

RAFAELI APARECIDA VIEIRA DE SOUZA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E AVALIAÇÃO DE PROMOTORES
HETERÓLOGOS PARA O CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM
MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S729t Souza, Rafaeli Aparecida Vieira de, 1986-
2015 Transformação genética e avaliação de promotores
heterólogos para o controle da expressão gênica em milho /
Rafaeli Aparecida Vieira de Souza. – Viçosa, MG, 2015.
ix, 103f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Aluizio Borém de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Milho. 2. Embriogênese somática. 3. Expressão gênica.
4. *Agrobacterium tumefaciens*. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação
em Fitotecnia. II. Título.


CDD 22. ed. 633.15

RAFAELI APARECIDA VIEIRA DE SOUZA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E AVALIAÇÃO DE PROMOTORES
HETERÓLOGOS PARA O CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM
MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

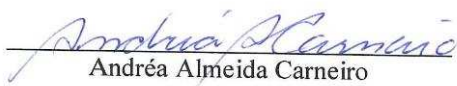
APROVADA: 16 de julho de 2015



Rodrigo Oliveira de Lima




Thais Roseli Corrêa



Andréa Almeida Carneiro



Tocio Sedyama



Alúzio Borém de Oliveira
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade da vida.

À minha mãe, Maria Betânia Vieira, pela educação, amizade, companheirismo, amor e pelo apoio durante toda a minha vida.

Ao meu marido, Jorge Marcelo Padovani Porto, companheiro de todas as horas, pelo amor, carinho, companheirismo, paciência, por ensinar-me o valor da vida e acreditar no meu potencial.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, ao Departamento de Fitotecnia pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Aluizio Borém pela oportunidade e orientação.

À minha coorientadora, Dra. Andréa Almeida Carneiro, pela co-orientação, amizade, confiança, compreensão, pelas valiosas sugestões e por ter me iniciado nas pesquisas de transformação genética de plantas. Agradeço-lhe por ter me disponibilizado as dependências do Núcleo de Biotecnologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo.

As analistas dos laboratórios de Biologia Celular e Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, Beatriz de Almeida Barros e Meire de Cássia Alves, por toda a colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Núcleo de Biologia Aplicada, Ilma, Célio, Miguel, Emanuelle, Letícia, Kamila, Amanda, Alessandra, Rayane, Simara, Barbara, pela amizade, ajuda e pelos momentos de descontração.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela atenção e prestatividade.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia e Genética e Melhoramento (Amilton, Haroldo, Alan, Priscila, Laura e Francisco) pela amizade, ajuda, companheirismo, troca de conhecimentos e pelo bom convívio.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!!!

BIOGRAFIA

Rafaeli Aparecida Vieira de Souza, filha de Maria Betânia Vieira e Antônio Carlos de Souza, nasceu em 24 de abril de 1986, em Cuiabá, no estado de Mato Grosso, Brasil. Em agosto de 2004 iniciou o curso de Agronomia na Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, em Cáceres, Mato Grosso. Graduiu-se em Agronomia em Agosto de 2008.

Em março de 2009 iniciou o curso de Mestrado em Agricultura Tropical, Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, em Cuiabá, Mato Grosso, submetendo-se a defesa da dissertação em 10 de março de 2011.

Em agosto de 2011 iniciou o curso de doutorado em Fitotecnia, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa de tese em 16 de julho de 2015.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1.INTRODUÇÃO GERAL	01
2.REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 Importância da cultura do milho	04
2.2 Origem e classificação botânica do milho	04
2.3 Transformação genética de plantas	05
2.4 Transformação genética de milho	05
2.5 Embriogênese somática de milho	06
2.6 Meio de cultivo na transformação genética	07
2.7 Genes de seleção e genes repórteres na transformação genética	08
2.8 Promotores na transformação genética	09
2.9 Promotor específico de floema <i>PP2</i>	10
2.10 Promotor específico de fruto <i>PCaLTP-S</i>	11
2.11 Promotor constitutivo <i>PSulfT0,5</i> e de folha <i>PCit0,4</i>	11
2.12 Promotor de senescência – <i>PSAG12-like</i>	12
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12

Capítulo 1

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE MILHO TROPICAL	18
RESUMO	19
ABSTRACT	19
1.Introdução.....	20
2.Materiais e Métodos	22
3.Resultados.....	24
4.Discussão	29
5.Conclusões.....	34
6.Referências Bibliográficas.....	34

Capítulo 2

TRANSFORMAÇÃO DE EMBRIÕES IMATUROS DE LINHAGEM DE MILHO TROPICAL.....	37
RESUMO	38
ABSTRACT	38

1.Introdução.....	39
2.Materiais e Métodos	41
3.Resultados	45
4.Discussão	51
5.Conclusões.....	53
6.Referências Bibliográficas.....	54

Capítulo 3

PROMOTOR ESPECÍFICO PARA EXPRESSÃO GÊNICA NO FLOEMA.....	56
RESUMO	57
ABSTRACT	57
1.Introdução.....	58
2.Materiais e Métodos	59
3.Resultados.....	70
4.Discussão	73
5.Conclusões.....	74
6.Referências Bibliográficas.....	74

Capítulo 4

PROMOTORES HETERÓLOGOS PARA O CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM MILHO.....	77
RESUMO	78
ABSTRACT	79
1.Introdução.....	80
2.Materiais e Métodos	82
3.Resultados.....	87
4.Discussão	94
5.Conclusões.....	98
6.Referências Bibliográficas.....	98
 CONCLUSÕES GERAIS	 103

RESUMO

SOUZA, Rafaeli Aparecida Vieira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Transformação genética e avaliação de promotores heterólogos para o controle da expressão gênica em milho.** Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Coorientadores: Sérgio Hermínio Brommonschenkel e Geraldo Magela de Almeida Cançado.

O milho é uma das principais culturas do Brasil e hoje os estudos de transformação genética de plantas estão sendo utilizados como estratégia para obtenção de materiais com resistência a pragas e doenças, tolerância a herbicidas e melhoria na qualidade nutricional. Assim, objetivou-se avaliar meios de cultivo na embriogênese somática de embriões imaturos de milho tropical, estudar metodologias de transformação genética de milho tropical, avaliar promotores de floema *PP2* na transformação de milho, avaliar promotores de fruto *PCaLTP-S*, constitutivo *PSulfT0,5*, de folha *PCit0,4*, de senescência *PSAG12-like*, na transformação genética de milho. Foram conduzidos quatro experimentos em laboratório. Os materiais utilizados foram a linhagem elite L3 de clima tropical para avaliar meios de cultivo na embriogênese somática e na transformação de milho tropical, e o híbrido Hi-II de clima temperado, para os experimentos de avaliação de promotores. Os resultados indicaram que para a embriogênese somática, o meio de cultivo mais eficiente na produção de calos embriogênicos foi o meio M1 (Meio basal N6, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de caseína hidrolisada, 100 mg L⁻¹ de mio inositol; 2,9 g L⁻¹ de L-prolina e; 15 mg L⁻¹ de nitrato de prata). Para a maturação dos calos embriogênicos, o tratamento sem reguladores de crescimento com adição de CuSO₄ possibilitou maior porcentagem de regeneração. O protocolo desenvolvido apresentou produção de 85% de calos embriogênicos e 45% de plantas regeneradas, podendo, dessa forma, ser utilizado para a produção de plantas transgênicas de milho. A metodologia mais indicada para a transformação genética de milho tropical, foi o método I, visto que a utilização de meios de co-cultivo e repouso com maior concentração de sais foi benéfico para a transferência do T-DNA. Adicionalmente, os resultados indicam que a suplementação do meio de co-cultivo com apenas um antioxidante, a cisteína, é suficiente para a recuperação de células transformadas. No estudo dos promotores de floema em milho, foi gerada uma construção com promotor *PP2* heterólogo de milho isolado de uma Cucurbitácea. O promotor *PP2* isolado de abóbora dirigiu a expressão do gene repórter

gus para o sistema vascular em milho, revelando que pode ser utilizado em estudos futuros de transformação genética de milho. Nas análises de PCR quantitativo dos promotores heterólogos *PCaLTP-S*, *PSulfT0,5*, *PCit0,4*, *PSAG12-like*, a expressão foi detectada nos tecidos de folha e raiz. Novos estudos devem ser realizados para comprovar a funcionalidade desses promotores heterólogos no milho.

ABSTRACT

SOUZA, Rafaeli Aparecida Vieira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2015. **Genetic transformation and evaluation of heterologous promoters to control gene expression in maize.** Advisor: Aluizio Borém de Oliveira. Co-Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel and Geraldo Magela de Almeida Cançado.

Maize is an important crop in Brazil and today the genetic transformation studies of plants are being used as a strategy to obtain materials with resistance to pests and diseases, herbicide tolerance and improved nutritional quality. Thus aimed to evaluate culture media in somatic embryogenesis of immature embryos of tropical maize, studying methods of genetic transformation of tropical maize, evaluate the phloem promoters PP2 in transforming maize, evaluate promoters *PCaLTP-S* fruit, *PSulfT0,5* constitutive, *PCit0,4* leaf and PSAG12-like senescence in genetic transformation of maize. Four experiments were conducted in the laboratory. The materials used were the tropical climate L3 elite line to evaluate culture media in somatic embryogenesis and transformation of tropical maize, and Hi-II hybrid temperate climate for promoters of evaluation experiments. The results indicated that for somatic embryogenesis, the most efficient means of cultivation in the production of embryogenic callus was the M1 medium (N6 basal medium, 30 g L⁻¹ sucrose 100 mg L⁻¹ casein hydrolyzate, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 2.9 g L⁻¹ L-proline and 15 mg L⁻¹ of silver nitrate). For the maturation of somatic embryogenesis, treatment without growth regulators with the addition of CuSO₄ allowed higher percentage of regeneration. The presented protocol developed production of 85% of embryogenic callus and 45% of regenerated plants and may thus be used for the production of transgenic maize plants. The most suitable method for the genetic transformation of tropical maize was the method I, since the use of means of co-cultivation and resting with a higher salt concentration is beneficial to the transfer of T-DNA. Additionally, the results indicated that supplementation of co-cultivation medium with only the antioxidant cysteine is sufficient to recover transformed cells. In the study of phloem promoters in maize, a construct was generated with PP2 heterologous promoter isolated from a cucurbit. The PP2 pumpkin isolated promoter directed the expression of the GUS reporter gene to the vascular system in maize, revealing that can be used in future studies of genetic transformation of maize. In the quantitative PCR analysis of heterologous promoters *PCaLTP-S* *PSulfT0,5*, *PCit0,4*, *PSAG12-like*

expression was detected in leaf and root tissues. Further studies should be conducted to verify the functionality of these heterologous promoters in maize.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays*) é uma das culturas mais importantes do Brasil. Na safra 2014/2015, a área plantada com milho foi de 15,8 milhões de hectares, ficando entre os três maiores produtores, com 79 milhões de toneladas colhidas, sendo que 85% são de variedades geneticamente modificadas (CONAB, 2015).

Originário do México, o milho evoluiu de uma gramínea selvagem, para uma espécie domesticada e altamente produtiva. Esses resultados foram devidos, em grande parte, a rigorosos programas de seleção e melhoramento de cultivares (CARNEIRO et al., 2009A).

Programas convencionais de genética continuam exercendo papel fundamental na melhoria das características agrônômicas do milho. Entretanto, tecnologias recentes, tais como a biotecnologia representam importantes instrumentos para auxiliar no melhoramento desta cultura (HUANG & WEI, 2005). Estas técnicas têm possibilitado aos melhoristas de plantas o acesso a novas fontes de variabilidade genética para o desenvolvimento de cultivares superiores (CARNEIRO et al., 2004).

Atualmente, a transformação genética do milho vem sendo realizada por meio da *Agrobacterium tumefaciens* a qual é bastante complexa, mas apresenta inúmeras vantagens sobre o sistema de introdução por bombardeamento de genes (FRAME et al., 2002; 2011).

Para a produção de milho transgênico, existem três requisitos básicos: (i) regeneração *in vitro* do tecido vegetal transformado; (ii) metodologia para inserção do T-DNA no genoma do milho; (iii) construção gênica, com o gene de interesse, o promotor e os marcadores de seleção (CARNEIRO, et al., 2009B).

A regeneração *in vitro* do tecido vegetal transformado de milho é mais eficiente por meio da embriogênese somática, e vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de criar protocolos bem ajustados para serem aplicados na transformação do milho (LU, VASIL e VASIL, 1983; VASIL, LU e VASIL, 1985; ANAMI et al., 2010; AKOYI et al., 2013).

Como plantas monocotiledôneas não são hospedeiros naturais da *A. tumefaciens*, alguns ajustes devem ser estudados durante a infecção e co-cultivo, visando otimizar a transferência de T-DNA para o genoma das plantas receptoras (SILVA, 2013).

Os transgenes são inseridos via técnicas de biologia molecular no milho e são constituídos basicamente da região codificadora do gene de interesse e/ou do gene marcador de seleção e de sequências reguladoras da expressão gênica, tais como promotores e terminadores.

Promotores são sequências de DNA, normalmente presentes na extremidade 5' de uma região codificadora, usada pela RNA polimerase e fatores de transcrição para iniciar o processo de transcrição gênica (BUCHANAN et al., 2000). Os promotores são classificados como constitutivos, tecidos e/ou órgãos específicos e induzíveis. O promotor mais utilizado para direcionar a expressão de uma proteína constitutivamente em milho é o promotor isolado do gene da ubiquitina de milho *Ubi1* (CHRISTENSEN et al., 1992). No entanto, a atividade deste promotor decresce com a idade da planta e este fato foi associado à redução na divisão celular com o envelhecimento da planta.

Apesar dos promotores constitutivos serem importantes para a produção de plantas geneticamente modificadas, em certos casos, a expressão constitutiva de um transgene não é necessária e pode representar alto gasto metabólico. Portanto, o isolamento e a caracterização detalhada de promotores que direcionam a expressão gênica de maneira específica são também de grande interesse para a produção de eventos transgênicos.

A diversidade em promotores de planta e seus elementos regulatórios é a base para o desenvolvimento de organismos transgênicos. Baseado nessa primícia foi decidido analisar a capacidade dos promotores (i) PP2 isolados de uma lecitina do floema de abóbora; (ii) *PCaLTP-S* –isolado de cafeeiro (COTTA et al., 2014); (iii) *PSulfT0,5* e *PCit0,4* – isolados de soja (SCHMUTZ et al., 2010) e, (iv) o *PSAG12-like* – promotor de senescência de cana-de-açúcar (GAN e AMASINO, 1995) em direcionar a expressão gênica em milho transgênico. Essas sequências regulatórias podem ser de grande utilidade em programas de melhoramento de milho.

Nesse contexto, os objetivos foram:

- i. Avaliar diferentes meios de cultivo para produção e regeneração de calos embriogênicos dos Tipos I e II da linhagem de milho tropical L3;

- ii. Verificar a eficiência de transformação via *A. tumefaciens* da linhagem elite tropical L3 utilizando duas metodologias de infecção e co-cultivo desenvolvidas para o milho temperado, visando padronização da transformação genética dessa linhagem;
- iii. Isolar, clonar e avaliar a atividade do promotor específico de floema PP2 de abóbora, no controle da expressão gênica em milho transgênico; e,
- iv. Avaliar os promotores heterólogos isolados do cafeeiro, da soja e da cana-de-açúcar, no controle da expressão gênica em plantas transgênicas de milho.

Para alcançar os objetivos propostos, os trabalhos foram realizados em quatro etapas: Capítulo 1: Embriogênese somática e a regeneração de plantas de milho tropical; Capítulo 2: Transformação genética de milho tropical; Capítulo 3: Avaliação de promotor de floema PP2 em plantas transgênicas de milho e Capítulo 4: Transformação de plantas com os promotores de café, soja e cana-de-açúcar heterólogos de milho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da cultura do milho

O milho é uma das culturas de maior importância na agricultura internacional, cultivado em todo território brasileiro. O Brasil ocupa o 3º lugar em produção ficando atrás dos EUA e China. Segundo dados da Conab (2015), na safra 2014/2015 o Brasil teve uma produção de 79 milhões de toneladas em área plantada de 15,8 milhões de hectares com produtividade 5.057 kg por hectare.

O milho é insumo para produção de centenas de produtos, tanto para o consumo humano como para alimentação de animais. Na cadeia produtiva de suínos e aves são consumidos aproximadamente 70% do milho produzido no mundo e entre 70 e 80% do milho produzido no Brasil (DUARTE et al., 2006).

2.2 Origem e classificação botânica do milho

Originado do México, o milho apresenta grande variabilidade e atualmente existem cerca de 250 raças (PATERNIANI & CAMPOS, 1999). A partir da segunda metade do século XX, o desenvolvimento de híbridos aumentou a produtividade e a qualidade do milho.

O milho é uma planta herbácea, monóica, isto é possui os dois sexos na mesma planta em inflorescências diferentes, é uma planta anual que completa o seu ciclo de vida em quatro a cinco meses (PONS & BRESOLIN, 1981).

Dentro da classificação botânica, o milho é uma gramínea da família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L., com $2n = 2x = 20$ cromossomos (PATERNIANI & CAMPOS, 1999). O milho é planta alógama com 99% de reprodução cruzada.

Paterniani & Campos (1999) salientam que a grande diversidade genética encontrada em milho é considerada exemplo de evolução, uma vez que a evolução corresponde a mudanças nas frequências gênicas ao longo das gerações. Dentre os fatores que contribuem para a evolução temos a seleção, mutação, oscilação genética, migração e hibridação, sendo os mais importantes à hibridação e a seleção.

O milho é a planta cultivada que atingiu o mais elevado estágio de domesticação, uma vez que não sobrevive sem a interferência do homem. A colheita de plantas individuais permite que o milho seja bem adaptado à seleção pelo homem, uma vez que a produção de cada planta e as características de cada espiga são imediatamente identificadas. (PATERNIANI e CAMPOS, 1999)

2.3 Transformação genética de plantas

Transformação genética é definida como sendo a introdução controlada de ácidos nucleicos em um genoma receptor, excluindo-se a introdução por fecundação. Diferentes técnicas de transformação genética de plantas foram estabelecidas, recentemente, com o desenvolvimento da cultura de tecidos e da engenharia genética. Elas ampliam os limites de disponibilidade de genes impostos pela incompatibilidade sexual, no melhoramento convencional de plantas. Isso ocorre devido ao fato de se poder transferir, para plantas, genes isolados de outras plantas, ou mesmo de microrganismos e animais (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998).

Um gene responsável por determinada característica, uma vez identificado, pode ser isolado, clonado, sequenciado e utilizado em programas de melhoramento genético de plantas, por meio da transformação genética (BRASILEIRO e DUSI, 1999).

Existem diversas técnicas de transformação genética de plantas, agrupadas em duas categorias: transferência direta e indireta de genes. A transferência indireta é aquela em que, para intermediar a transformação, utiliza-se um vetor, como *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*. A transferência direta de DNA é baseada em métodos físicos ou químicos, sendo o método mais utilizado a biobalística (BRASILEIRO e DUSI, 1999).

2.4 Transformação genética de milho

Atualmente a transformação mediada por *A. tumefaciens* está sendo recomendada para variedades de milho com boa resposta na cultura de tecidos (ISHIDA et al., 2007; LEE et al., 2007). Esta metodologia apresenta diversas vantagens como, por exemplo, maior precisão na integração do T-DNA, menor número de cópias do

transgene inseridas no genoma da planta e poucos rearranjos das moléculas de DNA introduzidas e, uma maior estabilidade fenotípica durante muitas gerações de cruzamento (ISHIDA et al., 1996). Em contrapartida, por ser um método genótipo-dependente a transformação via *Agrobacterium* apresenta limitações como, a recalcitrância em monocotiledôneas.

O primeiro relato de plantas transgênicas de milho produzidas pelo método da *A. tumefaciens* foi realizado por Ishida et al. (1996) com a transformação de embriões imaturos da linhagem A188. Estes autores observaram frequências de transformação entre 5 a 30%, obtendo plantas com morfologia normal e férteis, apresentando integração estável do gene com a herança confirmada por análises moleculares e genéticas.

Alguns fatores são responsáveis pelo sucesso da transformação genética e regeneração de plantas milho, dentre eles, uso de genótipos responsivos *in vitro*, estágio de desenvolvimento dos *explantes*, utilização de linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* competentes para transformação, concentração da bactéria no meio de infecção, meio e condições de infecção e co-cultivo (temperatura, pH, pré-tratamentos dos *explantes*, tempo de co-cultivo, uso de agentes estimuladores da transformação e antioxidantes como acetoseringona e L- cisteína), bem como os meios apropriados para indução de calos embriogênicos, seleção e regeneração de plantas.

A seleção de genótipos de milho para a produção de plantas transgênicas foca em duas características principais, a capacidade de regeneração *in vitro* e a possibilidade de infecção por *Agrobacterium*. Um genótipo ideal para o programa de produção de plantas transgênicas, além das características citadas anteriormente, deve possuir excelente desempenho agrônomo.

A regeneração de plantas através da cultura de tecidos é possível graças aos dois processos morfogenéticos: a organogênese e a embriogênese somática.

2.5 Embriogênese somática de milho

Na cultura do milho a metodologia mais estudada para a regeneração de plantas *in vitro* é a embriogênese somática (LU, VASIL e VASIL, 1983; VASIL, LU e VASIL, 1985; ANAMI et al., 2010; AKOYI et al., 2013). A embriogênese somática é o

processo pelo qual células haplóides ou somáticas se desenvolvem por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986, citado por GUERRA, TORRES e TEIXEIRA, 1999).

A embriogênese somática em milho é afetada por um componente genético e depende do genótipo utilizado na iniciação de calos e regeneração de plantas. Nos primeiros trabalhos de regeneração *in vitro*, a indução de calos e a regeneração de plantas de milho só eram possíveis em poucos genótipos (GREEN; PHILLIPS, 1975). O explante mais utilizado na transformação genética de milho é o embrião imaturo com tamanho entre 1,5 a 2,0 mm de comprimento (ISHIDA et al., 1996; LUPOTTO et al., 1998; FRAME et al., 2002; FRAME et al., 2006; VEGA et al., 2008; FRAME et al., 2011).

A ocorrência de calos embriogênicos friáveis do Tipo II não é tão comum, apenas um número restrito de genótipos de milho são capazes de expressar este fenótipo em meio de cultivo, especialmente o híbrido HiII (ARMSTRONG et al., 1991). Entretanto, Hi-II não é interessante para a avaliação de características agrônomicas como melhoria da produtividade e tolerância a estresses abióticos por apresentar um baixo desempenho agrônomico e uma base genética não uniforme (QUE et al., 2014).

Com o avanço da metodologia do cultivo *in vitro* e, particularmente com alterações na composição dos meios de cultura e nas relações e doses dos reguladores de crescimento, foi possível a regeneração de crescente número de genótipos. Apesar de a maioria destes genótipos serem de adaptação a clima temperado, genótipos de adaptação tropical capazes de regeneração também foram identificados (BOHOROVA et al., 1995, SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2000; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2000; DANSON et al., 2006; FERNANDES et al., 2008; ANAMI et al., 2010; GORJI et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2012) o que indica a possibilidade de se manipular genótipos elite tropicais via transformação genética.

2.6 Meio de cultivo na transformação genética

O meio de cultivo geralmente consiste de nutrientes inorgânicos, fontes de carbono e energia, vitaminas, reguladores de crescimento vegetal e suplementos

orgânicos (vitaminas, aminoácidos, etc.). Ausência ou concentrações inadequadas destas substâncias são fatores importantes que limitam a eficiência da transformação intermediada por *Agrobacterium*.

A concentração salina no meio de cultivo foi reportada influenciar a transferência do T-DNA. Elementos minerais são muito importantes na vida de uma planta, portanto estão sempre presentes no meio de cultivo. Os sais constituintes dos meios basais N6 (CHU et al., 1975) e MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) são amplamente utilizados no cultivo *in vitro* e transformação genética de milho (VEGA et al., 2008; FRAME et al., 2006). A maior diferença existente entre estas duas formulações é seu conteúdo em nitrogênio inorgânico, o meio basal MS possui 3,03 e 1,4 vezes mais NH₄ e NO₃, respectivamente do que o meio N6. Em alguns relatos a eficiência da transformação genética foi aumentada quando se utilizou baixa concentração de sais durante a infecção com *Agrobacterium* (FRY et al., 1987; ZHANG et al., 2003, VEGA et al., 2008).

2.7 Genes de seleção e genes repórteres na transformação genética

Para facilitar a seleção de plantas transgênicas são utilizados genes de seleção. Existem diferentes tipos de genes de seleção incluindo o gene *bar*, de *Streptomyces* que codificam a proteína PAT, fosfinotricina acetil-transferase, conferindo resistência ao herbicida glufosinato de amônio (WHITE; CHANG; BIBB, 1990). Esta enzima é usada como um marcador de seleção e também como fonte de resistência aos herbicidas do grupo fosfinotricina (glifosinato). O glifosinato de amônio é o princípio ativo presente em alguns herbicidas (Basta®, Rely®, Finale®, e Liberty®).

O gene de seleção é o gene *nptII* de *Escherichia coli*, o qual codifica a neomicina fosfotransferase II, conferindo resistência a antibióticos aminoglicosídeos contendo grupo 3'-hidroxila como a canamicina (DATLA et al., 1992); O gene *nptII* confere resistência à canamicina e antibióticos similares. O gene *hpt* de *E. coli* o qual codifica a higromicina B fosfotransferase, conferindo resistência ao antibiótico higromicina B (DUTT; LEE; GROSSER, 2010) e o gene *manA*, derivado da *E. coli*, que codifica fosfomanose isomerase permitindo a metabolização da manose (BOSCARIOL et al., 2003).

Além dos genes de seleção, na transformação genética podem ser utilizados genes repórteres, que permitem selecionar os brotos transformados dos demais. Exemplos de genes repórteres são o GFP que codificam a proteína GFP (*green fluorescent protein*), visível quando submetida à luz ultravioleta, método não destrutivo (DUTT; GROSSER, 2009) e o gene β -glucuronidase *uidA* (GUS), visualizado por análise histoquímica com o X-GLUC (5-bromo-4cloro-3-indolil glucuronida), tem como desvantagem ser um método destrutivo (CERVERA, 2005).

2.8 Promotores na transformação genética

No processo de produção de plantas transgênicas, um transgene constituído essencialmente por uma região codificadora de proteína e regiões regulatórias, é inserido no genoma da planta. Dentre as regiões regulatórias presentes no transgene, o promotor é um componente essencial que controla a expressão gênica de maneira precisa e, conseqüentemente, o fenótipo do evento.

De acordo com o tipo de regulação, os promotores usados em biotecnologia são divididos nas seguintes categorias: (i) promotores constitutivos são aqueles continuamente ativados na maioria dos tecidos; (ii) promotores espaço-temporal são aqueles ativados em diferentes estádios de desenvolvimento ou tecido específico; (iii) promotores induzíveis são aqueles regulados por estímulos hormonal, físicos ou químicos internos ou externos; e (iv) promotores sintéticos são aqueles que contem elementos regulatórios definidos localizados nas proximidades ou dentro de sequências promotoras e, podem direcionar a expressão de uma proteína de maneira constitutiva, espaço-temporal, induzida ou através da combinação dos diferentes padrões de expressão (POTENZA, 2004; HERNANDEZ-GARCIA e FINER, 2014). A escolha do promotor utilizado para a produção de uma planta transgênica depende fundamentalmente dos objetivos do projeto.

Promotores constitutivos que direcionam alta expressão do transgene e, que são rotineiramente utilizados para a geração de plantas geneticamente modificadas foram isolados tanto de genes de vírus quanto das próprias plantas. Um dos promotores mais utilizados para a expressão constitutiva de proteínas transgênicas é derivado do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) promotor 35S (ODELL et al.,1985).

Estudo dos elementos *cis* presentes dentro das 950 pb iniciais da região promotora do CaMV35S mostrou que a atividade do promotor está concentrada dentro das primeiras 343 pb e que interações entre os componentes resulta na alta expressão constitutiva detectada em plantas (FANG et al., 1989).

Promotores constitutivos que direcionam altos níveis de expressão de transgenes também foram isolados de genes endógenos de plantas, tais como a actina e a ubiquitina (GUPTA et al., 2001; DHANKHER et al., 2002).

Na maioria das plantas transgênicas presentes do mercado atualmente, foram utilizados promotores constitutivos para controlar a expressão da proteína de interesse. Apesar dos promotores constitutivos serem de grande valia para a produção de plantas geneticamente modificadas, em certos casos a expressão constitutiva de um transgene não é necessária.

Existem vários exemplos de promotores específicos caracterizados a partir de genes de monocotiledóneas, tais como: (i) promotor da hordeína da cevada (FORDE et al., 1985), gluteninas do trigo (LAMACCHIA et al., 2001), zeínas de milho (MARZABAL et al., 1998), que direcionam a síntese protéica para o grão; (ii) promotor RA8 de arroz, que direciona a síntese protéica para as anteras; (iii) promotor *rbcS* do gene ribulose-1,5-bifosfato carboxilase de arroz (SCHAFFNER e SHEEN, 1991), que direciona a síntese protéica em tecidos contendo clorofila, dentre outros.

2.9 Promotor específico de floema PP2

O Promotor do gene *PP2* isolado de abóbora (*Cucurbita sp*) codifica uma proteína estruturalmente distinta presente nos elementos da seiva e células companheiras do floema. Clones genômicos desta proteína (*PP2*) já foram isolados e caracterizados a partir de *Cucurbita pepo* (BOSTWICK et al, 1992). CARNEIRO (1994) mostrou que quando 1 kb da região 5' flanqueadora do clone genômico de *PP2* foi ligado ao gene repórter *gus*, e introduzido em plantas do tabaco usando *Agrobacterium*, a expressão da enzima β -glucuronidase foi detectada especificamente no floema. Portanto, a sequência gênica de 1 kb isolada possui as regiões necessárias para o direcionamento da expressão do gene *gus* para o floema de um sistema

heterólogo. Esta sequência promotora está em domínio público podendo ser utilizada para geração de plantas transgênicas sem a necessidade de pagamento de “royalties”.

2.10 Promotor específico de fruto *PCaLTP-S*

O gene *PCaLTP-S* isolado de café (*Coffea arabica*) codifica proteínas de transferência de lipídeos não-específicas (*PCaLTP-S*) caracterizadas por resíduos de cisteínas conservados, baixa massa molecular e alto conteúdo de α -hélices. Tais proteínas foram originalmente definidas pela capacidade de transferir fosfolipídeos *in vitro*. As *PCaLTP-S* estão envolvidas nos mecanismos de proteção das plantas contra estresses bióticos causados por fungos, vírus e bactérias. Em *C. arabica* a expressão foi detectada principalmente no endosperma dos frutos aos 90 e 120 dias após a floração. Transformação de tabaco com gene *gus* controlado por 1,2 Kb da região 5' a montante do gene *PCaLTP-S* isolado de *C. arabica* mostrou que a expressão do gene repórter foi detectada em todos os órgãos testados da planta, exceto nas raízes onde a expressão foi baixa ou nula (COTTA et al., 2014).

2.11 Promotor constitutivo *PSulfT0,5* e de folha *PCit0,4*

O promotor do gene *PSulfT0,5* isolado de soja (*Glycine max*) é constitutivo, identificado por meio do mapeamento dos genes selecionados do genoma da soja cv. Williams 82 (SCHMUTZ et al., 2010). O promotor foi clonado a montante do gene *gus* no vetor binário pMDC162. Esta construção foi utilizada para transformar *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium*. O promotor *PSulfT0,5* (509 pb) foi capaz de ativar a expressão do gene repórter em todos os órgãos das plantas de tabaco analisadas, sendo essa expressão mais forte em folha, raiz e semente.

O promotor do gene *PCit0,4* isolado de soja é específico de folha, e foi isolado de maneira semelhante ao isolamento do promotor constitutivo *PSulfT0,5*. O promotor foi clonado a montante do gene *gus* no vetor binário pMDC162. Esta construção foi utilizada para transformar fumo (*Nicotiana tabacum*) via *Agrobacterium*. As análises histoquímicas demonstraram que esse promotor foi capaz de conduzir a expressão do gene repórter *gus* de forma preferencial em folha.

2.12 Promotor de senescência – *PSAG12-like*

O promotor *PSAG12-like* isolado de uma cisteína protease, é específico de senescência e tem sido elucidado como promotor que controla a expressão do gene, com sistema auto ajustável antienvhecimento, que funciona da seguinte forma: quando as folhas entram no processo de envelhecimento, o promotor *SAG12* é ativado e o gene de interesse começa a expressar-se, levando a atraso no período de senescência da planta. Por conseguinte, o envelhecimento é suprimido. Quando a senescência for controlada e os sintomas de envelhecimento começarem a desaparecer, então o promotor *SAG12* é desativado, e o gene não é mais expresso. Gan e Amasino (1995) demonstraram atraso na senescência foliar em plantas de tabaco transgênicas contendo o promotor *SAG12* fusionado ao gene *IPT* (isopentenil transferase) de *Agrobacterium tumefaciens*, gene chave na biossíntese de citocinina em plantas. Em trabalho similar, Pontier *et al.* (1999) avaliaram a expressão do gene marcador da β -glucuronidase (*GUS*) dirigido pelo promotor *SAG12*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOYI, J.; MGUTU, A. J.; MACHUKA, J.; VAN LIJSEBETTENS, M.; TARACHA, C.; e ANAMI, S. E. Dicamba growth regulator promotes genotype independent somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of tropical maize inbred lines. **Journal of Life Sciences**, v.7, n.7, p.677-689, 2013.

ANAMI, S.; MGUTU, A.; TARACHA, C.; COUSSENS, G.; KARIMI, M.; ET AL. Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.102, n.3, p.285-295, 2010.

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**, v.65, p. 92-93, 1991.

BOHOROVA, N. E.; LUNA, B.; BRITO, R. M.; HUERTA, L. D.; HOISINGTON, D.A. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude, and highland maize inbreds. **Maydica**, v. 40, p. 275-281, 1995.

BOSTWICK, DE, DANNENHOFFER, JM, SKAGGS, MI, LISTER, RM, LARKINS, BA, THOMPSON, GA (1992). Pumpkin phloem lectin genes are specially expressed in companion cells. **Plant Cell**, v.4, p.1539-1548, 1992.

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/EmbrapaCenargen, 1998, 309 p.

CARNEIRO, A.A.; JACOBSEN, K R; SKAGGS, M I; THOMPSON, G. The PP2 promoter directs phloem-specific GUS expression in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology** v.105, p.135, 1994.

CARNEIRO, A. A.; GUIMARÃES, C.T.; VALICENTE, F.H.; WAQUIL, J.M. ETAL. **Milho Bt: Teoria e Prática da Produção de Plantas Transgênicas Resistentes a Insetos-Praga**. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 135). Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, dez. 2009a, 26p.

CARNEIRO, A. A.; PINTO, G. T. C.; PÔSSA, K. F.; PEREIRA, M. F. et al. **Transformação Genética de Embriões Zigóticos da Linhagem de Milho Tropical L3 Mediada por *Agrobacterium Tumefaciens***. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 132). Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, dez. 2009B, 26p.

CERVERA M. Histochemical and fluorometric assays for uidA (GUS) gene detection. In: PEÑA, L. (Ed.) **Transgenic plants. Methods and protocols**. Totowa :Humana Press, 2005, p. 203-214.

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

CONAB, 2015. **Safras – Grãos**. Capturado em 22 junho. 2015. Online. Disponível na Internet: <http://www.conab.gov.br>.

COTTA, M.G.; BARROS, L.M.G; ALMEIDA, J.D.; BARBOSA, E.A.; VIEIRA, N.G., ALVES, G.S.C.; VINECKY, F.; ANDRADE, A.C.; MARRACCINI, P. Lipid transfer proteins in coffee: isolation of Coffea orthologs, Coffea arabica homeologs, expression during coffee fruit development and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Mol Biol**. 013-0166-5, 2014.

DANSON, J. W.; LAGAT, M.; MBOGORI, M. Screening tropical maize lines for the production and regeneration of friable and embryogenic type II callus. **African J Biotechnol**. V.5 (23), p.2367-2370, 2006.

DATLA, R.S.S.; HAMMERLINDL, J.K.; PANCHUK, B.; PELCHER, L.E.; KELLER, W. Modified binary plant transformation vectors with the wild-type gene encoding nptII. **Gene**, Maryland Heights, v. 122, n. 2, p. 383-384, 1992.

DHANKHER, O. P.; LI, Y.; ROSEN, B. P.; SHI, J.; SALT, D.; SENECOFF, J. F.; SASHTI, N. A.; MEAGHER, R. B. Engineering tolerance and hyper accumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and g-glutamylcysteine synthetase expression. **Nature Biotechnology**, v.20, p.1-6, 2002.

DUARTE J.O.; CRUZ J.C.; GARCIA J. C.; MATTOSO M.J. Embrapa Milho e Sorgo, Sistema de Produção, 1 , 2006.http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes /milho_1_ed/economiadaprodu.htm acesso em: 05.07.2015

DUTT, M.; GROSSER, J.W. Evaluation of parameters affecting Agrobacterium mediated transformation of citrus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, p. 331- 340, 2009.

DUTT, M.; LEE, D.H.; GROSSER, J.W. Bifunctional selection-reporter systems for genetic transformation of citrus: mannose and kanamycin-based systems. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 46, n. 6, p. 467-476, 2010.

FANG R-X; NAGY F; SIVASUBRAMANIAM S; CHUA N-H. Multiple cis Regulatory Elements for Maximal Expression of the Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter in Transgenic Plants. **Plant Cell.**, v.1, p.141-150, 1989.

FERNANDES, E. H.; PRIOLI, A. J.; SCAPIM C. A.; SCHUSTER, I.; VIEIRA, E. S. N.; AMARAL JR., A. T.; MOTERLE, L. M. Embriogênese somática a partir de embriões imaturos em genótipos de milho. **Ciência Rural**, v.38 (9) p.2604-2607. 2008

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

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.; 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**, v. 710, p. 327-341, 2011.

FRY, J.; BARNASON, A.; HORSCH, R.B. Transformation of Brassica napus with Agrobacterium tumefaciens based vectors. **Plant Cell Rep.** v.6, p.321-325, 1987

GONZÁLEZ G. A.; PACHECO M. G.; ONETO, C. D.; ETCHART, V. J.; KANDUS, M. V.; SALERNO, J. C.; EYHERABIDE, G.; PRESELLO, D.; LEWI, D. M. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. **Electronic Journal of Biotechnology** ISSN: 0717-3458. 2012.

GORJI, A. H.; ZOLNOORI, M.; JAMASBI, A.; ZOLNOORI, Z. In vitro plant generation of tropical maize genotypes. **International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology IPCBEE** vol.16 (2011).

GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. J. Plant regeneration from tissue cultures of maize. **Crop Science**, Madison, v. 15, p. 417-421, 1975.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética em plantas**. Brasília: Embrapa - SPI, 1999. v. 2, p. 533-568.

GUPTA, P.; RAGHUVANSHI, S.; TYAGI, A. K. (2001) Assessment of the efficiency of various gene promoters via biolistics in leaf and regenerating seed callus of millets, *Eleusine coracana* and *Echinochloa crusgalli*. **Plant Biotechnol.** v.18, p.:275-282.

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

HERNANDEZ-GARCIA, C.M.; FINER, J.J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. **Plant Science**, 217-218:109-119, 2014.

ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. Agrobacterium mediated transformation of maize. **Nature Protocols**, 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**, v. 14, p. 745-750, 1996.

LAMACCHIA, C.; SHEWRY, P. R.; DI FONZO, N.; FORSYTH, J. L.; HARRIS, N.; LAZZERI, P. A.; NAPIER, J. A.; HALFORD, N. G.; BARCELO, P. Endosperm specific activity of a storage protein gene promoter in transgenic wheat seed. **J. Exp. Bot.** v.52, p.243–250, 2001.

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**, v. 52, p. 457-469. 2007.

LU, C.; VASIL, V.; VASIL, I.K. Improved efficiency of somatic embryogenesis in tissue culture of maize (*Zea mays* L.). **Theor. Applied Genet.**, v.66, p.285-289, 1983.

LUPOTTO, E, REALI, A, PASSERA, S, CHAN, M.T. Maize transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. 1998.

MARZABAL, P.; BUSK, P. K.; LUDEVID, M. D.; TORRENT, M. The bifactorial endosperm box of gamma-zein gene: characterization and function of the Pb3 and GZM cis-acting elements. **Plant J.** v.16, n.41–52, 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant physiology**, Bethesda, v. 15, p. 473-497, 1962.

ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N.-H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, v. 313, p.810–812, 1985.

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

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

POTENZA C; ALEMAN L; SENGUPTA-GOPALAN C. Targeting transgene expression. In research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v.40, p.1-22, 2004.

QUE, Q.; ELUMALAI, S.; LI, X.; ZHONG, H.; NALAPALLI, S.; SCHWEINER, M.; FEI, X.; NUCCIO, M.; KELLIHER, T.; GU, W.; CHEN, Z.; CHILTON, M.D.M. Maize transformation technology development for commercial event generation. **Frontiers Plant Sci.**, v.5, p.1-19, 2014.

SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Genótipos de milho com alta capacidade para embriogênese somática e regeneração de plantas obtidos a partir de calos. **Scientia Agricola**, v.57(4), p.717-722, 2000.

SCHAFFNER, A. R.; SHEEN, J. Maize rbcS promoter activity depends on sequence elements not found in dicot rbcS promoters. **Plant Cell**, v.3, p.997-1012, 1991.

SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; HYTEN, D. L.; et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v.463, n.7278, p. 78-183, 2010.

VASIL, V.; LU, C.; VASIL, I. K. Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). **Protoplasma**, New York, v.127, p.1-8, 1985.

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.

WHITE, J.; CHANG, S.Y.; BIBB, M.J.; A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygroscopicus* a selectable marker for plant transformation. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.4, p.1062, 1990.

Capítulo 1

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE MILHO TROPICAL

RESUMO

SOUZA, Rafaeli Aparecida Vieira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Embriogênese somática de milho tropical**. Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Coorientadores: Sérgio Hermínio Brommonschenkel e Geraldo Magela de Almeida Cançado.

Sistemas de regeneração de plantas a partir de células somáticas constituem-se em requisito de fundamental importância para a produção de plantas transgênicas de milho. A metodologia mais estudada para a regeneração de milho *in vitro* é a embriogênese somática e está diretamente relacionada a algumas características, como a escolha do material vegetal, explante e a composição do meio de cultivo. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes meios de cultivo e concentrações de 2,4-D e dicamba para produção de calos embriogênicos do tipo I e II, utilizando como explante, embriões imaturos da linhagem elite tropical L3 da Embrapa Milho e Sorgo, visando otimizar o protocolo de transformação genética do milho tropical. Embriões imaturos foram cultivados em três diferentes meios de indução de calos: M1 (Meio basal N6, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de caseína hidrolisada, 100 mg L⁻¹ de mio inositol; 2,9 g L⁻¹ de L-prolina e; 15 mg L⁻¹ de nitrato de prata); M2 (Meio basal N6, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de caseína hidrolisada, 2,9 g L⁻¹ de L-prolina, 0,01 g L⁻¹ de MES, 5,5 mg L⁻¹ de glicina e, 0,85 mg L⁻¹ de nitrato de prata) e; M3 (Meio basal MS, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,7 g L⁻¹ de L-prolina, 0,5 g L⁻¹ de MES e 0,85 mg L⁻¹ de nitrato de prata). Todos os meios foram suplementados com 2,4-D (0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 30,0 mg L⁻¹) ou dicamba (0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg L⁻¹) e a porcentagem de calos embriogênicos formados foi avaliada. Para maturação dos calos foram testados diferentes combinações de BAP (0; 0,1; 0,5; 1,0 mg L⁻¹) ou ANA (1,0 mg L⁻¹) e CuSO₄ (0; 1,25 mg L⁻¹) no meio MS com 60 g L⁻¹ de sacarose. A linhagem L3 apresentou alta capacidade para produção de calos embriogênicos do Tipo II em meio basal N6 suplementado com 10 mg L⁻¹ de 2,4-D. Para a maturação dos calos embriogênicos, o tratamento sem reguladores de crescimento com adição de CuSO₄ possibilitou maior porcentagem de regeneração. O protocolo desenvolvido apresentou produção de 85% de calos embriogênicos e 45% de plantas regeneradas, sendo eficiente o suficiente para viabilizar sua utilização na produção de plantas transgênicas de milho.

ABSTRACT

SOUZA, Rafaeli Aparecida Vieira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2015. **Somatic embryogenesis of tropical maize**. Advisor: Aluizio Borém de Oliveira. Co-Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel and Geraldo Magela de Almeida Cançado.

Plant regeneration systems from somatic cells are in extremely important requirement for the production of transgenic maize plants. The methodology most studied for in vitro regeneration maize is somatic embryogenesis and is directly related to some features such as the choice of plant material, explant and the composition of the culture medium. The objective of this study was to evaluate different culture media and concentrations of 2,4-D and dicamba to produce embryogenic callus of type I and II, using as explants, immature embryos of tropical elite line L3 to optimize a genetic transformation protocol tropical maize. Immature embryos were grown on three different callus induction media M1 (N6 basal medium, 30 g L⁻¹ sucrose, 100 mg L⁻¹ casein hydrolyzate, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 2.9 g L⁻¹ and L-proline, 15 mg L⁻¹ of silver nitrate); M2 (N6 basal medium, 30 g L⁻¹ sucrose, 100 mg L⁻¹ casein hydrolysate, 2.9 g L⁻¹ L-Proline, 0.01 g L⁻¹ MES, 5.5 mg L⁻¹ glycine and 0.85 mg L⁻¹ of silver nitrate) and; M3 (MS basal medium, 30 g L⁻¹ sucrose, 0.7 g L⁻¹ L-proline, 0.5 g L⁻¹ MES and 0.85 mg L⁻¹ of silver nitrate). All media were supplemented with 2,4-D (0; 2.5; 5.0; 10.0; 15.0; 30.0 mg L⁻¹) or dicamba (0, 0.25, 0.5 ; 1.0; 2.0; 4.0 mg L⁻¹) and the percentage of embryogenic callus formed was evaluated. For maturation of calli were tested different combinations of BAP (0; 0.1; 0.5; 1.0 mg L⁻¹) or NAA (1.0 mg L⁻¹) and CuSO₄ (0, 1.25 mg L⁻¹) in MS medium with 60 g L⁻¹ sucrose. The line L3 presented high capacity for somatic embryogenesis Type II on N6 basal medium supplemented with 10 mg L⁻¹ 2,4-D. For the maturation of somatic embryogenesis, treatment without growth regulators with the addition of CuSO₄ allowed higher percentage of regeneration. The protocol developed production showed 85% of embryogenic callus and 45% of regenerated plants, being effective enough to allow its use in the production of transgenic maize plants.

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das maiores cultura de cereais produzidas no mundo, sendo uma fonte importante de nutrientes para homens e animais. É cultivado em todo o território brasileiro, e o Brasil ocupa o terceiro lugar em produção, ficando atrás dos Estados Unidos e da China. Na safra 2014/2015, a produção de milho alcançou aproximadamente 79,0 milhões de toneladas, com produtividade de 5.168 kg ha⁻¹ em 15.207,3 milhões de hectares de área plantada (CONAB, 2015). Esses números somente foram possíveis em função do melhoramento genético e das tecnologias de transformação genética de plantas, que disponibilizaram novas cultivares mais adaptadas aos estresses bióticos e abióticos.

A biotecnologia moderna está disponibilizando grande número de genes passíveis de serem utilizados para a melhoria genética do milho e as técnicas de transformação genética de plantas podem ser empregadas para alterar a funcionalidade *in vivo* desses genes via complementação, superexpressão ou silenciamento. Progressos expressivos foram conseguidos no desenvolvimento da tecnologia de transformação genética de milho na última década. A transformação genética do milho, considerada por algum tempo recalcitrante, tornou-se, atualmente, procedimento rotineiro em laboratórios públicos e privados (CARNEIRO et al., 2009A).

Para que a transformação genética seja capaz de gerar um produto final, é necessário otimizar as condições do cultivo *in vitro* para permitir a regeneração das plantas. Conseqüentemente, a escolha do meio de cultivo apropriado é de fundamental importância para a produção de plantas transgênicas. No caso do milho, existem poucos genótipos de origem tropical com características agrônômicas desejáveis e um protocolo definido para a produção de calos embriogênicos com alta capacidade de regeneração de plantas (GORJI et al., 2011)

A embriogênese somática é a metodologia mais estudada para a regeneração de milho *in vitro*. Esta técnica tem a vantagem de produzir uma estrutura bipolar com capacidade de germinação e regeneração em apenas um processo (CARNEIRO et al., 2009B). A embriogênese somática no milho foi descrita pela primeira vez por Green & Philips (1975) utilizando embriões imaturos como explante. Os calos embriogênicos formados a partir de embriões imaturos são mais eficientes para regenerar plantas em

comparação com outros explantes utilizados na cultura do milho (HUANG & WEI, 2004).

Segundo Vasil & Vasil (1984), o meio nutritivo mais utilizado para indução e manutenção de calos embriogênicos em gramíneas é o meio básico MS desenvolvido por Murashige & Skoog (1962). Protocolos para indução de calos Tipo II, a partir de embriões imaturos, para os genótipos selecionados A118, B73 e seus híbridos, foram desenvolvidos utilizando o meio básico N6 (CHU et al., 1975) modificado por Armstrong & Green (1985) e posteriormente por Songstad et al., (1991). Estas modificações incluem a adição de L-prolina, caseína hidrolisada, nitrato de prata e substituição do ágar pelo phytigel como agente solidificante.

O herbicida sintético 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) é a auxina mais utilizada para indução e manutenção dos calos embriogênicos em gramíneas, sendo que concentrações variando de 0,5 a 5,0 mg L⁻¹ têm sido empregadas. Geralmente, a citocinina não é requerida para indução de calos em gramíneas, mas tem sido utilizada em combinação com auxinas, para elevar a produção de calos embriogênicos em algumas espécies (VASIL & VASIL, 1984; BHASKARAN & SMITH, 1990; GRANDO et al., 2002).

Culturas embriogênicas de milho apresentam duas formas de calos, do Tipo I e do Tipo II, que se diferem principalmente na eficiência de regeneração durante um prolongado tempo em cultivo. Os calos do Tipo I são compostos de dois tecidos distintos. Um tecido é duro, compacto, amarelo ou branco e normalmente capaz de regenerar plantas; o outro é granular, amarelo-pálido ou cinza-claro, translúcido e incapaz de regenerar plantas (VASIL, 1981). Os calos descritos como do Tipo II são macios, friáveis e altamente embriogênicos (ARMSTRONG & GREEN, 1985; TOMES & SMITH, 1985). Embora calos do Tipo II sejam os mais eficientes para a produção de plantas transgênicas de milho, calos do Tipo I podem também ser utilizados. A ocorrência de calos embriogênicos friáveis do Tipo II não é tão comum, sendo que apenas um número limitado de genótipos de milho é capaz de expressar este fenótipo em meio de cultivo (ARMSTRONG & GREEN, 1985).

A maioria dos estudos de transformação genética de milho é realizada com genótipos de clima temperado, sendo então necessário o desenvolvimento de protocolos aplicáveis para transformação genética de linhagens de milho tropical.

O objetivo foi avaliar diferentes meios de cultivo para produção e regeneração de calos embriogênicos dos tipos I e II, visando otimizar o protocolo de transformação genética da linhagem de milho tropical L3.

2. MATERIAL e MÉTODOS

Sementes de milho tropical (*Zea mays*) da linhagem L3, pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, foram plantadas em casa de vegetação em períodos escalonados para a obtenção do material vegetal. Os embriões imaturos de milho tropical foram colhidos entre 10-15 dias após polinização, com aproximadamente 1,5 a 2,0 mm. Para a assepsia, as espigas de milho foram despalhadas, enxaguadas com álcool 70% e mergulhadas em uma solução de 1:1 de hipoclorito de sódio (50%) e água destilada com duas gotas de detergente comercial, em agitação por 20 minutos. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, as mesmas passaram por tríplice lavagem com água destilada autoclavada e, logo após, os embriões zigóticos foram excisados com auxílio de bisturi e espátula.

Indução de calos embriogênicos

Os embriões zigóticos imaturos foram plaqueados em diferentes meios de cultivo para a indução de calo, conforme descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos meios de cultivo para indução de calos na embriogênese somática da linhagem L3 de milho tropical.

Meios*	Composição
M 1	Sais e vitaminas N6 (Chu et al., 1975); 30 g L ⁻¹ de sacarose; 100 mg L ⁻¹ de caseína hidrolisada; 100 mg L ⁻¹ de mio inositol; 2,9 g L ⁻¹ de L-prolina; 15 mg L ⁻¹ de nitrato de prata; 3 g L ⁻¹ de Phytigel e; pH 5,8.
M 2	Sais e vitaminas N6 (Chu et al., 1975); 30 g L ⁻¹ de sacarose; 100 mg L ⁻¹ de caseína hidrolisada; 2,9 g L ⁻¹ de L-prolina; 0,01 g L ⁻¹ de MES; 5,5 mg L ⁻¹ de glicina; 0,85 mg L ⁻¹ de nitrato de prata; 3 g L ⁻¹ de Phytigel e; pH 5,8.
M 3	Sais e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962); 30 g L ⁻¹ de sacarose; 0,7 g L ⁻¹ de L-prolina; 0,5 g L ⁻¹ de MES; 0,85 mg L ⁻¹ de nitrato de prata e; 3 g L ⁻¹ de Phytigel e; pH 5,8.

*M1=Gonçalves et al., 2010; M2= Anami et al., 2010; M3= Anami et al., 2010;

As auxinas utilizadas foram o 2,4-D e o dicamba em diferentes concentrações (0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 30,0 mg L⁻¹ de 2,4-D ou 0; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 4,0 mg L⁻¹ de dicamba) para os três diferentes meios utilizados, totalizando 36 tratamentos.

Os embriões foram orientados com o eixo embrionário em contato com o meio de cultivo. As placas foram fechadas com filme PVC e incubadas no escuro em sala de crescimento com temperatura de 28°C por 45 dias, sendo subcultivados a cada 15 dias.

Para avaliação desse experimento foi utilizado um fatorial triplo 3x2x6 (Fator 1: Meios; Fator 2: Reguladores; Fator 3: Doses).

O delineamento usado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. Cada repetição foi composta de 24 embriões imaturos, totalizando 96 embriões por tratamento. A variável analisada foi a porcentagem de calos do Tipo I e Tipo II. O software utilizado foi o programa R (R Core Team, 2015).

Maturação e regeneração dos calos embriogênicos

Para os experimentos de maturação e regeneração foi utilizado o meio de indução de calos mais eficiente selecionado inicialmente. 500 embriões zigóticos imaturos foram inoculados e mantidos no escuro por 45 dias, sendo subcultivados a cada 15 dias para a obtenção de calos embriogênicos do Tipo II.

Os calos embriogênicos obtidos foram subcultivados em meio de maturação (meio básico MS sais e vitaminas, 60 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-Inositol, 6 g L⁻¹ de phytigel), acrescido ou não de 1,25 mg L⁻¹ de sulfato de cobre (CuSO₄) e diferentes combinações dos reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) (0; 0,1; 0,5; 1,0 mg L⁻¹) e ácido naftaleno acético (ANA) (0; 1,0 mg L⁻¹).

As placas foram fechadas com filme PVC e incubadas no escuro em sala de crescimento com temperatura de 28°C por 30 dias.

Os calos maturados foram transferidos para o meio de regeneração de plantas, sendo utilizado o meio básico MS sais e vitaminas com 30 g L⁻¹ de sacarose, cultivados a 28°C com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa 36 μmol m⁻² s⁻¹, até a germinação das plantas. Plantas com aproximadamente 5 cm de comprimento foram aclimatizadas em casa de vegetação.

Para avaliação desse experimento foi utilizado um fatorial duplo 8x2 (Fator 1: doses; Fator 2: CuSO₄). O delineamento usado foi o inteiramente casualizado, com

cinco repetições por tratamento. Cada repetição foi composta de quatro calos embriogênicos, totalizando 20 calos embriogênicos por tratamento. As variáveis analisadas foram porcentagem de calos maturados e porcentagem de plantas regeneradas. O software utilizado foi o programa R (R Core Team, 2015).

3. RESULTADOS

Para a indução de calos embriogênicos foram utilizados embriões imaturos com 12 dias após a polinização, com cerca de 1,5 a 2,0 mm de comprimento.

Sete dias após a inoculação dos embriões imaturos nos meios de cultivos com as auxinas, 2,4-D ou o dicamba os tratamentos apresentaram-se homogêneos, começando pelo intumescimento dos embriões e posteriormente o aparecimento de uma massa pequena de calo. Apesar da alta concentração de auxinas, que normalmente inibe a germinação, houve o alongamento dos coleótilos dos embriões que foram excisados do calo em formação após sete dias de cultivo. Nos tratamentos sem reguladores de crescimento, ocorreu a germinação dos embriões zigóticos, e não houve a formação de calo.

Como o experimento foi repetido quatro vezes, observou-se que a sazonalidade influenciou o tamanho dos embriões pois, dependendo da época de cultivo do milho na casa de vegetação, o período de coleta dos embriões com tamanho entre 1,5 a 2 mm variou entre 10 a 15 dias após a polinização. Na cultura de tecidos esses fatores devem ser considerados em função das questões fisiológicas da planta utilizada como o material vegetal, o que pode influenciar, diretamente, nos processos de embriogênese somática. O material vegetal utilizado nesse experimento foi a linhagem elite de milho tropical L3, do programa de melhoramento genético da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS).

Indução de calos embriogênicos

Para a indução de calos embriogênicos foram testados três meios de cultivo. O meio M1 foi composto de meio básico de N6, com altas concentrações de nitrato de prata, prolina e caseína hidrolisada. O meio M2 foi composto de meio básico N6, porém

com concentrações menores de nitrato de prata e sem a presença da caseína hidrolisada. O meio M3 foi composto de meio básico MS com concentração baixa de prolina, nitrato de prata e sem caseína. Para cada meio foram testadas doses de 2,4-D (0; 2,5; 5; 10; 15 e 30 mg L⁻¹) ou dicamba (0, 0,25; 0,50; 1; 2; 4 mg L⁻¹). As variáveis analisadas foram a porcentagem de calos do Tipo I e Tipo II.

Para a variável analisada calo Tipo I, os resultados da análise estatística mostraram que houve interação entre os fatores analisados (reguladores e doses). O teste de regressão mostrou que nenhuma curva se ajustou para os dados obtidos dos tratamentos onde se utilizou diferentes doses de 2,4-D para a obtenção de calos do Tipo I. O regulador dicamba apresentou as maiores porcentagens de formação de calos do Tipo I. Os resultados de formação de calos para os meios 1, 2 e 3 suplementado com o regulador dicamba apresentaram comportamento quadrático, sendo que, nos calos formados nos meios 2 e 3, pôde-se observar incremento até a concentração de 1 mg L⁻¹, estabilizando mesmo com o aumento da concentração de dicamba. Contudo, para o M1, a elevação das doses de dicamba foi acompanhado pelo aumento nas porcentagens de formação de calos do Tipo I (Figura 1).

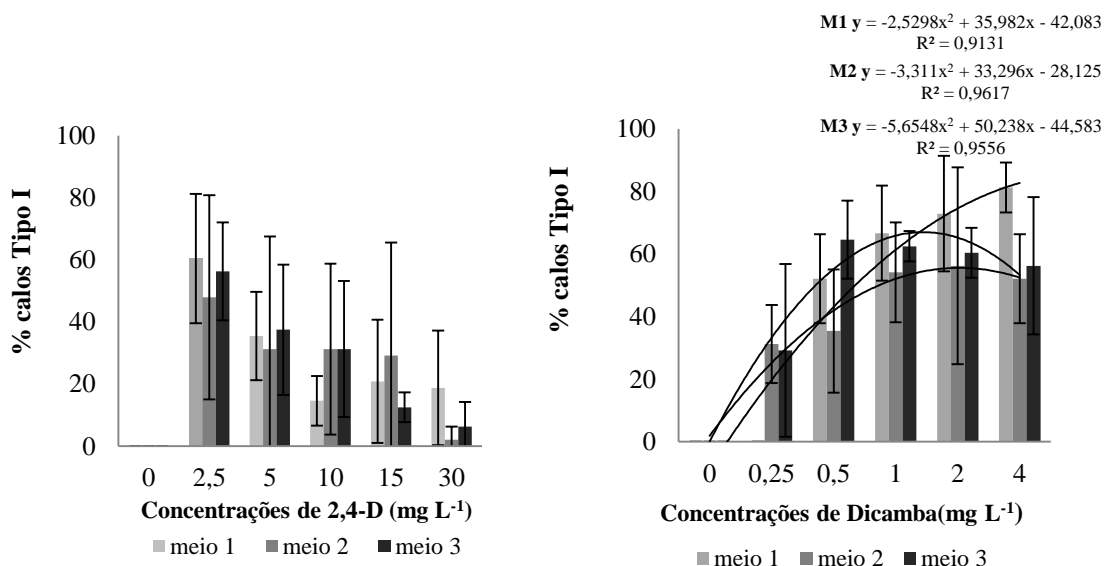


Figura 1. Porcentagem de calos Tipo I obtidos com os meios M1, M2 e M3 suplementados com os reguladores 2,4-D (0; 2,5; 5; 10; 15 e 30 mg L⁻¹) ou dicamba (0, 0,25; 0,50; 1; 2; 4 mg L⁻¹).

Para a variável analisada calo Tipo II, os resultados da análise estatística revelaram que houve interação tripla entre os fatores analisados (meios, reguladores e doses). O meio M1 apresentou as maiores porcentagens de formação de calos do Tipo II quando o regulador de crescimento utilizado foi 2,4-D nas concentrações de 10, 15 ou 30 mg L⁻¹, doses nas quais houve a estabilização e queda na curva de tendência, conforme Figura 2. Para o regulador dicamba, independente do meio utilizado, a formação de calos do Tipo II ocorreu na concentração de 2 mg L⁻¹, havendo elevação na concentração de 4 mg L⁻¹, apresentando formação de calos inferior quando comparado com o regulador 2,4-D (Figura 2).

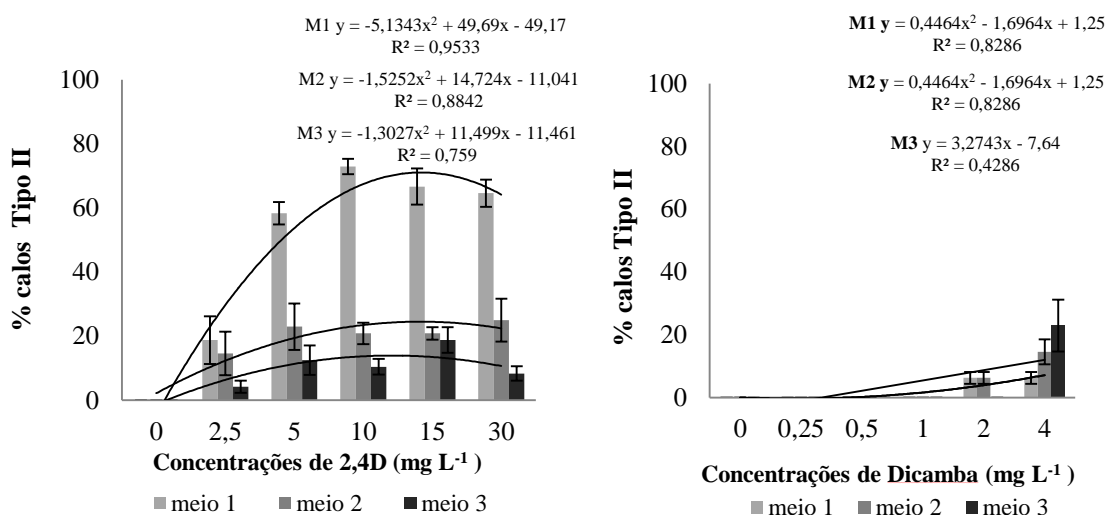


Figura 2. Porcentagem de calos Tipo II obtidos com os meios M1, M2 e M3 suplementados com os reguladores 2,4-D (0; 2,5; 5; 10; 15 e 30 mg L⁻¹) ou dicamba (0, 0,25; 0,50; 1; 2; 4 mg L⁻¹).

Nos resultados obtidos no M1 os calos apresentaram crescimento rápido, apresentando numerosos embriões em estágio globular e altamente friáveis, quando se utilizou o regulador 2,4-D, conforme Figura 3.

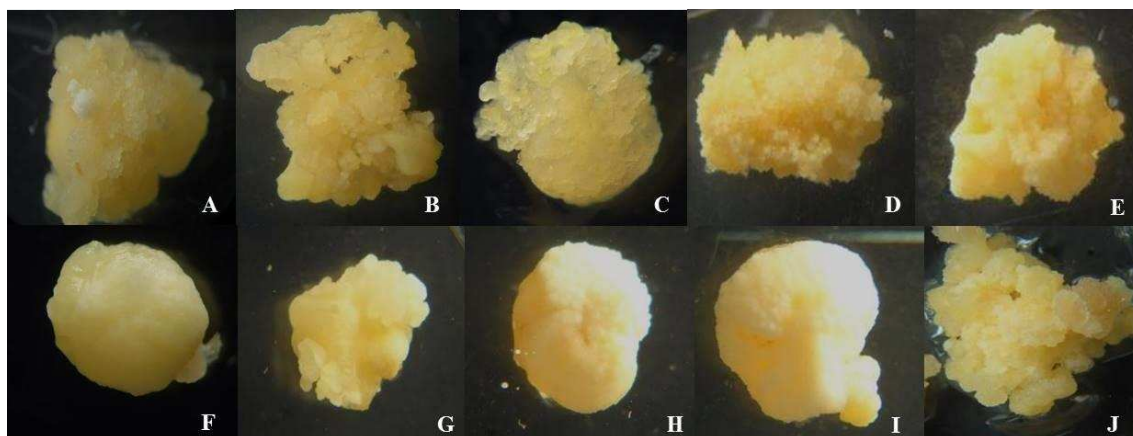


Figura 3. Calos obtidos após 45 dias no meio de cultivo M1 com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4D (A) 2,5 mg L⁻¹, (B) 5,0 mg L⁻¹, (C) 10,0 mg L⁻¹, (D) 15,0 mg L⁻¹, (E) 30,0 mg L⁻¹, e Dicamba (F) 0,25 mg L⁻¹ (G) 0,50 mg L⁻¹, (H) 1,0 mg L⁻¹, (I) 2,0 mg L⁻¹, (J) 4,0 mg L⁻¹.

Nos resultados obtidos com o meio de cultivo M2, os calos apresentaram uma formação grossa e dura, característica de calos do Tipo I, nos tratamentos em que o regulador dicamba estava presente (Figura 4).

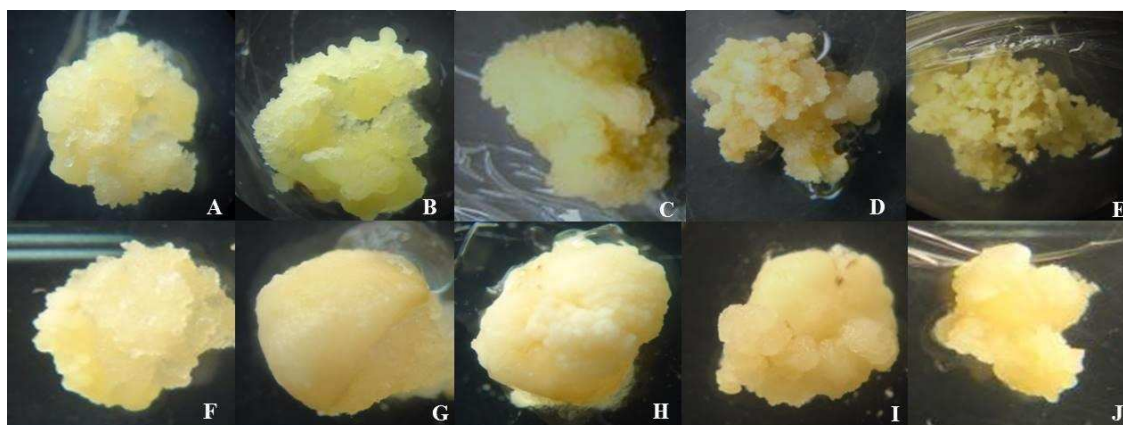


Figura 4. Calos obtidos após 45 dias no meio de cultivo M2 com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4D (A) 2,5 mg L⁻¹, (B) 5,0 mg L⁻¹, (C) 10,0 mg L⁻¹, (D) 15,0 mg L⁻¹, (E) 30,0 mg L⁻¹, e Dicamba (F) 0,25 mg L⁻¹, (G) 0,50 mg L⁻¹, (H) 1,0 mg L⁻¹, (I) 2,0 mg L⁻¹, (J) 4,0 mg L⁻¹.

O meio de cultivo M3 apresentou baixa formação de calos do Tipo II, mesmo com a adição das auxinas 2,4-D ou dicamba. Os calos do Tipo I produzidos no meio M3

apresentaram coloração amarela escura e, nas concentrações 0,25 e 0,5 de dicamba, os calos apresentaram formação de raízes (Figura 5).

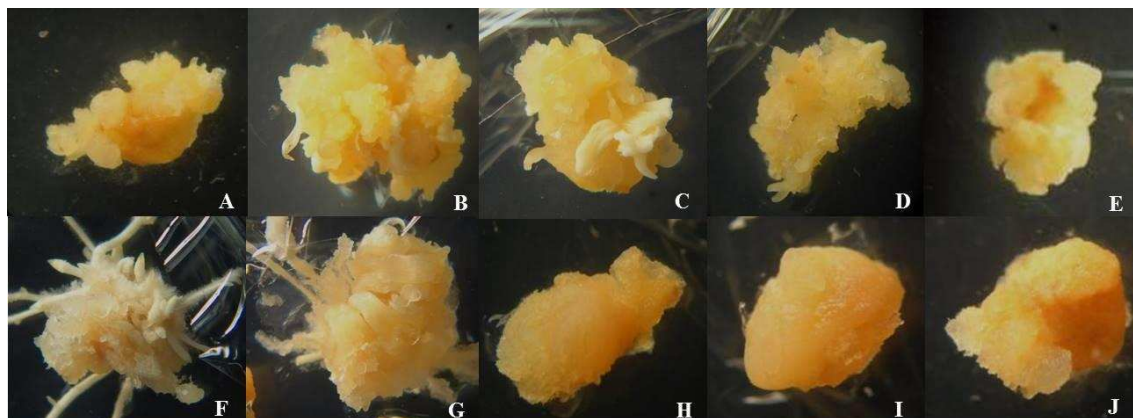


Figura 5. Calos obtidos após 45 dias no meio de cultivo M3 com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4D (A) 2,5 mg L⁻¹, (B) 5,0 mg L⁻¹, (C) 10,0 mg L⁻¹, (D) 15,0 mg L⁻¹, (E) 30,0 mg L⁻¹, e Dicamba (F) 0,25 mg L⁻¹, (G) 0,50 mg L⁻¹, (H) 1,0 mg L⁻¹, (I) 2,0 mg L⁻¹, (J) 4,0 mg L⁻¹.

Maturação e regeneração dos calos embriogênicos

Não houve interação entre os fatores analisados. Apenas o fator CuSO₄ apresentou diferenças para os fatores estudados. Os tratamentos onde o CuSO₄ estava presente mostraram-se maiores em relação aos tratamento na ausência de CuSO₄ (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem média de calos maturados e número de plantas regeneradas com 1,25 mg L⁻¹ CuSO₄ e sem CuSO₄.

Tratamentos	Calos maturados (%)	Nº de Plantas regeneradas
Com CuSO ₄	92,5 a	9,0
Sem CuSO ₄	76,87 b	4,8
CV(%)	27,44	-

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente a 5% pelo teste de Tukey.

Nesse experimento foi possível observar lenta maturação dos calos embriogênicos da linhagem L3, que variou entre 15 e 45 dias (Figura 5b).

Os calos maturados foram transferidos para o meio de germinação (Meio MS básico ½ força + 15 g sacarose/ sem reguladores de crescimento) e mantidos em sala de crescimento com temperatura de 28°C com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa

de $36 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, até a formação das plantas. A partir do terceiro dia começou a ser observado a presença de raízes e folhas em alguns dos tratamentos (Figura 5d). Aos 15 dias, o número de plântulas regeneradas por tratamento foi contabilizado, conforme descritos na tabela 2.

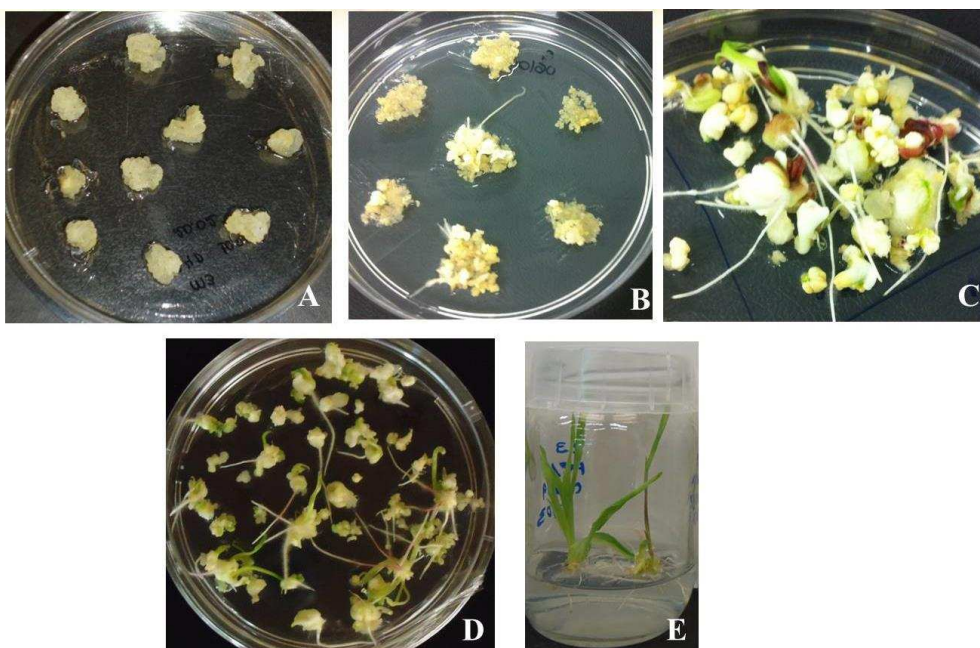


Figura 5. Calos embriogênicos (a), calos em processo de maturação com 15 dias (b); calos maturados em meio de germinação (c e d) e; plântula regenerada (e).

4. DISCUSSÃO

A capacidade de uma célula somática, sob condições apropriadas *in vivo* ou *in vitro*, em iniciar um desenvolvimento embriogênico, é conhecida como embriogênese somática (Ji et al., 2011). O sucesso na indução da embriogênese somática requer condições específicas como o genótipo, o explante, o meio de cultivo, o regulador de crescimento utilizado, dentre outras.

O genótipo é um fator chave afetando a embriogênese somática. Um pequeno número de genótipos de milho são responsivos *in vitro*, ou seja, poucos genótipos apresentam a capacidade de produção de calos embriogênicos e posterior regeneração *in vitro* de forma eficiente.

O híbrido de milho HiII foi desenvolvido especialmente para uso em processos biotecnológicos, uma vez que, apresenta alta frequência de produção de calos embriogênicos e regeneração de plantas *in vitro* (ARMSTRONG & GREEN, 1985). O híbrido Hi-II é de clima temperado, sendo muito utilizado no processo de indução de calos embriogênicos após processos de transformação genética. A dose recomendada de 2,4-D para a produção de calos do Tipo II é $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, conforme Frame et al., (2002). Para a linhagem tropical L3 utilizada nesse experimento, a dose indicada para a produção de calos do Tipo II foi 10 mg L^{-1} de 2,4-D.

As auxinas são consideradas importantes na regulação da embriogênese somática (FEHÉR et al., 2003). Esta sensibilidade pode ser evidenciada pelo fato que, somente tecidos responsivos reagem à presença das auxinas. No entanto, diferenças nas respostas podem ocorrer dependendo da espécie, genótipo ou do tecido de explantes com diferentes origens em uma mesma planta (DUDITS et al.,1995). Este relato pode ser evidenciado nesse trabalho, onde, a concentração de 2,4-D utilizada para a produção de calos do Tipo II na linhagem L3 foi aproximadamente sete vezes maior comparado ao utilizado por Frame et al., (2002) para o híbrido HiII.

Em geral, o estado fisiológico e de desenvolvimento de um explante impacta a embriogênese somática. Portanto, a seleção do explante apropriado é um fator crucial para a indução da embriogênese somática. Em milho, embriões imaturos têm sido amplamente utilizados, visto que, apresentam a capacidade de formar calos embriogênicos, dos quais plantas são facilmente regeneradas (LU, VASIL e VASIL 1983; CARVALHO, et al. 1997; OMBORI et al. 2008; ANAMI et al.; 2010; AKOYI et al., 2013).

Os componentes do meio base tem papel complexo na embriogênese somática. Existe principalmente dois meios diferentes utilizados na embriogênese somática de milho (N6 e MS). Neste, e em outros trabalhos, o meio básico N6 foi superior na indução de calos Tipo II quando comparado ao meio básico MS (ARMSTRONG & GREEN, 1985; KAMO et al., 1985, KAMO e HODGES, 1986). Isso pode ser devido a menor taxa de nitrogênio inorgânico contido no meio N6.

O meio MS é amplamente utilizado para várias culturas. O elemento chave deste meio nutritivo é a presença de elevados níveis de nitrogênio na forma de nitrato de amônio (NH_4NO_3) que tem se mostrado benéfico para a indução de embriogênese

somática. O nitrato, como única fonte de nitrogênio, é responsável por uma taxa de crescimento razoável para algumas culturas como a cenoura, por exemplo. No entanto, há espécies como o arroz, que não crescem bem na presença de apenas nitrato como única fonte de nitrogênio. No caso do milho, em particular, os resultados obtidos nesse trabalho revelam que os meios M2 e M3, não foram eficientes em comparação ao meio M1, que apresentou as maiores médias de produção de calos do Tipo I quando se utilizou o regulador de crescimento dicamba e calos do Tipo II quando se utilizou o regulador 2,4-D. A indução de calos em meio M1, com 2,4-D na dose de 10 mg L⁻¹, apresentou maior eficiência na formação de calos do Tipo II, sendo este, o meio mais indicado para a linhagem L3.

Songstad et al., (1991) também utilizaram o meio básico N6 suplementado com L-prolina, caseína hidrolisada, 2,4-D e nitrato de prata (AgNO₃) no meio de indução de calos, bem como phytigel como agente solidificante, e obtiveram grande impacto na frequência da indução de calo Tipo II. Resultados semelhantes a este foram observados nesse trabalho, porém, as concentração de 10 mg L⁻¹ de 2,4-D e 15 mg L⁻¹ de AgNO₃ ao meio de cultivo foram altas, pois em média utiliza-se 1,5 mg l de 2,4-D e 0,85 mg de AgNO₃, porém eficazes na produção de calos embriogênicos na linhagem tropical L3.

O AgNO₃ age como inibidor do gás etileno, e tem sido empregado na cultura de tecidos com efeito positivo na embriogênese somática. No meio M1, a alta concentração de AgNO₃ (15 mg L⁻¹) pode ter sido importante para obtenção de calos embriogênicos, indicando que pode existir uma relação benéfica entre o regulador 2,4-D e o AgNO₃. Muitos grupos de pesquisa demonstraram o efeito positivo do AgNO₃ na produção de calos do Tipo II em milho, que posteriormente, promoveram a regeneração (SONGSTAD et al. 1991; VAIN HORT et al. 1989; VAIN HORT e FLAMENT, 1989).

A prolina também exerce papel importante, atuando no ajuste osmótico, na manutenção do pH citoplasmático, na proteção contra desnaturação de enzimas, no sequestro de radicais livres, como reserva de carbono e nitrogênio, agindo como um produto de desintoxicação do íon amônio. Neste trabalho, utilizou-se 2,9 g de prolina, conforme indicado no trabalho realizado por Armstrong e Green (1985).

Formas orgânicas de nitrogênio como a caseína hidrolisada, podem ser utilizadas na cultura de tecidos, e alguns trabalhos mostram que essas fontes de nitrogênio na embriogênese somática são muito importantes.

Para embriogênese somática de milho tropical, em alguns estudos o dicamba foi utilizado com sucesso na formação de calos do Tipo II, como visto no trabalho de Akoyi et al., (2013), onde a presença de dicamba no meio N6 aumentou a frequência de produção de calos embriogênicos de milho quando comparados com 2,4-D. Outros autores também obtiveram sucesso quando utilizaram o dicamba em gramíneas (DUNCAN et al. 1985; HUNSINGER & SCHAUZ 1987; BOHOROVA et al. 1995). Nesse estudo, o uso do dicamba não foi eficiente para produzir calos embriogênicos, ou do Tipo II, porém, apresentou produção de calos do Tipo I.

O calo Tipo I é altamente indiferenciado, não friável e é capaz de regenerar plantas através da organogênese e da embriogênese somática (LOZOVAYA et al., 2006). São embriogênicos, compactos, nodulares, de cor branco-amarelados e podem se proliferar em uma mistura de tecidos complexos (GREEN & PHILLIPS, 1975). Este calo é caracterizado pelo crescimento lento ou pela inabilidade de serem cultivados por longo período de tempo, podendo ocorrer germinação precoce dos seus embriões somáticos (OZIAS-AKINS & VASIL, 1982; ARMSTRONG & GREEN, 1985).

Os calos do Tipo II apresentam estrutura friável, crescimento rápido e numerosos embriões em estágio globular. Esses calos podem apresentar uma alta taxa de atividade embriogênica por um tempo prolongado, sem perder sua capacidade de regeneração de plantas (ARMSTRONG, 1994).

Para transformação genética, a obtenção de calos do Tipo I e Tipo II podem regenerar plantas, no entanto, os calos do Tipo II regeneram um maior número de plantas em comparação com os calos do Tipo I, que são pouco embriogênicos.

De acordo com a literatura, poucos genótipos de milho tropical são capazes de formar calos Tipo II, o que sugere a ocorrência de controle genético na determinação do tipo de resposta ao cultivo *in vitro* (TOMES & SMITH, 1985; HENRY et al., 1994). Entretanto, existem poucos relatos sobre os genes envolvidos na embriogênese somática e regeneração de plantas de milho. Wan et al., (1992) identificaram, através da análise de RFLP, seis regiões cromossômicas envolvidas na resposta ao cultivo *in vitro*. Armstrong et al., (1992) verificaram que a região cromossômica mais crítica para a formação de calos encontrava-se no braço longo do cromossomo 9. Portanto, a linhagem L3 estudada representa um material interessante para futuras investigações do controle genético da resposta ao cultivo *in vitro*.

Para maturação de calos embriogênicos, o uso de reguladores de crescimento BAP e ANA não foi eficaz. Esses resultados diferem dos encontrados por Huang & Wei (2004), Ombori et al. (2008) e Akoyi, et al., (2013), onde observaram que o BAP e ANA, no meio de cultivo de maturação de embriões somáticos, foram eficazes na maturação de embriões somáticos de milho.

O uso do cobre na concentração de $1,25 \text{ mg L}^{-1}$ no meio de maturação sem a presença de reguladores de crescimento foi eficiente. O cobre é um micronutriente essencial para o desenvolvimento normal das plantas. Uma das suas principais funções é como ativador ou constituinte de enzimas, porém, tanto o excesso quanto a ausência de cobre pode inibir o crescimento e prejudicar importantes processos celulares como a fotossíntese, síntese de pigmentos e o transporte de elétrons.

A maturação de calos estimula a progressão das fases iniciais para as fases tardias. Consiste em interromper os ciclos repetitivos de divisão celular e fornecer estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais para a diferenciação celular, para que os ciclos de desenvolvimento e de maturação originem um grande número de embriões somáticos maduros, de alta qualidade e aptos a converterem-se em plantas (GUERRA, TORRES e TEIXEIRA, 1999).

As auxinas e as citocininas são os principais reguladores de crescimento envolvidos na regulação da divisão e diferenciação celular em plantas (FEHER, et al., 2003). As influências da aplicação de auxinas exógenas, preferencialmente o 2,4D, sobre a indução de calos embriogênicos são bem documentados (DUDITS et al., 1991; LU, VASIL e VASIL 1983; CARVALHO, et al. 1997; OMBORI et al. 2008; ANAMI et al.; 2010; AKOYI et al., 2013). No entanto, a maturação de embriões somáticos tem sido relatada na ausência de 2,4D, bem como na presença de outros reguladores de crescimento, tais como citocinina, ou ácido abscísico. Outros componentes podem também ser utilizados para promover a maturação de calos embriogênicos, tais como, alta concentração de sacarose e de agente gelificante, e a adição de metais pesados também podem ajudar nesse processo (FEHER, et al., 2003).

De acordo com os resultados obtidos nesse experimento de maturação, e a presença do sulfato de cobre, a alta concentração de sacarose e de phytagel no meio sem o uso de reguladores BAP e ANA, foram eficazes na maturação de embriões somáticos da linhagem L3

5. CONCLUSÕES

O meio de cultura com concentrações elevadas de prolina, nitrato de prata e caseína hidrolisada, suplementado com 2,4-D, é mais eficiente para produção de calos do Tipo II na linhagem de milho tropical L3. A presença de CuSO_4 no meio de cultura, mesmo sem a adição de reguladores de crescimento, eleva a maturação dos calos e consequentemente a regeneração de plantas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOYI, J., MGUTU, A. J., MACHUKA, J., VAN LIJSEBETTENS, M., TARACHA, C., & ANAMI, S. E. Dicamba growth regulator promotes genotype independent somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of tropical maize inbred lines. **Journal of Life Sciences**, 7(7), 677–689, 2013.

ANAMI, S.; MGUTU, A.; TARACHA, C.; COUSSENS, G.; KARIMI, M.; ET AL. Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 102, n. 3, p. 285-295, 2010.

ARMSTRONG, C.L.; ROMERO-SEVERSON, J.; HODGES, T.K. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.84, p.755-762, 1992.

BOHOROVA, N. E.; FENELL, S.; MALEAN, S.; PELLEGRINESCHI, A.; HOISINGTON, D. E. **Laboratory protocols: CIMMYT Applied Genetic Engineering Laboratory**. México D.F.: CIMMYT, 1999.

CARNEIRO, A. A.; GUIMARÃES, C.T.; VALICENTE, F.H.; WAQUIL, J.M. ETAL. **Milho Bt: Teoria e Prática da Produção de Plantas Transgênicas Resistentes a Insetos-Praga**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, dez. 2009A. 26p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 135).

CARNEIRO, A. A.; PINTO, G. T. C.; PÔSSA, K. F.; PEREIRA, M. F. et al. **Transformação Genética de Embriões Zigóticos da Linhagem de Milho Tropical L3 Mediada por *Agrobacterium Tumefaciens***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, dez. 2009B. 26p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 132).

CARVALHO, C.H.S.; BOHOROVA, N.E., 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**, v.17, p.73-76, 1997

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

CONAB, 2015. **Safras – Grãos**. Capturado em 22 set. 2014. Online. Disponível na Internet: <http://www.conab.gov.br>.

GONÇALVES, L.C.S.; MIRANDA, S.A.; PEREIRA, M.F.; VASCONCELOS, M.J.V.; CARNEIRO, A.A. Indução de calos embriogênicos em milho tropical em diferentes concentrações de 2,4-D. XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. CD-Rom.

DUDITS D, GYÖRGYÉY J, BOGRE L & BAKÓ L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *In Vitro Embryogenesis in Plants* (pp. 267–308). **Kluwer Academic Plant Mol. Biol.**, v.33, p.393–404, 1995.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201–228, 2003.

GREEN, C.E.; PHILLIPS, R.L. Plant regeneration from tissue cultures of maize. **Crop Science**, Madison, v.15, p.417-421, 1975.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. **Embriogênese somática e sementes sintéticas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética em plantas*. Brasília: Embrapa - SPI, 1999. v. 2, p. 533-568.

HENRY, Y.; VAIN, P.; DE BUYSER, J. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, v.79, p.45-58, 1994.

HUANG X. Q.; WEI Z. M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays L.*). **Plant Cell Rep.** v.22(11), p. 793–800, 2004.

IRAQI, D.; TREMBLAY, F. M. The role of sucrose during maturation of blackspruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 111, p. 381-388, 2001.

LI, X.Y.; HUANG, F. H.; MURPHY, B.; GBUR JUNIOR, E E. Polyethylene glycol maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda L.*). **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v. 34, p. 22-26, 1998.

LU, C.; VASIL, V.; VASIL, I.K. Improved efficiency of somatic embryogenesis in tissue culture of maize (*Zea mays* L.). **Theor. Applied Genet.**, v.66, p.285-289, 1983.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant physiology**, Bethesda, v.15, p. 473-497, 1962.

OMBORI, O.; GITONGA, N.M.; MACHUKA, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea mays* L.) inbred lines. **Biotechnonology**, v.7 (2), p.224-232, 2008.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2015.

SONGSTAD, D.D.; ARMSTRONG, C.L. and PETERSEN, W.L. Silver nitrate increase type II callus production from immature embryos of maize inbred B73 and its derivatives. **Plant Cell Reports**, v. 9, n. 12, p. 699-702, 1991.

TOMES, D.T.; SMITH, O.S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v.70, p.505-509, 1985.

VAIN HORT, Y.P.; FLAMENT, P. Role of ethylene in embryogenic callus initiation and regeneration in *Zea mays* L. **Journal of Plant Physiology**, v. 135, n. 5, p. 537-540, 1989.

VAIN HORT, Y.P.; YEAN, H.; FLAMENT, P. Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L by AgNO₃. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 18, n.2, p.143-142, 1989.

WALKER, D. R.; PARROTT, W. A. Effect of polyethyleneglycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. **Plant Cell Tissue and Organ**, v. 64, p.55-62, 2001.

WAN, Y.; ROCHEFORD, T.R.; WIDHOLM, J.M. RFLP analysis to identify putative chromosomal regions involved in the anther culture response and callus formation of maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.360-365, 1992.

Capítulo 2

TRANSFORMAÇÃO DE EMBRIÕES IMATUROS DE LINHAGEM DE MILHO TROPICAL

RESUMO

SOUZA, Rafaeli Aparecida Vieira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Transformação de embriões imaturos de linhagem de milho tropical.** Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Coorientadores: Sérgio Hermínio Brommonschenkel e Geraldo Magela de Almeida Cançado.

A eficiência na transformação genética intermediada por *Agrobacterium tumefaciens* de linhagens de milho tropical é influenciada por vários parâmetros. Desenvolver metodologias de transformação adequadas para germoplasma tropical é primordial, para que a obtenção de plantas geneticamente modificadas seja possível. O objetivo foi testar duas metodologias de transformação genética utilizadas para o híbrido de clima temperado Hi-II, na linhagem tropical L3. A transformação dos embriões zigóticos foi realizada via *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101, portadora do plasmídeo binário pTF102 que contem os cassetes gênicos *P35S::gus::T35S* e *P35S::bar::Tvsp*. As duas metodologias testadas apresentam diferenças nos meios de infecção e co-cultivo. O meio de infecção utilizado nos Métodos 1 e 2 se diferiram na concentração dos sais do meio N6 e na presença ou ausência de AgNO₃. No meio de co-cultivo, o Método 1 apresentou apenas o antioxidante L-cisteína, e o Método 2, a combinação de L-cisteína + DTT (Ditiotreitol). A expressão do gene *gus* foi avaliada através de teste histoquímico em três diferentes tempos: após o período de co-cultivo; após o período de repouso e; após a período de seleção II. A eficiência de transformação foi verificada através da contagem das plântulas regeneradas. Os resultados obtidos revelam que o uso da baixa concentração de sais presentes no método 2 e a combinação dos antioxidantes presentes no meio de co-cultivo não aumentam a frequência de transformação de embriões zigóticos da linhagem de milho tropical L3.

ABSTRACT

SOUZA, Rafaeli Aparecida Vieira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2015. **Transformation immature embryos of tropical maize line.** Advisor: Aluizio Borém de Oliveira. Co-Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel and Geraldo Magela de Almeida Cançado.

The efficiency of genetic transformation tropical maize inbred lines mediated by *Agrobacterium tumefaciens* is influenced by various parameters. To develop appropriate transformation methods for tropical germplasm is essential to the production of genetically modified plants is possible. The goal was to test two methods of genetic transformation used for hybrid temperate Hi-II in the tropical line L3. The transformation of zygotic embryos was carried out via *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101, carrying the binary pTF102 plasmid containing the gene cassettes P35S::gus::T35S and P35S::bar::Tvsp. The two tested methods differ in the means of infection and co-cultivation. The infection medium used in Methods I and II differed in the concentration of the salts N6 medium and in the presence or absence of AgNO₃. The co-cultivation medium, Method I showed only L-cysteine antioxidant, and Method 2, the combination of L-cysteine + DTT (Dithiothreitol). The GUS gene expression was evaluated by histochemical test on three different times: after the period of cocultivation; After the resting period; after the selection period II. The transformation efficiency was checked by counting the regenerated seedlings. The results show that the use of low concentration of salt present in Method II and the combination of the antioxidants present in the co-cultivation do not increase the frequency of transformation zygotic embryos of tropical maize line L3.

1. INTRODUÇÃO

Os mecanismos de interação planta-patógeno são extremamente complexos e diversificados. Entre os diferentes tipos de parasitismo, o que utiliza a transferência de material genético como estratégia de colonização é um dos mais intrigantes, tendo sido descritos nos vírus e agrobactérias (BARROS et al., 2004). As agrobactérias transferem parte de seu material genético para o genoma da planta hospedeira, mecanismo denominado de colonização genética (SCHELL et al., 1979). Os genes transferidos são replicados, transcritos e traduzidos como se fossem da própria célula vegetal.

O processo de infecção de células vegetais pela *Agrobacterium tumefaciens* tem sido intensamente estudado, podendo ser considerado um dos sistemas de interação planta-patógeno melhor caracterizado em nível molecular (VEGA et al., 2008; FRAME et al., 2012; CHO et al., 2015). É um processo longo e elaborado que envolve as seguintes etapas: i) Identificação de sinais químicos emitidos pela planta e indução das proteínas de virulência da bactéria; ii) processamento do T-DNA por meio das proteínas de virulência presentes na bactéria; iii) infecção da planta-alvo pela *Agrobacterium* e transferência do T-DNA para a célula vegetal; iv) integração do T-DNA no genoma da planta por intermédio de proteínas hospedeiras e, v) expressão do T-DNA e indução de tumores na planta (GUO et al., 2011).

Essa metodologia de transformação genética tem a grande vantagem de poder transferir segmentos de DNA relativamente grandes com poucos rearranjos, e, integrar um baixo número de cópias do gene no genoma de várias espécies de plantas. A aplicação da transformação genética mediada por *A. tumefaciens*, até pouco tempo, estava limitada às plantas dicotiledôneas, devido ao fato de a maioria das monocotiledôneas e gimnospermas não serem infectadas naturalmente por essa bactéria, ou por apresentarem pouca suscetibilidade (BINNS & TOMASHOW, 1988). Atualmente, vários laboratórios já transformam, de maneira eficiente, diversas espécies de monocotiledôneas via *A. tumefaciens*, como por exemplo, arroz (HIEI et al., 1994), o trigo (CHENG et al., 1997), o sorgo (ZHAO et al., 2000) e o milho (VEJA et al., 2008; FRAME et al. 2012; CHO et al, 2015). O sucesso desses laboratórios se deve ao fato de que vários fatores que influenciam a transferência do T-DNA e a regeneração de células transgênicas em cultura de tecidos, tais como a virulência das estirpes bacterianas, os

vetores binários, o tipo e a idade do explante, a densidade da suspensão bacteriana, a composição dos meios de cultura e os genótipos utilizados, têm sido investigados possibilitando a obtenção de protocolos eficientes de transformação genética de cereais.

A transformação via *A. tumefaciens* vem sendo a metodologia de transferência gênica mais estudada para o milho nos últimos anos. Novos protocolos onde diferentes parâmetros foram testados, buscando aumentar a eficiência de transformação genética de cultivares de milho temperado, tais como a linhagem A188 e o híbrido HiII, foram publicados (ZHAO et al., 2001; FRAME et al., 2002; HUANG; WEJ, 2005; ISHIDA; HIEI; KOMARI, 2007; VEGA et al., 2007; FRAME et al., 2011). No entanto, a maioria dos genótipos de milho tropical ainda é considerada recalcitrante para a regeneração *in vitro* e à infecção por *Agrobacterium*. Portanto, para maior eficiência da utilização de cultivares transgênicas em programas de melhoramento de milho, existe a necessidade de aumentar a eficiência de geração de linhagens de milho tropical transgênicas, testando diferentes protocolos.

Para o híbrido Hi-II, a baixa concentração dos sais do meio N6 e o uso de agentes antioxidantes como L-cisteína e/ou ditiotreitol (DTT) (FRAME et al., 2002; 2006; VEGA et al., 2008) favoreceram o processo de transferência do T-DNA durante o estágio de co-cultivo, aumentando a frequência de eventos transformados (VEGA et al., 2008). O uso de antioxidantes no meio de infecção pode aumentar a compatibilidade patógeno-hospedeiro pela melhoria do efeito prejudicial da resposta hipersensível, levando a um aumento na taxa de sobrevivência de células infectadas com *A. tumefaciens* e, assim, um aumento na eficiência da transformação estável (LUPOTTO et al., 1998).

Para a linhagem tropical L3, ainda não existem informações sobre o uso dessa combinação de antioxidantes no aumento da frequência de transformação.

Objetivou-se verificar a eficiência de transformação via *A. tumefaciens* da linhagem elite tropical L3 utilizando duas metodologias de infecção e co-cultivo desenvolvidas para o milho temperado, visando a padronização da transformação genética dessa linhagem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Sementes da linhagem L3 pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo foram plantadas em casa de vegetação para a obtenção do material vegetal. Os embriões imaturos de milho tropical foram colhidos após 12 dias da sua polinização, com aproximadamente 1,5 a 2,0 mm de comprimento. Para a assepsia, as espigas de milho foram mergulhadas em uma solução de hipoclorito de sódio (50%) e água destilada com 2 gotas de detergente comercial, em agitação por 20 minutos. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, as mesmas passaram por tríplice lavagem com água destilada autoclavada.

Preparo de Agrobacterium tumefaciens

A *A. tumefaciens* utilizada para a transformação dos embriões zigóticos imaturos foi a estirpe desarmada EHA101, contendo o plasmídeo binário pTF102 (*P35S::gus::T35S* e *P35S::bar::Tvsp*) (FRAME et al., 2002).

Essa bactéria foi mantida em meio YEP (5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ peptona, 5 g L⁻¹ NaCl, 15 g L⁻¹ Bacto-agar e pH 6,8), contendo 100 mg L⁻¹ de espectinomicina, por até 4 semanas à 4°C. Culturas estoque de longa duração foram mantidas a -80°C em solução de glicerol.

Três dias antes da transformação, as culturas de *A. tumefaciens* mantidas a 4°C foram estriadas em meio YEP suplementado com espectinomicina.

Para a transformação foram distribuídos 5 ml de meio de infecção (Tabela 1) suplementado com 100 µM de acetoseringona (AS) em tubos de 50 mL. Em seguida, inoculou-se a *A. tumefaciens* EHA 101, até obter uma densidade de 0,3-0,4 (O.D₅₅₀=0,3-0,4). Posteriormente, o tubo foi incubado horizontalmente em shaker a temperatura de 22°C à 100 rpm, por 2 horas.

Transformação de embriões zigóticos de L3

Foram realizados quatro experimentos de transformação genética diferentes utilizando as metodologias de infecção 1 e 2. Nos diferentes experimentos, 200 embriões imaturos foram infectados para cada uma das metodologias testadas. Embriões

de uma mesma espiga foram divididos entre as duas metodologias para minimizar as diferenças de desenvolvimento que poderiam influenciar no processo de transformação. Os embriões foram acondicionados em tubos de 1,5 ml contendo 1,0 ml de meio de infecção suplementado com 100 μ M de AS, inicialmente sem *Agrobacterium*. Em seguida, o meio de infecção foi retirado, os embriões lavados em 1 ml deste mesmo meio e adicionado 1ml da suspensão de *Agrobacterium* contendo o plasmídeo pTF102. Os tubos foram gentilmente invertidos 20 vezes e incubados por cinco minutos no escuro. Após a infecção, os embriões foram transferidos para o meio de co-cultivo. Os embriões foram orientados com o eixo embrionário em contato com o meio de co-cultivo. As placas foram fechadas com micropore e incubadas no escuro a 20°C durante cinco dias.

Os meios de infecção e co-cultivo utilizados para a transformação genética de embriões imaturos da linhagem L3 foram os desenvolvidos por Frame et al. (2002) e Vega et al. (2008), denominados Método 1 e 2, respectivamente. A composição destes meios encontra-se descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Meios de infecção e co-cultivo utilizados na transformação da linhagem tropical L3.

Meios de cultivo/ Composição	Infecção		Co-cultivo	
	MI (1)	MI (2)	MCC (1)	MCC (2)
*N6 sais (g L ⁻¹)	4,0	2,0	4,0	2,0
2,4D (mg L ⁻¹)	1,5	1,5	1,5	1,5
Sacarose (g L ⁻¹)	68,4	68,4	30	30
Glicose (g L ⁻¹)	36	36	-	-
Prolina (g L ⁻¹)	0,7	0,7	0,7	0,7
MES (g L ⁻¹)	-	0,5	-	0,5
pH	5,2	5,2	5,8	5,8
Phytigel (g L ⁻¹)	-	-	3,0	3,0
N6vitaminas(1000x)(ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
Nitrato de prata (mg L ⁻¹)	-	0,85	0,85	0,85
Acetoseríngona (μ M L ⁻¹)	100	100	100	100
L-cisteína (mg L ⁻¹)	-	-	3,0	4,0
DTT (g L ⁻¹)	-	-	-	0,15

* Meio N6 (CHU et al., 1975).

Seleção e regeneração de plantas transgênicas

Após o período de co-cultivo, os embriões foram transferidos para o meio de repouso e incubados a 28°C no escuro por sete dias. A composição dos meios de repouso, de seleção, de maturação e de germinação está apresentada na Tabela 2. Para a seleção das células transformadas, os embriões foram transferidos por 30 dias para o meio de seleção I, sendo subcultivados a cada 15 dias. Posteriormente, os calos foram transferidos para o meio de seleção II por 15 dias. Calos que sobreviveram ao período de seleção foram transferidos para o meio de maturação e, após 30 dias, para o meio de germinação. Plântulas com aproximadamente 5 cm de comprimento foram aclimatadas em vasos de 2 L e, em seguida, transferidas para vasos de 30 L em casa de vegetação. Plantas T0 e T1 obtidas após a polinização das plantas foram tratadas em casa de vegetação com o herbicida Finale (1 mg L⁻¹). As plantas foram analisadas para tolerância ao herbicida sete dias após a aplicação.

Tabela 2. Meios de cultivo utilizados na transformação da linhagem tropical L3.

Meios de cultivo/ Composição	Concentrações				
	Repouso	Sel. 1	Sel. 2	Maturação	Germinação
N6 Sais* (g L ⁻¹)	4,0	4,0	4,0	-	-
MS Sais** (g L ⁻¹)	-	-	-	4,3	4,3
Sacarose (g L ⁻¹)	30	30	30	60	30
L- Prolina (g L ⁻¹)	0,7	0,7	0,7	-	-
MES (g L ⁻¹)	0,5	0,5	0,5	-	-
2,4D (mg L ⁻¹)	10	10	10	-	-
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
Phytigel (g L ⁻¹)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
N6 vit, 1000x (ml L ⁻¹)	1,0	1,0	1,0	-	-
MS vit, 1000x (ml L ⁻¹)	-	-	-	1,0	1,0
Nitrato de prata (mg L ⁻¹)	0,85	-	-	-	-
Cefotaxima (g L ⁻¹)	0,25	0,25	0,25	-	-
PPT (mg L ⁻¹)	-	1,5	3,0	-	-

*N6 (CHU et al., 1975);

**MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

Análise histoquímica de GUS

A expressão da β -glucuronidase foi avaliada através de teste histoquímico em três diferentes tempos: (i) após o período de co-cultivo; (ii) após o período de repouso e,

(iii) após o período de seleção II. Os calos obtidos nos diferentes estádios de desenvolvimento foram coletados e imersos em solução contendo 1 mM de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D glucuronide, 50 mM tampão fosfato pH 6,8, 20% de metanol e 1% de Triton X-100 (JEFFERSON et al., 1987; RUEB & HENSGENS, 1998). O resultado do ensaio histoquímico foi avaliado utilizando um estereoscópio Axio ZoomV16 Zeiss.

Análise molecular das plantas transgênicas

O DNA total de folhas das plantas crescidas em casa de vegetação foi isolado utilizando o protocolo descrito por Saghai-Maroo et al. (1984). A presença da construção gênica *P35S::bar::Tvsp* foi confirmada por PCR usando os primers 5' AGA AAC CAC GTC ATG CC e 3' TGC ACCATC GTC AAC CAC, que amplificam um produto de 407 pb. Cada reação de amplificação de 20 μ l continha 0,2 μ l de *Taq* DNA polymerase, 0,8 μ l de MgCl₂, 2 μ l dNTPs, 2 μ l de tampão, 11 μ l H₂O e 2 μ l de DNA. A amplificação foi realizada em aparelho Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C por 20 segundos; 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos gerados foram separados em géis de agarose 1%, corados com Gelred Nucleic Acid Stain na diluição de 1:100 (Biotium).

Delineamento e análise estatística

Na comparação das duas metodologias de infecção e co-cultivo utilizadas, avaliou-se: (i) número de embriões GUS positivos após o período de co-cultivo, de repouso e da seleção II e; (ii) número de eventos transgênicos obtidos e aclimatizados em casa de vegetação. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para a análise de variância utilizou-se o software programa R (R Core Team, 2015) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.RESULTADOS

Infecção de embriões imaturos de L3 por Agrobacterium tumefaciens

O primeiro passo no processo de transformação genética de uma planta intermediada pela *A. tumefaciens* é o contato entre o explante e a bactéria por um curto período de tempo. Após a infecção, os embriões são subcultivados em meio de co-cultivo, onde ocorrerá a transferência do T-DNA da *A. tumefaciens* para as células do explante, com uma duração média de três a sete dias. Neste estudo foram avaliados duas metodologias para a infecção e co-cultivo de embriões imaturos de L3 por *A. tumefaciens*. O MI (1) foi o estabelecido por Frame et al. (2002) para a transformação de embriões imaturos do híbrido HiII. O MI (2), baseado no MI (1), foi desenvolvido por Vega et al. (2008) visando otimização da transformação de HiII através da utilização de metade da concentração dos sais componentes do meio N6 e da adição de AgNO₃. Os meios de co-cultivo foram suplementados com L-cisteína (FRAME et al., 2002) ou L-cisteína e DTT (VEGA et al., 2008).

Das análises histoquímicas da expressão transiente do gene repórter *gus* em 10% dos embriões utilizados foi realizada cinco dias após a infecção, mostraram que ambos os meios de infecção e co-cultivo testados foram capazes de promover o processo de transferência do gene heterólogo, sendo que o método 1 foi melhor que o método 2 (Figura 1), e a análise estatística ratificou os resultados obtidos (Tabela 3). Embriões permaneceram por sete dias em meio de repouso após o período de co-cultivo e, novamente, a expressão do gene *gus* foi avaliada pela análise histoquímica.

Os resultados confirmaram as análises anteriores, demonstrando que a metodologia 1 foi mais eficiente que a metodologia 2 para a transferência do T-DNA de *A. tumefaciens* para as células do milho (Figura 1 e Tabela 3).

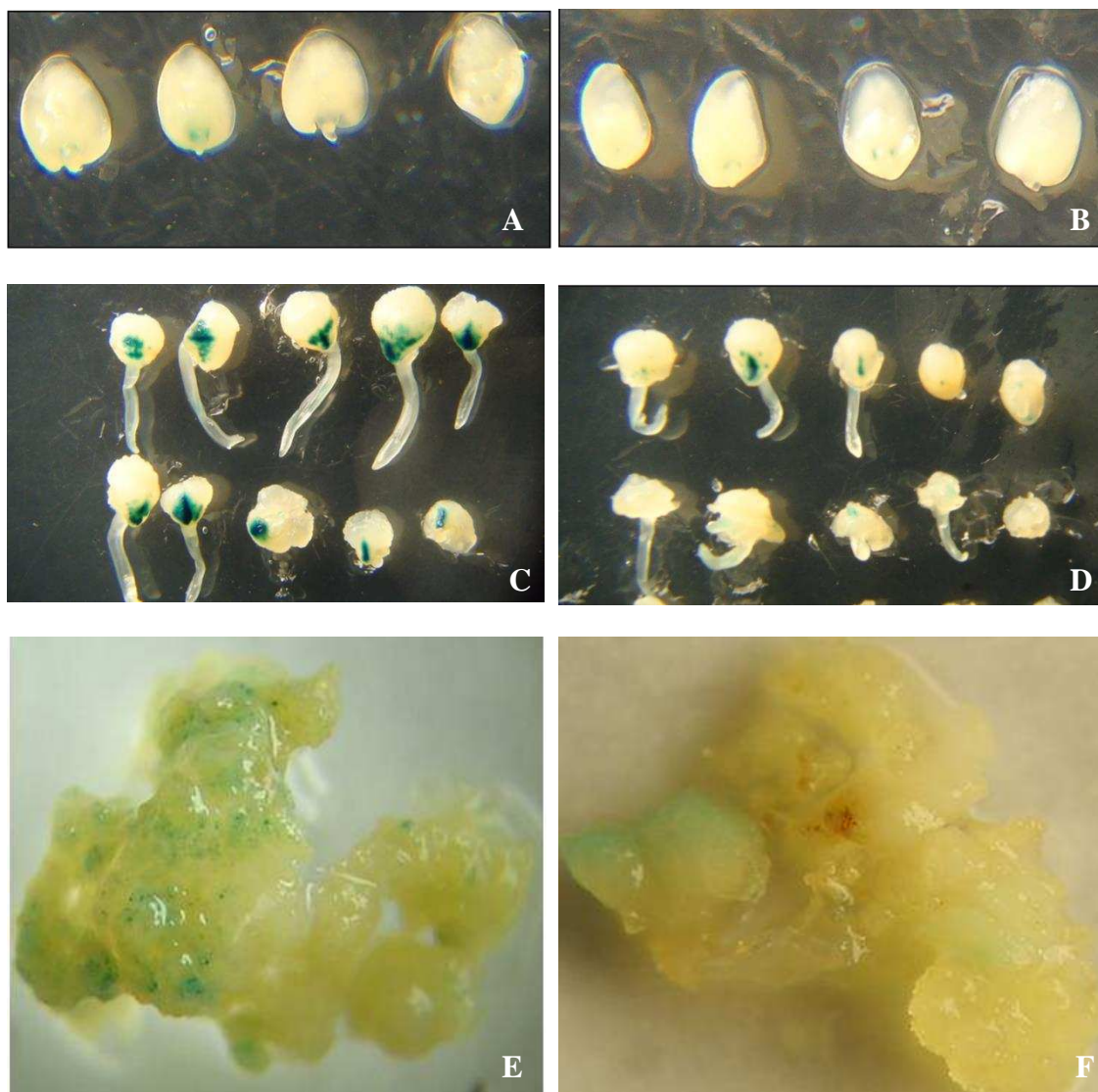


Figura 1. Teste histoquímico de GUS, realizado após a transformação de embriões imaturos de milho tropical. Cinco dias após co-cultivo, MI 1(A) e MI 2 (B). Sete dias após período de repouso, MI 1 (C) e MI 2 (D). Após período de Seleção II, MI 1 (E), MI 2 (F).

Tabela 3. Expressão do gene GUS em embriões imaturos de milho tropical L3 infectados com *A. tumefaciens* EHA101 carregando as construções gênicas *P35S::gus::T35S* e *P35S::bar::Tvsp* inseridas no vetor binário pTF102 durante as etapas de co-cultivo, repouso e seleção.

Métodos	Co-cultivo (%)	Repouso (%)	Seleção II (%)
1	89,66 a	74,66 a	53,00 a
2	74,00 b	32,00 b	24,66 b
CV (%)	5,21	20,47	14,83

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Seleção e maturação de calos transformados

A seleção das células transgênicas foi realizada durante seis semanas através da observação do desenvolvimento de calos embriogênicos em meio de cultivo suplementado com o herbicida Finale, cujo princípio ativo é o fosfotricina (PPT). Os calos do Tipo II obtidos tinham crescimento rápido, aspecto friável, coloração amarela clara, sendo altamente embriogênicos (Figura 2). O meio de seleção utilizado foi o mesmo para as duas metodologias de infecção testadas. Um total de 106 calos se desenvolveram no meio de seleção. Deste total, 61 foram provenientes da metodologia de infecção 1 e, 45 da metodologia de infecção 2.

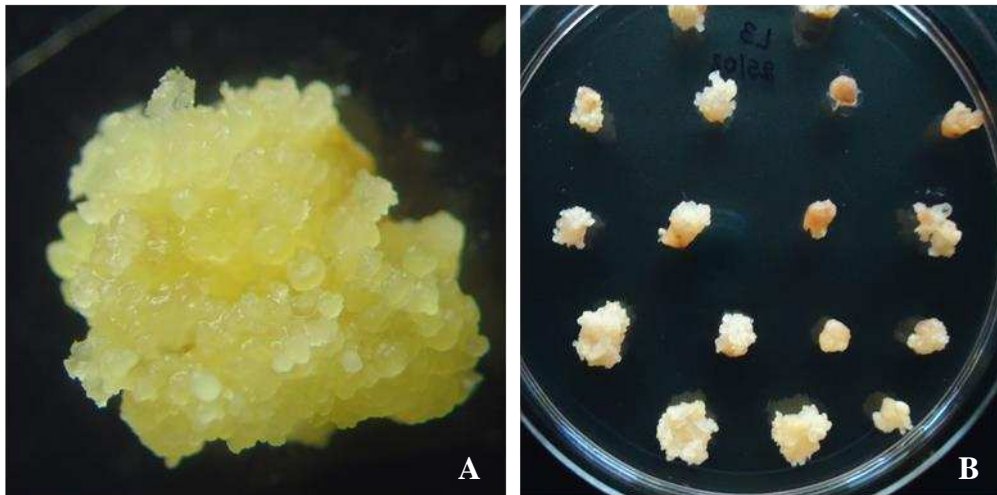


Figura 2. Desenvolvimento de calos embriogênicos em meio de seleção suplementado com PPT. Calo embriogênico da linhagem L3 (A); Calos resistentes e não resistentes (escuros e pequenos) ao agente seletivo (B).

Os resultados mostraram que os calos provenientes do Método de Infecção 1 apresentaram maior sobrevivência em comparação com o Método 2 (Figura 3).

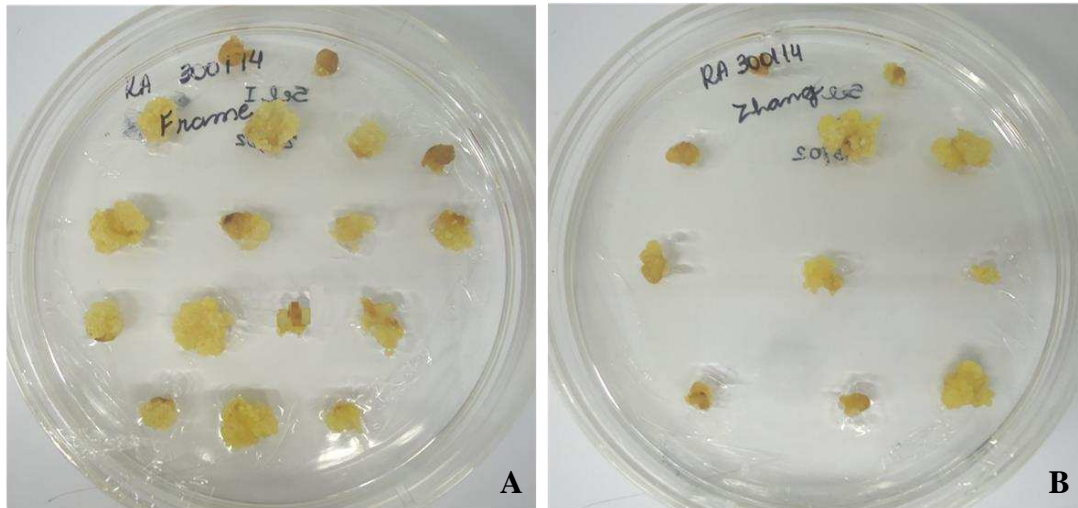


Figura 3. Calos da linhagem de milho tropical L3 transformados com as construções gênicas *P35S::gus::T35S* e *P35S::bar::Tvsp* e cultivados em meio contendo o herbicida Finale. Calos embriogênicos provenientes de embriões infectados pela metodologia 1 (A); Calos embriogênicos derivados da metodologia 2 (B).

Todos os calos capazes de se desenvolverem em meio de seleção foram transferidos para o meio de maturação. A maturação ocorreu de maneira desuniforme e os calos, inicialmente, apresentaram aparência translúcida e macia, tornaram-se opacos e duros. Esta modificação ocorreu no período entre 20 e 45 dias independente do método de infecção utilizado inicialmente. Nem todos os calos originados no meio de seleção foram capazes de maturar, onde apenas 42,62% e 20% dos calos provenientes dos métodos de infecção 1 e 2 maturaram, respectivamente. Os calos maduros foram transferidos para o meio de germinação e, pelo menos três plantas de cada evento foram transferidas e aclimatadas em casa de vegetação (Figura 4).

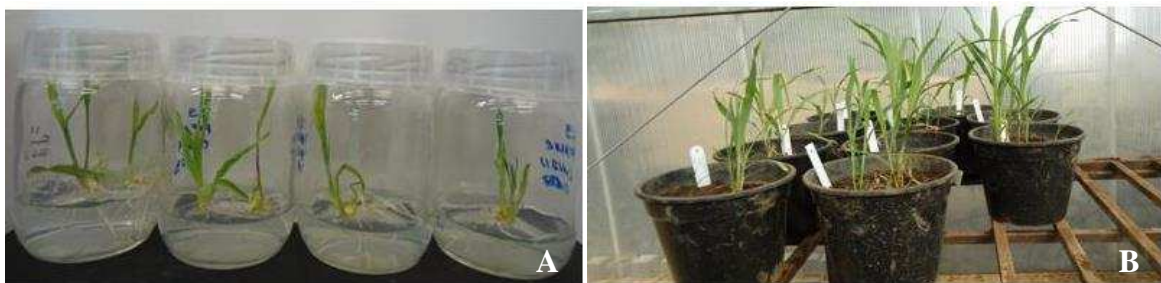


Figura 4. Plantas da linhagem de milho L3 geradas via transformação por *A. tumefaciens*. Plantas no meio de germinação (A) e, plantas aclimatizadas em casa de vegetação (B).

Após duas semanas de crescimento em solo, o herbicida Finale foi aplicado para confirmar a resistência das plantas geradas. Enquanto o controle não transgênico apresentou folhas com necrose e morreu, as plantas transgênicas mostraram resistência ao herbicida. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos em cada uma das transformações realizadas, o número de embriões que foram infectados, o número de eventos transgênicos (calos embriogênicos resistentes ao herbicida), o número de calos que regeneraram plantas e a eficiência de transformação conseguida para cada tratamento.

Tabela 4. Eficiência da transformação da linhagem de milho L3 mediada pela *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando os métodos de infecção 1 e 2.

Data	Método	Nº de embriões infectados	Nº de eventos transgênicos	Nº de calos regeneraram plantas	Eficiência de transformação ⁽¹⁾ (%)
27.11.2013	1	200	13	12	6
27.11.2013	2	200	9	1	0,5
30.01.2014	1	200	14	8	4
30.01.2014	2	200	10	4	2
27.03.2014	1	200	22	0	0
27.03.2014	2	200	9	0	0
30.04.2014	1	200	12	6	3
30.04.2014	2	200	17	4	2

⁽¹⁾ Eficiência de transformação = (nº de plantas regeneradas/nº de embriões infectados) x100.

O número de calos embriogênicos gerados após o período de seleção e o número de calos capazes de regenerar plantas foram as variáveis utilizadas para a análise estatística que comparou a metodologia de infecção 1 e 2. Os resultados apontaram que para a linhagem de milho tropical L3 o método de infecção 1 foi superior em relação ao método de infecção 2 (Tabela 5).

Tabela 5. Média do número de eventos e plantas obtidos com as metodologias utilizadas na transformação de milho tropical L3

Método	Nº de calos*	Nº de plantas	Eficiência de transformação (%)**
1	18,75 a	12,25 a	6
2	9,50 b	4,00 b	2
CV (%)	16,79	53,35	-

*Médias seguidas pelas mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. **Eficiência de transformação = (nº de plantas/nº de embriões infectados) x100.

Análise molecular dos eventos gerados

A amplificação do DNA genômico foi realizada em todos os 35 eventos regenerados da transformação dos embriões imaturos infectados pelas duas metodologias testadas. Foi observado um fragmento de 407 pb, correspondente a amplificação do gene *bar* presente na construção gênica pTF102 (*P35S::gus::T35S* e *P35S::bar::Tvsp*), em todos os eventos analisados (Figura 5).

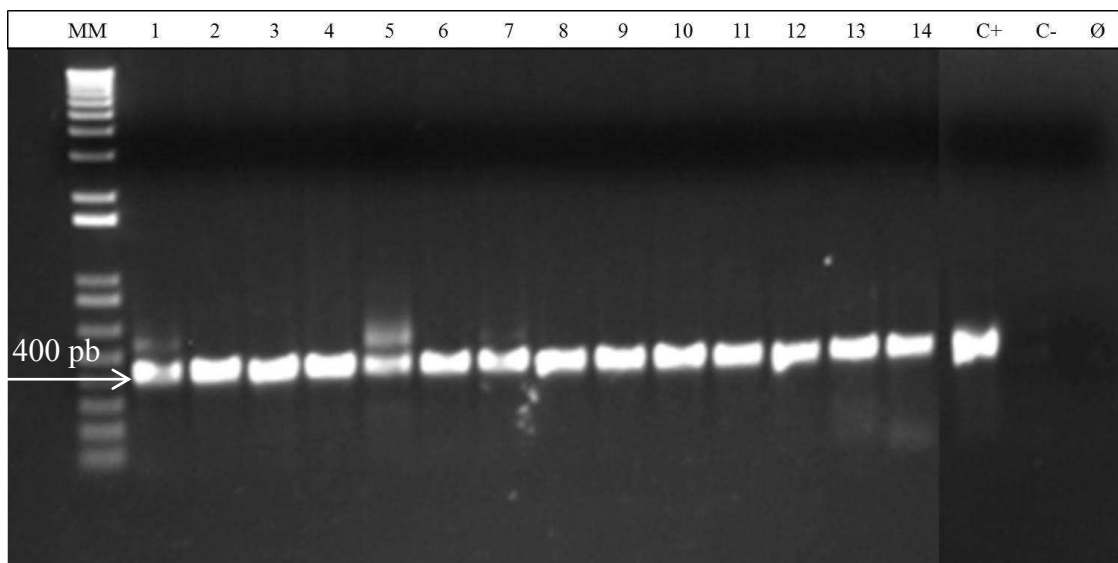


Figura 5. Amplificação por PCR do DNA genômico de 14 eventos da linhagem de milho tropical L3 transformados por *A. tumefaciens* carregando o vetor binário pTF102. (MM): marcador molecular de 1 Kb, (1 a 9): plantas regeneradas após infecção com *A. tumefaciens* utilizando a metodologia 1; (10 a 14): plantas regeneradas após infecção com *A. tumefaciens* utilizando a metodologia 2; (C+): controle positivo plasmídeo pTF102 (*P35S::gus::T35S* e *P35S::bar::Tvsp*); (C-): planta de milho da linhagem L3 não transgênica e; (Ø): reagentes sem o DNA (branco).

4. DISCUSSÃO

O híbrido HiII é um genótipo altamente embriogênico e tem sido utilizado extensivamente em protocolos de transformação genética de milho. Entretanto, Hi-II não é interessante para a avaliação de características agronômicas como melhoria da produtividade e tolerância a estresses abióticos por apresentar um baixo desempenho agronômico, espigas pequenas, e com alta segregação de plantas no campo (QUE et al., 2014). Assim, transgenes inseridos no genoma de HiII precisarão ser transferidos para as linhagens elites dos programas de melhoramento para a obtenção dos híbridos comerciais. Este processo pode requerer até seis ciclos de retrocruzamentos para a recuperação acima de 99% do genoma recorrente, tempo excessivo, se considerado a alta competitividade do mercado de híbridos de milho (CARNEIRO et al., 2009).

Como alternativa para este híbrido temperado, foi selecionado entre as linhagens de adaptação tropical do programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo, a linhagem L3, que possui excelentes características agronômicas combinadas com ótimo desempenho em cultura de tecidos, formando calos embriogênicos do Tipo II com uma eficiência em torno de 85%. Além da capacidade de regeneração *in vitro*, a seleção de genótipos de milho para a produção de plantas transgênicas foca na possibilidade do genótipo escolhido ser infectado por *Agrobacterium*. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de dois meios de cultivo utilizados na fase de infecção e co-cultivo na transferência de genes da *A. tumefaciens* EHA101 para a linhagem de milho tropical L3.

Os meios testados para a infecção com *A. tumefaciens* e co-cultivo da linhagem L3, MI(1) e MCC(1) e, MI(2) e MCC(2) foram desenvolvidos por Frame et al. (2002) e Vega et al. (2008), respectivamente. Vega et al. (2008) desenvolveram um protocolo otimizado para a transformação do híbrido Hi-II de milho com agrobactéria utilizando plasmídeo binário pCambia 3301 que contém o gene repórter *gus* e o gene *bar* controlados pelo promotor CaMV35S. Este protocolo apresenta ajustes nos meios de infecção e co-cultivo, como a utilização da metade da concentração dos sais N6, uso do tampão MES, nitrato de prata, L-cisteína e DTT (antioxidantes) em determinados estádios do processo de infecção e co-cultivo, além do ajuste do pH 5,2 para a infecção e 5,8 para os meios seguintes. Estes ajustes resultaram em uma eficiência de

transformação de 12% em média, sendo que a maior frequência obtida foi de 18%. Esta frequência é superior as obtidas por Frame et al. (2002; 2006) (5 a 8%), utilizando vetores binários padrão. Estes parâmetros ressaltam a complexidade dos fatores envolvidos no processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* e demonstram que as condições relacionadas a estirpes, crescimento da bactéria e meios de cultura devem estar bem ajustadas.

Alguns relatos anteriores já haviam descrito um aumento na eficiência da transformação genética quando se utilizou uma baixa concentração de sais durante a infecção com *Agrobacterium* (FRY et al., 1987; ARMSTRONG & ROUT, 2001; ZHANG et al., 2003). Entretanto, o mecanismo que promove este aumento da eficiência de transferência do T-DNA na presença de baixas concentrações salinas permanece desconhecido (VEGA et al., 2008).

O uso de antioxidantes tais como, a cisteína e o DTT no meio de repouso, pode estar agindo para minimizar a morte celular causada pela resposta a hipersensibilidade nas células do escutelo no milho pela infecção com *A. tumefaciens* (PERL et al., 1996; OLHOFT & SOMERS, 2001; PAZ et al., 2004). Estes antioxidantes parecem favorecer a sobrevivência pós-infecção das células embriogênicas competentes, aumentando assim a estabilidade e a eficiência de transformação. Outro constituinte que provavelmente contribuiu para a eficiência da transformação foi o AgNO_3 . Sua ação é devida, provavelmente, à supressão do crescimento excessivo da *Agrobacterium* no explante sem afetar a transferência do T-DNA, o que facilita a recuperação das células do milho em cultura após o período de infecção, aumentando assim a eficiência de transformação (ARMSTRONG & ROUT, 2001; ZHAO et al., 2001; CHENG et al., 2003).

Os dois métodos testados na transformação de embriões imaturos da linhagem tropical L3 por *A. tumefaciens*, propiciaram a transferência do T-DNA para o genoma do milho. Para a linhagem tropical L3, a baixa concentração de N6 sais, a presença de AgNO_3 e o uso de agentes antioxidantes combinados, cisteína e DTT, não aumentaram a eficiência do processo de transferência gênica, o que pôde ser comprovado pelo maior número de eventos gerados quando os meios MI(1) e MCC(1) foram utilizados.

Os resultados mostraram que a maturação foi um processo ineficiente pois, apenas 33% dos calos selecionados em meio contendo herbicida a base de glufosinato de

amônio, foram capazes de maturar e regenerar. Como as análises moleculares foram feitas apenas nas plantas regeneradas e não nos calos selecionados, existe a possibilidade de que os calos selecionados que não regeneraram plantas serem apenas escapes. A sobrevivência de plantas não-transgênicas ao processo de seleção já foi relatado anteriormente (HUANG & WEI, 2005).

Neste trabalho, demonstrou-se que a transformação da linhagem de milho tropical L3 realizada por *A. tumefaciens* é viável, embora exista variabilidade na eficiência das transformações. Além disto, um maior número de experimentos comparando os dois meios de infecção e co-cultivo seria desejável para validar tais observações. Esses experimentos mostram que, a utilização de um meio de co-cultivo e repouso com maior concentração de sais foi benéfico para a transferência do T-DNA. Adicionalmente, os resultados indicam que a suplementação do meio de co-cultivo com apenas um antioxidante, a cisteína, já é suficiente para a recuperação de células transformadas.

5.CONCLUSÕES

A eficiência de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* em linhagens de milho tropical, depende de vários fatores, dentre eles, a interação entre a bactéria e o material vegetal utilizado e também as condições *in vitro*.

O método I foi eficiente com a linhagem L3. Por ser o primeiro teste, novos trabalhos devem ser realizados visando ajustar outros fatores relacionados às condições *in vitro*, para aumentar a eficiência de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* em embriões zigóticos de linhagens de milho tropical.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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**, v. 710, p. 327-341, 2011.

FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHICKWAMBA, 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**, v. 129, p.13-22, 2002.

HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **Plant Journal**, v.6(2), p.271-282, 1994.

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**, v. 6, p.3901-3907, 1987

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant physiology**, v. 15, p. 473-497, 1962.

QUE Q.; ELUMALAI, S.; LI, X.; ZHONG H.; NALAPALLI, S.; SCHWEINER, M.; FEI, X.; NUCCIO, M.; KELLIHER, T.; GU, W.; CHEN, Z.; CHILTON, M.D.M. Maize transformation technology development for commercial event generation. **Frontiers Plant Science**, v.5, p.1-19, 2014.

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**, v. 27, p.297-305, 2008.

BINNS, A. N.; TOMASHOW, M. F. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plant. **Annual Review of Microbiology**, v. 42, p.575-606, 1988.

HOOYKASS, P. J .J.; SCHILPEROORT, R. A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. **Plant Molecular Biology**, v.19, p.15-38, 1992.

WINANS, S. C. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. **Microbiology. Review**, v.56, p.12-31, 1992.

RUEB, S.; HENSGENS, L.A.M. Improved histochemical staining for β -glucuronidase activity in monocotyledonous plants. **Rice Genetic Newsletters**, v.6, p.168-169, 1998.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN,R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings National Academy of Science of the United States of America**, v.81, p.8014-8018, 1984.

ZHAO, Z.; CAI, T.; TAGLIANI, L.; MILLER, M.; WANG, N.; PANG, H.; RUDERT, M.; SCHROEDER, S.;HONDRED, D.; SELTZER, J.; PIERCE, D. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. **Plant Molecular Biology**, v. 44, p.789-798, 2000.

Capítulo 3

PROMOTOR ESPECÍFICO PARA EXPRESSÃO GÊNICA NO FLOEMA

RESUMO

SOUZA, Rafaeli Aparecida Vieira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Promotor específico para expressão gênica no floema.** Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Coorientadores: Sérgio Hermínio Brommonschenkel e Geraldo Magela de Almeida Cançado.

Uma alternativa empregada para a transformação genética visando à resistência às pragas, consiste na produção de plantas que expresse uma proteína que possua atividade inseticida contra insetos fitófagos. Os promotores são essenciais no processo de transformação de plantas, pois direcionam a expressão gênica e conseqüentemente o fenótipo de evento. Objetivou-se isolar o promotor *PP2* específico de floema de abóbora e avaliar se ele é capaz de dirigir a expressão gênica em plantas transgênicas de milho. O experimento foi dividido em três partes, a primeira foi o isolamento da seqüência promotora da proteína *PP2* isolada de abóbora, a segunda parte foi a clonagem e ligação no vetor binário pTF102 e a transformação de *Agrobacterium tumefaciens* e *rhizogenes*. A terceira parte foi a transformação de discos foliares de tabaco com *A. rhizogenes* e os embriões imaturos de milho do híbrido HiII, com *A. tumefaciens*, contendo os cassetes gênicos *PP2 cucurbita::gus::terminador*. Foram utilizados 50 discos foliares na transformação de tabaco e 250 embriões imaturos de milho na transformação genética de milho. A capacidade do promotor *PP2* isolado de abóbora em dirigir a expressão do gene repórter foi demonstrada pela presença da coloração azul através de teste histoquímicos da atividade do gene *gus* em raízes de tabaco sugerindo a funcionalidade desses fragmentos promotores e em plantas de milho transformadas. O promotor *PP2* dirigiu a expressão dos gene repórter *gus* em raízes transgênicas de tabaco e em plantas transgênicas de milho regeneradas. Novas transformações de embriões imaturos de milho devem ser realizadas, para a obtenção de mais eventos transgênicos com os promotores *PP2*, para estudos da sua funcionalidade e validação em plantas de milho

ABSTRACT

SOUZA, Rafaeli Aparecida Vieira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2015. **Specific promoter for gene expression in the phloem.** Advisor: Aluizio Borém de Oliveira. Co-Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel and Geraldo Magela de Almeida Cançado.

An alternative employed for genetic transformation for resistance to pests, is the production of plants which express a protein having insecticidal activity against phytophagous insects. Promoters are essential in plant transformation process as direct gene expression and consequently the event phenotype. The objective was isolate the specific PP2 promoter pumpkin phloem and available it is capable of driving gene expression in transgenic corn plants. The experiment was divided into three parts, the first was the isolation of the promoter sequence isolated PP2 protein pumpkin, the second part was the cloning and link the binary vector pTF102 and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes*. The third part was the transformation of tobacco leaf discs with *A. rhizogenes* and immature maize embryos of hybrid HI-II with *A. tumefaciens* containing the gene cassettes PP2 cucurbita::gus::terminator. Fifty leaf discs were used to transform tobacco and 250 immature embryos of maize genetic transformation of maize. The PP2 promoter isolado pumpkin was ability to direct reporter gene expression demonstrated by the presence of blue coloration by histochemical test the activity of the gus gene in tobacco roots suggesting functionality and fragments of such promoters in corn plants transformed. The PP2 promoter directed the expression of gus reporter gene in transgenic roots of tobacco and transgenic plants regenerated maize. New transformation of immature maize embryos must be carried out to obtain more transgenic events with PP2 promoters for studies of its functionality and validation of maize plants.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho (*Zea mays* L.) do mundo e previsões indicam que a produção agrícola no nosso país vai continuar crescendo. Mesmo com este cenário positivo, diversos estresses ambientais limitam o rendimento deste cereal.

Atualmente, com a liberação comercial da tecnologia Bt, que controla principalmente as infestações de *Spodoptera frugiperda* ou lagarta do cartucho nas lavouras de milho, outros insetos como os percevejos, pulgões, mosca branca e cigarrinhas, ganharam importância a ponto de merecerem especial atenção de técnicos e produtores na condução de suas lavouras (Pioneer, 2013). Estes insetos atuam como praga nas culturas agrícolas, por se alimentarem da seiva presente no floema, podendo levá-las à morte ou à diminuição da produção, especialmente quando há alta densidade populacional do inseto. Alguns destes insetos também são vetores de vírus bastante prejudiciais, e por isso, as perdas ocasionadas por essas pragas podem ser expressivas do ponto de vista econômico.

Uma abordagem empregada para a transformação genética visando à resistência às pragas consiste na produção de plantas que expresse uma proteína que possua atividade inseticida contra insetos fitófagos. Na produção de plantas transgênicas, uma etapa importante é a escolha do promotor, sequência que regula a expressão do gene transferido. É necessário que a região promotora seja compatível com a função do gene a ser expresso e adequado à planta receptora, uma vez que a utilização de promotores constitutivos na regulação de genes nem sempre é a melhor estratégia.

Na maioria dos trabalhos de transformação genética, os genes introduzidos estão sob o controle de promotores constitutivos, ou seja, eles promovem a expressão gênica em todos os órgãos e durante toda a fase de desenvolvimento da planta.

Um dos promotores mais utilizados para a expressão constitutiva de proteínas transgênicas é derivado do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) promotor 35S. Em cereais, outro promotor constitutivo vem sendo bastante utilizado, o promotor ubiquitina. Ubiquitina é uma proteína abundante no citoplasma de todas as células da planta. Experimentos mostraram que a atividade do promotor da ubiquitina é dez vezes mais potente do que a do promotor 35S em cereais (CHRISTENSEN et al., 1992;

WEEKS et al., 1993; SCHLEDZEWSKI e MENDEL, 1994; GUPTA et al., 2001). No entanto, também tem sido mostrado experimentalmente que a atividade deste promotor decresce com a idade e este fato foi associado à redução na divisão celular com o envelhecimento da planta.

Apesar dos promotores constitutivos serem de grande valia para a produção de plantas geneticamente modificadas, em certos casos, a expressão constitutiva de um transgene não é necessária e pode representar um gasto metabólico desnecessário. Portanto, o isolamento e a caracterização detalhada de promotores que direcionam a expressão gênica de maneira específica são também de grande interesse para a produção de eventos transgênicos.

Em cucurbitáceas, dentre mais de 100 proteínas do floema, estão as *phloem protein 1* (PP1) e *phloem protein 2* (PP2), altamente expressas nas células companheiras e transportadas para o floema. Trabalhos comprovam a expressão preferencial no floema em plantas de tabaco transgênico contendo o promotor da PP2 direcionando a síntese de proteínas heterólogo (GUO et al., 2004; JIANG et al., 1999).

Carneiro (1994) mostrou que quando 1 kb da região 5' flanqueadora do clone genômico de PP2 foi ligado ao gene repórter *gus* e introduzido em plantas do tabaco usando *Agrobacterium*, a expressão da enzima β -glucuronidase foi detectada especificamente no floema. Portanto, a sequência gênica de 1 kb isolada possui as regiões necessárias para o direcionamento da expressão do gene repórter *gus* para o floema de um sistema heterólogo.

Diante disso, é possível que a sequência promotora do gene que codifica para a proteína PP2 direcione de maneira correta a expressão do gene repórter *gus* no floema de milho. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi isolar e avaliar um promotor específico de floema isolado de abóbora (*Cucurbita pepo*) para o controle da expressão gênica em milho transgênico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Preparo da construção gênica

Clones genômicos que codificam para a proteína PP2 já foram isolados e caracterizados a partir de *Cucurbita pepo* (Bostwick et al. 1994). (Figura 1).

```

-1125 GAATTCGGAT CTTTCTATTT AACTTTCCTA AAGGAGAAAG TATCAAACAT
-1075 CACATTATCC AAGAAATTTT TTTATAAATT CTAAGATTAA ATTTATTAAA
-1025 AATAGATATC CTTAAAAATC CATAGTCTAA ATAAAACTCA AGCGTTCGAA
-975 GATGAGTAAA TAAATGTGAT TAATGTACAA TATCGACGAA TAAATAACGG
-925 TAGAAAAAAA TTATAACTTT CAACAAAATA ACTGTTCTAG TTTTATTTTT
-875 TTCGTGTGTC AAATAGATTT TTTATTTAAT ATATATTTTT TAATTTATTA
-825 ACGAACAAAA TATTATATTT AATTAAGGTT TTAATTACAA TATATGCTAT
-775 TTTCTATTAA AAAATGGTTA ATTATTTTTTC AAAACACAAA TATAAATGAA
-725 AAGGAAAATA TATTTTTTAA AAGAATTAAA ATGTCTTTTC ATTTCTTTTA
-675 CTTTTCTTTT CGGGCATCAT GAACCGAAAA TAATAGAACC TTCCTTTTTA
-625 AGGCCTAAAT AGTTCATATT CTAAATTAAA TTCGTGTATT CTTAGATTTA
-575 TATAAAAATA AATTTCATAG ACAAATGCA TTCATCCATA CAAAATAATT
-525 AAAACAACC GTTGATTAA TTCATTTTCT TGAAGTAGTA AAATCTTTCA
-475 AAACCTCTCT ACGACGGTAA AGTTAAAATG GAGTATTGGG GGTGCGAAAAG
-425 GCAGGTTGAG CAATTGCAAG AACATCCATC TAGTTATAGC ACAGCCAAAG
-375 TAGCATATAC GACGACAACC ACCCGAGCAA GAAGTAATTA AAAAGAGACC
-325 AACACTTTTT AAATAAAATA AATTAGATAT GATATATTTA ATTATAATTT
-275 TCCATGGGGG AATCAATTAC TATTATCATA ATAAAAATAA AAATAAAAAT
-225 ATTGTTCTTG ATTTTATAAT TTTTAAAATC TTAAAGTAAA AGAATATATG
-175 AAAGAGGACG TTGATTTGTT AAAAGAAGAT AGATTATTAT GGACGGTAAA
-125 ACAGTTCGGT ATCAAATAGA CATAGAGATA GACACGCGTA TGAAAATAAG
-75 AAATAAGCAT GGCTTAGGTT GAAAATAGTG CAGCAAAGAA GGGGTTATAT
-25 ATATCCCTTC TTCCCTCTCA CATTAACTCA TATCTCACTT CTGTTCATAA
+26 AGAGAAGGAT CCGCAATGG

```

Figura 1. Sequência gênica de 1 kb com as regiões necessárias para o direcionamento da expressão do gene repórter *gus* para o floema(Carneiro, 1998).

Os oligonucleotídeos iniciadores das sequências da proteína PP2 de cucurbita foram desenhados com o auxílio do programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e sintetizados,

utilizando a sequência apresentada na Figura 1. Foram selecionados três primers F, um primer R e primers para utilizar no sequenciamento do cassete gênico.

Tabela 1. Iniciadores sintetizados da proteína de floema *PP2* de *Cucurbita* .

Identificação	Sequência 5' - 3'	Amplicon (pb)
Cucur_F1	GGCGGATCCGAATTCCTCAAGCGTTCGAAGATGAGT	1463
Cucur_F2	GGCGGATCCGAATTCCTCGGATCTTTCTATTTAACTTTCC	1596
Cucur_F3	GGCGGATCCGAATTCAAAGGAGAAAGTATCAAACATCACA	1570
Cucur_R	GGCGGATCCAAGCTTTGCGGATCCTTCTCTTTATGA	-
Cucur_seq_F	GGCGGATCCGAATTCAGTATTGGGGGTCGAAAAGG	918
Cucur_seq_R	GGCGGATCCAAGCTTTAATTGATTCCCCCATGGAA	-

Amplificação da região promotora

Sementes de *Cucurbita moschata*, *pepo* e *maxima* foram plantadas em vasos em casa de vegetação para a extração do DNA (Figura 1). Após a extração dos DNAs, foi realizada uma reação em cadeia de polimerase (PCR) para a amplificação do promotor *PP2* pelos oligonucleotídeos iniciadores que foram sintetizados.

Cada reação de amplificação continha 0,1 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 2,5 mM de $MgCl_2$; 200 μ M de dNTPs, 1X de tampão, 2 μ L de DNA (20 ng) e H_2O para volume final de 20 μ L. A amplificação foi realizada em aparelho Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos gerados foram separados em géis de agarose 1%, com Gelred Nucleic Acid Stain na diluição de 1:100 (Biotium), contendo o corante azul de bromofenol.

Clonagem e transformação das regiões promotoras

Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pGEM de 3015 pb do kit “pGEM-T Easy Vector Systems” (Promega) (Figura 1). A clonagem dos fragmentos promotores no vetor foi feita seguindo as instruções do fabricante, utilizando 5 μ l de 2x rapid ligation buffer; 1 μ l do vetor pGEM-T Easy®, 3 μ l do inserto (produto de PCR) e 1 μ l da enzima T4 DNA ligase (1U). A reação ocorreu a 4 °C por 12 horas.

O produto desta ligação foi inserido em bactéria *Escherichia coli*, cepa DH5 α , pelo método de choque térmico. Após crescimento, as bactérias foram plaqueadas em meio CG (Circle Grow) sólido contendo X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside), IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) e o agente de seleção ampicilina, como descrito por Sambrook et al. (1989). Cinco colônias brancas contendo o inserto foram selecionadas para a extração plasmidial e confirmação da clonagem.

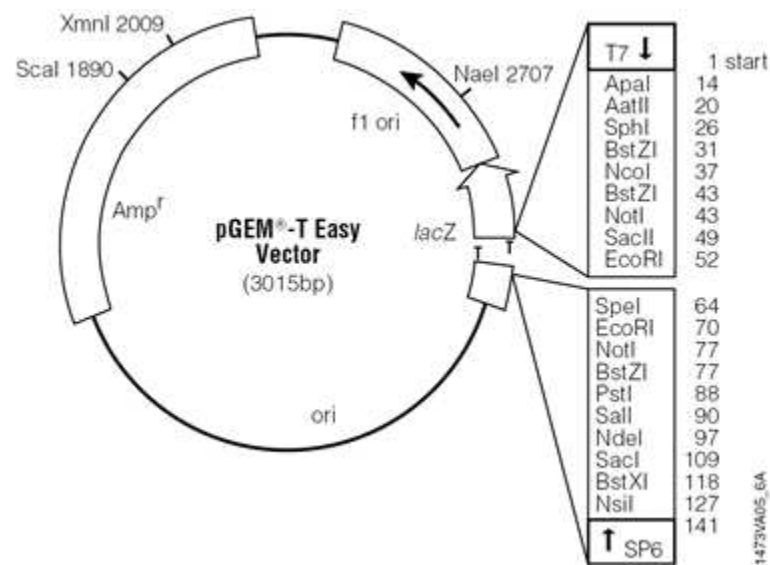


Figura 1. Vetor pGEM-T Easy Vector Systems” (Promega), de 3015pb.

Extração do DNA plasmidial

Cinco colônias de *E. coli* transformadas foram inoculadas em tubos de 15 ml contendo 5 ml de meio CG líquido com o antibiótico ampicilina (100 mg.l⁻¹). Após 16 h de crescimento a 37 °C e 180 rpm de agitação, as culturas foram transferidas para tubos de 1,5 ml, centrifugadas a 7.000 rpm por 1 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o precipitado de células de cada tubo foi totalmente ressuspensionado em 250 μ l de Solução I (Tris-HCL 25 mM, Glicose 50 mM e EDTA 10 mM; pH 8,0), incubando-o à temperatura ambiente por 10 minutos. O próximo passo foi acrescentar 300 μ l de Solução II (NaOH 0,2 M e SDS 1 %), misturado por inversão e incubado no gelo por 5 minutos. A seguir, acrescentou-se 300 μ l de Solução III (Acetato de potássio 5 M, pH 4,8) que também foi misturado por inversão e novamente incubado no gelo por 5

minutos. Posteriormente, realizou-se uma centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 1,5 ml e adicionou-se 500 µl de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -80°C por aproximadamente 40 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e efetuou-se a lavagem do precipitado com 300 µl de etanol (70 %) e novamente, submeteu-se a mais uma centrifugação por 5 minutos à 12.000 rpm. Após o descarte do etanol, os tubos foram incubados em estufa a 65°C durante 10 minutos, para a secagem das amostras.

As amostras secas foram ressuspensas em 50 µL de TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0) com ribonuclease A (RNase A, invitrogen®) na concentração de 50 µg.mL⁻¹ e incubadas a 37°C por 30 min.

O DNA plasmidial foi verificado por eletroforese em gel de 1 % agarose corado com Gelred, utilizando o tampão TAE 1X. A quantificação do DNA foi realizada em aparelho Nanodrop ND-1000.

Após a extração do DNA plasmidial, cinco clones de cada fragmento foram amplificados por PCR e o tamanho dos produtos foi confirmado em gel de agarose 1% com Gelred contendo o corante azul de bromofenol.

Digestão do DNA plasmidial

Os plasmídeos foram submetidos às reações de digestão enzimática, para confirmar o processo de clonagem dos fragmentos. As enzimas de restrição utilizadas foram *Bam*HI e *Eco*RI. Os fragmentos gerados na digestão foram separados em gel de agarose a 0,8%. As bandas correspondentes às sequências de interesse no gel foram isoladas com o auxílio de uma lâmina de bisturi e, posteriormente foram purificadas utilizando-se o kit QIAquick Gel extracion Kit® (Qiagen®).

Sequenciamento do DNA plasmidial

As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando 100 ng do DNA plasmidial; 2 µl de Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, C.A); 2 µl do tampão 5 X (Applied Biosystems, Foster City, C.A) e 1 µl de primer a 5 mM, em um

volume final de 10 µl. As reações foram submetidas a 94 °C por 20 segundos, 50 °C por 20 segundos, 60 °C por 1 minuto e 30 segundos, repetidos 35 vezes.

Após o término da reação, adicionou-se 40 µl de isopropanol 75 % (v/v), a placa foi homogeneizada e incubada no escuro por 15 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida, centrifugou-se a amostra a 4000 rpm por 45 minutos. Após, o isopropanol foi retirado vertendo diretamente a placa em sentido contrário ao precipitado. Foi adicionada a placa 100 µl de etanol 70 % (v/v) e foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos. Por fim, o etanol foi retirado da mesma forma que o isopropanol.

A placa foi deixada por 3 minutos em estufa a 65 °C no escuro para a sua secagem. Após a secagem, foi adicionado 10 µl de formamida HI-DI e desnaturado no termociclador a 95 °C por 5 minutos. Foi transferido para o gelo para posterior injeção no sequenciador (Sequenciador ABI3100).

Clonagem em vetor de expressão

As regiões promotoras selecionadas após o sequenciamento foram clonadas no vetor binário pTF102 (Figura 2). Foi realizada uma reação com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* para as regiões promotoras selecionadas e também para o vetor pTF102 (FRAME, et al., 2002).

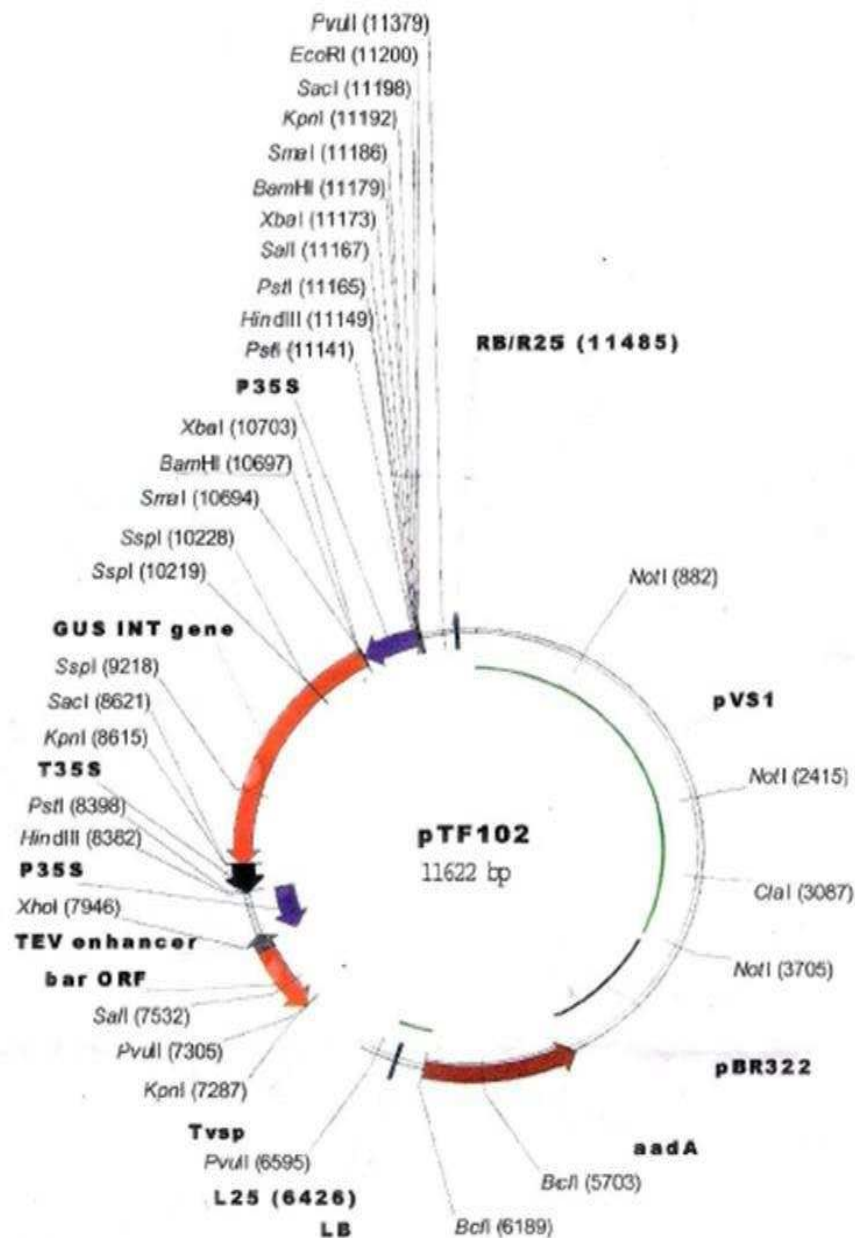


Figura 2. Esquema geral do vetor binário pTF102.

Após a clivagem com as enzimas de restrição, as bandas no gel foram purificadas utilizando-se o kit QIAquick Gel extracion Kit® (Qiagen®). Posteriormente foi feita a quantificação dos fragmentos em aparelho Nanodrop.

Após a obtenção do inserto e do vetor foi realizada uma reação de ligação, utilizando uma relação inserto/vetor de 5:1. Foi adicionado 1,0 µl de vetor, 4,0 µl de

inserto, 1,0 µl de T4 ligase, 1,0 µl de tampão, 3 µl de água, totalizando 10 µl. A reação de ligação foi incubada por 30 minutos a 37°C no termociclador.

O produto desta ligação foi inserido em bactéria *Escherichia coli*, cepa DH5α, pelo método de choque térmico e, após crescimento, as bactérias foram plaqueadas em meio CG (Circle Grow) sólido contendo o agente de seleção espectinomicina, como descrito por Sambrook et al. (1989). Cerca de dez colônias foram selecionadas para a realização de uma reação de PCR de colônias e, após a confirmação da presença da região promotora, foi realizada a extração do DNA plasmidial.

Foram selecionadas 10 colônias e foram feitas as suas réplicas em nova placa com o meio CG contendo o antibiótico espectinomicina. Foram utilizadas ponteiras estéreis, que foram colocadas junto às colônias dentro de tubos de PCR (200 µL) com 20 µL de água miliq autoclavada. Em seguida, os tubos foram colocados em termociclador por 15 minutos a 94 °C, para ocorrer a desnaturação das bactérias.

Para a reação de PCR de colônia, foram utilizadas para cada amostra 0,2 U de *Taq* DNA Polymerase, 0,8 mM de MgCl₂, 2 mM dNTPs, 2X de tampão, 11µl H₂O, 2 µl de colônia de bactéria anteriormente desnaturada, 1 µl de primers a 5 mM dos respectivos promotores. A amplificação foi realizada em Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos gerados foram separados em gel de agarose a 1 % com Gelred e corante.

Após a confirmação da presença do fragmento dos promotores, as réplicas das colônias selecionadas foram utilizadas para realizar a extração do DNA plasmidial, conforme metodologia acima. Após a extração de DNA plasmidial, foi realizada a confirmação através de gel de agarose a 1 % e a sua quantificação com o aparelho nanodrop.

Transformação de Agrobacterium tumefaciens e A. rhizogenes via eletroporação

Para a transformação de *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, o DNA plasmidial foi diluído para 10 ng/ml. Células competentes de *A. tumefaciens*, linhagem EHA101 e 1,0 µL da preparação plasmidial foram transferidos para uma cubeta do eletroporador, e realizada a transformação via eletroporação, utilizando o programa específico para a

Agrobacterium. A cada transformação foi adicionado 1 ml de meio YEP e, incubados a 28°C sob agitação a 180 rpm por 2 horas. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3600 rpm por 5 minutos. O pellet formado foi ressuspensionado em 200 µL de meio YEP e 40 µL foram plaqueados em meio YEP sólido com os agentes de seleção (espectinomicina, canamicina e cloranfenicol). As placas foram incubadas a 28 °C por 48 horas. Para confirmação da transformação foi realizado PCR de colônia capaz de crescer no meio de seleção.

Transformação genética de discos foliares de tabaco com A. rhizogenes (R1601)

O tabaco foi utilizado como planta modelo em função de ter um desenvolvimento rápido *in vitro* e para obtenção dos resultados preliminares.

Para a transformação, foram utilizados como explantes, folhas de plantas de tabaco provenientes de cultivo *in vitro*. Foram utilizadas *A. rhizogenes* contendo a construção obtida do promotor de cucurbita. Foi utilizada como controle positivo a construção 35S::*gus*::T em *A. rhizogenes*.

A. rhizogenes foi plaqueada em meio YEP a partir de uma cultura estoque mantida em glicerol a -80 °C. Para a transformação genética, foi feita uma estria da *A. rhizogenes* utilizando uma colônia isolada, em meio YEP e incubada por 2 a 5 dias a 19°C. Antes da transformação, as *A. rhizogenes* foram ressuspensionadas em meio de infecção suplementado com acetoseringona e mantida sob agitação de 150 rpm à 22 °C. As soluções bacterianas tinham OD550 de 0,9 a 1,0.

Para a transformação, folhas de tabaco *in vitro* foram excisadas e mergulhadas em tubo de 50 ml com meio de infecção. Os tubos foram gentilmente invertidos 20 vezes e, em seguida, foram secos em papel toalha estéreis. Os explantes transformados foram transferidos para meio MS básico e após dois dias em repouso, foram transferidos para o meio MS básico acrescido de antibiótico Tioxina (Tioxin®). As placas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo 16 horas e 28 °C.

Transformação genética de embriões imaturos de milho utilizando A. tumefaciens.

A. tumefaciens contendo a construção gênica com o promotor PP2, isolado de cucurbita direcionando a expressão do gene *gus* foi utilizada para transformação genética de embriões imaturos de milho do híbrido Hi II. Embriões com tamanho entre

1,5 e 2,0 mm foram utilizados como explantes para transformação do milho conforme protocolo desenvolvido por FRAME et al. (2002).

Na preparação da *A. tumefaciens* para a transformação do milho utilizou-se o inóculo (estoque a -80 °C) para estriar uma placa contendo meio YEP mais o agente seletivo. A placa estriada foi mantida a 28 °C por dois dias e depois a -4 °C por até um mês (denominada placa mensal), e dessa placa fez-se a placa semanal (placa de trabalho), porém está foi mantida a 20 °C e descartada após o uso.

Utilizou-se 5 ml de meio de infecção (Meio B, Tabela 1) e adicionou-se 100 µM acetoseringona (AS) em tubos de 50 ml. Em seguida, inoculou-se com auxílio de alça de platina esterilizada em câmara de fluxo laminar, *A. tumefaciens* EHA 101 (placa de trabalho) até atingir uma O.D550 de 0,3 a 0,4. Posteriormente, o tubo foi incubado horizontalmente em shaker à temperatura de 22 °C a 100 rpm por 2 horas.

Foram retirados 250 embriões zigóticos para a transformação genética. Os embriões foram acondicionados em tubos eppendorf de 1,5 ml contendo 1,0 ml de meio de infecção (Meio B, Tabela 1) suplementado com 100 µM de AS, inicialmente, sem *A. tumefaciens*. Em seguida, o meio A foi retirado, os embriões lavados em mais 1 ml de meio A e, em seguida foi adicionado 1 ml da suspensão de *A. tumefaciens*. Os tubos foram gentilmente invertidos 20 vezes e incubados por 5 minutos no escuro. Após a infecção, os embriões foram transferidos para o meio de co-cultivo (Meio C, Tabela 1) e o excesso de *A. tumefaciens* foi retirado com auxílio de uma pipeta.

Tabela 1. Composição dos meios de cultivo utilizados na transformação de plantas.

Composição	B	C	D	E	F	G	H
*N6 sais (g)	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	-	-
**MS sais (g)	-	-	-	-	-	4,62	4,62
2,4-D (1mg/ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	-	-
Sacarose (g)	68,4	30	30	30	30	60	30
Glicose (g)	36	-	-	-	-	-	-
Prolina (g)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	-	-
MÊS (g)	-	-	0,5	0,5	0,5	-	-
N6 vitaminas (1000x)	1,0ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	-	-
MS vitaminas (1000x)	-	-	-	-	-	1,0 ml	1,0ml
AgNO3 (8,5mg/ml)	-	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	-	-
Acetoseríngona (100µM)	-	1,0 ml	-	-	-	-	-
L-cisteína (100mg/ml)	-	3,0 ml	-	-	-	-	-
Cefotaxima (100mg/ml)	-	-	1,0ml	1,5 ml	1,5	-	-
Bialaphos (1,5mg/ml)	-	-	-	1,0 ml	2,0 ml	-	-
pH	5.2	5.2	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
Phytigel (g)	-	3,0	3,0	3,0	3,0	6,0	3,0

*CHU et al., 1975

**MURASHIGE E SKOOG, 1962

Os embriões transformados foram orientados com o eixo embrionário em contato com o meio de co-cultivo. As placas foram fechadas com micropore e incubadas no escuro à 20°C durante 5 dias. Após o período de co-cultivo, os embriões foram transferidos para o meio de repouso (Meio D, Tabela 1) e incubados à 28 °C no escuro por sete dias. Depois desse período, os embriões foram transferidos por 30 dias para o meio de seleção I (Meio E), sendo subcultivados a cada 15 dias. Posteriormente, os calos foram transferidos para o meio de seleção II (Meio F) por 15 dias. Após esse período de seleção, os calos que não morreram foram transferidos para o meio de maturação (Meio G) e após 30 dias para o meio de germinação (Meio H). As plântulas formadas foram transferidas para vasos em casa de vegetação.

Deteção da atividade do gene uidA (GUS) pelo ensaio histoquímico

As plântulas geradas foram avaliadas pelo ensaio histoquímico de GUS segundo metodologia apresentada por Brasileiro e Carneiro (1998). Pequenos segmentos foliares foram coletados e inoculados em solução de X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronida), à temperatura de 37°C, em ausência de luz, por 16 h. Após este período, o

material foi lavado com álcool etílico (70%) para retirada da clorofila, facilitando a visualização da presença da coloração azul no tecido vegetal transformado.

3. RESULTADOS

Construções gênicas

Os resultados do sequenciamento demonstraram que a região amplificada pelos primers (Tabela 1) correspondeu ao promotor vascular (dados não mostrados). A partir dessas evidências, o fragmento foi ligado ao vetor binário pTF102, direcionando a expressão do gene repórter *gus* e este inserido em *E. coli*. Após a confirmação da clonagem no vetor binário, este foi inserido em *A. tumefaciens*.

Tabela 1. Iniciadores utilizados no isolamento e clonagem dos promotores.

Identificação	Sequência 5' - 3'	Amplicon (pb)
PP2.Cucur_F3	GGCGGATCCGAATTCAAAGGAGAAAAGTATCAAACATCACA	1570
PP2.Cucur_R	GGCGGATCCAAGCTTTGCGGATCCTTCTCTTTATGA	-

Transformação de folhas de tabaco com A. rhizogenes

A capacidade do promotor PP2 (proteína de floema 2) em direcionar a expressão dos genes repórteres foi demonstrada pela presença da coloração azul através de teste histoquímicos da atividade do gene repórter *gus* em raízes de tabaco sugerindo a funcionalidade desses fragmentos promotores e a possibilidade de aplicação em transformação estável de milho. Para obtenção das raízes transformadas, discos foliares de plantas de tabaco *in vitro* foram transformados com *A. rhizogenes* que induz a formação de raízes (Figura 3).

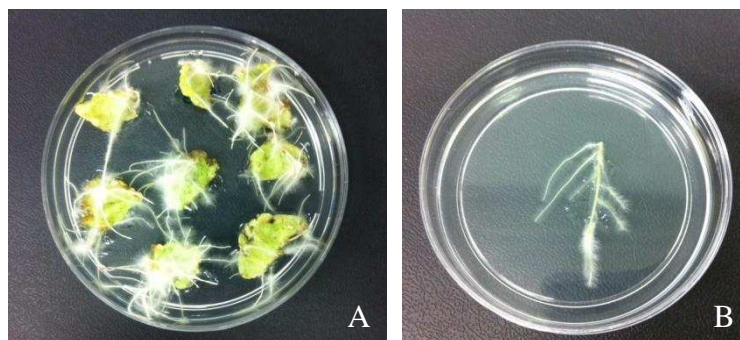


Figura 3. Folhas de tabaco transformadas com *A. rhizogenes* (18 dias) (A). Raiz de tabaco transgênica individualizada em meio de seleção (B).

A capacidade de dirigir a expressão do gene repórter *gus* foi comprovada para o promotor PP2Cucur e o controle positivo promotor 35 S, que apresentaram a coloração azul nas raízes. (Figura 4).

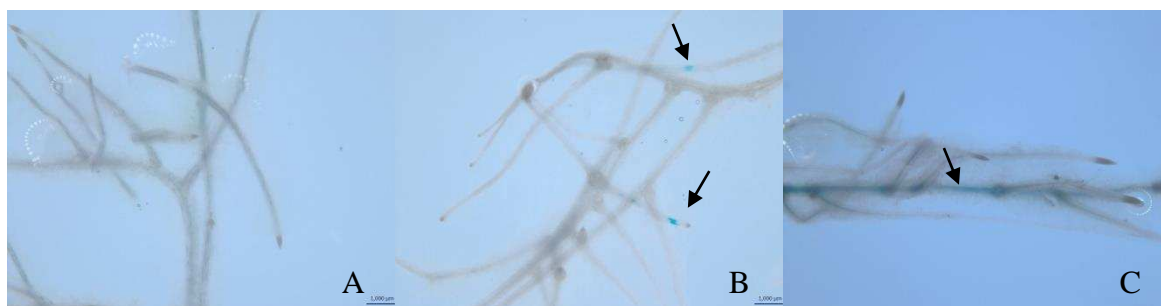


Figura 4. Teste histoquímico *gus*, (A) raiz de tabaco não transgênica, (B) raiz de tabaco transformada com promotor 35S, (C) raiz de tabaco transformada com o promotor PP2Cucur.

Transformação de embriões imaturos de milho

Foram realizadas transformações de embriões imaturos de Hi-II com a construção gênica *PP2 cucurbita::gus::terminador*. A transformação realizada gerou apenas um evento transgênico. Deste evento transgênico obtido, foram regeneradas várias plântulas que foram transferidas para casa de vegetação. Plantas regeneradas foram analisadas para atividade do gene repórter por meio de ensaio histoquímico de GUS utilizando folhas de plantas.

A atividade do gene *gus* foi observada no sistema vascular das plantas transformadas e, dessa forma, demonstrou-se que o promotor PP2 isolado a partir de *Cucurbita* foi capaz de direcionar a expressão gênica em plantas de milho (Figura 5).

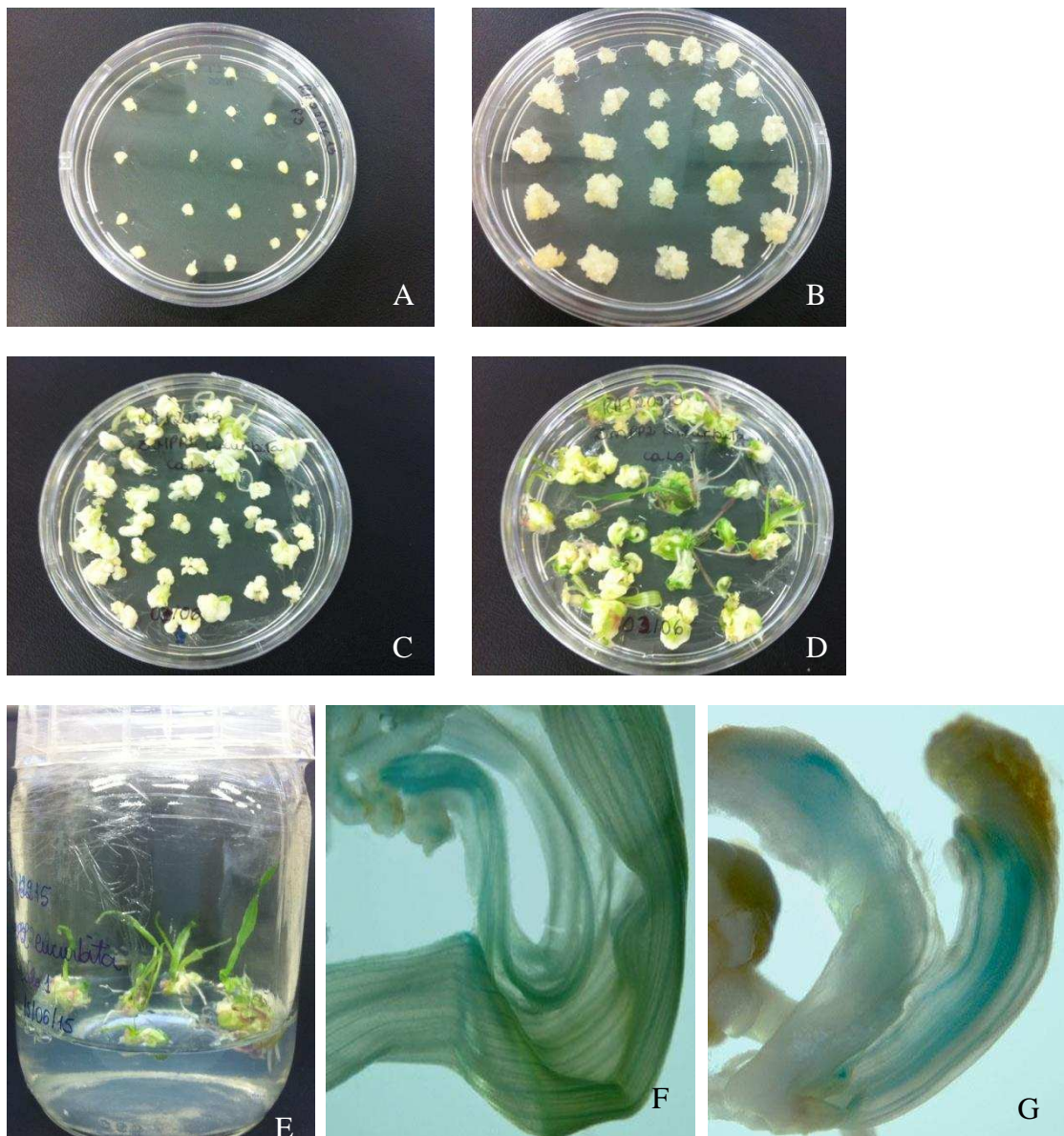


Figura 5. Etapas na transformação de embriões imaturos de milho com a construção genica *PP2Cucur::gus::T*. (A) embriões transformados após período de repouso, (B) calo multiplicado em meio de seleção II, (C) calos maturados, (D) calos germinando, (E) plântulas enraizando, (F, G) teste histoquímico do gene *gus* em folhas de milho.

4. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a cultura do milho tem enfrentado inúmeros problemas em função de pragas e doenças que afetam o floema das plantas. O floema é o principal tecido de condução de fotoassimilados de onde eles são produzidos (fontes), para as regiões onde serão consumidos (drenos). A expressão de genes no floema das plantas de milho pode ajudar a controlar o ataque de insetos fitófagos e doenças.

No presente estudo foi avaliado o desempenho de um promotor floema específico isolado de cucurbita em plantas transgênicas de milho. O promotor PP2Cucur é um candidato forte para ser usado no direcionamento da expressão de genes heterólogos para o floema de milho.

O promotor PP2 isolado de *Cucurbita moschata* ativou a expressão gênica no floema em plantas transgênicas de tabaco (GUO et al. 2004). Esse promotor foi capaz de dirigir eficientemente a expressão do gene *uidA* (*gus*) no floema, conforme demonstrado por análises histoquímicas, histológicas e moleculares (DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012). Os resultados indicaram que este promotor é adequado para dirigir a expressão de genes capazes de influenciar no estabelecimento de pragas que colonizam o floema. Recentemente foram divulgados trabalhos relacionados à produção de plantas transgênicas, contendo transgenes associados a promotores para a expressão gênica no floema (DUTT et al. 2012; MIYATA et al., 2012). Os promotores estudados foram AtPP2 (proteína de floema 2) isolados de *Arabidopsis thaliana*, CsPP2 (proteína de floema 2) de *Citrus sinensis*.

Mais recentemente, o promotor *rolC* de *Agrobacterium* foi utilizado para direcionar a expressão gênica de proteínas inseticidas no floema. O gene que codifica para a aglutinina da folha de *Allium sativum* (ASAL) controlado pelo promotor *rolC* foi inserido no feijão-caupi. Bioensaios mostraram que a sobrevivência e fecundidade de *A. craccivora*, um inseto sugador do floema, diminuiu para 11-26% e 22-42%, respectivamente. Assim, através da expressão específica no floema de uma lecitina inseticida, a resistência parcial ao pulgão foi alcançada (Chakraborti et al., 2009).

A transformação genética de embriões imaturos de milho, como o promotor PP2Cucur, dirigindo a expressão de genes no floema de planta, é uma estratégia para obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos sugadores como os percevejos, as

cigarrinhas e os pulgões, e também impede que doenças sejam transmitidas por esses insetos.

De acordo com Hauptmann et al. (1988) e Shimamoto (1994), citados por Dutt et al. (2012), promotores de plantas monocotiledôneas, exibem alta regulação nos padrões de expressão em monocotiledôneas, podendo funcionar em plantas dicotiledôneas porém em nível reduzido de expressão.

No presente estudo, o promotor de floema PP2 isolado de cucurbitacea com funcionalidade em plantas de tabaco, foi capaz de controlar a expressão gênica em plantas de milho. Esses resultados revelam que um promotor de dicotiledôneas pode ter funcionalidade em plantas monocotiledôneas, como o milho. Testes moleculares avaliando os níveis de expressão em plantas transformadas, devem ser analisados para a validação da funcionalidade em plantas de milho.

5. CONCLUSÃO

O promotor *PP2* isolado de abóbora é capaz de direcionar a expressão do gene repórter *gus* em plantas transgênicas de milho regeneradas. Novas transformações devem ser realizadas para estudos da funcionalidade e validação desse promotor vascular em plantas transgênicas de milho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOSTWICK, D.E.; SKAGGS, M.I.; THOMPSON, G.A. Organization and characterization of Cucurbita phloem lectin genes. **Plant Mol Biol**, v.26, p.887–897(1994)

CARNEIRO, A A; JACOBSEN, K R; SKAGGS, M I; THOMPSON, G. The PP2 promoter directs phloem-specific GUS expression in transgenic tobacco plants. **Plant Physiol**. 105:135, 1994.

CHAKRABORTI, D.; SARKAR, A.; MONDAL, H. A.; DAS, S. Tissue specific expression of potent insecticidal, *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) in important

pulse crop, chickpea (*Cicer arietinum* L.) to resist the phloem feeding *Aphis craccivora*. **Transgenic Res.** 18:529–544, 2009.

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

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

DINANT, S.; RIPOLL, C.; PIEPER, M.; DAVID, C. Phloem specific expression driven by wheat dwarf geminivirus V-sense promoter in transgenic dicotyledonous species. **Plant Physiology**, Berkeley, v. 121, p. 108-116, 2004.

DUTT, M.; ANANTHAKRISHNAN, G.; JAROMINUTOS, M.K.; BRLANSKY, R.H.; GROSSER, J.W. Evaluation of four phloem-specific promoters in vegetative tissues of transgenic citrus plants. **Tree Physiology**, Victoria, v. 32, n. 1, p. 83-93, 2012.

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

GUO, H.; CHEN, X; ZHANG, H.; FANG, R.; YUAN, Z.; ZHANG, Z.; TIAN, Y. Characterization and activity enhancement of the phloem-specific pumpkin PP2 gene promoter. **Transgenic Research**, London, v. 13, p. 559-566, 2004.

GUPTA, P.; RAGHUVANSHI, S.; TYAGI, A. K. Assessment of the efficiency of various gene promoters via biolistics in leaf and regenerating seed callus of millets, *Eleusine coracana* and *Echinochloa crusgalli*. **Plant Biotechnology**. 18:275–282, 2001.

JIANG, H.; QIN, H.M.; YU, H.M; Cloning and function of phloem protein gene promoter from *Cucurbita maxima*. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology**, Cambridge, v. 7 p. 63–68, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant physiology**, Bethesda, v. 15, p. 473-497, 1962.

MYIATA, L.Y. **Promotores específicos para expressão gênica no floema na transformação genética de citros**. 2009. 67p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.

SCHLEDZEWSKI K; MENDEL RR. Quantitative transient expression: comparison of the promoters for maize polyubiquitin1, rice actin1, maize-derived Emu and CaMV35S in cells of barley, maize and tobacco. **Transg. Res.** 3:249-255, 1994.

SINGER, S.D.; HILY, J.M.; COX, K.D. The *sucrose synthase-1* promoter from *Citrus sinensis* directs expression of the β -glucuronidase reporter gene in phloem tissue and in response to wounding in transgenic plants. **Planta**, 234:623–637, 2011.

Pioneer (2013). <http://www.showrural.com.br/blog/agricultura/pioneer-manejo-de-percevejos-no-milho-safrinha/>. Acesso:10/05/13.

WEEKS, J. T.; ANDERSON, O. D.; BLECHL, A. E. (1993) Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). **Plant Physiol.** 102:1077–1084.

YANG, N.S.; RUSSEL, D. Maize sucrose synthase-1 promoter directs phloem cell-specific expression of *Gus* gene in transgenic tobacco plants. **Proc Natl Acad Sci USA**, 87:4144–4148, 1990.

FINN, R.D.; BATEMAN, A.; CLEMENTS, J.; COGGILL, P.; EBERHARDT R.Y., S.R. EDDY, A. HEGER, K. HETHERINGTON, L. HOLM, J. MISTRY, E.L.L. SONNHAMMER, J. TATE, M. The Pfam protein families database **Punta Nucleic Acids Research Database Issue 42:D222-D230**, 2014.

CAPÍTULO 4

**PROMOTORES HETERÓLOGOS PARA O CONTROLE DA EXPRESSÃO
GÊNICA EM MILHO**

RESUMO

SOUZA, Rafaeli Aparecida Vieira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Promotores heterólogos para o controle da expressão gênica em milho.** Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Coorientadores: Sérgio Hermínio Brommonschenkel e Geraldo Magela de Almeida Cançado.

A diversidade de promotores de plantas e seus elementos regulatórios são a base para o desenvolvimento de organismos transgênicos. Promotores são importantes no controle da expressão, tanto ativando quanto reprimindo a transcrição de genes. O isolamento e a caracterização detalhada de promotores que controlam a expressão gênica em órgãos ou tecidos específicos são de grande interesse para a engenharia genética do milho. Objetivou-se avaliar a capacidade dos promotores gênicos *PCaLTP-S*, *PSulfT0,5*, *PCit0,4* e *PSAG12-like*, isolados de cafeeiro, soja e cana-de açúcar, em controlar a expressão gênica em plantas transgênicas de milho. As construções gênicas do promotor de senescência da cana-de-açúcar (*PSAG12-like*), do promotor específico do fruto de café (*PCaLTP-S*), do promotor constitutivo de soja (*PSulfT0,5*) e do promotor específico de folha de soja (*PCit0,4*) foram clonados a montante do gene repórter *gus* no vetor binário p7iUm, este vetor possui o gene *bar* como marcador de seleção para as células vegetais transgênicas. Foram realizadas transformações genéticas mediada por *A. tumefaciens* contendo os cassetes de expressão com os promotores heterólogos em embriões imaturos do híbrido de milho HiII. Para as avaliações, foram realizados teste histoquímico para verificar a atividade do gene *gus*, transcriptase reversa e PCR em tempo real para verificar e quantificar a expressão gênica nas plantas obtidas. Nos resultados para as análises de transcriptase reversa e PCR em tempo real os resultados revelam que os promotores heterólogos apresentaram expressão gênica em plantas transgênicas de milho. Novos trabalhos devem ser realizados a fim de validar esses resultados preliminares obtidos para a cultura do milho.

ABSTRACT

SOUZA, Rafaeli Aparecida Vieira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2015. **Heterologous promoters to control gene expression in maize**: Aluizio Borém de Oliveira. Co-Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel and Geraldo Magela de Almeida Cançado.

A variety of plant promoters and their regulatory elements are the basis for the development of transgenic organisms. Promoters are important in controlling expression, activating both as repressing gene transcription. Isolation and detailed characterization promoters that control gene expression in specific organs or tissues are of great interest for the genetic engineering of maize. It aimed was available the ability of the gene promoters *PCaLTP-S*, *PSulfT0,5*, *PCit0,4* and *PSAG12-like*, isolated from coffee, soy and sugarcane, in controlling gene expression in transgenic plants of maize. The constructs of sugarcane promoter of senescence (*PSAG12-like*), the specific promoter of coffee fruit (*PCaLTP-S*), the constitutive promoter from soybean (*PSulfT0,5*) and soya-specific promoter sheet (*PCit0,4*) were cloned upstream of the *gus* reporter gene in binary vector p7iUm, this vector has the *bar* gene as a selection marker for transgenic plant cells. Genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* containing the expression cassette with heterologous promoters in immature embryos of maize hybrids HI-II were performed. For evaluations were performed histochemical test to check the activity of the *gus* gene, reverse transcriptase and real-time PCR to verify and quantify gene expression in plants obtained. The results for RT analysis and qPCR results show that heterologous promoters showed gene expression in transgenic maize plants. Further studies should be performed to validate these preliminary results for the corn crop.

1.INTRODUÇÃO

O promotor é um componente essencial que controla a expressão gênica de maneira precisa e, conseqüentemente o fenótipo do evento. A escolha do promotor é de fundamental importância para o sucesso da geração de uma planta transgênica.

A diversidade de promotores de plantas e seus elementos regulatórios é a base para o desenvolvimento de organismos transgênicos. Existem evidências na literatura científica, que elementos regulatórios da expressão gênica foram conservados durante a evolução de várias famílias e também, que muitos desses elementos regulatórios quando transferidos para um sistema heterólogo, são capazes de direcionar a expressão gênica de modo similar aquela do organismo de origem.

Um dos maiores desafios para a engenharia genética é encontrar promotores apropriados para controlar a expressão de genes de maneira constitutiva, temporal ou espacial.

Os promotores 35S (Odell et al.,1985), actina e ubiquitina (Gupta et al., 2001; Dhankher et al., 2002) são exemplos de promotores constitutivos que direcionam alta expressão do transgene e, que são rotineiramente utilizados para a geração de plantas geneticamente modificadas. Também existem vários exemplos de promotores tecido-específicos caracterizados a partir de genes de monocotiledóneas, tais como: (i) promotor da hordeína da cevada (Forde et al., 1985), gluteninas do trigo (LaMacchia et al., 2001), zeínas de milho (Marzabal et al., 1998), que direcionam a síntese protéica para o grão; (ii) promotor RA8 de arroz, que direciona a síntese protéica para as anteras; (iii) promotor rbcS do gene ribulose-1,5-bifosfato carboxilase de arroz (Schaffner e Sheen, 1991), que direciona a síntese protéica em tecidos contendo clorofila, entre outros. Além disto, existem os promotores induzíveis e/ou repressíveis, os quais utilizam componentes endógenos e/ou exógenos para o controle da expressão gênica. Em plantas, vários tipos de estresses, tanto bióticos quanto abióticos, induzem um grande número de genes. Os promotores wun1 e proteinase inibidor II (pin2) de batata são exemplos de promotores induzíveis por fermento e/ou patógeno, mas que apresentam pouca ou nenhuma atividade constitutiva sem o estímulo (Logemann et al, 1989;Keil et ai, 1990; Xu et al, 1993). Os promotores tecido-específicos ou os induzíveis/repressíveis são interessantes porque direcionam a expressão gênica

especificamente para o tecido ou o momento biológico de interesse, economizando o gasto energético da planta e diminuindo as preocupações com a biossegurança.

Os cassetes de expressão empregados atualmente para a produção de plantas geneticamente modificadas de milho são baseados, na sua maioria, em promotores constitutivos fortes que determinam a expressão generalizada do transgene na planta,. A alternativa mais viável para substituição de tais promotores é investir na identificação e caracterização de promotores órgão/tecido-específicos ou estímulo-dependentes nas espécies de interesse (DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012).

A utilização de promotores tecido específicos é uma técnica poderosa para o controle da expressão do gene. Entretanto, um promotor heterólogo pode agir de maneira diferente, quando inserido no genoma de outra espécie de planta, portanto existe a necessidade deste promotor ser caracterizado e validado no sistema de interesse antes de sua utilização final.

Um grupo de pesquisadores da Embrapa isolou, caracterizou em tabaco ou *Arabidopsis* e patenteou os seguintes promotores: *PCaLTP-S* – promotor específico de fruto isolado de cafeeiro; *PSulfT0,5* – promotor constitutivo isolado de soja; *PCit0,4* – promotor específico de folha isolado de soja e *PSAG12-like* – promotor de senescência de cana-de-açúcar. Essa coleção de sequências regulatórias pode ser de grande utilidade em programas de melhoramento de milho. Entretanto, análises para verificar o seu funcionamento em milho ainda não foram realizadas e, se fazem necessárias uma vez que tanto a perda quanto a conservação de especificidade de promotores originários de sistemas heterólogos têm sido relatadas na literatura.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade dos promotores gênicos *PCaLTP-S*, *PSulfT0,5*, *PCit0,4* e *PSAG12-like*, isolados de cafeeiro, soja e cana-de-açúcar, em controlar a expressão gênica em plantas transgênicas de milho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das sequências promotoras

As construções gênicas utilizadas foram cedidas pela Embrapa, os promotor de senescência da cana-de-açúcar (*PSAG12-Like*), promotor específico do fruto de café

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados e o tamanho dos seus respectivos amplicons.

Promotor	Iniciador	Sequência	tamanho
<i>PSAG12-like</i>	F	5'- AACCTCGAAGGATTTCAGACG -3'	402pb
	R	5'- CTGGCACGCAGTGGGAAGTAG -3'	-
<i>PCaLTP-S</i>	F	5'- TGGATAACGTCCGCTGCT-3'	327pb
	R	5'-GAAAAGCAAAAAGTGCAGAAGA-3'	-
<i>PSulfT0,5</i>	F	5'- GGATTGGAGTTGCTTACTTGAA-3'	490pb
	R	5'- CTCTGGTACTGATTGGCATGAG-3'	-
<i>PCit0,4</i>	F	5'-TTAGATTTAGACACACTTGATGCTG-3'	350pb
	R	5'- TGAATTGATGGGTTTTCCAA-3'	-
<i>oGusi</i>	F	5'- AGCCAAATCACAGACCGAGT-3'	932pb
	R	5'- TTCCACCCACCCTCAGAAT-3'	-

Material vegetal

Sementes do milho HiII foram plantadas em casa de vegetação para a obtenção do material vegetal. Os embriões imaturos de milho HiII foram colhidos após 12 dias da sua polinização, com aproximadamente 1,5 a 2,0 mm. Para assepsia, as espigas de milho foram mergulhadas em uma solução de 50% hipoclorito de sódio e água destilada com duas gotas de detergente comercial, em agitação por 20 minutos, em seguida, em câmara de fluxo laminar, as mesmas passaram por tríplice lavagem com água destilada autoclavada.

Preparo de Agrobacterium tumefaciens

Agrobacterium tumefaciens foi mantida em meio YEP (5g/L de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ peptona, 5 g L⁻¹ NaCl, 15 g L⁻¹ Bacto-agar, pH 6,8), contendo 100 g L⁻¹ de espectinomicina (seleção para o vetor), por 4 semanas na geladeira a 4°C. Culturas estoque de longa duração foram mantidas a -80°C em solução de glicerol. Três dias antes da transformação, culturas de *A. tumefaciens* mantidas a 4°C foram estriadas em meio YEP suplementado com espectinomicina.

Para transformação, foram distribuídos 5 mL de meio de infecção (Tabela 1) suplementado com 100 µM Acetoseríngona (AS) em tubos de 50 mL. Em seguida, inoculou-se com auxílio de alça de platina esterilizada em câmara de fluxo laminar, *A. tumefaciens* EHA 101, até atingir uma O.D550 de 0,3 a 0,4. Posteriormente, o tubo foi incubado horizontalmente em shaker a temperatura de 22°C à 100 rpm, por 2 horas.

Transformação de milho HiII

Para a transformação do milho HiII foi utilizado o protocolo desenvolvido por FRAME et al., (2002). Com auxílio de pinça e bisturi os embriões foram cuidadosamente excisados e acondicionados em tubos de 1,5 ml contendo 1,0 ml de meio de infecção (meio B) (Tabela 1) suplementado com 100 μ M AS, inicialmente sem *Agrobacterium*. Em seguida, o meio de infecção foi retirado, e os embriões lavados em mais 1 ml de meio de infecção e foi adicionado 1mL da suspensão de *Agrobacterium*. Os tubos foram gentilmente invertidos 20 vezes e incubados por 5 minutos no escuro. Após a infecção, os embriões foram transferidos para o meio de co-cultivo (Meio C) (Tabela 1) e o excesso de *Agrobacterium* foi retirado com auxílio de uma pipeta.

Os embriões transformados foram orientados com o eixo embrionário em contato com o meio de co-cultivo. As placas foram fechadas com micropore e incubadas no escuro a 20°C durante 5 dias. Após o período de co-cultivo, os embriões foram transferidos para o meio de repouso (Meio D) (Tabela 1), e incubados a 28°C no escuro por sete dias. Depois desse período os embriões foram transferidos por 30 dias para o meio de seleção I (Meio E) e incubados a 28°C no escuro, sendo subcultivados a cada 15 dias. Posteriormente, os calos foram transferidos para o meio de seleção II (Meio F) e incubados a 28°C no escuro, por 15 dias. Após esse período de seleção os calos que sobreviveram foram transferidos para o meio de cultivo de maturação (Meio G) e incubados a 28°C no escuro. Após 15 dias, os calos maturados foram transferidos para o meio de cultivo de germinação (Meio H), a 28°C com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa 36 μ moles $m^{-2}.s^{-1}$, até a formação das plantas.

Tabela 2. Composição dos meios de cultivo utilizados na transformação de plantas.

Composição	B	C	D	E	F	G	H
*N6 sais (g)	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	-	-
**MS sais (g)	-	-	-	-	-	4,62	4,62
2,4-D (1mg/ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	-	-
Sacarose (g)	68,4	30	30	30	30	60	30
Glicose (g)	36	-	-	-	-	-	-
Prolina (g)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	-	-
MÊS (g)	-	-	0,5	0,5	0,5	-	-
N6 vitaminas (1000x)	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	-	-
MS vitaminas (1000x)	-	-	-	-	-	1,0 ml	1,0 ml
AgNO3 (8,5mg/ml)	-	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	-	-
Acetoseríngona (100µM)	-	1,0 ml	-	-	-	-	-
L-cisteína (100mg/ml)	-	3,0 ml	-	-	-	-	-
Cefotaxima (100mg/ml)	-	-	1,0ml	1,5 ml	1,5	-	-
Bialaphos (1,5mg/ml)	-	-	-	1,0 ml	2,0 ml	-	-
pH	5.2	5.2	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
Phytigel (g)	-	3,0	3,0	3,0	3,0	6,0	3,0

*CHU ET AL., 1975; **MURASHIGE E SKOOG, 1962

Plantas com aproximadamente 5 cm de altura foram transferidas para vasos de 3 litros com solo em casa de vegetação. Após 10 dias da aclimatização, foi realizada uma aplicação de herbicida, para verificar a resistência dos eventos transgênicos. As plantas que sobreviveram, foram transferidas para vasos de 30 litros até a produção de sementes.

Análise dos calos transgênicos

Para analisar previamente os eventos transgênicos, foi realizada a extração de DNA dos calos embriogênicos que desenvolveram após o período de Seleção II (Meio F). Para a extração do DNA um volume de aproximadamente 500 µL da massa embriogênica foi acondicionada em tubo de 1,5 mL contendo 400µl de tampão de extração CTAB e 0,4% de β-mercaptoetanol. O material foi cuidadosamente macerado com auxílio de um pistilo. Em seguida, o material foi vortexado por 15 segundos e incubado à 60°C por 20 minutos. Posteriormente, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos. Ao final da incubação adicionou-se 300µl de clorofórmio-octanol e os tubos foram novamente vortexados por 15 segundos. Após centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos o sobrenadante foi transferido para outro

microtubo de 1,5 ml, foram adicionados 300 µl de isopropanol gelado e a mistura foi incubada a -80°C por 20 minutos. Após centrifugação a 14000 rpm, lavagem do pellet formado com 200µl de etanol 70% este foi seco em estufa a 65°C por 25 minutos. Finalmente, o pellet foi tratado com 100µl de TE + 0,2 µl de RNASE e armazenados em freezer (-20°C). A quantificação do DNA foi feita em o aparelho nanodrop.

Para confirmação das plantas transgênicas, foi realizada uma reação de PCR usando o Primer BAR. Para a reação de PCR, foram utilizadas para cada amostra: 0,2 U de *Taq* DNA Polymerase, 0,8 mM de MgCl₂; 0,8 mM dNTPs, 2X de tampão, 10µl H₂O, 1µl de DNA concentrado, 0,5 µL de primer F e R BAR (10mM), 4µ de solução de adjuvantes. A amplificação foi realizada em Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 20 segundos; 60°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos gerados foram separados em gel de agarose 1% com gel red mais corante.

Análise da expressão dos genes

Sementes T1 foram plantadas em casa de vegetação e após 15 dias de germinação foram realizadas coletas de folhas e raízes de 3 plantas de cada evento gerado. Todas as coletas foram realizadas em nitrogênio líquido e as amostras foram acondicionadas à -80C° até o momento da análise. Três plantas adicionais de cada evento permaneceram em casa de vegetação para coletas posteriores, de colmo, das estruturas e, também do fruto para análises de expressão.

Transcriptase reverse

O RNA foi extraído das folhas coletadas utilizando o kit Quiagen (RNeasy Plant Mini Kit – cat.: 74904 /Invitrogen). A quantificação do RNA, foi realizada em aparelho Nanodrop, e visualizadas em gel de agarose a 1,5% coradas contendo gelred. Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit High Capacity/Applied. O RNA foi diluído para 10µg e, em cada amostra foi adicionado 2µl RT Buffer 10x, 0,8µl dNTPs mix 25x, 2,0µl random primer 10x, 1,0µl Multi Scribe RT, 1,0 µl H₂O. As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas e 80°C por 5 minutos.

Foi realizada uma reação com os cDNAs: Para a reação, foram utilizadas para cada amostra: 0,2 U de *Taq* DNA Polymerase, 0,8 mM de MgCl₂; 1mM dNTPs, 2x de tampão, 12µl H₂O, 3 µl de cDNA (diluído 1:10), 0,5 µL de primer F e R (10mM). A amplificação foi realizada em Veriti Thermal Cyclor (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 20 segundos; 60°C por 20 segundos e 72°C por 40 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos gerados foram separados em gel de agarose 1% com gel red mais corante.

PCR em tempo real

Para a obtenção do número de cópias dos transgene nas plantas transformadas, foi feita a extração do DNA, e diluiu-se para 20 ng. Foram utilizados como controle positivo, a amostra A2.22 que possui apenas uma cópia inserida no seu genoma, e como controle negativo uma planta não transgênica da linhagem L3. Foram utilizados os primers dos genes de referência ADH1 (F: 5'-GTAACATGCTCCAGCACTGCTATT-3' e R: 5'-TCGTATGATGTGTTTCAGCCAGACT-3') e os primer do gene *bar* (F: 5'-ACAGCGACCACGCTCTTGA-3' e R: 5'-GCTCTACACCCACCTGCTGAA-3'). Foi utilizado o equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Para o PCR em tempo real amostras de cDNAs foram diluídas (1:10) A expressão foi avaliada por meio de PCR em tempo real quantitativo no equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). A expressão endógena foi quantificada com o controle interno actina (F: 5'-TCCTGACACTGAAGTACC CGATTG-3' e R: 5'-CGTTGTAGAAGGTGTGATGCC AGTT-3'). A quantificação relativa dos genes foi calculada usando o método CT comparativo, denominado $\Delta\Delta CT$ (SCHMITTGEN E LIVAK, 2001), sendo adotadas três repetições técnicas para cada amostra.

Ensaio histoquímico da atividade GUS em milho

Para avaliar qualitativamente a expressão da enzima β -glucuronidase (*GUS*), controlada pelos promotores selecionados, foram realizados ensaios histoquímicos, de

acordo com a metodologia descrita por JEFFERSON et al. (1987). Tecido de folhas, raiz, colmos e estruturas reprodutivas das plantas transgênicas foram coletados e imediatamente imersos em solução contendo 50mM tampão fosfato de sódio (pH 7.0) e 1 mM ácido 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronico. A reação foi incubada por 24 horas a 37°C. Buscando facilitar a visualização da expressão de GUS nos tecidos verdes, a clorofila foi retirada utilizando banhos de crescentes concentrações de etanol. A localização celular da atividade de *gus* foi observada com o auxílio de microscópio óptico (Zeiss) e estereoscópio (Zeiss stemi SV 11). Plantas de milho contendo a construção gênica *CaMV35S::GUS* foram utilizadas como controle positivo.

4. RESULTADOS

Pelo menos três experimentos de transformações genética de milho mediada por *A. tumefaciens* foram realizados para cada construção testada; promotor de senescência da cana-de-açúcar (*PSAG12-like*), promotor específico do fruto de café (*PCaLTP-S*), promotor constitutivo de soja (*PSulfT0,5*) e o promotor específico de folha de soja (*PCit0,4*). O número de eventos gerados e a eficiência de cada transformação são mostrados na Tabela 3. A eficiência foi calculada com base no número de embriões imaturos que foram transformados e o número de eventos gerados em cada experimento, variando de 0 a 25%. Todos os eventos obtidos foram analisados previamente, na fase de calo embriogênico, através de PCR para a presença do gene de seleção *bar*. De um total de 112 calos que conseguiram desenvolver em meio de seleção, 42 foram positivos para a presença do gene de seleção. A eficiência das transformações variou de 0 – 25% conforme ilustrado na Tabela 3.

Foram obtidos oito eventos diferentes que geraram 11 plantas nas transformações com a construção gênica contendo o Promotor *PSAG12-like::gus::Tnos* (senescência), 15 eventos diferentes e 76 plantas do Promotor *PCaLTP-S::gus::Tnos* (fruto), 4 eventos e 24 plantas do Promotor *PSulfT0,5::gus::Tnos* (constitutivo) e 15 eventos e 58 plantas do promotor *PCit0,4::gus::Tnos* (folha) (Tabela 3).

Tabela 3. Experimentos de transformação de milho com os promotores heterólogos.*PSAG12-Like, PCaLTP-S, PSulfT0,5, PCit0,4.*

Exp.	Promotor	Nºeventos/ explantes	Calos (BAR +)	Eficiência de trans.(%) ¹	Nº plantas aclimatizadas
1	<i>PSAG12-like</i>	4/400	0	0	0
2	<i>PSAG12-like</i>	6/500	6	0,8	4
3	<i>PSAG12-like</i>	5/200	2	3,5	7
4	<i>PSAG12-like</i>	5/200	0	0	0
5	<i>PSAG12-like</i>	7/250	0	0	0
	<i>PSAG12-like</i>	42/1800	8		11
7	<i>PCaLTP-S</i>	14/200	10	25	51
8	<i>PCaLTP-S</i>	7/300	5	8,33	25
9	<i>PCaLTP-S</i>	6/200	0	0	0
		27/700	15		76
10	<i>PSulfT0,5</i>	4/200	3	8	16
11	<i>PSulfT0,5</i>	2/250	0	0	0
12	<i>PSulfT0,5</i>	2/300	1	2,66	8
13	<i>PSulfT0,5</i>	6/250	0	0	0
		14/1000	4		24
14	<i>PCit0,4</i>	2/400	1	0,25	1
15	<i>PCit0,4</i>	4/200	0	0	0
16	<i>PCit0,4</i>	2/250	0	0	0
17	<i>PCit0,4</i>	4/250	4	3,2	8
18	<i>PCit0,4</i>	13/250	6	13,2	33
19	<i>PCit0,4</i>	4/250	4	6,4	16
		29/1600	15		58

¹Eficiência de transformação = (nº de plantas aclimatizadas/nº de embriões infectados - explantes) x100.

A atividade do gene repórter *GUS* foi verificada através da análise histoquímica (Tabela 4 e Figura 2) nas folhas, colmo, pendão, boneca e semente.

Tabela 4. Teste histoquímico de *gus* realizado nos eventos transgênicos. (+) *gus* positivo, (-) *gus* negativo, L3 controle negativo (planta não transformada), *35Sgus* (planta transformada com *35Sgus*).

Promotor	n° evento	folha	colmo	pendão	boneca	semente
<i>PCaLTP-S</i>	10	-	+	+	-	+
	11	-	-	+	+	-
	12	-	-	+	-	+
	13	-	-	+	+	-
	14	-	-	-	+	-
	15	-	-	-	-	-
	16	-	-	+	-	-
	17	-	-	+	+	-
	18	-	-	+	+	-
	19	-	-	+	+	+
	20	-	-	+	+	+
21	-	-	+	+	+	
<i>PSulfT0,5</i>	22	-	-	+	+	+
	23	-	-	+	+	-
	24	-	-	+	-	-
	25	-	-	+	+	-
<i>PCit0,4</i>	26	-	-	+	+	-
	27	-	-	-	+	-
	28	-	-	+	+	-
	29	-	-	+	+	-
	30	-	-	+	+	-
	31	-	-	+	+	-
	32	-	-	+	+	-
	33	-	-	-	-	-
	34	-	-	+	+	-
	35	-	-	+	+	-
	36	-	-	+	+	-
<i>PSAG12-like</i>	37	-	-	-	+	-
	38	-	-	-	+	-
	39	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-
	41	-	-	-	-	-
	42	-	-	-	-	-
HiII controle	C-	-	-	-	-	-
35S GUS	C+	+	+	+	+	+

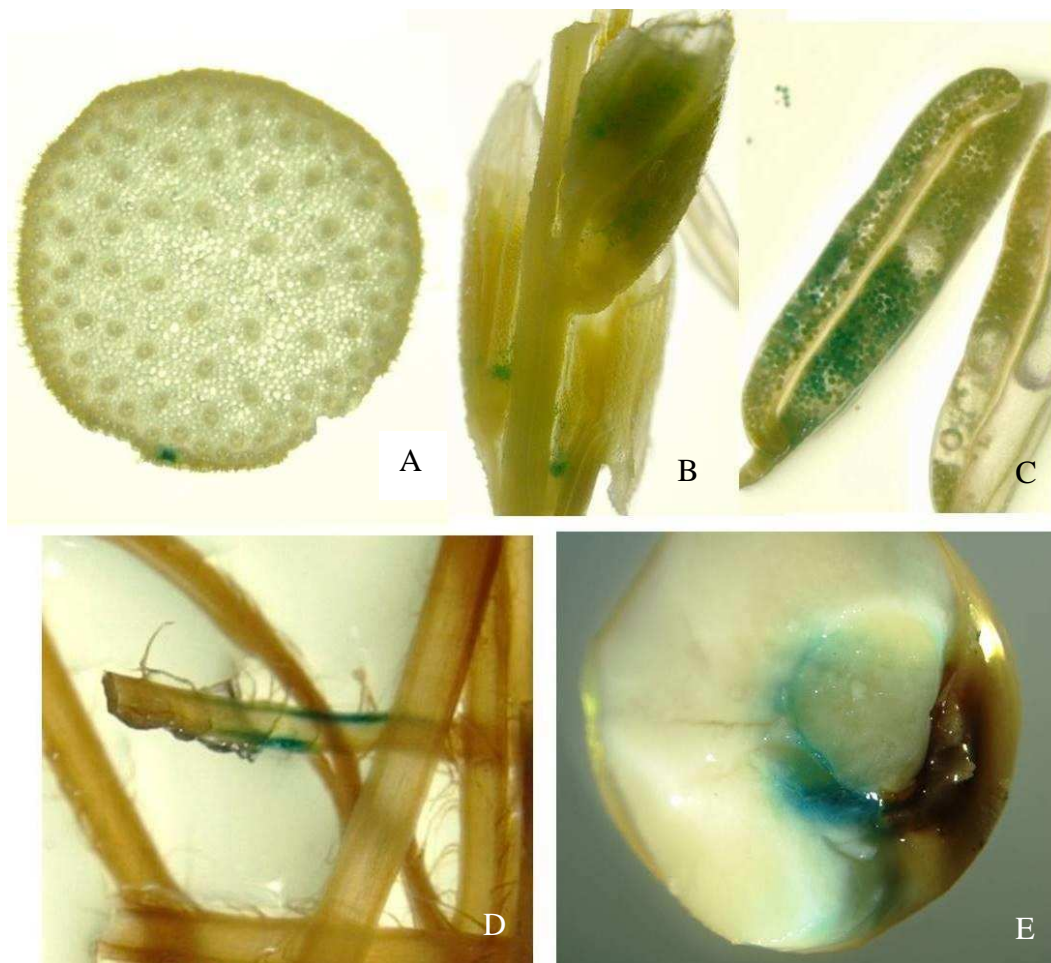


Figura 2. Teste histoquímico de GUS, (A) corte transversal de colmo; (B) inflorescência de milho, (C) anteras com polén; (D) cabelo da boneca; (E) semente;

Uma vez que a maioria do material vegetal coletado proveniente das plantas transgênicas foi negativo para o teste histoquímico de GUS, decidimos avaliar a expressão dos genes inseridos, por análise de transcriptase reversa, utilizando amostras de folhas e de raízes dos eventos transgênicos obtidos conforme ilustrado nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

Das plantas transgênicas de milho com o promotor de fruto *PCaLTP-S*, as amostras de folha amplificaram os eventos 10, 11, 12, 16, 17 e 20, e para as amostras de raiz amplificaram 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21.

Nas folhas e raízes dos eventos de milho 22, 23 e 24 transformadas com a construção gênica contendo o promotor *PSulfT0,5* constitutivo de soja foi possível detectar a expressão do gene *gus*. Também, para o promotor *PCit0,4* de folha de soja,

nas amostras de folha e raiz dos eventos 27, 28, 29, 30, 31, 32, e 36 o gene *gus* foi amplificado .

O promotor de senescência *PSAG12-like* de cana-de-açúcar teve expressão nas folhas e raízes do evento 42 das plantas de milho transformadas com esse promotor.

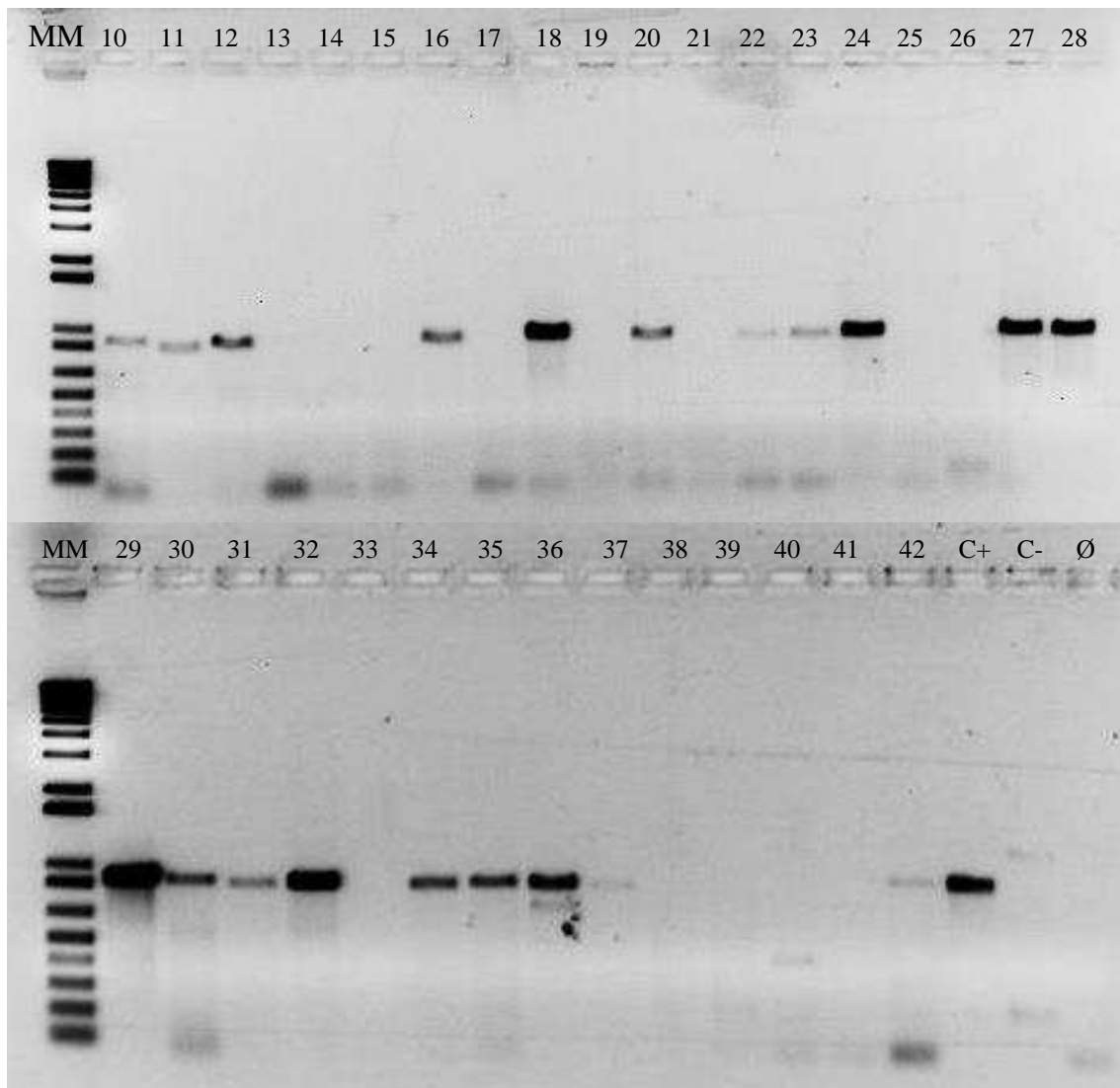


Figura 2. Expressão do gene GUS reação *transcriptase reversa* com cDNA de folha, promotores *PCaLTP-S* (10-21), *PSulfT0,5* (22-25), *PCit0,4* (26-36), *PSAG12-like* (37-42), C+ controle positivo do gene *oGUSI*, C- planta HiII não transgênica, Ø branco – água)

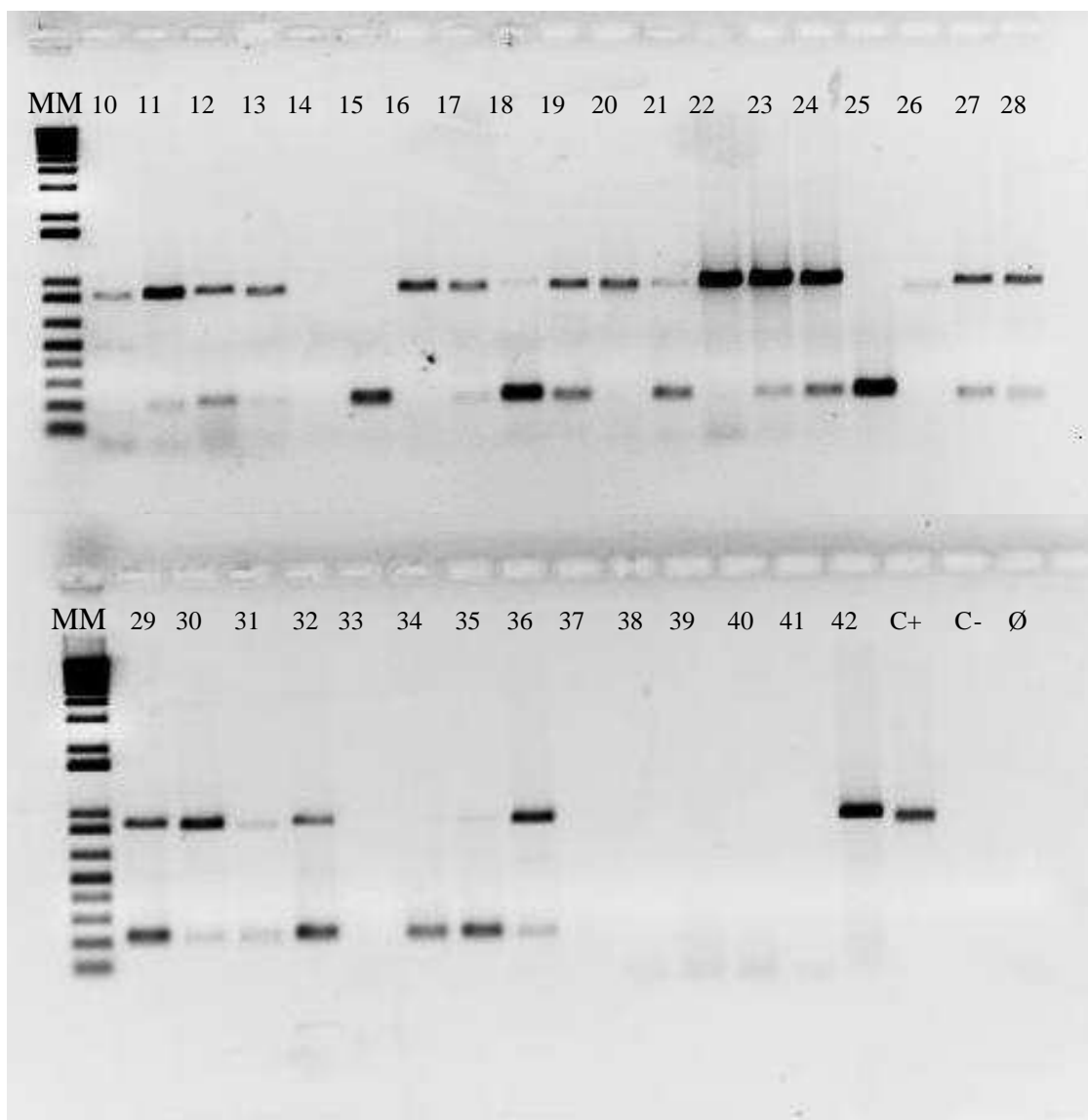


Figura 3. Expressão do gene GUS reação transcriptase reversa com cDNA de raiz, promotores *PCaLTP-S* (10-21), *PSulfT0,5* (22-25), *PCit0,4* (26-36), *PSAG12-like* (37-42), C+ controle positivo do gene *ogusi*, C- planta HiII não transgênica, Ø branco – água)

A quantificação da expressão relativa do gene *gus* nos eventos gerados foi realizada por PCR em tempo real. A figura 4 ilustra as análises de PCR em tempo real realizada com amostra de folha e a figura 5 com amostra de raiz das plantas transformadas (Figura 4 e 5). O resultado destas análises foram muito variáveis mesmo em plantas com a mesma construção.

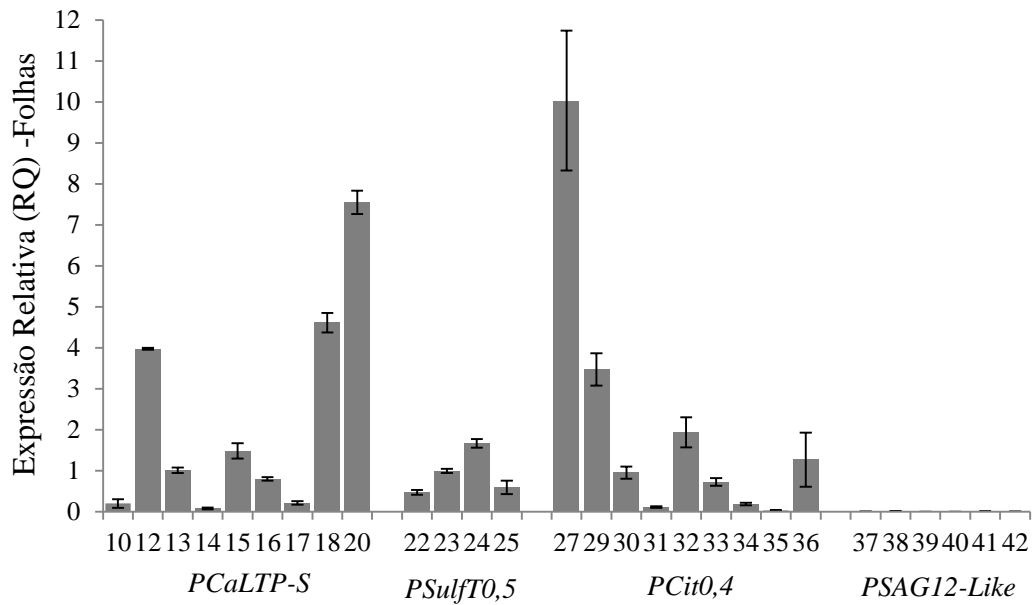


Figura 4. Perfil de expressão dos promotores heterólogos em plantas transgênicas de milho. A expressão gênica foi determinada nas folhas das plantas. As barras indicam o desvio padrão da média de três repetições técnicas.

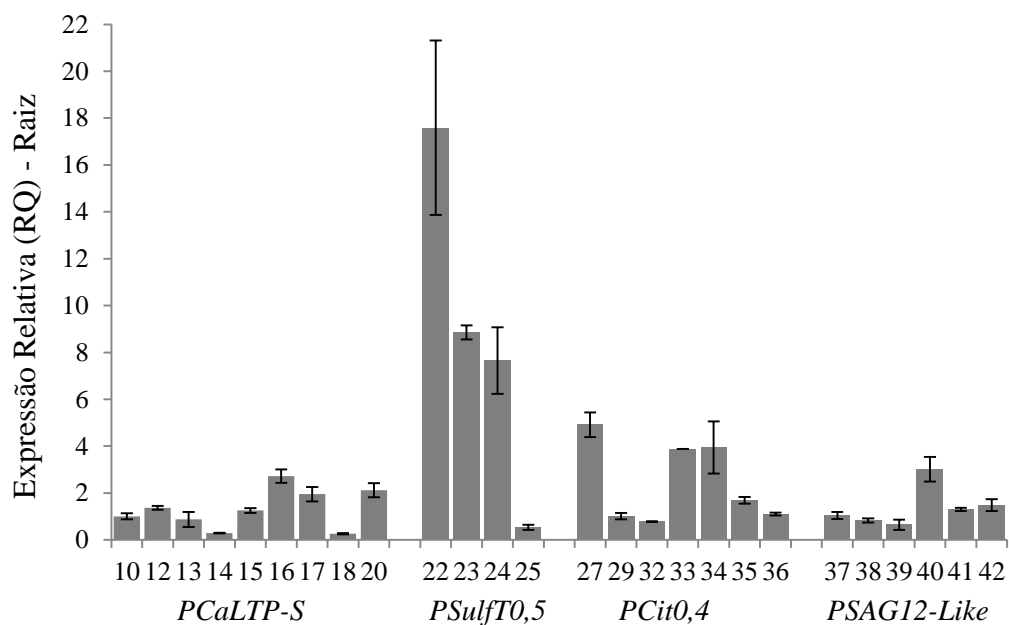


Figura 5. Perfil de expressão dos promotores heterólogos em plantas transgênicas de milho. A expressão gênica foi determinada nas raízes das plantas. As barras indicam o desvio padrão da média de três repetições técnicas.

Na análise do número de cópias dos transgenes que foram transferidos para as plantas transformadas pela *A. tumefaciens*, os resultados obtidos mostram alta inserção de cópias, como exposto na figura 6. A planta número 12, transformada com o promotor de fruto *PCaLTP-S*, e a planta 41 transformada com o promotor de senescência *PSAG12-like*, apresentaram 10 e 12 cópias do transgene inserido no seu genoma, respectivamente.

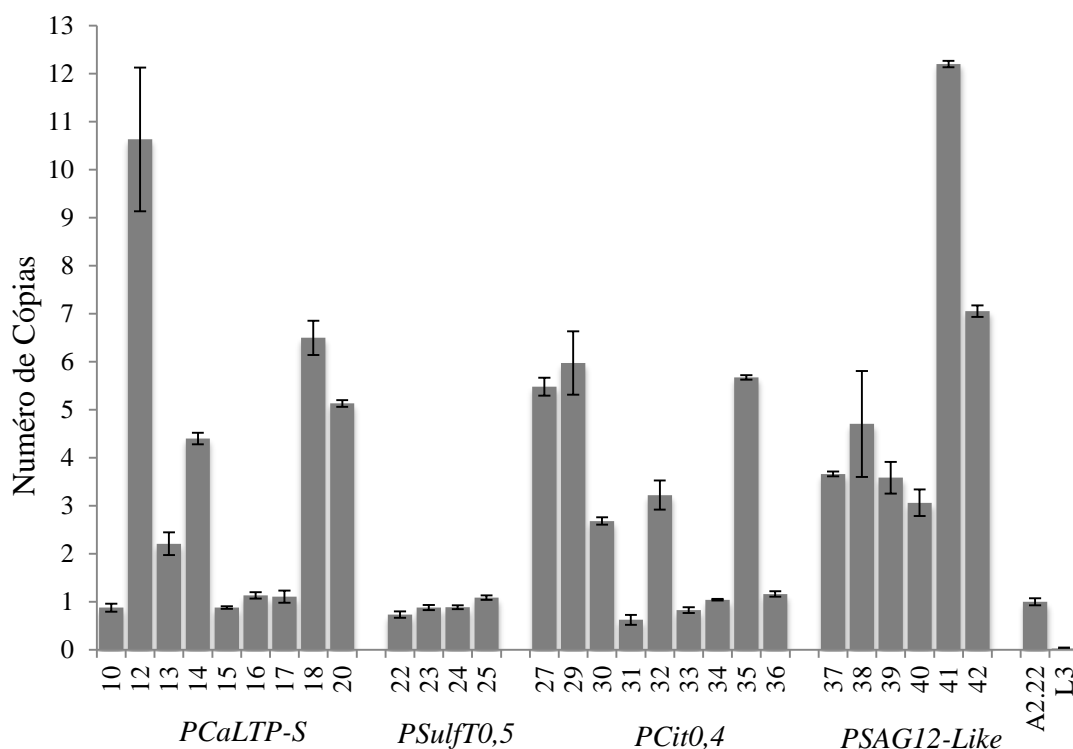


Figura 6. Número de cópias de T-DNA transferido pela *A. tumefaciens* em plantas transgênicas de milho, amostra A2.22 (Planta transgênica com 1 cópia), amostra L3 (planta não transformada).

5. DISCUSSÃO

As regiões de DNA localizadas acima da região codante do gene (5') que contêm sequências específicas reconhecidas por proteínas envolvidas na iniciação da transcrição são conhecidas como promotores. Estas regiões são responsáveis pela

regulação temporal e espacial da expressão gênica. De acordo com o tipo de regulação da expressão gênica, os promotores usados para controlar a expressão dos transgenes são tradicionalmente divididos em três categorias: (i) promotores constitutivos são aqueles continuamente ativados na maioria dos tecidos; (ii) promotores espaço-temporal são aqueles ativados em estágio ou tecido específico e, (iii) promotores induzíveis são aqueles regulados por estímulos físicos ou químicos externos (POTENZA, 2004).

No processo de produção de plantas transgênicas, um transgene constituído essencialmente por uma região codificadora de proteína e regiões regulatórias, é inserido no genoma da planta. Dentre as regiões regulatórias presentes no transgene, o promotor é um componente essencial que controla a expressão gênica de maneira precisa e, conseqüentemente, o fenótipo do evento. Um dos maiores desafios para a engenharia genética é encontrar promotores apropriados para controlar a expressão do gene de maneira constitutiva, temporal ou espacial. A escolha do promotor é de fundamental importância para o sucesso da geração de uma planta transgênica. Vários promotores já foram identificados e isolados a partir de plantas, animais, vírus e bactérias e têm sido amplamente utilizados na produção de plantas transgênicas.

Neste trabalho foram avaliados quatro promotores, sendo estes, o promotor de senescência da cana-de-açúcar (*SAG12*), o promotor específico do fruto de café (*PCaLTP-S*), o promotor constitutivo da soja (*PSu1T0,5*) e o promotor específico de folha de soja (*PCit0,4*).

Foram observadas variações na eficiência de transformação genética dos embriões imaturos de milho HiII. Essas variações são esperadas, visto que na transformação de plantas, muitos fatores influenciam, como o número de células presentes na solução de bactéria (O.D) e o período de coleta dos embriões imaturos. Por isso devem ser realizadas várias transformações, para garantir que essas variações sejam minimizadas e seja possível obter materiais transformados.

Nas análises preliminares dos calos embriogênicos que sobreviveram ao processo de seleção, foram considerados como escapes, ou seja, calos embriogênicos resistentes ao meio seletivo com herbicida, mas que não foram confirmados por PCR para o gene *bar*. Melotto-Passarin (2009) relatou altas taxas de escapes em experimentos de transformação de cana. Nesse trabalho também foi observado alta taxa

de escapes gênicos, pois somente 41% dos calos obtidos confirmaram o gene *bar* em análise de PCR.

Dos calos transgênicos regenerados, foram obtidos 42 eventos transgênicos, dos promotores heterólogos *PSAG12-like*, *PCaLTP-S*, *PSulfT0,5* e *PCit0,4*. Após 10 dias do plantio das sementes desses eventos, foi aplicado o herbicida Finale, a fim de eliminar as plantas que não fossem transgênicas, sem o gene de seleção *bar*. Somente 32 eventos apresentaram resistência ao herbicida Finale e sobreviveram, sendo observadas 23,80% plantas como escapes.

Uma abordagem para estudar a regulação da transcrição de genes em sistemas heterólogos é através da análise da atividade de genes repórter *gus*. O gene *gus* foi utilizado com sucesso em vários trabalhos (JEFFERSON et al. 1987). Nas análises histoquímicas, a expressão do gene *gus* pode não ter sido observada nas folhas analisadas em função do baixo nível de expressão dos transgenes inseridos, mediados pelos promotores *PSAG12-like*, *PCaLTP-S*, *PSulfT0,5* e *PCit0,4*. Em alguns casos, é necessária a seleção de centenas de linhagens transformantes para obtenção de uma capaz de apresentar altos níveis de expressão do transgenes (WEI et al., 2003).

Neste estudo, a análise do número de cópias do transgene e também quantificação da expressão apresentaram uma grande variação entre os eventos com a mesma construção. Em algumas plantas de milho com alta expressão do gene *gus* (22, 23, 24, 25) apenas uma única cópia do gene estava presente, enquanto que aquelas plantas com níveis médio e baixo tiveram várias cópias do genes (plantas 37 a 42).

A associação oposta entre o número de cópias do transgene e o nível de expressão detectado, corroboram com o argumento de que várias cópias do transgene pode dirigir uma co-supressão e silenciamento (FAGARD e VAUCHERET, 2000; DAI et al., 2001; SHOU et al., 2004; ASSEM e HASSAN, 2008). Com frequência o número de cópias é inversamente proporcional com a expressão do transgene (HOBBS et al., 1990; HOBBS et al., 1993; SCHUBERT et al., 2004, SHOU et al., 2004).

Na transformação genética do milho, a expressão do promotor *PCaLTP-S* foi observada nas folhas e raízes das plantas submetidas a análise da expressão quantitativa. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que o promotor *PCaLTP-S* é capaz de ativar a expressão em mais de um órgão da planta, podendo ter aplicação como promotor constitutivo no milho. Em *Coffea arabica*, a expressão foi detectada

principalmente no endosperma dos frutos aos 90 e 120 dias após a floração. Em transformação de tabaco com gene *gus* controlado pelo promotor *PCaLTP-S* isolado de *C. arabica* mostrou que a expressão do gene repórter foi detectada em todos os órgãos testados da planta, exceto nas raízes onde a expressão foi baixa ou nula (COTTA et al., 2014).

Plantas de tabaco transformadas com o promotor constitutivo *PSulfT0,5*, isolado de *Glycine max*, apresentaram alta expressão do gene repórter *gus* em todos órgãos das plantas analisadas, sendo essa expressão mais forte em folha, raiz e semente (SANTANA, 2012). Nesse trabalho a expressão do gene *PSulfT0,5* foi verificada nos tecidos de folha e raízes em milho.

O promotor específico de folha *GmCit1* isolado de *Glycine max*, foi utilizado para transformar *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium*. As análises histoquímicas demonstraram que o promotor denominado *PCit0,4* (437pb), foi capaz de conduzir a expressão do gene repórter *gus* de forma preferencial em folha. Neste trabalho o promotor *GmCit1* apresentou comportamento diferente no milho, pois a expressão apareceu tanto nas folhas como nas raízes das plantas transformadas com esse promotor. De acordo com Potenza et al., 2004, promotores ativos em determinados tecidos de dicotiledôneas podem não ser ativos em monocotiledôneas, ou ser ativos em diferentes tecidos ou em níveis diferentes.

Nesse trabalho, as plantas obtidas da transformação com o promotor de senescência *PSAG12-like*, nas análises histoquímicas de *gus*, a expressão pode não ter sido observada nas folhas, em função da baixa expressão do gene observada nas folhas, na análise de expressão quantitativa. Já nos tecidos das raízes foi detectada expressão no PCR quantitativo.

Gan e Amasino (1995) demonstraram um atraso na senescência foliar em plantas de tabaco transgênicas contendo o promotor *SAG12*. Em um trabalho similar, Pontier et al. (1999) avaliaram a expressão do gene marcador da β -glucuronidase (*gus*) dirigido pelo promotor *SAG12*. Em um estudo realizado por Martins (2010), com o gene *gus* sendo dirigido pelo promotor *SAG12*, a expressão foi inicialmente detectada em folhas onde o conteúdo de clorofila reduziu em 50%. Esses resultados indicaram que o promotor do gene *PSAG12-like* possui elementos regulatórios que permitem a indução da transcrição do gene, especificamente, durante o processo de senescência foliar. No

entanto, nesse trabalho o promotor *PSAG12-Like* não dirigiu a expressão do gene *gus* em plantas de milho.

Esses resultados permitem pressupor que promotores órgãos específicos, quando validados em milho, apresentam comportamento diferente, uma vez que os mecanismos de regulação gênica podem ser distintos para cada espécie. Segundo Cotta et al. (2011), pode haver divergência de expressão ao utilizar um mesmo promotor dentro do grupo das angiospermas, pois há muitas vezes diferenças no nível de expressão para monocotiledôneas e dicotiledôneas e, desta forma, pode não existir garantia de que esses promotores se comportem da mesma forma em diferentes espécies de plantas.

6. CONCLUSÃO

Os promotores heterólogos *PCaLTP-S*, *PSulfT0,5*, *PCit0,4* e *PSAG12-Like* isolados de cafeeiro, soja e cana-de açúcar, controlam a expressão gênica em plantas transgênicas de milho.

Novos trabalhos devem ser realizados a fim de validar esses resultados preliminares obtidos para a cultura do milho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSEM, S.K.; HASSAN, O.S. Real time quantitative PCR analysis of transgenic maize plants produced by Agrobacterium-mediated transformation and particle bombardment. **Journal Applied Science Reserch**, v.4, p.408-414, 2008.

COTTA, M.G., BARROS, L.M.G., ALMEIDA, J.D., SANTOS, D.B.M., ABREU, M.S.; BARBOSA, E.A., VINECKY, F., ANDRADE, A.C., MARRACCINI, P. Isolamento e caracterização do promotor fruto-específico do gene *CALTP1* de *Coffea arabica*. In: **VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 2011, Araxá- MG, Resumo Expandido.

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

DUTT, M.; ANANTHAKRISHNAN, G.; JAROMINUTOS, M.K.; BRLANSKY, R.H.; GROSSER, J.W. Evaluation of four phloem-specific promoters in vegetative tissues of transgenic citrus plants. **Tree Physiology**, Victoria, v. 32, n. 1, p. 83-93, 2012.

FAGARD, M.; VAUCHERET, H. Transgene silencing in plants: How many mechanisms? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v. 51, p.167-194, 2000.

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

HOBBS, S.L.; KPODAR, P.; DELONG, C.M. The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. **Plant Molecular Biology**, v. 15, p.851–864, 1990.

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

JEFFERSON, R.A.; KAVANAUGH, T.A.; BEVAN, M.W. Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, v.6, p.3001–3907, 1987.

MEHOTA, R.; GUPTA, G.; SETHI, R.; BHALOTHIA, P.; KUMAR, N.; MEHOTA, S. Designer promoter: an artwork of cis engineering. **Plant Molecular Biology**, v.75, p.527-536, 2011.

MELOTTO-PASSARIN, D.M. **Transformação genética de cana-de-açúcar por biobalística e *Agrobacterium tumefaciens* visando estudar o mecanismo de morte celular programada**. 2009. 147p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MIYATA, L.Y.; HARAKAVA, R.; STIPP L.C.L.; MENDES B.M.J.; GLORIA B.A.; MOURAO FILHO, F.A.A. GUS expression in sweet oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) driven by three different phloem-specific promoters. **Plant Cell Reports**, July 2012.

PERAMARTI A; TWYMAN RM; GÓMEZ-GALERA S; NAQVI S; FARRÉ G; SABALZA M; MIRALPEIX B; DASHEVSKAYA S; YUAN D; RAMESSAR K;

CHRISTOU P; ZHU C; BASSIE L; CAPEL T. Promoter diversity in multigene transformation. **Plant Molecular Biology**, v.73, p.363-378, 2010.

POTENZA, C.; ALEMAN, L.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Invited review: Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental Applications: promoters used in plant transformation. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v.40, p.1-22, 2004.

SANTANA, R. H. **Isolamento e caracterização de promotores órgão-específicos de plantas de soja (*Glycine max*)**. 2012. 97 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

SCHUBERT, D.; LECHTENBERG, B.; FORSBACH, A.; GILS, M.; BAHADUR, S.; SCHIMIDT, R. Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: the predominant role of gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. **Plant Cell**, v.16, p.2561–2572, 2004.

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

WEI, H.; WANG, M.L.; MOORE, P.H.; ALBERT, H.H. Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, p. 1241-1251, 2003.

CONCLUSÕES GERAIS

A embriogênese somática na transformação de plantas de milho é um processo que deve ser otimizado e padronizado, e nesse estudo a linhagem L3 de milho tropical apresenta alta produção de calos embriogênicos/tipoII, quando utiliza-se o meio de indução de calos MI (Meio basal N6, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de caseína hidrolisada, 100 mg L⁻¹ de mio inositol; 2,9 g L⁻¹ de L-prolina e 15 mg L⁻¹ de nitrato de prata), suplementado com 10 mg L⁻¹ de 2,4-D. Para a maturação dos calos, a presença do sulfato de cobre no meio de cultura sem a adição de reguladores de crescimento, eleva a maturação dos calos e a regeneração de plantas.

A transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* em milho tropical apresenta maior frequência de transformação genética quando se utiliza o método I (Meio de Infecção: N6 sais e vitaminas, 68,4 g L⁻¹ sacarose, 36 g L⁻¹ glicose, 0,7 g L⁻¹ prolina, 0,25 g L⁻¹ cefotaxima, 1,5 mg L⁻¹ 2,4D, 100 µM L⁻¹ acetoseringona, 3 g L⁻¹ Phytigel, pH 5,2 – Meio de co-cultivo: N6 sais e vitaminas (30 g L⁻¹ sacarose, 0,7 g L⁻¹ prolina, 0,25 g L⁻¹ cefotaxima, 1,5 mg L⁻¹ 2,4D, 100 µM L⁻¹ acetoseringona, 0,85 mg L⁻¹ nitrato de prata, 3 mg L⁻¹ L-cisteína, 3 g L⁻¹ Phytigel, pH 5,8). Novos trabalhos devem ser realizados visando ajustar outros fatores relacionados às condições *in vitro*, para aumentar a eficiência de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* em embriões zigóticos de linhagens de milho tropical.

O promotor *PP2* isolado de abóbora é capaz de dirigir a expressão do gene repórter *gus* em plantas transgênicas de milho.

Os promotores heterólogos *PCaLTP-S*, *PSulfT0,5*, *PCit0,4* e *PSAG12-Like* isolados de cafeeiro, soja e cana-de açúcar, controlam a expressão gênica em plantas transgênicas de milho. Novos trabalhos devem ser realizados a fim de validar esses resultados preliminares obtidos para a cultura do milho.