



TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE ARROZ E CANA-DE-AÇÚCAR VISANDO TOLERÂNCIA À SECA

No. 14102

**Beatriz Áreas Macários¹; Larissa Mara de Andrade²; Rafael Fávero Peixoto Junior²;
Alexandre Palma Boer Martins²; Silvana Creste³.**

RESUMO - A cana-de-açúcar é um organismo com um genoma complexo e recalcitrante para a transformação genética. Em estudos de suporte para a prospecção e caracterização de funcional de genes candidatos, é de grande utilidade o uso de espécies modelos para transformação, como o arroz. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo padronizar metodologia para o cultivo de calos embriogênicos de arroz e cana, visando a transformação por *Agrobacterium tumefaciens*. Foi utilizada a cepa EAH105 de *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o vetor controle pXHb7-F-F-UBIL de super-expressão desenvolvido especialmente para monocotiledôneas, com o gene repórter Green Fluorescent Protein (GFP) controlado pelo promotor UBQ. Como marcador de seleção na planta, este vetor possui gene de resistência a higromicina (*hpt*). Em arroz os calos embriogênicos foram obtidos a partir do desenvolvimento do tecido escutelo da semente de arroz da variedade 'Nipponbare' (subespécie Japonica). Em cana os calos embriogênicos foram obtidos a partir do de tecido meristemático do ponteiro do colmo. A eficiência da transformação em arroz foi de 50-60%, e a de cana 0,5 evento/g calo transformado. Foram avaliados por qPCR o nível de expressão do transgene em 6 e 5 eventos de arroz e cana transformados, respectivamente. Os métodos desenvolvidos neste trabalho estão sendo utilizados para super-expressar em arroz e em cana quatro genes candidatos a tolerância a seca, a saber, desidrina, dirigente-jacalina e dois fatores de transcrição

Palavras chaves: genômica funcional; OGMs; plantas transgênicas.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, Barão de Mauá, Ribeirão Preto - SP, bia.macarios@hotmail.com

² Bolsista CNPq. Curso de Doutorado, departamento Genética FMRP/USP.

³Orientadora: Pesquisadora, Centro de Cana, IAC, Ribeirão Preto - SP. screste@iac.sp.gov.br



ABSTRACT - Sugarcane has a complex genome, which is recalcitrant to genetic transformation. In studies supporting the prospection and characterization of functional candidate genes, it is useful to use model species for transformation, as rice. Thus, this study aimed to develop methods for calli cultivation of rice and cane, focusing on *Agrobacterium tumefaciens* transformation. The EAH105 *Agrobacterium tumefaciens* strain were used carrying the overexpression vector pXHb7-F-F-UBIL, developed specially for monocot with UBQ promoter regulating the Green Fluorescent Protein (GFP) reporter gene. As a plant selectable marker, this vector carries hygromycin (*hpt*) gene. In the rice, the calli were obtained from the development of the scutellum seed tissue of rice variety 'Nipponbare' (*Japonica* subspecies), while in sugarcane, the calli were obtained from leaf roll. The efficiency of transformation in rice ranged from 50-60% and in sugarcane was 0.5 event/g calus. The transgene expression level was evaluated in six and five events of rice and sugarcane transformed, respectively. The methods developed in this work are being used to overexpress four genes candidates in rice and sugarcane for drought tolerance, i.e. *dehidrina*, *jacalin-dirigent* and two transcription factors.

Key words: functional genomics, trasgenic plants, GMOs.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, e sua área destinada à atividade sucroalcooleira está estimada em mais de 9 milhões de hectares, distribuídos em todos os estados produtores, sendo o estado de São Paulo o maior deles, contribuindo com 54% da área total plantada. No entanto, aumento do aquecimento global tem gerado a ampliação e imprevisão dos períodos de seca, influenciando de forma direta na disponibilidade de água no solo para os canaviais, reduzindo significativamente os rendimentos da cana-de-açúcar., como verificado nas três últimas safras na região Centro Sul do país. Nesse sentido, o desenvolvimento de variedades de cana capazes de manter uma boa performance produtiva em condições de deficiência hídrica assume particular importância no panorama de alterações climáticas, pois há perspectiva de aumento da temperatura e prolongamento das restrições hídricas (Bruce, 2002).

Dessa forma, o uso da biotecnologia nos programas de melhoramento para gerar plantas geneticamente modificadas dá-se como uma solução bastante viável para a obtenção de variedades superiores. No entanto, a cana-de-açúcar é uma planta de genoma complexo, recalcitrante aos processos de transformação disponíveis. Nesse sentido, faz-se necessária a otimização de procedimentos capazes de incrementar a eficiência da transformação daqueles



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

genótipos responsivos à transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Ao mesmo tempo, a caracterização funcional de genes alvos ao processo de transformação de cana necessitam ser validados em plantas modelos, onde os protocolos de transformação são bem estabelecidos, rápidos e eficientes, a exemplo do arroz.

Portanto, este projeto teve por objetivos desenvolver procedimentos de transformação de cana e arroz, utilizando-se os vetores construídos pela equipe do Centro de Cana, de forma a poder utilizá-los em experimentos futuros voltados para obtenção de canas transgênicas com maior tolerância a seca.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Transformação genética de arroz: sementes de arroz, variedade *Nipponbare* foram descascadas e desinfetadas, em fluxo laminar, por imersão em álcool 70% por 1 min, seguida da lavagem com água estéril. Após, as sementes foram colocadas em solução de hipoclorito de sódio 2,5% durante 25 minutos. A seguir, as sementes foram lavadas em água estéril por cinco vezes e todo o processo de desinfecção repetido mais uma vez. Após, foram introduzidas em meio N6D+2,4D solidificado com Gelrite (4g/L) e cultivadas sob luz contínua a 32°C por 10 dias para produção dos calos embriogênicos conforme procedimento descrito por Toki et al, (2006). Para transformação das sementes de arroz foi utilizada a cepa EAH105 de *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o vetor controle *pXHb7-F-F-UBIL*. Esse vetor contém gene repórter GFP (*Green Fluorescent Protein*) controlado pelo promotor UBQ, o qual permite acompanhar a transformação em lupa com filtro para GFP. Sementes de arroz foram transformadas seguindo o procedimento proposto por Toki et al., (2006), usando-se suspensão de *Agrobacterium* ajustada para OD₆₀₀ = 0,1. Após, os calos foram deixados secar em fluxo laminar, em papel filtro estéril por 40 min e a seguir transferidos para uma placa de Petri contendo meio 2N6-AS. Os calos foram co-cultivados a 25°C durante três dias no escuro para processo de infecção. Após o co-cultivo, os calos foram submetidos a lavagens em água estéril para remoção do excesso de *Agrobacterium*, seguida de uma lavagem em solução de antibiótico Meropenem (20mg/L), para eliminação da *Agrobacterium*. A seguir, os calos foram colocados em descanso, em luz contínua a 32°C durante quinze dias para a proliferação das células transformadas. Após, estes foram transferidos para meio de regeneração REIII (Toki et al., 2006) suplementado com os antibióticos, Meropenem (20mg/L) e Higromicina (50mg/L), mantidos a 26°C, com fotoperíodo de 16 horas de luz para regeneração das células transformadas, com subcultivos a cada quinze dias por até cinco subcultivos.



2.2. Produção de calos embriogênicos de cana: ponteiros do genótipos SP80-3280 com idade entre 6 a 9 meses, foram coletados de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação e levados ao laboratório, removendo-se duas camadas mais externas de folhas. Em fluxo laminar foi realizado a desinfecção do material com etanol 70% por 10 minutos, seguido de água sanitária 60% (v/v) por 15 minutos, e três lavagens com água Mili-Q autoclavada. Após o processo de desinfecção, foi retirada às camadas de folhas restantes para a exposição do palmito, região que contem o meristema apical caulinar. Os palmitos foram cortados em discos transversais e introduzidos em meio de indução de calos (MS), suplementado com 20g sacarose, 10 ml de água de côco 3 mg/L de 2,4D, solidificado com Gelrite (4g/L) e incubados no escuro, a 26 °C, por 60 dias, subcultivando-os a cada 15 dias.

2.3. Transformação dos calos embriogênicos de cana-de-açúcar com *Agrobacterium tumefaciens*: calos embriogênicos de cana foram imersos em suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor *pXHb7-F-F-UBIL*. Após, os calos foram removidos e colocados para secar sobre papel de filtro estéril, e posteriormente transferidos a uma placa de *Petri* contendo um papel filtro, mantidos em co-cultivo por 3 dias, no escuro, a 26°C. Como controle, calos foram submetidos ao mesmo procedimento, exceto a adição de *Agrobacterium*. Após, os calos foram transferidos para o meio de indução calos, contendo 20mg/L de Meropenem, mantido no escuro a 24-26°C por 10 dias. A seguir, foram transferidos para o meio de regeneração, suplementado com Hygromicina (20mg/L) e Meropenem (20mg/L), para a seleção dos transformantes, incubados a 26°C sob fotoperíodo de 16h luz, subcultivando-os a cada 15 dias, para regeneração de plantas.

2.4. Confirmação dos eventos transgênicos de arroz e cana: a confirmação dos eventos transgênicos de arroz e cana foi feita por meio da técnica PCR quantitativo (qPCR), utilizando-se um par de *primers* desenhado para amplificar um segmento do gene de resistência a higromicina (*hpt*). Para tal, o RNA total foi extraído de folhas das plantas transformadas e controle, utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen), segundo o procedimento do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *Go Script Reverse Transcription system* (Promega) de acordo com o manual de instruções do fabricante. Como normalizador interno, foi utilizado um par de *primers* específico para gene constitutivo GAPDH de arroz e cana.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Calos de arroz submetidos ao processo de transformação foram capazes de regenerar plantas em meio seletivo 35 dias após a transformação. (Figura 1).

Em geral, a eficiência de transformação para arroz foi alta, variando de 50 - 60%, sendo que a transformação de sementes novas mostrou ser o principal determinante para obtenção de maiores taxas de transformação. Essa eficiência foi superior àquelas obtidas por Saika & Toki (2009) na transformação de sementes maduras da cultivar Nipponbare, cujos valores variaram de 9,4% a 20,5%.

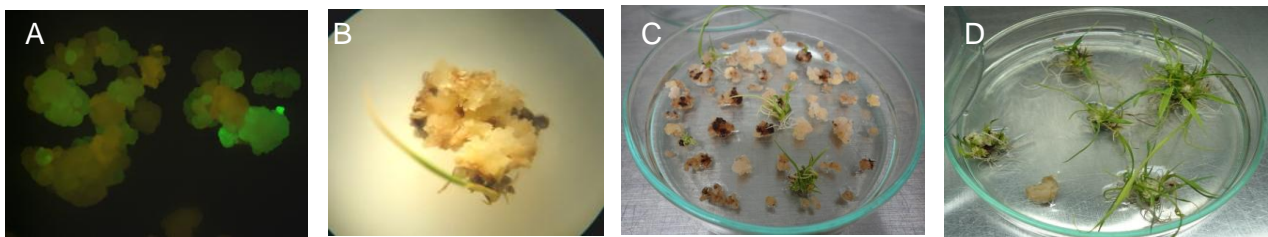


Figura 1. Calos de arroz transformados. (A) Calos transformados expressando GFP; (B) Início de regeneração de plantas (aumento 20X). (C) Calos em Regeneração no meio REIII. (D) Regeneração completa dos calos transformados.

Similarmente, o procedimento de transformação genética de cana possibilitou a obtenção e plantas regeneradas aos 50 dias após a transformação (Figura 2), sendo a eficiência de transformação ao redor de 8 plantas para cada 15 g de calo transformado.

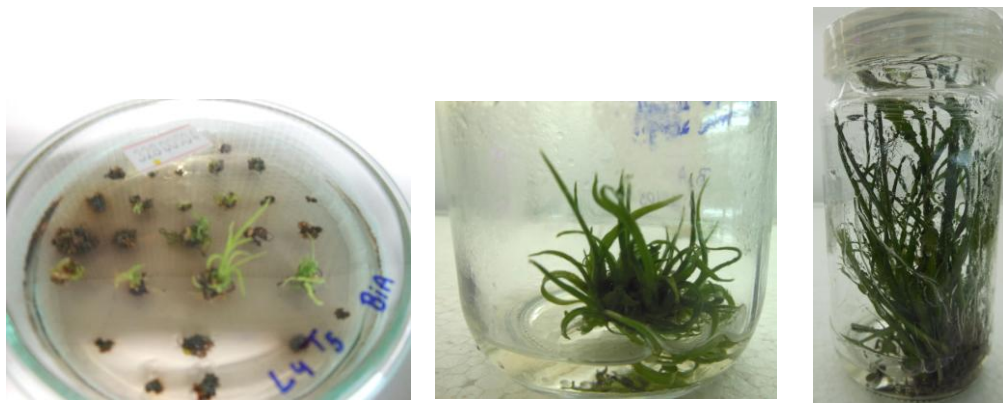


Figura 2. Regeneração, em meio seletivo, de plantas de cana-de-açúcar, variedade SP80-3280 transformadas com o vetor pXHb7-F-F-UBIL.

A análise PCR em tempo real realizada com seis plantas de arroz regeneradas em meio seletivo e uma planta controle evidenciou que todas as plantas provenientes de calos transformados expressaram o gene da higromicina, ao contrário da planta não transformada, o que demonstra que todas as plantas transformadas são transgênicas. Conforme pode ser notado na

Figura 3, a planta 2 foi a que apresentou maior expressão do gene da higromicina, enquanto que as plantas 1 e 5 foram as que apresentaram menor expressão do transgene.

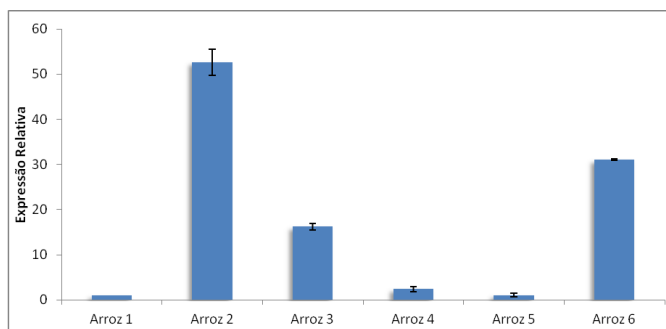


Figura 3. Perfil de expressão do gene da Higromicina em 06 plantas transformadas de arroz contendo o T-DNA da construção pXHb7-F-F-UBIL. Os cálculos foram realizados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), utilizando como normalizador o gene endógeno GAPDH, e como controle, a amostra com o menor nível de expressão (Amostra 1).

Similarmente, a análise realizada com cinco plantas de cana-de-açúcar crescendo em meio seletivo evidenciou que todas as plantas transformadas expressaram o gene da Higromicina, enquanto que o controle não houve expressão do gene (Figura 4), como era esperado. Conforme pode ser notado na Figura 4, a o evento “cana 2” foi a que apresentou maior expressão do gene da Higromicina, enquanto que os eventos “cana 3” e “cana 5” foram as que apresentaram menor expressão do transgene.

Os relatos bem sucedidos da transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* em cana-de-açúcar até o momento são escassos, decorrentes sobretudo da baixa eficiência da método e também da alta dependência do genótipo a ser transformado. Em uma taxa inferior a 1%, plantas transgênicas resistente a insetos foram obtidas por Arencibia e colaboradores (1997), quando calos embriogênicos da cultivar cubana Ja60-5 foram co-cultivados com as cepas LBA-4404 e EHA-101, contendo um vetor supervirulento carregando o repórter *uidA* (GUS) sob controle do promotor CaMV35S.

No mesmo ano e utilizando a mesma variedade, Enríquez-Obregón e colaboradores desenvolveram plantas transgênicas resistentes ao herbicida BASTA, em uma frequência de transformação de 10 a 30%, a partir de seções meristemáticas co-cultivadas com a cepa agrobacteriana C58C1, contendo o gene repórter *uidA*, o gene de seleção *bar*, o qual confere resistência à fosfotricina (composto ativo do herbicida comercial BASTA), ambos sob controle do promotor CaMV35S. Elliot e colaboradores (1998), utilizando calos embriogênicos da cultivar

australiana Q117 co-cultivados com a cepa AGL0, obtiveram plantas transgênicas expressando GFP, sob controle do promotor CaMV35S, em taxas inferiores a 6%. Joyce e colaboradores (2010), por sua vez, avaliaram o potencial de transformação genética em cana-de-açúcar avaliando a influência das cepas AGL0, AGL1, EHA-105 e LBA-4404, na transformação da cultivar Q117. Para todas as cepas houve regeneração de plantas transgênicas em uma taxa variável entre 0,8 - 4,8%. Recentemente, também estamos transformando um genótipo IAC, a IACSP95-5000, porém ainda não temos plantas positivas confirmadas para esse genótipo.

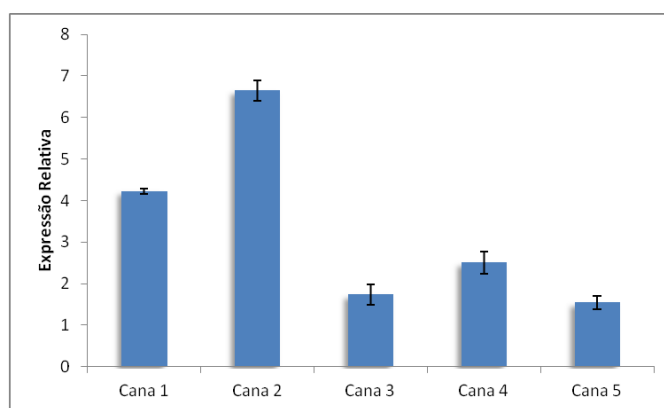


Figura 4. Perfil de expressão do gene da Higromicina em 05 plantas transformadas de cana-de-açúcar contendo o T-DNA da construção pXHb7-F-F-UBIL. Os cálculos foram realizados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), utilizando como normalizador o gene endógeno GAPDH, e como controle, a amostra com o menor nível de expressão (Amostra 5).

No mesmo ano e utilizando a mesma variedade, Enríquez-Obregón e colaboradores desenvolveram plantas transgênicas resistentes ao herbicida BASTA, em uma frequência de transformação de 10 a 30%, a partir de seções meristemáticas co-cultivadas com a cepa agrobacteriana C58C1, contendo o gene repórter *uidA*, o gene de seleção *bar*, o qual confere resistência à fosfotricina (composto ativo do herbicida comercial BASTA), ambos sob controle do promotor CaMV35S. Elliot e colaboradores (1998), utilizando calos embriogênicos da cultivar australiana Q117 co-cultivados com a cepa AGL0, obtiveram plantas transgênicas expressando GFP, sob controle do promotor CaMV35S, em taxas inferiores a 6%. Joyce e colaboradores (2010), por sua vez, avaliaram o potencial de transformação genética em cana-de-açúcar avaliando a influência das cepas AGL0, AGL1, EHA-105 e LBA-4404, na transformação da cultivar Q117. Para todas as cepas houve regeneração de plantas transgênicas em uma taxa variável entre 0,8 - 4,8%.

No Centro de Cana, as transformações com os vetores carregando genes para tolerância seca estão sendo realizadas os genes desidrina, dirigente jacalina, e para o fator de transcrição gene



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

ScbZIP, e os protocolos para transformação de cana e de arroz encontram-se otimizados e poderão ser utilizados na caracterização funcional de genes de interesse econômico.

4. CONCLUSÃO

- Os procedimentos de transformação aqui estabelecidos foram eficientes para obtenção de plantas geneticamente modificadas de arroz e cana, e poderão ser empregados em outros experimentos visando a caracterização funcional de genes de cana-de-açúcar.

5. AGRADECIMENTOS

CNPq; Bioen FAPESP (2011-50661-8).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARENCIBIA, A. D., VÁZQUEZ, R. I.; PRIETO, D., TÉLLEZ, P., CARMONA, E. R., COEGO, A., HERNÁNDEZ, L., RIVA, G. A., SELMAN-HOUSSEIN, G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 247-255, 1997.

BRUCE, W. B.; EDMEADES, G. O.; BARKER, T. C. Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. **Journal of experimental botany**, v. 53, p. 13-25, 2002.

ELLIOTT, A. R., CAMPBELL, J. A., BRETTELL, R. I. S., GROF, C. P. L. *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 25, p. 739-743, 1998.

ENRÍQUEZ-OBREGÓN, G. A., VÁZQUEZ-PADRÓN, R. I., PRIETO-SAMSÓNOV, D. L., RIVA, G. A. DE LA; SELMANHOUSEIN, G. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta**, v. 206, p. 20-27, 1998.

JOYCE, P., KUWAHATA, M., TURNER, N., LAKSHMANAN, P. Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *Agrobacterium* mediated transformation of sugarcane. **Plant Cell Reporter**, v. 29, n. 2, p. 795-799, 2010.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

SAIKA, H., TOKI, S. Visual selection allows immediate identification of transgenic rice calli efficiently accumulating transgene products. **Plant Cell Reporter** v.28, p.619–626, 2009.

TOKI, S., HARA, N., ONO, K., ONODERA, H., TAGIRI, A., OKA, S., TANAKA, H. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. **Plant Journal** v.47, p.961–976. 2006