

PRODUÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE MILHO TROPICAL VIA BIOBALÍSTICA

CARNEIRO AA₁, CARVALHO CHS₁, CARNEIRO NP₁, VASCONCELOS MJV₁, LOPES MA₂, PAIVA, E₁

¹NBA- Núcleo de Biologia Aplicada – EMBRAPA/CNPMS – Rodovia MG 424 Km 65 – 35701-970 -Caixa Postal 151– cnpm@cnpm.embrapa.br

²EMBRAPA sede – mauricio@sede.embrapa.br

Palavras-chave: biobalística, transgênicos, milho, qualidade nutricional

INTRODUÇÃO

Atualmente, com 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 via transformação genética. O milho é um cereal muito importante economicamente, sendo também uma das culturas preferidas para estudos moleculares em muitos temas básicos e aplicados. O endosperma, 80% do grão de milho, tem sido de especial interesse devido à sua importância como fonte de energia e proteínas. Embora, o endosperma do grão de milho apresente em média 9% de proteína na matéria seca, esta proteína é de baixa qualidade quando utilizada na alimentação humana ou de outros animais monogástricos, uma vez que possui baixos teores de aminoácidos essenciais como metionina, triptofano e lisina. O principal objetivo deste trabalho é a obtenção de plantas transgênicas de milho com uma melhor qualidade nutricional do grão através da super-expressão no endosperma de uma proteína rica em metionina, a delta zeína. Apesar dos cereais serem um dos grupos mais difíceis de se transformar (Barcelo & Lazzeri, 1995), transformações genética deste grupo de plantas têm sido conseguidas utilizando estratégias tais como eletroporação, biobalística e *Agrobacterium tumefaciens* (Hiei et al., 1994; Ishida et al., 1996; Cheng et al., 1997). Bombardeamento de partículas cobertas com DNA de interesse tem sido o método de maior sucesso para produção de milho transgênico uma vez que as gramíneas não são facilmente transformadas via *A. tumefaciens*. A biobalística 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 falso positivos devido à persistência de *Agrobacterium* no tecido infectado. Portanto, neste trabalho parâmetros biobalísticos tais como pressão de hélio, a distância percorrida pelo microcarreador, o tipo de partícula usada, e a concentração ideal de DNA foram otimizados para a transformação do milho utilizando a construção genética Gam.Del-pCAMBIA que contem o promotor endosperma específico da gama zeína direcionando a expressão da delta zeína. Plantas transgênicas de milho, confirmadas por Southern blot, se encontram em casa de vegetação no período de enchimento dos grãos.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação de embriões imaturos e calos embriogênicos para bombardeamento:

Embriões imaturos de milho, 1,5-2,0 mm, foram isolados em condições estéreis e cultivados em meio básico N6 (Chu et al., 1975) (Linhagem A188) suplementado com 2 mg/L 2,4-D e N6 suplementado com 3,3 mg/L Dicamba (Linhagem 1345). Os explantes foram bombardeados depois de 2-6 dias de isolamento. Foi feito um pré-tratamento osmótico, no qual os embriões foram colocados em meio N6 com 12% de sacarose. O tratamento osmótico foi iniciado 4 horas antes do bombardeamento e continuado por 0-24 horas após o bombardeamento.

Transformação via biobalística: Diferentes concentrações de DNA plasmidial foram precipitadas em 3 mg de partículas de tungstênio M10 de acordo com o protocolo descrito por Rech & Aragão (1998). Para os estudos de transformação genética de embriões imaturos e/ou calos embriogênicos de milho via biobalísticas foram analisados os seguintes parâmetros: pressão de gás hélio (650, 1000 e 1100 psi), tipo de microcarreador (tungstênio ou ouro), concentração de DNA (0,8 ou 1,6 µg/tiro); distância percorrida pelo microcarreador para atingir os explantes (6,0; 9,5; 12,5 cm); e número de tiros por placa (1, 2, 3 e 6 tiros).

Seleção de plantas transgênicas: Calos embriogênicos de A188 cultivados em meio N6 + 2,4-D ou embriões imaturos de L1345 cultivados em meio N6 + Dicamba antes do bombardeamento foram subcultivados por duas semanas nos mesmos meios à 26°C, no escuro depois do bombardeamento. Seleção foi iniciada 14 dias depois do bombardeamento quando os calos de A188 e L1345 foram transferidos para os mesmos meios sem casaminoácidos e suplementados com 3 à 9 mg/L de glufosinato de amônia, o composto ativo do herbicida Finale. Calos foram subcultivados a cada 2 semanas em dosagens crescentes de glufosinato de amônia. Para regeneração os calos foram colocados em meio de cultura contendo 12% de sacarose e 6 mg/L glufosinato de amônia por duas semanas. Calos embriogênicos foram então transferidos para meio MS suplementado com 3 mg/L glufosinato de amônia e cultivados à 26°C em luz (16 horas). Plantas com aproximadamente 5 cm de altura foram transferidas para solo em casa de vegetação.

Análise histoquímica de GUS: Expressão transiente ou estável de GUS foi feita de acordo com o protocolo descrito por Jefferson et al. (1998).

Construções gênicas: O promotor da gama-zeína de 27 Kda foi isolado de um clone genômico por PCR. O produto da reação de PCR (1,2 Kb) foi purificado (kit Quiagen, CA), ligado nos sítios *EcoRI* – *BamHI* do vetor pCAMBIA (Roberts et al., 1997) criando a construção Gam-pCAMBIA. Esta construção foi transformada em *E. coli* DH5- α usando seleção de canamicina/X-gal/IPTG. A região codante da delta zeína foi também isolada de DNA genômico por PCR. O produto da reação de PCR (0.9 Kb) foi ligado à construção Gam-pCAMBIA digerido com *BamHI* e *HindIII* e subsequentemente transformado em *E. coli* com seleção de canamicina. O plasmídeo recombinante, Gam.Del-pCAMBIA, foi amplificado e purificado usando um kit da Quiagen.

Análise de plantas transgênicas: DNA genômico foi isolado das plantas transformantes usando o protocolo de Dellaporta et al. (1983). 30 µg de DNA enzimaticamente digerido com *EcoRI* foi transferido para um membrana de nylon pela técnica de "Southern blot". DNA transgênico foi detectado usando o método quimioluminescente de digoxigenin. As membranas foram hibridadas com uma sonda 35S marcada por PCR.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Calos embriogênicos da linhagem A188 ou tecido escutelar da linhagem L1345 foram bombardeados sobre diferentes condições, e a expressão transiente de GUS foi detectada 48 horas após bombardeamento.

Na otimização dos experimentos de biobalística uma pressão de hélio de 650 psi produziu melhor expressão transiente quando calos embriogênicos de A188 foram bombardeados, entretanto não houve diferença entre 650, 1000 e 1100 psi quando embriões imaturos de L1345 foram usados; também não foi notada diferença de expressão transiente quando ouro ou tungstênio foram utilizados; porém, o uso de uma concentração osmótica elevada rendeu melhores níveis de expressão. A distância de 6 cm percorrida pelo microcarrier para atingir os explantes, 1,6 µg/tiro de DNA plasmidial e dois a três tiros em cada placa geraram os melhores níveis de expressão transiente para ambos, calos embriogênicos e tecido escutelar de embriões imaturos. Plantas transgênicas foram geradas em quase todos os tratamentos mas para a linhagem A188 os melhores parâmetros foram; pressão de hélio de 650 psi; distância percorrida pelo microcarreado entre 6 e 8 cm; dois ou três tiros em cada placa e 1,6 µg/tiro de DNA plasmidial. Os resultados para produção de plantas transgênicas de L1345 foram muito parecidos sendo que um aumento na pressão do gás hélio (1100 psi) gerou maiores taxas de transformação. Atualmente 120 plantas, em período de enchimento de grãos, representando 40 diferentes eventos transgênicos estão em casa de vegetação. Todos os eventos foram confirmados por análise de "Southern blot".

CONCLUSÃO

Cereais, particularmente plantas de milho, são uns dos grupos mais recalcitrantes para produção de plantas transgênicas. A maioria dos estudos de transformação de milho têm sido focados em linhagens adaptadas ao clima temperado, muito pouca atenção têm sido dada às linhagens tropicais. Portanto, é necessário, para os genótipos tropicais, o desenvolvimento de técnicas de transformação eficientes. Neste projeto alguns dos parâmetros importantes para transformação de *Zea mays* via biobalística foram determinados. Os resultados obtidos servirão como base para a produção de linhagens de milho tropical transgênicos que poderão ser incorporadas à programas de melhoramento tradicional, diminuindo o tempo e o custo na produção de novos genótipos adaptados às condições de estresses abióticos/bióticos dos trópicos e de melhor qualidade nutricional.

REFERÊNCIAS

- CHENG, M.; FRY, J.E.; PANG, S.; ZHOU, H.; HIRONAKA, C.M.; DUNCAN, D.R.; CONNER, T.W.; WAN, Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, Bethesda, v.115, p.971-980, 1997.
- CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y.; BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, Peking, v.18, p.659-668, 1975.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v.4, p.419-421, 1983.
- HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHO, T. Efficient transformation of rice

mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of T-DNA. **Plant Journal**, Oxford, v.6, p.271-282, 1994.

ISHIDA, V.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v.14, p.745-750, 1996.

JEFFERSON, R.A.; BEVAN, M.; KAVANAGH, T. The use of the *E. coli* B-galactosidase gene as a gene fusion marker for studies of gene expression in higher plants. **Biochemical Society Transactions** Essex, v.15, p.17-18, 1987.

BARCELO, P.; HAGEL, C.; BECKER, D.; MARTIN, A.; LORZ, H. Transgenic cereal (*Triticum*) plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of inflorescence tissue. **Plant Journal**, Oxford, v.5, p.583-592, 1994.

RECH, E.L.; ARAGAO, F.J.L. Biobalística. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. eds. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-Cenargen, 1998.

ROBERTS, C.S.; RAJAGOPAL, C.S.; NUGROHO, S.; SMITH, L.; NGUYEN, T.; RAVI, K.S.; DRANSFIEL, L.; HARCOUT, R.; VIJAYACHANDRA, K.; PATELL, V.; SALAUD, C.; DESAMERO, N.; SLAMET, I.; KEESE, P.; KILIAN, A.; JEFFERSON, R.A. A comprehensive new set of modular vectors to allow both routine and advanced manipulations and efficient transformation of rice by both *Agrobacterium* and direct gene-transfer methods. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL PROGRAM ON RICE BIOTECHNOLOGY, 1997. New York: Rockefeller Foundation, 1997.