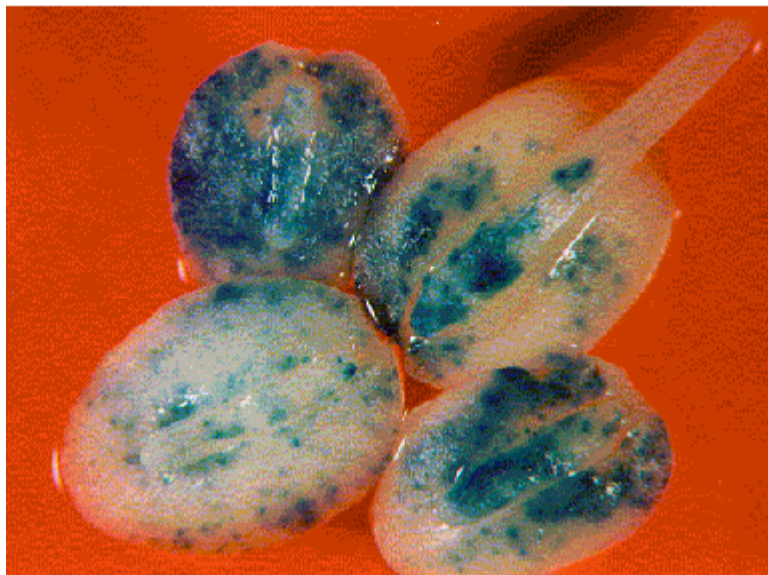


**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MILHO TROPICAL (*Zea mays* L.) USANDO BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS.** Maria José Vilaça de Vasconcelos<sup>1</sup>; Marcelo Antoniol Fontes<sup>2</sup>; Maurício Schusterschitz Antunes<sup>3</sup>; Edilson Paiva<sup>1</sup>; Fernando Hercos Valicente<sup>1</sup> & Maurício Antônio Lopes<sup>1</sup>. <sup>1</sup> Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo - Núcleo de Biologia Aplicada - C.P. 151 - 35701-970. Sete Lagoas - MG. <sup>2</sup> Bolsista Pronex, Embrapa Milho e Sorgo. <sup>3</sup> Estudante de doutorado Purdue University

Palavras-chave: Transformação genética, Milho tropical, Bombardeamento de partículas, *Zea mays* L.

Diversos métodos para introdução de ácidos nucléicos no interior da célula têm sido descritos. Dentre estes, o processo chamado de biobalística, bombardeamento de partículas ou aceleração de partículas, foi inicialmente descrito por Sanford et al. (1987) e Kein et al. (1992). O processo consiste na aceleração de micropartículas que atravessam a parede celular e a membrana plasmática, de forma não letal, carregando substâncias adsorvidas, como DNA, para o interior da célula. Esse processo possibilitou a transformação de espécies que até então não eram passíveis de serem transformadas por outros métodos. Dados de literatura mostram com sucesso transformação de várias espécies de importância econômica usando essa metodologia, principalmente cereais, incluindo-se arroz (Christou et al. 1991; Cao et al. 1992), sorgo (Casas et al. 1993), trigo (Vasil et al. 1992; Altpeter et al. 1996) e aveia (Somers et al. 1992). No presente trabalho, são descritos os procedimentos para produzir plantas transgênicas de milho, cujo objetivo foi ajustar a metodologia de transformação para milho tropical usando bombardeamento de partículas. Os plasmídeos usados neste experimento foram o pBI 121 (13.0 kb) e o pBI 221 (5.7 kb). Os genes de ambos os plasmídeos estavam sob controle do promotor constitutivo CaMV35S. O plasmídeo pBI 221 contém o gene repórter uidA, que codifica para a enzima  $\beta$ -glucuronidase (GUS), e o gene para resistência à canamicina. O plasmídeo pBI121 contém apenas o gene repórter GUS. Os resultados da expressão transiente do gene GUS nos permitem avaliar a eficiência do processo de transformação, porém, não nos permitem concluir a respeito da integração do DNA exógeno ao genoma da planta. Na Figura 1, podem-se observar resultados de expressão transiente do gene da  $\beta$ -glucuronidase (GUS), 24 horas após o bombardeamento. Pontos (“spots”) azuis bem definidos são característicos desta técnica de transformação. Os embriões bombardeados com o plasmídeo pBI121, que contém o gene que confere resistência ao antibiótico canamicina (NPT II), foram transferidos para meio de cultura, conforme descrito por Carvalho et al. (1997), adicionado do antibiótico, em concentrações crescentes, para seleção de possíveis transformantes. O uso de 0,4% de Phytigel como agente solidificante do meio de bombardeamento conduziu aos melhores resultados, não permitindo que os embriões se desprendessem do meio de cultura no momento do disparo. A menor concentração testada (0,2%) permitiu que o meio de cultura borbulhasse ao se fazer vácuo na câmara de bombardeamento, alterando o posicionamento dos embriões. A concentração de 0,8% tornou o meio excessivamente rígido, fazendo com que os embriões fossem lançados para fora da placa, sob o impacto das micropartículas de tungstênio. O efeito da pressão do gás hélio sobre os resultados de expressão transiente de GUS nos embriões deve ser analisado de acordo com a distância percorrida pelo microcarreador de DNA, no caso, partículas de tungstênio. Os melhores níveis de expressão de GUS foram obtidos quando se ajustou a pressão do gás hélio para 60 Kgf cm<sup>-2</sup>, e a distância foi fixada em 12,5 cm, independentemente do genótipo utilizado. Pressões mais elevadas de gás hélio (70; 85 Kgf cm<sup>-2</sup>) podem ser utilizadas, desde que os embriões sejam colocados a uma distância maior da tela de retenção. A velocidade

atingida pelos microcarreadores de DNA é um fator importante a ser considerado, uma vez que, microcarreadores disparados em alta velocidade podem causar grandes danos às células da planta. Não se observou efeito do genótipo sobre o níveis de expressão do gene GUS, sob as mesmas condições de bombardeamento, bem como efeito marcante da idade dos embriões sobre a expressão do gene GUS nos embriões.



**FIGURA 1** - Expressão transiente do gene GUS em embriões imaturos de milho, linhagem 048, transformados por bombardeamento do plasmídeo pBI 221.

### **Bibliografia**

- Altpeter, F.; Vasil, V.; Srivastava, V.; Stöger, E.; Vasil, I. K. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Cell Reports**, 16:12-17. 1996.
- Cao, J. ; Duan, X.; McElroy, D.; Wu, R. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile mediated transformation of suspension culture cells. **Plant Cell Reports**, 11:586-591. 1992.
- Carvalho, C. H. S.; Bohorova, N.; 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**, 171: 73-76. 1997.
- Casas, A. M.; Kononowicz, A. K.; Zehr, U. B.; Tomes, D. T.; Axtell, J. D.; Buttler, L. G.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. Transgenic sorghu plants via microprojectile bombardment. **Proceedings of National Academic Science**, 90: 11212-11216. 1993.

- Christou, P.; Ford, T. L.; Kofron, M. Production of transgenic rice (*Oriza sativa* L.) plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. **Bio/Technology**, 9: 957-962. 1991.
- Kein, T.M.; Arentzen, R.; Lewis, P.A. & Fitzpatrick-McElligott, S. Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. **Bio/Technology**, 10: 286-291. 1992.
- Somers, D. A.; Rines, H. W.; Gu, W.; Kaeppler, H. F.; Bushnell, W. R. Fertile, transgenic oat plants. **Bio/Technology**, 10: 1589-1594. 1992.
- Sanford, J.C.; Klein, T.M.; Wolf, E.D. & Allen, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Part. Sci. Techn.** 5: 27-37. 1987.
- Vasil, V.; Castillo, A. M.; Fromm, M. E.; Vasil, I. K. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. **Bio/Technology**, 10: 667-674. 1992.