

SILVA, M. R. Cultivo in vitro e Transformação Genética de Milho com *Agrobacterium tumefaciens*. 2013. Tese de doutorado (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade de Passo Fundo, 2013.

SLUYS, M. A. V. *Agrobacterium*: um vetor natural para transformação em plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SP/ Embrapa-CNPQ. v.2, 1999, 354p.

SOOD, P.; BHATTACHARYA, A.; SOOD, A. Problems and possibilities of monocot transformation. *Biologia Plantarum*, Prague, v. 55, n. 1, p. 1-15, 2011.

STACHEL, S. E.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, New York, v. 318, p. 624–629, 1985.

TINGAY, S.; MCELROY, D.; KALLA, R.; FIEG, S.; WANG, MB.; THORNTON, S.; BRETTELL, R. *Agrobacterium tumefaciens* mediated barley transformation. *Plant J. Oxford*. v.11, p.1369–1376, 1997.

TRICK, H. N.; FINER, J. J. SAAT Sonication Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation. *Transgenic Research*, New York, v. 6, n. 1, p. 329-337, 1997.

TZFIRA, T.; TIAN, G. W.; LACROIX, B.; VYAS, S.; LI, J. LEITNER-DAGAN, Y.; KRICHEVSKY, A.; TAYLOR, T.; VAINSTEIN, A.; CITOVSKEY, V. pSAT vectors: a modular serie/s of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. *Plant Molecular Biology [S.l.]*, v. 57, n.4, p. 503–516, 2006.

TZFIRA, T.; VAIDYA, M.; CITOVSKEY, V. VIP1, an Arabidopsis protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity. *European Molecular Biology Organization Journal [S.l.]*, v. 20, n. 13, p. 3596 - 3607, 2002.

TZFIRA, T; CITOVSKEY, V. The *Agrobacterium*-Plant Cell Interaction. Taking Biology Lessons from a Bug. *Plant Physiology*, Moscou, v. 133, n. 3, p. 943–947, 2004.

USDA, (United States Department of Agriculture) 2014. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdHome.aspx>. Acesso em 03 de dezembro de 2015.

VALDEZ-ORTIZ, A.; MEDINA-GODOY, S.; VALVERDE, M. E.; PAREDES-LÓPEZ, O. A transgenic tropical maize line generated by

the direct transformation of the embryo-scutellum by *A. tumefaciens*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, New York, v. 91, n.3, p. 201–214, 2007.

VASIL, V.; VASIL, I. K.; LU, C. Somatic embryogenesis in long-term callus culture in *Zea mays* L. (Gramineae). *American Journal of Botany*, [S.l.], v. 71, p.158-161, 1984.

VEGA, J. M.; YU, W.; KENNON, A.; CHEN, X.; ZHANG, Z. J. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 27. p.297-305, 2008.

VEENA, J. H.; DOERGE, R. W.; GELVIN, S. B. Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation & suppresses host defense gene expression. *Plant Journal*, Oxford, v. 35, n. 2, p. 219 - 236, 2003.

WALTERS, D. A.; VETSCH, C. S.; POTTS, D. E.; LUNDQUIST, R. C. Transformation and inheritance of a hygromycin phosphatase gene in maize plants. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 18, p. 189-200, 1992.

WANG, D.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from inflorescence segments of *Pennisetum purpureum* Schum. (Napier or elephant grass). *Plant Science Let.* Limerick, v. 25, p. 147-154, 1982.

WANG, J.; SUN, Y.; LI, Y. Maize (*Zea mays*) genetic transformation by co-cultivating germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnology Applied Biochemistry*, Beijing, v. 46, p. 51-55, 2007.

WANG, M. S.; ZAPATA, F. J.; CASTRO, D. C. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature seed and young inflorescence of wild rice (*Oryza perennis* Moench). *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 6, p. 294-296, 1987.

WANG, Y.; FU, S.; WEN, Y.; ZHANG, Z.; XIA, Y.; LIU, Y.; RONG, T.; PAN, G. Selection of Maize Inbred Lines with High

Regeneration and Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Genetics and Genomics (Formerly Acta Genetica Sinica)* [S.l.], v. 34, n. 8, p. 749-755, 2007.

WU, H.; SPARKS, C.; AMOAH, B. JONES, H.D. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Reports*, New York, v. 21, n. 7, p. 659-668, 2003.

ZHANG, Y.; YIN, X.; YANG, A.; L. I. G.; ZHANG, J. Stability of inheritance of transgenes in maize (*Zea mays* L.) lines produced using different transformation methods. *Euphytica*, Wageningen, v. 144, p. 11-22, 2005.

ZHAO, Z. Y; CAI, T.; TAGLIANI, L.; MILLER, M.; WANG, N.; PANG, H. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. *Plant Mol. Biol.* Dordrecht, v. 44, p. 789–798. 2000.

ZHAO, Z.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L.; HONDRED, D.; BOND, D.; SCHROEDER, S.; RUDERT, M.; PIERCE, D. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. *Molecular Breeding*, Netherlands, v. 8. p. 323-333, 2001.

ZHAO, Z.Y.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L.A.; HONDRED, D.; BOND, D.; KRELL, S.; RUDERT, M. L.; BRUCE, W. B.; PIERCE, D.A. Molecular analysis of T0 plants transformed by *Agrobacterium* and comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation with bombardment transformation in maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, v. 72. p.34-37, 1998.