



MILHO TRANSGÊNICO

Melhoria da qualidade nutricional do grão

Fotos cedidas pelos autores

O milho, uma das maiores fontes de alimento, é cultivado em todo o mundo. Movimenta um mercado de, aproximadamente, U\$40 bilhões anuais, distribuídos entre indústrias de produção de alimentos para consumo humano, rações e matéria-prima para centenas de produtos industrializados. O Brasil produz mais de 30 milhões de toneladas de milho anualmente, em 13 milhões de hectares. Apesar de possuir teores protéicos em torno de 10% da

fato de que o endosperma, aproximadamente 80% do peso seco do grão, possuir uma baixa porcentagem de proteínas ricas em aminoácidos essenciais necessários à manutenção de uma dieta balanceada (Nelson, 1969).

Na América Latina, África e Ásia, vários milhões de pessoas dependem do milho como fonte diária de alimento. Para muitos, este cereal é a principal fonte de proteína da dieta. O grande estado de pobreza, em algumas regiões do planeta, faz com que seja impossível para seus habitantes comprar carne, ovos, leite, ou mesmo outros alimentos à base de vegetais ricos em proteínas para suplementar o milho. Muitas pessoas, entre elas recém-nascidos, crianças, mulheres grávidas e doentes, têm sua alimentação baseada em uma dieta quase que totalmente derivada do milho, o que não é capaz de proporcionar crescimento e saúde adequados (National Research Council, 1988). Dietas não balanceadas em carboidratos, proteínas, lipídeos e micronutrientes são um problema mundial. Atualmente, mais de 800 milhões de pessoas, o equivalente a 15% da população do mundo, obtêm menos do que 2.000 calorias por dia e vivem em estado de fome permanente ou intermitente, sendo cronicamente subnutridos (Conway, 2000). Portanto, o melhoramento da composição nutricional de plantas usadas na alimentação, principalmente de culturas básicas como o milho, é uma necessidade ao redor do mundo.

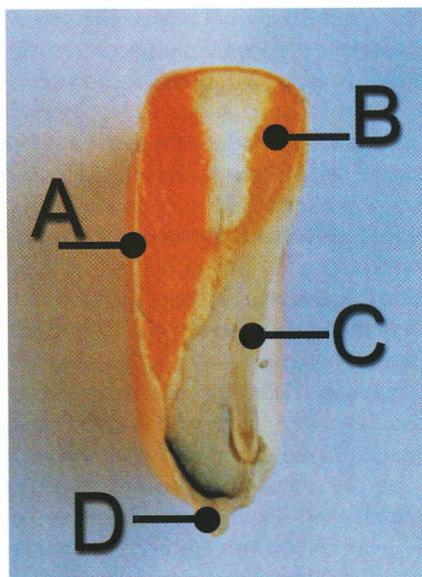


Figura 1: Estrutura do Grão de Milho. (A) Pericarpo; (B) Endosperma; (C) Embrião; (D) Pendúculo

matéria seca, a proteína do grão do milho não é considerada adequada para a nutrição de animais monogástricos incluindo o homem. Isso se deve ao

O Grão do Milho

O milho é uma planta cultivada de grande versatilidade, sendo utiliza-

Andréa Almeida Carneiro

Ph.D Biologia Molecular
andreaac@cnpms.embrapa.br

Newton Portilho Carneiro

Ph.D Biologia Molecular
newtonc@cnpms.embrapa.br

Carlos Henrique S. Carvalho

Ph.D Biologia Molecular
henrique@cnpms.embrapa.br

Maria J. V. Vasconcelos

MS Agroquímica
mariajose@cnpms.embrapa.br

Edilson Paiva

Ph.D Biologia Molecular
edilson@cnpms.embrapa.br

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG.

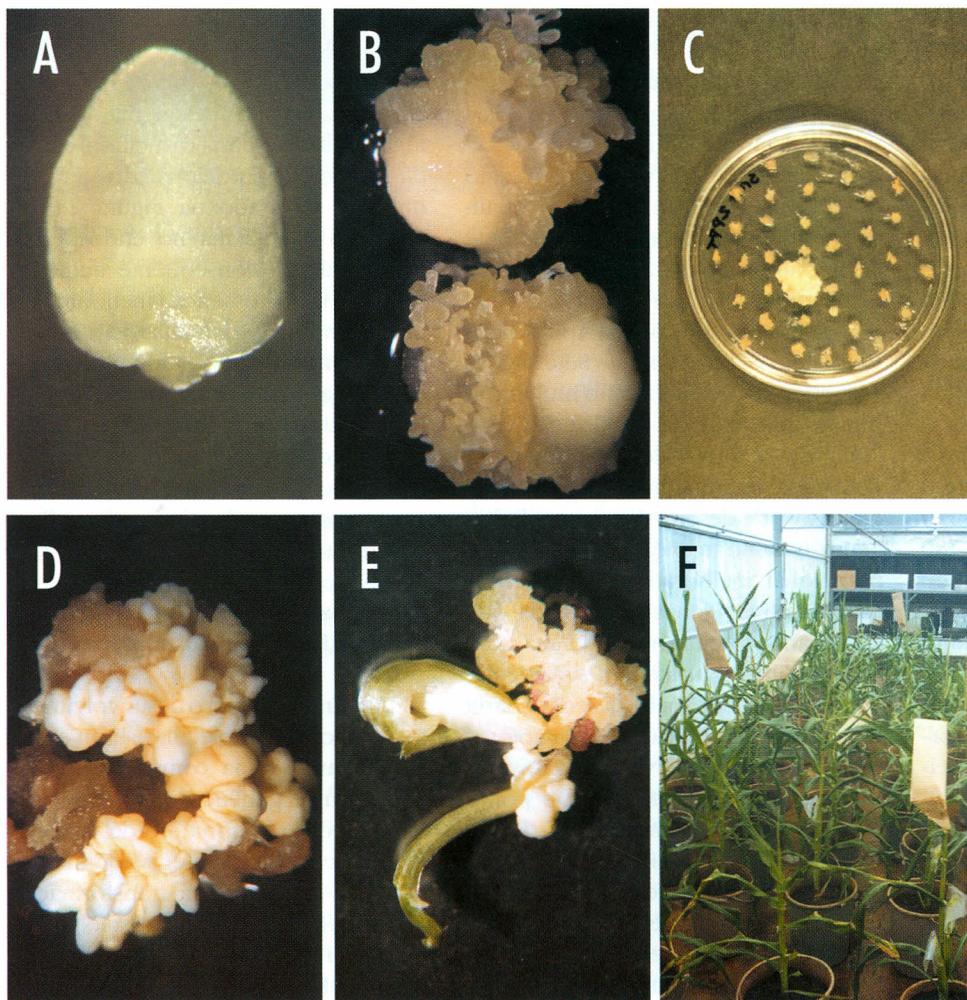
Maurício Antônio Lopes

Ph.D Biologia Molecular
mauricio.lopes@embrapa.br
Embrapa Sede - Brasília, DF



Figura 2: Melhoria da Qualidade Nutricional do Milho – Hipótese em Estudo. A ORF do gene da δ -zeína, representado pelo bloco vermelho, codifica para uma proteína rica em metionina, um aminoácido essencial. Entretanto, essa proteína corresponde a apenas 5% das zeínas presentes no endosperma do milho. No bloco azul está representado o gene da γ -zeínas, o qual codifica para uma proteína abundante no endosperma, mas pobre em aminoácidos essenciais. A abundância de γ -zeínas no grão é devida principalmente à alta atividade endosperma-específico do promotor desse gene (PROM). Na tentativa de aumentar a produção da δ -zeína no endosperma e, conseqüentemente, o teor de metionina do grão, um gene quimérico composto da região promotora do gene das γ -zeínas ligada à região codante do gene das δ -zeína foi construído (representado no esquema acima pelo bloco azul e vermelho). PROM: região promotora dos genes; ORF: “open reading frame” ou região codificadora das proteínas

Figura 3: Processo de Seleção e Regeneração de Plantas Transgênicas de Milho. (A) Embrião imaturo de milho com 2 mm; (B) Embriões imaturos após 2 semanas em meio de cultura N6 suplementado com Dicamba; (C) Calo embriogênico cultivado em meio seletivo com glufosinato de amônio; (D) Processo de maturação de calos embriogênicos; (E) Germinação de embriões transgênicos; (F) Plantas transgênicas em casa de vegetação



do diretamente como alimento, forragem ou matéria-prima para vários produtos industrializados. Somente é conhecido em cultivo e, na sua forma atual, não apresenta indicativos de que pudesse sobreviver sem os cuidados do homem. Os programas de melhoramento genético têm desenvolvido tipos tão diferentes de milho, que seu cultivo é possível desde o Equador até o limite das terras temperadas e desde o nível do mar até altitudes superiores a 3.600 m.

O grão de milho é uma cariopse que consiste de embrião, endosperma, pericarpo e pedúnculo (Figura 1). O pericarpo (camada externa) é derivado da parede do ovário e pode ser incolor, vermelho, marrom ou variegado. Os embriões do milho não armazenam reservas durante o desenvolvimento da semente, a não ser uma pequena quantidade de lipídios no escutelo. Observa-se, entretanto, que as reservas de carboidratos são polimerizadas no endosperma na forma de amido e as reservas de proteínas, acumuladas nos corpos protéicos distribuídos em todo o endosperma.

O endosperma é um tecido triplóide, que se forma como resultado da fusão do núcleo do pólen com dois núcleos femininos (Wolf *et al.*, 1952). Esse tecido é responsável por 98% do amido, 80% da proteína e 15% dos lipídios presentes no grão

(Glover and Mertz, 1987). As proteínas do endosperma do milho podem ser divididas, de acordo com sua solubilidade, em quatro frações: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas. As albuminas são solúveis em água e as globulinas em soluções salinas diluídas. Albuminas e globulinas contribuem com 6% das proteínas do endosperma; sendo que várias delas são enzimas sintetizadas no início do desenvolvimento do embrião. As glutelinas podem ser extraídas com soluções ácidas ou alcalinas diluídas e contribuem com 30 a 40% das proteínas totais do grão. As prolaminas, 60% das proteínas, são solúveis em soluções alcoólicas e não possuem atividade enzimática, sendo apenas fonte de aminoácidos, nitrogênio e esqueletos carbônicos para o desenvolvimento da plântula (Guimarães, 1993). Prolaminas do milho são também conhecidas como zeínas.

As zeínas são classificadas em quatro tipos distintos baseados na sua estrutura primária e solubilidade: 19 – 22 kD alfa zeína (α), 14 kD beta zeína (β), 16-27 kD gamma zeína (γ) e 10 kD delta zeína (δ) (Esen, 1986; Larkins *et al.*, 1989). Alfa zeínas são as proteínas mais abundantes, perfazendo aproximadamente 60% das proteínas de reserva, sendo seguidas pela γ -zeína (25%), β -zeínas (5-10%) e δ -zeínas (5%). As zeínas possuem uma constituição aminoacídica bastante diversificada. As α -zeínas têm conteúdo elevado de glutamina (25%), leucina (20%) alanina (15%) e prolina (11%) e variam em tamanho de 210 a 245 aminoácidos. A proteína β -zeína é constituída de 160 aminoácidos e contém menos glutamina (16%), leucina (10%) e prolina (9%) que as α -zeínas, mas tem significativamente mais metionina (4%) e cisteína (7%). A γ -zeína possui 180 aminoácidos e 7% de cisteína e 25% de prolina. A δ -zeína é uma proteína de 130 aminoácidos e conteúdo muito alto do aminoácido sulfurado metionina (23%) (Kirihiara *et al.*, 1988). Apesar das zeínas constituírem a maior porção do grão de milho, seu valor protéico para alimentação de animais monogástricos, incluindo o homem, é baixo, devido à baixa concentração de aminoácidos essenciais, tais como lisina, metionina e triptofano.

Os genes que codificam para essas proteínas já foram isolados e caracte-

rizados (revisão Feix e Quayle, 1993). As α -zeínas são codificadas por uma família de genes múltiplos com 50 a 100 membros (Heidecker *et al.*, 1991). Em contraste, β , γ e δ zeínas são codificadas por apenas um ou dois genes. Um dos maiores desafios no melhoramento do milho é entender a regulação desses genes para que eles possam ser manipulados com o objetivo de melhorar a qualidade física e nutricional do grão.

Melhoria da Qualidade Nutricional do Milho Utilizando Sequências Endógenas: Uma Estratégia Desejável do Ponto de Vista de Biossegurança

Os melhoristas de plantas dependem da variabilidade genética existente na natureza como matéria-prima para desenvolverem cultivares superiores. A revolução biotecnológica ocorrida na última década possibilitou o desenvolvimento de tecnologias que permitem acesso a novas e variadas fontes de variabilidade genética. Em especial, o aprimoramento das tecnologias de DNA recombinante tem gerado um crescente interesse na aplicação desses conhecimentos para geração de nova variabilidade genética, utilizável em programas de melhoramento de plantas. O desenvolvimento de cultivares com uma melhor qualidade protéica pode ser drasticamente acelerado com a utilização de técnicas de manipulação gênica e transformação. O Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo – Sete Lagoas / MG desenvolve uma ação multidisciplinar, que engloba a utilização conjunta de técnicas de melhoramento genético e de biologia molecular, com o objetivo de desenvolver novas linhagens de milho tropical com qualidade nutricional melhorada. Para alcançar esse objetivo, genes endógenos que codificam proteínas raras de alta qualidade nutricional tiveram sua regulação alterada por meio da engenharia genética, com adição de promotores de proteínas de reserva de alta atividade endosperma-específica. Do ponto de vista de biossegurança, a estratégia de transformar milho com seqüências isoladas da própria espécie é desejável, uma vez que se buscará apenas alterar a regulação de genes que já são naturalmente expressos na planta.

Na tentativa de aumentar a produção da δ -zeína no endosperma utilizando-se técnicas de biologia molecular, foi construído um gene quimérico, onde a região promotora do gene das γ -zeínas foi ligada à região codante do gene das δ -zeína. Como foi exposto anteriormente, a δ -zeína é uma proteína que contém 23% do aminoácido essencial metionina, mas essa proteína corresponde a apenas 5% das prolaminas presentes no endosperma. Por outro lado, um dos promotores de maior atividade no endosperma do milho é aquele dos genes que codificam a proteína de reserva γ -zeínas. Em milhos normais, 25% das proteínas de reserva dos grãos são representados pelas γ -zeínas. As δ -zeínas e as γ -zeínas são codificadas por genes presentes em uma ou duas cópias no genoma, o que torna seus sistemas regulatórios ferramentas potenciais para alteração da atividade gênica via engenharia genética. Hipoteticamente, plantas transgênicas de milho, contendo a construção quimérica descrita acima, produzirão uma maior quantidade de δ -zeína no endosperma, uma vez que essa proteína está sob o comando de um promotor de alta atividade endosperma-específico – promotor γ -zeínas. Um esquema da estratégia utilizada para o melhoramento da qualidade nutricional do grão de milho é mostrado na Figura 2. Um aumento da δ -zeína no endosperma acarretará um conseqüente aumento do aminoácido essencial metionina no grão do milho, possibilitando o desenvolvimento de plantas de milho tropical transgênicas de alta qualidade nutricional sem a necessidade da utilização de genes exógenos, uma vez que δ -zeína e γ -zeínas são normalmente expressas no endosperma de milhos não transgênicos.

Transformação Genética do Milho Via Biobalística

Atualmente, com o desenvolvimento da biologia molecular, houve um grande avanço na compreensão dos mecanismos genéticos e bioquímicos básicos, o que permitiu o desenvolvimento de novas estratégias de melhoramento por meio da transformação genética. Sendo uma das maiores commodities na agricultura internacional e uma fonte importante de nutrientes

para homens e animais, o milho tem sido alvo de muitos estudos de manipulação gênica (Barcelo e Lazzeri, 1995). Entretanto, a maioria dos estudos sobre produção de plantas transgênicas de milho foram realizados com a utilização de genótipos adaptados ao clima temperado (Bohorova *et al.*, 1999), portanto foi necessário o desenvolvimento de tecnologias para a produção de linhagens de milho transgênicas adaptadas ao clima tropical e subtropical.

Apesar dos cereais serem um dos grupos mais difíceis de se transformar, plantas transgênicas têm sido conseguidas utilizando estratégias tais como eletroporação, biobalística e *Agrobacterium tumefaciens* (Hiei *et*

madas via *A. tumefaciens*. Esse método também oferece vantagens sobre a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, tais como independência de genótipos específicos, simplicidade dos protocolos de transformação, uso de construções mais simplificadas e eliminação de falsos positivos devido à persistência de *Agrobacterium* no tecido infectado.

A biobalística é baseada na transformação de células usando micropartículas de tungstênio ou de ouro revestidas com o DNA de interesse. Usando-se equipamentos especiais denominados "particle gun", as micropartículas são propulsionadas sob alta pressão e penetram na parede celular e nas membranas sem matar as células (Klein

de tungstênio cobertas com DNA foram cuidadosamente lavadas e ressuspendidas em 60 µl de etanol 100%. Seis microlitros foram depositados no centro dos macrocarreadores, discos (24 mm) de membranas Kapton (Du Pont). Essas membranas foram usadas no bombardeamento dos tecidos de interesse utilizando 1100 psi de pressão de gás hélio, 1,6 µg/tiro de DNA plasmidial e os explantes foram posicionadas a 6 cm da plataforma de lançamento das micropartículas. Foram mantidos constantes a distância entre a câmara de gás de alta pressão e a membrana carreadora contendo as micropartículas cobertas com DNA (8 mm), distância entre a membrana carreadora e a tela de retenção (12 mm) e a pressão de vácuo (27 mm Hg).

A seleção de plantas transgênicas foi iniciada 14 dias após o bombardeamento, quando os calos de milho foram transferidos para meio básico N6 suplementados com glufosinato de amônia, o composto ativo do herbicida Finale. Os calos foram subcultivados a cada 2 semanas, em dosagens crescentes de glufosinato de amônia. Para regeneração, os calos embriogênicos foram transferidos para meio MS suplementado com glufosinato de amônia e cultivados a 26°C em luz (16 horas). As plantas com aproximadamente 5 cm de altura foram transferidas para o solo, em casa de vegetação. A Figura 3 ilustra o processo de seleção e regeneração de plantas transgênicas a partir de embriões imaturos de milho.

O DNA genômico foi isolado das plantas transformadas, usando-se o protocolo de Dellaporta *et al.* (1983). 30 µg de DNA enzimaticamente digerido com *EcoRI* foi transferido para uma membrana de nylon pela técnica de "Southern blot". O DNA transgênico foi detectado usando-se o método quimioluminescente de digoxigenina. As frações zeínas, não-zeínas e a proteína total extraídas foram quantificadas pelo teor de nitrogênio determinado pelo método micro-Kjeldhal.

Resultados e Conclusões

O protocolo de regeneração e transformação de milho tropical desenvolvido nos laboratórios do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da EMBRAPA Milho e Sorgo, atualmente atin-

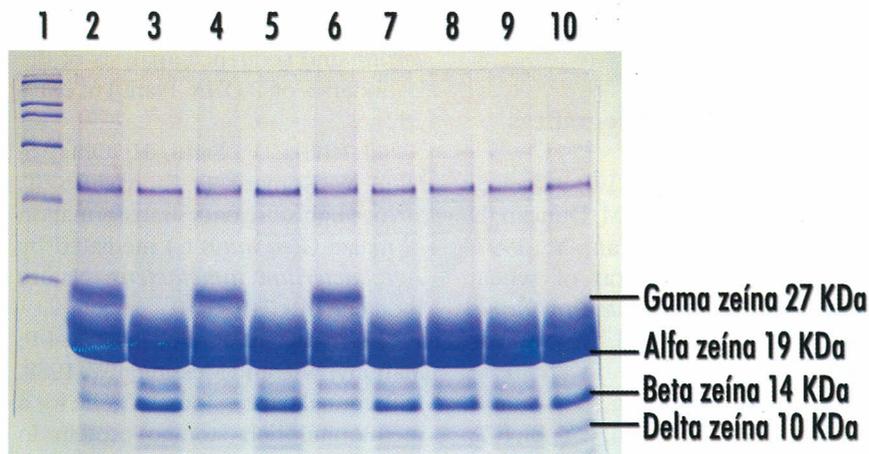


Figura 4: Comparação Entre as Zeínas Presentes no Endosperma de Grãos de Milho não-Transgênicos e Transgênicos. A fração das zeínas foi extraída de endospermas de grãos de milho e separadas utilizando gel de poliacrilamida. Coluna 1: Marcador de peso molecular; Coluna 2: Milho não transgênico; Colunas de 3 a 10: Milho transformado com a construção gênica que contém o promotor da γ -zeínas, e a região codante da δ -zeína

al., 1994; Ishida *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1997). Bombardeamento de micropartículas cobertas com DNA de interesse, biobalística, tem sido o método de maior sucesso para produção de milho transgênico, uma vez que as gramíneas não são facilmente transfor-

et al., 1987). Em geral, o tecido que é bombardeado pode ser regenerado e plantas transgênicas são produzidas.

Para a produção de milho tropical transgênico via biobalística, foi desenvolvido um protocolo na EMBRAPA Milho e Sorgo, onde embriões imaturos, de 1,5 a 2,0 mm, foram isolados em condições estéreis e cultivados durante 2 a 6 dias, em meio básico N6 (Chu *et al.*, 1975) suplementado com 2,4-D ou Dicamba. Durante o bombardeamento, foram utilizadas micropartículas de tungstênio aceleradas por um aparelho movido a hélio. Um estoque de micropartículas de tungstênio foi preparado ressuspendendo 60 mg de tungstênio M10 (Sylvania, GTE Chemicals/ Towanda - USA) em 1 ml de uma solução com 50% de glicerol estéril. DNA plasmidial, construção que contém o gene da δ -zeína sobre o controle do promotor da γ -zeínas, foi precipitado sobre 50 µl da solução estoque de tungstênio. As partículas

giu uma eficiência entre 0,66 e 3,0% para a produção de plantas transgênicas pelo uso do bombardeamento do tecido escutelar de embriões imaturos de milho tropical. Essa eficiência de produção de plantas transgênicas de milho é similar à descrita por vários laboratórios internacionais que trabalham com milho de zonas climáticas temperadas. O domínio da tecnologia para transformação genética de milho tropical nos insere em um seletivo grupo de instituições capazes de executar todas as etapas técnicas necessárias à obtenção de plantas transgênicas de milho. Ressaltando que esse conhecimento deverá ser utilizado não apenas para obtenção de plantas transgênicas, mas, também, em processos de avaliação e monitoramento de produtos transgênicos disponibilizados no mercado brasileiro.

As plantas transgênicas obtidas nesse estudo, confirmadas através da técnica de Southern blot, cresceram normalmente e produziram grãos de milho duros e vítrios. Análises iniciais da proteína do endosperma dos grãos transgênicos (Figura 4) mostraram que, conforme o previsto, em alguns eventos transgênicos, houve um aumento na produção da δ -zeína, entretanto um aumento na produção da β -zeína, outra proteína rica em aminoácidos essenciais, também foi observado. Interessantemente, a γ -zeína desapareceu na maioria dos grãos transgênicos analisados. Alterações no nível da γ -zeína parecem estar relacionadas com a dureza e a vitricidade dos grãos de milho. Muitos dos grãos transgênicos produzidos, apesar de serem vítrios, não possuem γ -zeína no endosperma, portanto, novos questionamentos relacionados ao processo de modificação do endosperma farináceo para vítrio surgiram com esse trabalho. Os estudos do grão para avaliar as consequências da mudança do teor protéico na formação ultraestrutural dos corpos protéicos e na deposição de amido, bem como estudos bioquímicos para analisar detalhadamente a nova composição aminoacídica dos grãos transgênicos produzidos continuam em andamento.

Os resultados obtidos nesse projeto servirão como base para a produção de linhagens de milho tropical

transgênicos que poderão ser incorporadas a programas de melhoria tradicional, diminuindo o tempo e o custo na produção de novos genótipos de melhor qualidade nutricional.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte técnico dado pelas seguintes pessoas: Antônio G. P. Filho, Célio V. Moreira, Douglas Barduche, Luana M. Costa, Luciano Paiva, Luciano P. Nogueira, Marcelo A. Fontes, Mariana C. A. Gonçalves, Maurício S. Antunes, Raymundo D. Filho, Rosimere C. S. Saraiva, Solange M. Barbosa, Ubiraci G. P. Lana. AAC é bolsista recém-doutor pelo CNPq. Órgãos financiadores: SEP EMBRAPA, PROMOAGRO, CNPq, FAPEMIG, IAEA, PADCT, PRONEX.

Referências Bibliográficas

1. Cheng, M; Fry, J E; Paang, S; Zhou, H; Hironaka, C M; Duncan, D R; Conner, T W; Wan, Y. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115: 971 – 980.
2. Chu, C C; Wang, C C; Sun, C S; Hsu, C; Yin, K C; Chu, C Y; Bi, F Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sinica* 18; 659 – 668.
3. Conway G. 2000. President Rockefeller Foundation, New York. Speech delivered March 28 in Edinburgh, Scotland at: GM Food Safety: Facts, Uncertainties, And Assessment; The Organization For Economic Co-operation And Development (OECD) Edinburgh Conference on the Scientific and Health Aspects of Genetically Modified Foods.
4. Dellaporta, S L; Wood, J; Hicks, J B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19 – 21.
5. Esen, A. 1986. Separation of Alcohol soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. *Plant Physiol.* 80: 623 – 627.
6. Feix, G and Quayle, T. 1993. Structure and expression of zeins

genes. *Cr. Rev. Plant. Sci* 12, 111 - 127.

7. Glover, D V and Mertz, E T. 1987. In: *Nutritional Quality of Cereal Grains: Genetic and Agronomic Improvement*. Agronomy Monograph, Olson R A and Frey K J eds. (Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy), pp. 183 - 336.

8. Guimarães, C T. 1993. Caracterização de populações indígenas de milho (*Zea mays* L.) que apresentam grãos opacos. Tese M.S. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

9. Heidecker, G; Chaudhuri, S and Messing, J W. 1991. Highly clustered zein gene sequences reveal evolutionary history of the multigene family. *Genomics* 10: 719 – 726.

10. Hiei, Y; Ohta, S; Komari, T; Kumasho, T. 1994. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of T-DNA. *Plant J* 6: 271 – 282.

11. Ishida, V; Saito, H; Ohta, S; Hiei, Y; Komari, T; Kumashiro, T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotech.* 14 : 745 - 750

12. Kirihara, J A; Hunsperger, J P; Mahony, W C and Messing, J W. 1988. Differential expression of a gene for a methionine rich storage protein in maize. *Mol. Gen. Genet.* 211, 477-484.

13. Klein, T M; Wolf, E d; Wu, R; Sandford, J C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 6117: 70 – 73.

14. Larkins, B A; Lending, C R; Wallace, J C; Galili, G; Kawata, E E, Geetha, K B, Kris, A L Martin, D N and Bracker, C E. 1989. In: *The Molecular Basis of Plant Development*, R. B. Goldberg, ed (New York: Alan R. Liss, In.), pp. 109-120.

15. National Research Council. 1988. *Quality-Protein Maize*. National Academy Press, Washington, D.C.

16. Nelson, O E. 1969. Genetic modification of protein quality in plants. *Advanced Agronomy*, 21:171-194.

17. Wolf, M J; Buzan, C L; Mac Masters, M M; Risr, C E. 1952. Structure of the mature corn kernel. I. Grass anatomy and structure relationship. *Cereal Chemistry*, 29: 321-333.