

OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS PARA BIOLÍSTICA EM CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO O GENE GUS. Maria Cristina Falco, Augusto Tulmann Neto e Eugênio César Ulian. Depto de Genética - ESALQ -USP, e Centro de Tecnologia Copersucar, Piracicaba - SP.

A utilização da biolística como forma de introdução de genes de interesse em plantas requer um estudo preliminar de otimização de alguns parâmetros envolvidos no processo, como por exemplo a distância da suspensão de partículas ao tecido alvo, a pressão utilizada no disparo e a quantidade de DNA precipitado nas partículas. Utilizando-se calos embriogênicos de cana-de-açúcar como tecido alvo e o gene da  $\beta$ -glucuronidase (GUS) como gene repórter, foram testados os parâmetros citados. A avaliação se deu por análise histoquímica da expressão GUS. Quantificou-se também a diminuição da expressão do gene ao longo do tempo. Os experimentos foram realizados em equipamento desenvolvido no Centro de Tecnologia Copersucar. Não houve diferenças significativas entre os valores de distância do alvo (testou-se 5,0, 8,0, 11,0, 14,0 e 17,0 cm) e de quantidade de DNA (0,1, 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0  $\mu\text{g}/\text{disparo}$ ). Para pressão de disparo, 8  $\text{Kgf}/\text{cm}^2$  apresentou maior expressão GUS (entre 7, 8, 9, 10 e 11  $\text{Kgf}/\text{cm}^2$  testados). Optou-se então, por utilizar nos experimentos futuros a distância de 14,0 cm do alvo, a pressão de disparo de 8  $\text{Kgf}/\text{cm}^2$  e 1,0  $\mu\text{g}$  de DNA/disparo.

CAPES

EXPERIMENTOS PRELIMINARES VISANDO A OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) RESISTENTES A HERBICIDA E A ESTRESSES OSMÓTICOS

Pedro A. L. Bittencourt<sup>1</sup>, Grácia M. S. Rosinha<sup>2</sup>, Adriana T. Ferreira<sup>1</sup> & José A. Peters<sup>1</sup>, <sup>1</sup>UFPEL/FAEM - Depto de Botânica, Campus Universitário - Caixa Postal, 354 - CEP 96010-900 - Pelotas/RS - <sup>2</sup>Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, EMBRAPA, Caixa Postal 02372, Brasília/DF, 70770 Brasil.

A engenharia genética oferece, atualmente, a possibilidade da transferência de genes úteis às cultivares comerciais, permitindo incorporar características herdáveis sem a destruição de genótipos valiosos que se tem obtido como resultado de muitos anos de cruzamentos e seleção, possibilitando assim a obtenção de resultados por metodologia menos sujeita a variação genética não controlável. A transferência de DNA através do método biolístico, permitirá a introdução de genes de interesse sem alterar a base genética dos cultivares preferidos pelo agricultor. Em nossos experimentos estamos otimizando a eficiência de transformação genética, principalmente para as variedades locais do tipo indica, via método biolístico analisando a expressão transiente utilizando o gene reporter *uidA* (GUS). Como explantes de transformação estamos utilizando embriões imaturos, calos primários de embriões maduros e outros explantes alternativos como panículas imaturas e gemas axilares. Como objetivo final destes experimentos visamos a transformação de arroz com o gene *bar* (fosfinotricina acetiltransferase) que confere resistência ao herbicida FINALE® (Hoechst AG, glufosinato de amônia) e do gene *mtlD* (manitol-1-fosfato dehidrogenase) que provoca acúmulo de manitol, aumentando assim a capacidade de ajustamento osmótico, permitindo que as plantas possuam uma maior tolerância, por exemplo, à salinidade e ao déficit hídrico.

Suporte financeiro: CNPq e FAPERGS

PREDIÇÃO DE ESTRUTURA E MODELAGEM MOLECULAR DE BiP (Binding Protein) DA SOJA [*Glycine max* L. (Merrill)] USANDO BIOLOGIA COMPUTACIONAL. Wanderson Duarte da Rocha<sup>1</sup>, Luiz Pacheco Motta<sup>2</sup>, José Domingos Fabris<sup>2</sup>, José Edson Fontes Figueiredo<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa. <sup>2</sup>Núcleo de Biologia Aplicada, CNPMS/Embrapa, Sete Lagoas, Minas Gerais.

Proteínas de estresse catalizam hidrólise de ATP ligado através de mudança conformacional de dois domínios com topologia  $\beta\beta\alpha\beta\alpha$  circundando o nucleotídeo. BiP (Binding Protein) pertence a família de proteínas de estresse. Um cDNA de BiP da soja foi seqüenciado (Figueiredo e Fontes, dados não publicados) e a proteína deduzida foi comparada com a estrutura cristalográfica do sítio de ligação de ATP de HSC70 citoplasmática de leveduras usando os programas Rasmol e Prowin. A estrutura conservada de BiP da soja no domínio de ligação de ATP consiste de 234 resíduos formando diade quase simétrica. BiP da soja possui os domínios I e II com subdomínios IA e IIA e subdomínios IB e IIB conservados com relação a estrutura de HSC70 e resíduos localizados na mesma posição, ou diferente, mas com funções semelhantes aos resíduos Asp10; Asp199 e Asp199 a Glu175 de Ligação de  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ; Asp11; Gln137; Asp154 ácidos no sítio ativo e Glu175; Asp199, Lys71; Asp199 e Asp206 que coordenam a ligação de água em HSC70. Modificações na seqüência de aminoácidos em BiP não alteram o modelo da estrutura terciária da proteína.

Recursos financeiros RHA-E-CNPq/Embrapa.

### Production of transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants through electroporation of immature leaves

M.C. Pestana<sup>1,2</sup>, V.L.M. de Pádua<sup>1</sup>, M. M. Pinheiro<sup>1</sup>, D.E. de Oliveira<sup>1</sup> and E. Mansur<sup>2</sup>

1. Universidade Federal do Rio de Janeiro, I.B., LGMV/DG, RJ- Brazil

2. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, I. B., Labmit/DBCG, RJ-Brazil

Electroporation-mediated DNA delivery to plant protoplasts is a well established procedure. More recently, it has been shown that also intact cells, both in suspension cultures and as part of organized tissues, can take up DNA through electroporation. In the present study we established a transformation protocol for peanut based on the electroporation of immature leaves. Plant regeneration (22 shoots/explant, after 45 days culture period) was obtained upon continued culture of explants on MS medium containing 22  $\mu\text{M}$  6-benzilaminopurine (BAP) plus 5  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  and incubated at 35  $\pm$  2°C. Some parameters related to the efficiency of DNA delivery to peanut immature leaves, such as electric pulse, electrolyte concentration and co-incubation conditions were previously studied, using transient GUS expression assays. The plasmids used were pTDE4 and pGUSINT, containing the GUS gene coding region driven by the CaMV promoter and the *npt-II* gene under the control of the nopaline sintase (NOS) promoter. Leaves from 2-day-old seedlings were excised and electroporated with field strength of 625V/cm discharged from a 900  $\mu\text{F}$  capacitor. After electroporation, explants were transferred to regeneration medium containing 100mg/L kanamicin. Resistant regenerants were obtained at a frequency of 5%. The presence of foreign DNA into putative transgenic plantlets was demonstrated using PCR primers designed to amplify a 20bp sequence of the *npt-II* gene. Three out of eight plants were PCR positive and the PCR products hybridized with a *npt-II* probe. In order to confirm DNA integration into genomic DNA, Southern blot analysis is currently being performed.

Supported by Capes and Cepuerj