

## EFEITO DA ACETOSIRINGONA NA VIRULÊNCIA DE *Agrobacterium tumefaciens* EM ARROZ

Tcaceco, F. A. Epagri, Estação Experimental de Itajaí, Caixa Postal 277, 88301-970 – Itajaí. Email: tcaceco@epagri.rct-sc.br

Há vários fatores que influenciam na virulência de copas de *Agrobacterium tumefaciens*, incluindo-se o genótipo bacteriano, o pH do meio, e a presença de substâncias fenólicas no meio de cultura, o que, por sua vez, irá influenciar na taxa de transformação efetuada pela bactéria. A acetosiringona (AS; 3',5'-dimetoxi-4'-hidroxi-acetophane) tem sido implicada como um dos mais importantes compostos fenólicos para a indução da virulência, interagindo com os genes *virA*, *virG* e *virG* do plasmídeo pTi. Outros compostos incluem AS sintética, acetovanilone, siringaldeído, e beta-glicosídeos do ácido siringico. O pH do meio também afeta a virulência da bactéria. Embora o crescimento possa se dar a pH variando desde 4,5 até 11,0, com um ótimo de 7,25, existe uma correlação negativa entre o pH e a eficiência de transformação de plantas por agrobactéria, para faixas de pH entre 5,2 e 5,8. Um outro fator comumente citado na literatura diz respeito a diferenças na infectividade e virulência de distintas copas da bactéria.

Para testar alguns desses efeitos, quatro experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia da Universidade da Louisiana (Baton Rouge), em 1997, nos quais várias concentrações de AS foram utilizadas em diversas copas de *Agrobacterium tumefaciens*, testando-se a indução da virulência nas cultivares Epagri 106 e Epagri 109. O meio de cultura CC foi utilizado. A indução de calos foi promovida pela adição de 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, enquanto que para a regeneração de plantas utilizou-se a combinação de 0,05 mg L<sup>-1</sup> de zeatin ribosídeo e 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (IAA). As sementes após descascadas foram desinfetadas por um processo em duas etapas; na primeira, as mesmas foram imersas em álcool 70% por dois minutos, e após lavadas abundantemente com água esterilizada; na segunda, as sementes foram imersas por 40 minutos em uma solução de hipoclorito de sódio a 2,65%, com agitação, sendo após lavadas. As sementes, após colocadas no devido meio de cultura, foram mantidas no escuro por duas semanas, a 28 °C.

As seguintes copas de *Agrobacterium tumefaciens* foram utilizadas, todas contendo o gene para resistência ao antibiótico higromicina (*hpt*) e o gene *gus*: LBA4404(pTOK233), EHA105(pCAMBIA1201) e EHA105(pCAMBIA1301). As soluções estoque de AS foram preparadas pela dissolução da quantidade apropriada em etanol a 95%. As soluções foram esterilizadas por filtração antes do uso, e adicionadas às suspensões bacterianas nas seguintes concentrações: 100 µM, 250 µM e 400 µM. Estoques em glicerol foram mantidos em um freezer a -70 °C e, por ocasião do uso, as células bacterianas foram colocadas em meio de cultura sólido Luria Bertani contendo os antibióticos apropriados para cada cepa, e após três dias transferidas para meio AB. Após três dias nesse meio, as células foram coletadas, suspensas em meio AAM a uma densidade de 3-5 x 10<sup>9</sup> células por mL contendo a concentração apropriada de AS, e utilizadas para a transformação dos calos de arroz.

Os calos utilizados para transformação foram transferidos para meio de cultura quatro dias antes do evento e quebrados em pedaços com cerca de 5 mm de diâmetro. Os mesmos foram imersos na suspensão de bactérias, transferidos para meio CC e incubados a 28 °C por três dias, após o que os mesmos foram lavados com água esterilizada contendo 250 mg mL<sup>-1</sup> cefotaxima, para eliminação das bactérias. O material foi incubado em meio CC contendo 40 mg mL<sup>-1</sup> higromicina para a seleção de células transformadas, além de 250 mg mL<sup>-1</sup> cefotaxima. Para verificar a condição de transformação dos calos cerca de 21 dias após a transformação, o teste histoquímico para expressão de Gus foi realizado. A expressão em calos foi analisada pela presença / ausência de setores azulados.

Embora os quatro experimentos tenham utilizado o mesmo protocolo básico, algumas diferenças existiram, sendo listadas a seguir:

#### Experimento 1

Cv. e n°. de amostras: Epagri 109, 252 amostras  
Idade dos calos: 1 a 2 meses, dependendo do lote  
Preparação dos calos: replicados para novo meio 4 dias antes  
Cepa(s): LBA4404(pTOK233); OD<sub>600</sub> = 1,85  
Concentr. AS: 100 µM, 250 µM, 400 µM  
No. de dias em cultivo: 28  
Controle positivo: nenhum  
Controle negativo: calos não transformados e células de *A. tumefaciens*

#### Experimento 3

Cv. e n°. de amostras: Epagri 109, 336 amostras  
Idade dos calos: 14 dias  
Preparação dos calos: sem preparo específico  
Cepa(s): LBA4404(pTOK233); OD<sub>600</sub> = 1,82  
Concentr. AS: 100 µM, 250 µM, 400 µM  
No. de dias em cultivo: 8  
Controle positivo: calos transgênicos do experimento 1 e células de *Escherichia coli* expressando o gene *gus*  
Controle negativo: calos não transformados e células de *A. tumefaciens*

#### Experimento 2

Cv. e n°. de amostras: Epagri 109, 912 amostras  
Idade dos calos: 28 dias  
Preparação dos calos: replicados para novo meio 4 dias antes  
Cepa(s): LBA4404(pTOK233); OD<sub>600</sub> = 1,82  
EHA105(pCAMBIA1201); OD<sub>600</sub> = 1,88  
EHA105(pCAMBIA1301); OD<sub>600</sub> = 1,74  
Concentr. AS: 100 µM, 250 µM, 400 µM  
No. de dias em cultivo: 4  
Controle positivo: calos transgênicos do experimento 1  
Controle negativo: calos não transformados e células de *A. tumefaciens*

#### Experimento 4

Cv. e n°. de amostras: Epagri 106, 360 amostras  
Idade dos calos: 14 dias  
Preparação dos calos: sem preparo específico  
Cepa(s): LBA4404(pTOK233); OD<sub>600</sub> = 1,82  
EHA105(pCAMBIA1201); OD<sub>600</sub> = 1,88  
EHA105(pCAMBIA1301); OD<sub>600</sub> = 1,74  
Concentr. AS: 100 µM  
No. de dias em cultivo: 8  
Controle positivo: calos transgênicos do experimento 1 e células de *Escherichia coli* expressando o gene *gus*  
Controle negativo: calos não transformados e células de *A. tumefaciens*

Os calos foram coletados do meio de crescimento vários dias após os eventos de transformação, de acordo com os tratamentos acima, e avaliados para a expressão da proteína Gus. Porções equivalentes a 1/2 calo foram depositadas em placas de ELISA com 96 poços, cobertos com a solução e incubados por 12 horas a 37 °C, sendo após este período analisada a expressão. Os dados foram analisados pelo teste de  $\chi^2$ .

Os controles positivos utilizados nos experimentos 2, 3 e 4 expressaram a proteína a níveis elevados, como era de se esperar; nos calos testados, a expressão foi geralmente localizada em pequenos setores, indicando que apenas poucas células em cada calo foram transformadas. Os controles negativos não expressaram a proteína. Um dos problemas apresentados quando a cepa EHA105 foi utilizada foi o crescimento excessivo da mesma, inclusive após a utilização de carbenicilina; em muitos casos a concentração do antibiótico teve que ser elevada para 400 mg L<sup>-1</sup>. Como o gene utilizado nessas construções contém um intron, o qual não permite a sua expressão em células eucarióticas, este crescimento excessivo não influenciou nas leituras de expressão do gene em células de arroz transformadas. No entanto, em alguns casos houve o descarte de alguns tratamentos devido ao crescimento desordenado de células de *A. tumefaciens*.

O teste de  $\chi^2$  (Tabela 1) mostrou diferenças significativas entre as concentrações de AS no experimento 2 quando a cepa LBA4404(pTOK233) foi utilizada, no qual as taxas de

transformação obtidas com 400  $\mu\text{M}$  de AS foram cerca da metade das taxas obtidas com concentrações mais baixas. Para os demais casos, a concentração de AS não influenciou significativamente a taxa de transformação.

O efeito positivo de AS na indução da virulência de *Agrobacterium tumefaciens* é bastante comum, e em alguns casos concentrações tão baixas quanto 20  $\mu\text{M}$  foram suficientes para produzir efeitos marcantes. É também comum observarem-se efeitos devido à cepa bacteriana utilizada. Em geral, cepas do tipo octapina, como LBA4404, parecem ser menos sensíveis aos sinais induzidos por AS ou por outros compostos no meio de cultura. No presente caso, essa cepa não mostrou aumento na virulência quando a concentração de AS passou de 100  $\mu\text{M}$  para 250  $\mu\text{M}$ , no entanto houve uma redução na virulência quando a concentração mais alta (400  $\mu\text{M}$ ) foi aplicada, indicando algum efeito tóxico desse composto nos calos de arroz ou nas células de *Agrobacterium tumefaciens*.

No total, foram analisados 1788 setores, sendo a taxa média de transformação da ordem de 13,9%. Os valores mínimos observados foram de 1,4%, e em geral a cepa LBA4404 transformada com o plasmídeo pTOK233 conduziu a resultados superiores, apresentando uma média de transformação de 22,6% quando todas as concentrações de AS em três experimentos foram consideradas.

Em geral os resultados indicam que concentrações da ordem de 100  $\mu\text{M}$ , ou até 250  $\mu\text{M}$  de acetosiringona podem ser benéficas para a transformação de calos de arroz, sendo que há evidências de efeitos tóxicos quando concentrações mais altas (400  $\mu\text{M}$ ) são utilizadas.

Tabela 1- Expressão da proteína Gus em calos de arroz de vários experimentos testando o efeito de concentrações de acetosiringona ( $\mu\text{M}$ ) na virulência de cepas de *Agrobacterium tumefaciens*

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Cepa <sup>a</sup>	Expressão de Gus				Valor de $\chi^2$	Probabilidade
		Positiva		Negativa			
		N <sup>b</sup>	Porcent.	N <sup>b</sup>	Porcent.	Total	
Experimento 1							
100	4TOK	21	19,4	87	80,6	108	0,76
250	4TOK	17	23,6	55	76,4	72	
400	4TOK	13	18,0	59	82,0	72	
	Total	51	20,2	201	79,8	252	
Experimento 2							
100	4TOK	49	43,8	63	56,2	112	14,1
250	4TOK	50	44,6	62	55,4	112	
400	4TOK	26	23,2	86	76,8	112	
	Total	125	37,2	211	62,8	336	
100	5(12)	2	2,1	94	97,9	96	2,0
250	5(12)	0	0,0	100	100	96	
400	5(12)	2	2,1	94	97,9	96	
	Total	4	1,4	284	98,6	288	
100	5(13)	7	7,3	89	92,7	96	5,3
250	5(13)	1	1,0	95	99,0	96	
400	5(13)	3	3,1	93	96,9	96	
	Total	11	3,8	277	96,2	288	
Experimento 3							
100	4TOK	12	10,7	100	89,3	112	0,61
250	4TOK	9	8,0	103	92,0	112	
400	4TOK	12	10,7	100	89,3	112	
	Total	33	9,8	303	90,2	336	
Experimento 4							
100	4TOK	10	10,4	86	89,6	96	0,81
100	5(12)	7	7,3	89	92,7	96	
100	5(13)	7	7,3	89	92,7	96	
	Total	24	8,3	264	91,7	288	
Total	Geral	248	13,9	1540	86,1	1788	

<sup>a</sup> Os códigos para as cepas de *Agrobacterium tumefaciens* são os seguintes: 4TOK = LBA4404 pTOK233; 5(12) = EHA105 pCAMBIA1201; 5(13) = EHA105 pCAMBIA1301