



Agrobacterium:

Um sistema natural de transferência de genes para plantas

Ana Cristina Miranda Brasileiro, Ph.D.,
Biologia Molecular e Celular Vegetal
anacmb@cenargen.embrapa.br

Cristiano Lacorte, M.Sc.,
Genética - Laboratório de Transferência de Genes
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Parque Estação Biológica,
Brasília - DF

Da galha-da-coroa para as plantas transgênicas

Fotos cedidas pelos autores

Entre as doenças bacterianas de plantas, a galha-da-coroa (do inglês *crown-gall*) tem-se destacado nos últimos anos, não pela importância econômica dos prejuízos causados por ela, mas pelo impacto que o estudo dessa doença trouxe para a ciência moderna. Apesar de ser conhecida desde a Antiguidade, somente em 1907, após a primeira descrição do seu agente etiológico, essa doença despertou o interesse de cientistas que trabalham nos mais diferentes campos da pesquisa. O interesse particular nessa doença deveu-se ao fato de que as galhas vegetais são normalmente causadas por microrganismos ou por insetos, sendo que a proliferação do tecido vegetal é induzida por um estímulo externo, de natureza química ou mecânica. No caso da galha-da-coroa, as células vegetais infectadas pela bactéria adquirem a propriedade de se multiplicarem de maneira autônoma, sem a necessidade de estímulos externos. Essa doença se traduz assim, pela formação de uma galha na coroa (junção entre o tronco e a raiz) ou diretamente nas raízes da planta infectada. Inicialmente, os pesquisadores associaram o desenvolvimento dessas galhas ao câncer animal, o que estimulou numerosas pesquisas visando à elucidação das causas da galha-da-coroa. Esses estudos concluíram que o surgimento da galha é, na realidade, o resultado de um processo natural de transferência de genes da bactéria para a célula vegetal, que passam a sintetizar substâncias que estimulam a divisão celular no sítio de infecção. Os conhecimentos gerados desde então culminaram com um entendimento bastante aprofundado desse parasitismo, sendo considerado atu-

almente um sistema modelo para estudos das interações patógeno-hospedeiro em plantas.

O agente etiológico causal da galha-da-coroa é *Agrobacterium tumefaciens*, uma bactéria tipicamente do solo, do tipo bacilo aeróbico e Gram-negativa. Além de *A. tumefaciens*, o gênero *Agrobacterium* possui outras 4 espécies que diferem entre si pela patogenicidade e modo de infecção em diferentes plantas, principalmente em Angiospermas dicotiledôneas. Dessa forma, *A. tumefaciens* é o agente

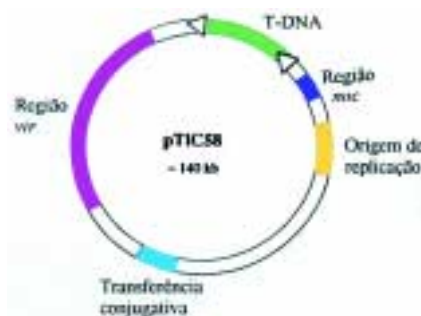


Figura 1: Mapa funcional de um plasmídeo Ti do tipo nopalina: T-DNA - corresponde ao segmento de DNA que é transferido para a célula vegetal; região *vir* - genes responsáveis pelo corte e transferência do T-DNA; região de transferência conjugativa - genes responsáveis pela transferência do plasmídeo Ti entre linhagens de *Agrobacterium*; região de replicação - funções ligadas a replicação, manutenção e estabilidade do plasmídeo Ti dentro da bactéria; região *noc* - genes responsáveis pelo catabolismo das opinas

faciens, uma bactéria tipicamente do solo, do tipo bacilo aeróbico e Gram-negativa. Além de *A. tumefaciens*, o gênero *Agrobacterium* possui outras 4 espécies que diferem entre si pela patogenicidade e modo de infecção em diferentes plantas, principalmente em Angiospermas dicotiledôneas. Dessa forma, *A. tumefaciens* é o agente

etiológico da galha-da-coroa, *A. rhizogenes* causa a raiz em cabeleira (do inglês *hairy root*), *A. rubi* induz galhas especificamente em *Rubus* spp., *A. vitis* induz galhas especificamente em videiras e *A. radiobacter* é saprófita (não-patogênica). As agrobactérias pertencem à família Rhizobiaceae, que agrupa, entre outros, os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Phyllobacterium*, que são bactérias fixadoras de nitrogênio.

Biologia do processo infeccioso

No início do processo de infecção de uma planta por *Agrobacterium*, ocorre o reconhecimento e a ligação da bactéria à célula vegetal. As bactérias são atraídas em direção ao tecido vegetal por quimiotactismo em relação às moléculas-sinal (compostos fenólicos, açúcares e aminoácidos), que são exsudadas por células lesadas em decorrência de ferimentos superficiais causados por insetos, geadas ou tratos culturais. Uma vez em contato com as células vegetais, as bactérias sintetizam microfibrilas de celulose para favorecer a formação de agregados de células bacterianas em volta do tecido vegetal ferido. A capacidade de infectar células vegetais está associada à presença, nas agrobactérias, de um plasmídeo de alto peso molecular (150 a 250 kb), conhecido como plasmídeo Ti (do inglês *tumor-inducing*) (Figura 1).

As moléculas-sinal liberadas pela planta irão também ativar genes que estão localizados em uma região do plasmídeo Ti, chamada de região de virulência (região *vir*), que é um regulon composto de seis a oito operons, contendo, aproximadamente, 25 genes no total. As diversas proteínas codificadas pelos genes da região *vir* vão pro-

mover a transferência de uma outra região do plasmídeo Ti da bactéria para o núcleo da célula vegetal. Essa região, denominada T-DNA (do inglês *transferred DNA*), é delimitada por duas seqüências repetidas de 25 pb, conhecidas como extremidades direita e esquerda (Figura 1). Uma vez no núcleo da célula, o T-DNA é integrado ao genoma vegetal e aí expresso de forma estável. Apesar de sua origem procariota, a expressão dos genes presentes no T-DNA só é possível por serem os sinais de regulação desses genes reconhecidos pelo sistema de transcrição eucariota vegetal.

O T-DNA de *A. tumefaciens* contém uma série de genes conhecidos como oncogenes que codificam enzimas envolvidas na via de biossíntese de hormônios vegetais (citocininas e auxinas), causando um desbalanço hormonal nas células transformadas. Em *A. tumefaciens*, essa proliferação desordenada das células transformadas leva à formação da galha, enquanto que em *A. rhizogenes*, a expressão dos oncogenes induz a produção de raízes no local do ferimento (Figura 2).

O T-DNA também possui genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese de opinas, que são aminoácidos ou carboidratos modificados. O tipo de opina produzido (nopalina, octopina, agropina, manopina etc.) é utilizado como um dos critérios para a classificação de linhagens e espécies de *Agrobacterium*.

Como resultado do processo infeccioso, a linhagem de *Agrobacterium* indutora da galha faz com que a célula vegetal parasitada produza um tipo específico de opina. Somente a linhagem indutora é capaz de catabolizar essa opina como fonte de energia, carbono e nitrogênio. Desta forma, as células transformadas pelo T-DNA continuam dividindo-se incontroladamente devido à produção de citocininas e auxinas e, quanto mais elas se dividem, mais elas produzem opinas que vão sendo utilizadas pela bactéria, formando um nicho extremamente favorável a ela.

Essa pressão seletiva favorece a multiplicação da linhagem indutora da galha que, por sua vez, irá reinfectar as células vegetais que ainda não foram transformadas. A síntese de opinas pelas células vegetais infectadas e seu catabolismo pela bactéria indutora da galha tiveram provavelmente um papel

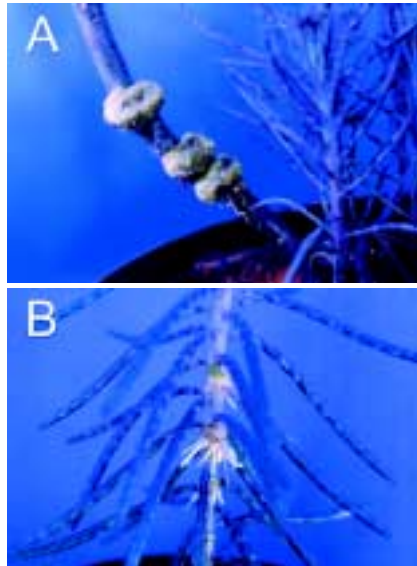


Figura 2: Sintomas típicos de galha-da-coroa (A) e de raiz em cabeleira (B) em plantas de *Kalanchoe* sp., induzidas pela inoculação de linhagens patogênicas de *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes*, respectivamente, sob condições controladas em casa de vegetação

muito importante na disseminação do plasmídeo Ti na natureza. A teoria que propõe a atuação das opinas como intermediárias químicas do parasitismo, é conhecida como o “conceito de opinas” (Dessaux *et al.*, 1993).

O sistema de infecção de plantas pelas agrobactérias representa, assim, uma situação única na natureza: a transferência de um elemento genético, o T-DNA, de um organismo procariota para um organismo eucariota superior, com sua subsequente integração e expressão no genoma hospedeiro. A demonstração de que a causa da proliferação celular da galha é a transferência de informação genética da bactéria para a célula vegetal (Chilton *et al.*, 1977) foi o ponto de partida para pesquisas intensivas visando a utilização desse sistema natural de transferência de genes para a obtenção de plantas transgênicas (Zambryski, 1992).

Agrobacterium como vetor de transformação de plantas

A obtenção de uma planta transgênica envolve a transferência e inte-

gração do T-DNA na célula vegetal e a capacidade dessas células transformadas se diferenciarem em uma planta. A capacidade de diferenciação, chamada totipotência, permite a regeneração de plantas por meio de técnicas de cultura de tecidos *in vitro*.

O avanço nos conhecimentos de biologia molecular foi fundamental, tanto para elucidar de forma aprofundada as bases moleculares do processo de interação *Agrobacterium*-hospedeiro, como para a construção de vetores de transformação baseados no plasmídeo Ti. Assim, as técnicas de biologia molecular em associação com as técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* constituem a base para a obtenção de uma planta transgênica.

A construção de vetores derivados do plasmídeo Ti para introduzir genes exógenos em plantas só foi possível graças a uma particularidade do mecanismo de transferência do T-DNA: nenhum gene presente no T-DNA, exceto os 25 pb de suas extremidades, é necessário ao processo de transferência e integração do T-DNA. Assim sendo, pode-se eliminar partes ou todo o T-DNA, incluindo os oncogenes, sem que isso afete o processo de transferência. A síntese de auxina e citocinina dentro das células vegetais transformadas com o T-DNA interfere no balanço endógeno de reguladores de crescimento, tornando-se incompatível com o cultivo de plantas *in vitro*. Assim, a remoção dos oncogenes do T-DNA é necessária para a diferenciação e regeneração de plantas a partir das células transformadas. Uma linhagem de *Agrobacterium* cujos oncogenes foram eliminados do T-DNA é denominada “desarmada”, pois ela não é mais capaz de induzir galhas ou raízes em plantas.

A região *vir* também é essencial para a transferência do T-DNA, pois contém genes cujos produtos vão promover a excisão e o transporte do T-DNA para a célula vegetal. Concluiu-se, então, que o desenvolvimento de vetores baseados no sistema *Agrobacterium* requer que as extremidades direita e esquerda do T-DNA sejam conservadas, mantendo também intacta a região *vir*, e que os oncogenes sejam removidos. Dessa maneira, qualquer outra nova seqüência de DNA, inserida entre as extremidades do T-DNA, pode ser transferida e integrada ao genoma vegetal sem afetar a regeneração da

célula transformada em uma planta.

A preparação de uma linhagem de *Agrobacterium* para ser utilizada como vetor na transformação de plantas inclui três etapas distintas. Em uma primeira etapa, é necessário obter as linhagens desarmadas por meio de um processo de dupla recombinação. Numa segunda etapa, é preciso construir um vetor contendo no seu T-DNA os genes de interesse. Por causa do seu tamanho, o plasmídeo Ti não pode ser manipulado diretamente. Desta forma, plasmídios menores, mais fáceis de manipular, foram desenvolvidos. Estes plasmídios, chamados de vetores binários, contêm as extremidades do T-DNA, entre as quais os genes de interesse são clonados. Em uma última etapa, o vetor binário deverá ser transferido para a linhagem desarmada de *Agrobacterium*, o que pode ser feito por métodos de conjugação triparental, eletroporação ou choque térmico (Figura 3).

Sistema de transformação via *Agrobacterium*

A partir do desenvolvimento de vetores binários e sua introdução em linhagens desarmadas de *Agrobacterium*, foi possível a transferência de genes exógenos para plantas, utilizando esta bactéria como vetor natural de transformação. Os primeiros estudos de transformação genética de plantas envolveram a inoculação de tecidos de fumo (*Nicotiana tabacum*) com linhagens engenheiradas de *Agrobacterium* (Herrera-Estrella *et al.*, 1983; Zambryski *et al.*, 1983). A partir de então, o sistema de transformação via *Agrobacterium* vem sendo utilizado para transformar um grande número de plantas. A alta eficiência de transformação, o baixo custo operacional, assim como a simplicidade dos protocolos de transformação e de seleção são as principais razões para a universalidade do uso do sistema *Agrobacterium*.

O princípio da transformação com uma linhagem desarmada de *Agrobacterium* está baseado na seleção de uma ou mais células transformadas e na sua posterior regeneração em uma planta transgênica, isto é, as células competentes a transformar deverão ser as mesmas células competentes a regenerar. Assim, a metodologia ideal de trans-

formação deve combinar, ao mesmo tempo, a descontaminação do tecido infectado pela bactéria, a seleção das células que foram transformadas e que expressam o gene marcador de seleção, e a regeneração destas células em plantas.

Ao se estabelecer um protocolo de transformação, diferentes fatores devem ser levados em consideração. As etapas de reconhecimento da planta hospedeira, de ligação célula bacteriana-célula vegetal e de indução da re-

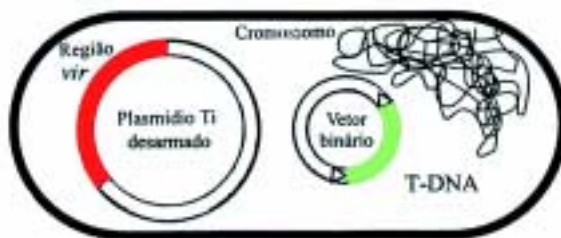


Figura 3: Sistema binário: o vetor binário, contendo o gene de interesse entre as extremidades do T-DNA, se mantém em uma linhagem desarmada de *Agrobacterium* de forma independente do plasmídeo Ti desarmado, cujos oncogenes foram eliminados e a região *vir* mantida

gião *vir* pelas moléculas-sinal são interações complexas e específicas entre o hospedeiro e o patógeno. Na planta, a transferência do T-DNA é influenciada tanto pela fisiologia (idade, tipo de tecido, condições de cultura etc.) quanto pelo genótipo. A determinação da compatibilidade *Agrobacterium*-hospedeiro faz-se também necessária antes do estabelecimento de um protocolo de transformação via *Agrobacterium* para qualquer espécie vegetal. Para a indução dos genes *vir* é também importante levar em consideração três condições básicas: pH entre 5 e 6, temperatura entre 27 e 30°C e fonte de carbono (em geral, sacarose) (Godwin *et al.*, 1992). Outro requerimento importante é a presença de compostos que são naturalmente produzidos pela planta em resposta à infecção pela bactéria, principalmente compostos fenólicos, tais como acetossiringona e hidroxiaacetossiringona, entre outros (Stachel *et al.*, 1985).

Vários métodos de transformação genética de plantas utilizando *Agro-*

bacterium como vetor já foram descritos, sendo que a maioria deles é, essencialmente, uma adaptação do método de co-cultura de discos foliares de fumo (*N. tabacum*), descrito em 1985 por Horsch e colaboradores (Horsch *et al.*, 1985). O protocolo básico de co-cultura consiste no cultivo de um explante vegetal em um meio de cultura líquido ou sólido, juntamente com uma linhagem desarmada de *Agrobacterium* contendo um vetor binário com o gene a ser introduzido na planta (Figura 4). O tempo de co-cultura pode variar de algumas horas a vários dias. O explante a ser utilizado poderá ter diversas origens (discos ou fragmentos foliares, segmentos de caules ou de raízes, tubérculos, pecíolos, cotilédones, protoplastos, embriões somáticos etc.), mas o importante é que tenha um alto potencial de regeneração *in vitro*.

Deve-se sempre procurar otimizar as condições de cultura de tecido, visando as altas taxas de regeneração de plantas.

Durante a co-cultura, ocorrerá a ligação entre a bactéria e a célula vegetal, no local de ferimento do explante, e a indução dos genes da região *vir*, com subsequente transferência do T-DNA para o genoma vegetal. Posteriormente, o explante deverá ser transferido para um meio de regeneração apropriado, contendo antibióticos (geralmente cefotaxima, ampicilina ou carbenicilina) para eliminar as células de *Agrobacterium* que são, a partir desse momento, indesejáveis no meio de cultura. Esse meio deverá conter também um agente de seleção que será responsável pela inibição do crescimento das células não-transformadas. O efeito nocivo do agente de seleção será anulado pelo produto da expressão do gene marcador de seleção (geralmente uma enzima) nas células transformadas. Assim, somente estas células serão capazes de regenerar em meio seletivo. Os processos de seleção e regeneração das células transformadas são de grande importância para que se obtenha um protocolo eficiente. A dose do agente de seleção (geralmente antibiótico ou herbicida), assim como o tempo de exposição dos explantes aos mesmos, são essenciais para inibir a divisão das células não-transformadas, sem, no entanto, prejudicar o desenvolvimento das transformadas.

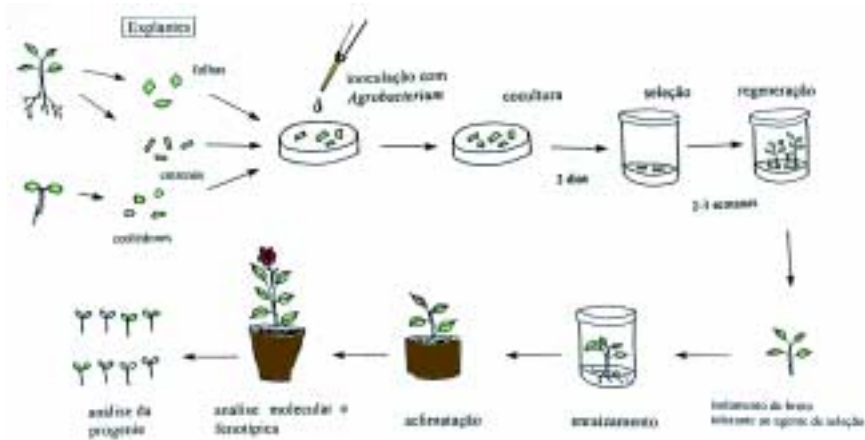


Figura 4: Esquema das principais etapas para obtenção de plantas transgênicas por meio da técnica de co-cultura

Durante as semanas seguintes, as células transformadas (resistentes ao agente de seleção) crescem e diferenciam-se em brotos que são então isolados e transferidos para um meio de indução de raiz. Durante todos os estágios posteriores à co-cultura, uma pressão de seleção deve ser mantida pela adição do agente seletivo ao meio de cultura, garantindo somente a regeneração de plantas transgênicas. Ainda assim, os sistemas de seleção não são totalmente eficientes e alguns “escapes” (plantas não-transformadas tolerantes ao agente de seleção) podem ocorrer.

Uma vez enraizadas, as plantas transformadas são aclimatadas e transferidas para casa de vegetação para análises posteriores. Essas plantas transformadas são, em geral, morfologicamente idênticas às plantas não-transformadas, embora alterações fenotípicas possam ser, algumas vezes, observadas devido às variações somaclonais decorrentes do processo de cultura de tecidos, ou pela expressão do próprio transgene. Uma análise molecular e bioquímica detalhada dessas plantas é necessária para comprovar a integração do DNA exógeno no genoma da planta e a sua expressão. A análise da progênie e o estudo da segregação também são fundamentais para demonstrar a estabilidade da expressão dos genes introduzidos.

Conclusão

A insensibilidade de certas espécies vegetais, especialmente Angiospermas monotiledôneas, à infecção por *Agrobacterium* limita a utilização dessa bactéria como vetor de transformação genética. Assim, sistemas de transformação direta, baseados em métodos químicos ou físicos, foram desenvolvidos paralelamente ao sistema *Agrobacterium*. Entre elas, a

transformação por biobalística (ou aceleração de partículas) tem-se destacado pela sua alta eficiência.

Atualmente diferentes características de interesse sócio-econômico já foram introduzidas em diferentes espécies vegetais por transformação genética, principalmente por intermédio do sistema *Agrobacterium* e do método biobalístico. Essas características visam principalmente o melhoramento do desempenho em campo das plantas cultivadas, por meio da resistência a estresses bióticos e abióticos. Características relacionadas com o desenvolvimento da planta e com a qualidade do produto também podem ser modificadas em plantas transgênicas. A tendência é que cada vez um maior número de características possam ser manipuladas por meio da engenharia genética, aumentando a gama de produtos a serem disponibilizados para o agricultor e para o consumidor. Em um futuro próximo, as plantas transgênicas desempenharão também o papel de biofábricas, desenvolvidas para a produção de produtos de interesse para as indústrias de medicamentos, de alimentos e de rações.

Além de todas as implicações com a agricultura e com outros setores da economia, as plantas transgênicas constituem também um excelente sistema para estudos básicos em diferentes campos da biologia, como fisiologia, genética, botânica, biologia molecular e celular.

Para maiores informações sobre técnicas de transformação genética de plantas e análises moleculares da inte-

gração e expressão de transgenes, consulte o “Manual de Transformação Genética de Plantas” (Brasileiro e Carneiro, 1998). Nele estão descritas as diferentes técnicas utilizadas na transformação de plantas, assim como metodologias para a detecção de genes repórteres e marcadores de seleção, e a análise molecular e bioquímica da integração e expressão de genes em plantas. Para adquirir o Manual, acessar via Internet a *home page* da Embrapa no endereço: <http://www.spi.embrapa.br>

Referências Bibliográficas

- Brasileiro ACM, Carneiro VTC (eds) (1998) Manual de Transformação Genética de Plantas. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 309 p.
- Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263-271.
- Dessaux Y, Petit A, Tempé J (1993) Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism. *Phytochem.* 34: 31-38.
- Godwin ID, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ (1992) *In vitro* approaches to extending the host-range of *Agrobacterium* for plant transformation. *Aust. J. Botany* 40: 751-763.
- Herrera-Estrella L, De Block M, Messens E, Hernalsteens JP, van Montagu M, Schell J (1983) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2: 987-995.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- Stachel SE, Messens E, van Montagu M, Zambryski P (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318: 624-629.
- Zambryski PC (1992) Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 465-490.
- Zambryski P, Joos H, Genetello C, Leemans J, van Montagu M, Schell JS (1983) Ti plasmid vector for introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2: 2143-2150.