

BC/29456

IB/80220

T/UNICAMP

Si38_d

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Instituto de Biologia
Departamento de Genética e Evolução

Desenvolvimento de “ferramentas” biológicas e moleculares para
transformação de milho através de
bombardeamento com micropartículas

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Márcio José da Silva
e aprovada pela Comissão Julgadora.
27/11/96 Arruda

Márcio José da Silva

Orientador: Prof. Dr. Paulo Arruda

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de
Campinas (UNICAMP) para a obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas, área de concentração Genética de Plantas.

1996

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	
	Tilimicampa
	du 38 d
V.	Ex.
COMBO BC/	29456
PROC.	281197
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	2311,00
DATA	16/04/97
N.º CPDC	M.00097437-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Si38d Silva, Márcio José da
Desenvolvimento de "ferramentas" biológicas e
moleculares para transformação de milho através de
bombardeamento com micropartículas / Márcio José
da Silva. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Paulo Arruda.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Milho. 2. Plantas-Genética molecular. 3. Pólen.
4. Antocianina. 5. Transformação genética. I. Arruda,
Paulo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

Data: Campinas, de novembro de 1996.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Arruda (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo



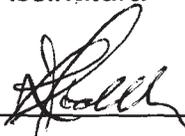
Assinatura

Prof. Dr. Hamza El-Dorry



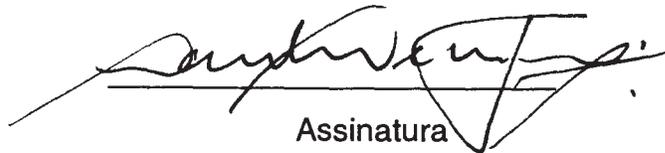
Assinatura

Prof. Dr. Ladaslav Sodek



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Teixeira Menossi



Assinatura

Suplente:

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Assinatura

Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Assinatura

À Dona *Lourdes*,

minha mãe querida, que brilhantemente mostra como superar as peças que a vida nos prega.

À pequenina *Larissa*,

minha filha, que com seus poucos anos me acompanha nesta caminhada.

Ao *Luciano*,

meu filho, que se transforma em todos heróis de sua fantasia e agora tem que enfrentar o primeiro ano da escola.

À *Melissa*,

minha filha adolescente, que luta na preparação de sua vida livre e independente que certamente virá.

À minha amada *Célia*,

esposa e amiga, pelo seu carinho e parceria,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Paulo Arruda, pela orientação e estímulo. Pelo exemplo de desenvolvimento, desde soluções administrativas mais simples até a conduta científica das linhas de pesquisa do Laboratório. Pela confiança em mim depositada para treinamento no exterior e implantação no laboratório da tecnologia de bombardeamento com micropartículas. Pela liberdade que levaram a realização deste trabalho e pela amizade desde antes da criação do CBMEG.

Ao professor Dr. Adilson Leite, pelo incentivo e dedicação profissional que tem mostrado ao longo dos anos, pela força com que desenvolveu e mantém a punho de ferro a biologia molecular no CBMEG.

À professora Dra. Anete P. Souza, pela análise prévia, pelas sugestões sobre a forma e conteúdo deste trabalho. Pelo exemplo de luta diária no desempenho do seu laboratório, pela formação do seus alunos e desenvolvimento dos projetos de pesquisa.

À professora Dra. Laura M. M. Ottoboni, pela participação no exame de qualificação, incentivo e profissionalismo de sempre. Pela nossa amizade e convivência desde as aulas de Bioquímica Vegetal, no Instituto de Biologia.

Ao Dr. Marcelo Menossi Teixeira, pela leitura minuciosa e discussão de todos os detalhes deste trabalho, pelas sugestões, pela velha amizade e novo convívio após sua formação no exterior.

Ao Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pelas sugestões e objetividade que conduziu a análise prévia deste trabalho, pela amizade desde os experimentos para obtenção de clones celulares tolerante ao AEC.

À Dra. Maricilda P de Mello e Dra. Carmem Sílvia Bertuso, pela prontidão em compor a banca para exame de qualificação.

Ao José Andrés Yunes, pela nossa “sociedade” nos experimentos de expressão transitória e trabalhos que temos realizado juntos. Pela nossa amizade e exemplo de centralizador de amizades.

Ao Germano Cord Neto, pelo intelecto mais brilhante do laboratório, pela compreensão e vivência diária ali na minha frente. Pelo testemunho de dedicação às pessoas.

Ao Edson Luís Kemper, pela amizade e trabalhos que temos realizado juntos, pela estimável ajuda prestada na análise estatística dos resultados.

À Sílvia Regina Turcinelli, pela sua preciosa colaboração na revisão do texto e pelas valiosas sugestões, pela amizade e convívio.

Aos caros amigos Celso Eduardo Benedetti, Ivan de Godoy Maia e Ebersson Sanches Calvo, pela amizade e exemplo de dedicação e responsabilidade profissional.

Ao pessoal do nosso laboratório: Adriana, Cinthia, Ricardo, André, Felipe, Raul, Rodrigo Fábio, Karen, Teresa, Marília, Claudete, Rogério, Luciana, Sandra, Susely, Berenice e Sibov, por formar um grupo de trabalho alegre e de convívio saudável.

Ao Maurício e Sr. Chico, pela amizade e exemplo de dedicação ao trabalho, pela atenção e preparo de material.

Às meninas da secretaria: Sandra, Tânia, Cláudia e Fabiana, pela amizade e solicitude com que sempre me atenderam.

Às secretárias do Departamento de Genética e Evolução: Sílvia, Teresa e Célia, pela atenção e auxílios prestados.

À UNICAMP e aos dirigentes imediatos, pela oportunidade e confiança em mim depositada no cumprimento das minhas obrigações durante o decorrer deste trabalho.

ABREVIações

A	Absorbância
<i>act1</i>	Gene da actina 1 de arroz
<i>adh1</i>	Gene da álcool desidrogenase 1 de milho
BAR	Região codificadora da PAT
<i>c1</i>	Gene <i>c1</i> de milho
CaMV35S	Promotor 35S do Vírus do Mosaico da Couve Flor
CTAB	Brometo de alquiltrimetilamônia
dATP	2'-desoxiadenina 5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitosina 5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanina 5'-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo
DO	Unidade de densidade óptica
dTTP	2'-desoxitimina 5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
GUS	β -glucuronidase de <i>Escherichia coli</i>
He	Gás hélio
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	Quilo base
KDa	Quilo Daltons
<i>lat52</i>	Gene tecido específico dos estágios finais do desenvolvimento da antera de tomate
<i>lat56</i>	Gene tecido específico dos estágios finais do desenvolvimento da antera de tomate
<i>lat59</i>	Gene tecido específico dos estágios finais do desenvolvimento da antera de tomate
M	Concentração Molar
MOPS	3-(N-morpholino)propano-ácido sulfônico

MOPS	Ácido 3-(N-morpholino)propano-sulfônico
N	Concentração Normal
NPT	Neomicina fosfotransferase
<i>o2</i>	Gene <i>opaco-2</i> de milho
PAT	Fosfinotricina acetil transferase
PCR	Reação de poliadenilação em cadeia
PEG	Polietilenoglicol
PPT	Fosfinotricina
psi	Libra por polegada quadrada
PVC	Cloreto de polivinil
<i>r</i>	Gene <i>r</i> de milho
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hidrocimetil)-aminometano
<i>uidA</i>	Gene codificador da β -glucuronidase de <i>Escherichia coli</i>
UV	Ultravioleta
X-GAL	5-bromo-4-clor-3-indolil- β -D-galactosídio
X-GLUC	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucurônico
<i>zm13</i>	Gene tecido-específico de grãos de pólen de milho

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática do vetor pBI221	26
Figura 2 -	Representação esquemática do vetor pAIGUSN	27
Figura 3 -	Representação esquemática do vetor pMF6-GUS	28
Figura 4 -	Representação esquemática do vetor pAct1-F	29
Figura 5 -	Representação esquemática do vetor p35SI-C1	30
Figura 6 -	Representação esquemática do vetor p35SI-Bperu	31
Figura 7 -	Representação esquemática do vetor pZM13(-260GN)	33
Figura 8 -	Representação esquemática do vetor pLAT52-7	34
Figura 9 -	Representação esquemática do vetor pR5'-GUS	35
Figura 10 -	Representação esquemática do vetor p α Z4-GUS	36
Figura 11 -	Diagrama do acelerador de micropartículas	52
Figura 12 -	Comparação dos mecanismos de disparo	54
Figura 13 -	Dispositivo para bombardeamento de grãos de pólen maduros	56
Figura 14 -	Comparação entre os mecanismos de bombardeamento Kaptan e direto	59
Figura 15 -	Efeito da pressão de disparo e distância do tecido alvo na transformação transitória	61
Figura 16 -	Interação entre a pressão e o nível dos disparos	63
Figura 17-	Representação esquemática do vetor pAct-GUSNPT	66
Figura 18-	Representação esquemática do vetor p35S-HPH	68
Figura 19-	Representação esquemática do vetor pActBARGUS	70
Figura 20	Representação esquemática do vetor pR5'-C1	72
Figura 21-	Representação esquemática do vetor pR5'-Bperu	73
Figura 22-	Representação esquemática do vetor pRT101-O2	74
Figura 23	Representação esquemática do vetor pPO2O2Coix	75
Figura 24-	Expressão transitória da β -glucoronidase em calos embriogênicos de milho	77

Figura 25-	Transformação de embriões imaturos	79
Figura 26-	Expressão transitória de GUS em endosperma imaturo de milho	82
Figura 27-	Expressão transitória de GUS em grãos de pólen	84
Figura 28-	Efeito dos promotores 35SCaMV, Adh1-Intron1, 35SCaMV-Intron1 e Act1-F na expressão transitória da β -glucuronidase em calos embriogênicos de milho	86
Figura 29-	Efeito da higromicina no crescimento de calos embriogênicos	88
Figura 30	Efeito da fosfofinotricina no crescimento de calos embriogênicos	89
Figura 31-	Expressão dos genes reguladores da via biossintética da antocianina em calos embriogênicos de milho	92
Figura 32-	Expressão dos genes reguladores da via biossintética da antocianina em plântulas em processo de regeneração	94
Figura 33-	Expressão dos genes reguladores da via biossintética da antocianina em sementes	96
Figura 34	Transformação de calos embriogênicos com os genes reguladores da via biossintética da antocianina	99
Figura 35-	Regeneração de plantas a partir de calos transformados com genes reguladores da via biossintética da antocianina	101
Figura 36-	Acúmulo de antocianina nas plantas regeneradas partir de calos transformados com genes reguladores da via biossintética da antocianina	104
Figura 37-	“Southern blot” das plantas regeneradas de calos bombardeados com os genes <i>c1</i> e <i>bperu</i>	107
Figura 38-	Efeito do trauma físico e do choque acústico gerado pelo acelerador de micropartículas sobre os grãos de pólen.	111
Figura 39-	Eficiência de transformação de pólen de milho	113
Figura 40	Germinação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de grãos de pólen transformados	116

Figura 41	Caracterização da expressão da antocianina na camada de aleurona de plantas F-352AG imaturas	119
Figura 42-	Transativação da α -zeína de 22 KDa pela proteína opaco-2	123
Figura 43	Restituição do fenótipo vítreo a partir de plantas polinizadas com grãos de pólen transformados com o gene opaco-2	128
Figura 44-	Análise molecular das progênies opaco-2 que apresentaram restituição do fenótipo vítreo	130

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição do Meio de Cultura N6 utilizado para indução e manutenção de calos embriogênicos de milho	21
Tabela 2 -	Composição do Meio de Cultura MS utilizado para regeneração de plantas de milho	23
Tabela 3-	Transformação de calos embriogênicos com os genes marcadores visuais	102
Tabela 4-	Plantas que apresentaram expressão de antocianina contrastando com o controle.	105
Tabela 5-	Transformação de milho F352AG através de bombardeamento de grãos de pólen com micropartículas contendo o vetor pR5'-C1	120
Tabela 6-	Restituição <i>in vitro</i> da expressão gênica <i>opaco-2</i>	124
Tabela 7-	Transformação de milho <i>opaco-2</i> através de bombardeamento de grãos de pólen com micropartículas contendo o gene <i>opaco-2</i>	126
Tabela 8-	Análise genética das progênies obtidas de plantas polinizadas com grãos de pólen bombardeados com o vetor pRT101O2	127

ÍNDICE GERAL

1. RESUMO	1
2. ABSTRACT	4
3. INTRODUÇÃO	6
3.1 - Transformação de plantas.	6
3.2 - Transformação de cereais	7
3.3 - Bombardeamento com micropartículas.	8
3.4 - Transformação de grãos de pólen.	10
3.5 - Transformação de pólen através de bombardeamento com micropartículas	12
3.6 - Genes reguladores de transcrição como marcadores visuais	13
3.6.1 - Genes reguladores da via biossintética da antocianina	14
3.6.2 - O gene <i>opaco-2</i> de milho	15
4. OBJETIVO	17
5. MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1 - Material vegetal	19
5.2 - Cultura de tecidos	19
5.2.1 - Calos embriogênicos	20
5.2.2 - Regeneração de plantas	22
5.2.3 - Inibição do crescimento dos calos embriogênicos pela higromicina e fosfinotricina	22
5.3 - Vetores plasmidiais	24
5.4 - Purificação de DNA plasmidial	32

5.4.1 - Transformação de E.coli DH5 α	32
5.4.1.1 - Preparação de células competentes:	37
5.4.1.2 - Transformação das células competentes:	38
5.4.2 - Minipreparação de DNA plasmidial	38
5.4.3 - Preparação em larga escala de DNA plasmidial	39
5.4.4 - Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose	42
5.5 - Minipreparação de DNA genômico de folha	44
5.6 - Bombardeamento com micropartículas	45
5.6.1 - Preparação de micropartículas	45
5.6.2 - Precipitação de DNA com micropartículas	45
5.6.3 - Bombardeamento de tecidos	46
5.7 - Ensaio histoquímico de GUS	47
5.8 - Análise de "Southern blot"	48
5.8.1 - Transferência do DNA para membrana de Nylon Hybond-N -Amersham	48
5.8.2 - Marcação de sonda radioativa	49
5.8.3 - Hibridização	50
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1 - Construção do acelerador de micropartículas	51
6.2 - Avaliação de parâmetros físicos do bombardeamento com micropartículas	57
6.2.1 - Comparação entre os sistemas de bombardeamento Kapton e direto	57
6.2.2 - Efeito da pressão de disparo e distância do tecido alvo sobre a eficiência de transformação de células	60
6.3 - Avaliação de parâmetros biológicos do bombardeamento	

com micropartículas	64
6.3.1 - Genes marcadores	64
6.3.2 - Genes seletivos	65
6.3.3 - Genes reguladores de expressão gênica	71
6.4 - Tecidos de milho	76
6.4.1 - Expressão transitória de GUS em calos embriogênicos de milho	76
6.4.2 - Expressão transitória de GUS em embrião imaturo recém induzido em cultura de milho	78
6.4.3 - Expressão transitória de GUS em endosperma imaturo de milho	80
6.4.4 - Expressão transitória de GUS em grãos de pólen de milho	81
6.5 - Análise comparativa dos promotores de expressão gênica contidos nos vetores plasmídias pBI221, pAIGUSN, pMF6-GUS e pAct1-F	85
6.6 - Método seletivo de transformação genética de milho através de cultura de tecidos	87
6.7 - Genes reguladores da antocianina como marcadores visuais	90
6.7.1 - Caracterização genotípica dos reguladores da biossíntese da antocianina em calos de milho através de transformação com os genes <i>c1</i> e <i>bperu</i>	91
6.7.2 - Acúmulo de antocianina durante o processo de regeneração das plantas	93
6.7.3 - Acúmulo de antocianina durante o desenvolvimento das sementes imaturas de milho	95
6.8 - Transformação estável de calos embriogênicos com os genes <i>c1</i> e <i>bperu</i>	97
6.8.1 - Obtenção de calos apresentando acúmulo de antocianina	98

6.8.2 - Regeneração de plantas a partir de tecidos apresentando alta expressão de antocianina	98
6.8.3 - Acúmulo de antocianina nas plantas regeneradas	103
6.8.4 - Análise molecular das plantas regeneradas de calos bombardeados com os genes <i>c1</i> e <i>bperu</i>	106
6.9 - Desenvolvimento da transformação de pólen	108
6.9.1 - Efeito do trauma físico e choque acústico gerado pelo acelerador de micropartículas sobre os grãos de pólen	109
6.9.2 - Determinação da eficiência de transformação dos grãos de pólen	112
6.9.3 - Viabilidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos grãos de pólen transformados	114
6.10 - Avaliação dos genes <i>c1</i> e <i>opaco-2</i> para transformação mediada por grãos de pólen	117
6.10.1 - Transformação de plantas com o vetor pR5'-C1	117
6.10.2 - Transformação de plantas <i>opaco-2</i> de milho através de bombardeamento com micropartículas contendo o gene <i>Opaco-2</i>	121
6.10.3 - Análise molecular das progênies bombardeados com o gene <i>opaco-2</i>	129
6.11 - Publicações científicas	131
7. CONCLUSÃO	133
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

1. RESUMO

Utilizando-se o milho como modelo de estudo, "ferramentas" biológicas e moleculares foram desenvolvidas no sentido de propiciar estratégias alternativas para produção de plantas transgênicas. Estas "ferramentas" visaram facilitar a transformação estável dos cereais que atualmente constitui-se de um processo trabalhoso requerendo longo período de tempo, de difícil reprodutividade o qual restringe-se a alguns genótipos.

Um acelerador de micropartículas foi construído e testado, sendo demonstrada sua eficiência em transformar vários tecidos de milho, através da expressão transitória da β -glucuronidase. Algumas inovações foram realizadas neste aparelho visando torná-lo mais prático e eficaz durante os experimentos. Na versão original o sistema Kapton foi substituído pelo sistema direto para aceleração das micropartículas, eliminando-se o "flying disk". O sistema direto mostrou superioridade em relação ao sistema Kapton tanto em relação à eficiência de transformação transitória quanto a variação entre os tratamentos.

Um dispositivo para bombardeamento de grãos de pólen maduros foi elaborado, sendo observada a transformação de 0,69% dos grãos de pólen de milho, quando bombardeados com o gene marcador da β -glucuronidase. A viabilidade *in vitro* e *in vivo* dos grãos de pólen transformados foi averiguada, sendo demonstrado que os grãos de pólen que receberam o DNA não foram impedidos em sua habilidade de germinar e alongar seus tubos polínicos.

Algumas estratégias para obtenção de plantas transgênicas de milho foram idealizadas, onde a identificação dos transformantes se apresentasse como uma característica fenotípica qualitativa, passível de visualização. Os genes *c1* e *opaco-2*, reguladores de expressão e responsáveis por fenótipos facilmente reconhecidos na semente madura, foram utilizados para a transformação de milho. A efetividade dos respectivos produtos gênicos foi demonstrada, havendo acúmulo de antocianina na camada de aleurona, quando sementes imaturas de milho F352AG foram bombardeadas com o vetor p35SI-C1. Por outro lado, o nível de expressão do promotor do gene da α -zeína de 22 KDa foi restituído, quando transativado pela proteína *opaco-2*, através de bombardeamento de endosperma imaturo com micropartículas co-precipitadas com p α -Z4-GUS e pRT101O2.

Calos embriogênicos de milho foram bombardeados com micropartículas contendo os vetores p35SI-C1 e p35SI-B-peru, sendo selecionados, visualmente, setores com acúmulo de antocianina. A partir destes setores, vários clones celulares foram isolados através de subculturas e 508 plantas regeneradas. Algumas destas plantas apresentaram padrão diferenciado de acúmulo de antocianina nas pontas das raízes, estigmas e sementes, contrastando com os controles. A análise molecular destas plantas não evidenciou a ocorrência de transgênese, tendo sido considerado variação epigenética, possivelmente devido às condições de cultura *in vitro*.

Grãos de pólen de milho foram bombardeados com os vetores contendo os genes *c1* ou *opaco-2*, para fertilização de plantas aceptoras em condições de campo experimental. As sementes de milho F325AG obtidas a partir de grãos de pólen bombardeados com p35SI-C1 não apresentaram acúmulo de antocianina na camada de aleurona. Por outro lado as plantas *opaco-2* que foram polinizadas com grãos de pólen transformados com o gene *opaco-2* produziram 31.108 sementes das quais 17 sementes apresentaram o fenótipo vítreo. A análise

molecular destes genótipos não demonstrou integração do gene *opaco-2* selvagem, contido no vetor pPO2O2. A reversão do fenótipo foi devida à presença de plantas normais nas proximidades do campo experimental.

2. ABSTRACT

Using maize as a model plant, biological and molecular tools were developed as alternative ways to produce transgenic plants. These tools were used to facilitate stable transformation of cereals, a hard task in our days.

A gene gun was constructed and tested and several maize tissues were used to test transient expression of the GUS gene. Innovations were introduced in the equipment to make it more practical and efficient. In the original version, the Kapton system was substituted by the direct system to accelerate the microparticles eliminating in this way the flying disk. The direct system proved to be superior in relation to the Kapton system in the transitory transformation efficiency in respect to variation between treatments.

An accessory for pollen grains bombardment was elaborated. The transformation efficiency of maize pollen grains was 0.69% when bombarded with the reporter gene GUS. The *in vitro* and *in vivo* viability of the transformed pollen grains was tested. The pollen grains that received the DNA germinated and elongated the pollen tube.

New strategies to obtain maize transgenic plants were tested using a qualitative phenotypic characteristic. The genes *c1* and *opaque-2*, expression regulator genes, were used in maize transformation experiments. Anthocyanin accumulation was observed in the aleurone layer of maize F1 (F352AG) seeds, when the vector p35SI-C1 was used to bombardment. On the other hand, the level of expression of a 22 kDa α -zein promoter was restored when transactivated by

the opaque-2 protein by bombardment of immature endosperm with microparticles having p α -Z4-GUS and pRT101O2 co-precipitated.

Maize embryogenic calli was bombarded with microparticles having the vectors p35SI-C1 and p35SI-Bperu. Those calli were visually selected based on anthocyanin accumulation. From those sectors, several cellular clones were selected and a total of 508 plants were regenerated. Some of those plants presented anthocyanin accumulation in the root tips, stigma and seeds, contrasting with the controls. The molecular analyses of those plants did not showed the presence of transgenics, epigenetic variations were considered, probably due to the in vitro culture conditions.

Maize pollen grains were bombarded with the vectors containing the *c1* and *opaque-2* genes to be used in the fertilization of plants in the experimental field. The maize F325AG seeds obtained after pollen grain bombardment with p35SI-C1 did not presented anthocyanin accumulation in the aleurone layer. On the other hand, opaque-2 plants pollinated with pollen grains transformed with the opaque-2 gene produced 31.108 seeds from which 17 presented a vitreous phenotype. The molecular analyses of those genotypes did not demonstrated the integration of the *opaque-2* gene present in the pPO2O2 in the wild type. The phenotypic reversion was due to the presence of normal plants in the experimental field.

3. INTRODUÇÃO

3.1 - Transformação de plantas.

O grande avanço da biotecnologia vegetal, observado nos últimos 10 anos, é uma consequência natural da explosão verificada no conhecimento básico em biologia molecular de plantas. Por volta de 1983 houve um sobressalto nessa área do conhecimento onde a aplicação da tecnologia do DNA recombinante permitiu o desenvolvimento das “ferramentas” básicas para a manipulação genética de algumas espécies de plantas (Rogers *et al.*, 1986). Inicialmente com tabaco, expandindo posteriormente para várias outras espécies da família das solanáceas e algumas dicotiledôneas, plantas começaram a ser manipuladas geneticamente, utilizando-se principalmente vetores baseados no sistema de transformação intermediado pela *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes* (Barton *et al.*, 1983). Entretanto esse sistema mostrou-se bastante limitado, devido ao leque reduzido de hospedeiros susceptíveis à transformação por *Agrobacterium*. Paralelamente, houve um grande avanço da biologia celular permitindo o desenvolvimento de metodologias de cultura *in vitro* de tecidos, células e protoplastos, com a subsequente regeneração de plantas (Armstrong & Green, 1985, Shillito *et al.*, 1989 e Gordin-Kamm *et al.*, 1990). Esses modelos celulares passaram então a ser explorados como alvo para o desenvolvimento de metodologias, visando a transformação direta de plantas (DeBlock *et al.*, 1984). Inúmeros protocolos de transformação direta foram testados (Lörz *et al.*, 1985 e

Fromm *et al.*, 1986), porém, espécies economicamente importantes das famílias das gramíneas e leguminosas mostraram-se extremamente recalcitrantes à transformação genética, devido as limitações da cultura celular e problemas com os métodos de transformação direta (Gasser & Fraley 1989 e Potrykus, 1989). Esses problemas foram quase que plenamente suplantados com o desenvolvimento da tecnologia do bombardeamento com micropartículas descrita por Klein *et al.*, 1987 (Fionnuala *et al.*, 1992; Christou, 1992 e Christou, 1994). Essa técnica permite a introdução de DNA exógeno no interior do núcleo das células de tecidos diferenciados, contornando o problema da utilização de células em suspensão ou protoplastos, a partir dos quais é difícil regenerar-se plantas (Walden & Schell 1991). Atualmente um grande número de espécies, incluindo leguminosas e cereais, pode ser transformado com essa técnica (Christou, P. 1994). Entretanto, procedimentos menos genótipo-dependentes, os quais utilizam tecidos organizados como embriões imaturos ou parte de embriões para o bombardeamento, ainda apresentam uma baixa eficiência e é alta a probabilidade de produzir-se plantas não transgênicas ou quimeras (Potrykus, 1991; Walden & Schell, 1991 e Christou, 1993).

3.2 - Transformação de cereais

O arroz foi o primeiro cereal transformado geneticamente. Para tanto, foram empregados métodos de transformação de protoplastos, utilizando-se protocolos de eletroporação ou polietilenoglicol (PEG) (Toriyama *et al.* 1988; Yang *et al.* 1988; Zhang & Wu, 1988; Shimamoto *et al.* 1989; Datta *et al.*, 1990 e Peng *et al.*, 1992). Esses métodos não puderam ser aplicados com facilidade a outros cereais, uma vez que os mesmos requerem culturas de células embriogênicas em suspensão, característica geralmente genótipo dependente, para a obtenção de protoplastos (Vasil, 1988; Abdullah *et al.*, 1986 e Fujimura *et al.*, 1985). Mesmo assim, alguns grupos relataram a obtenção de plantas transgênicas de arroz,

trigo, cevada e milho (Shimamoto *et al.*, 1989 e Rhodes *et al.*, 1988). A transformação estável em milho tem sido alcançada utilizando-se cultura de células embriogênicas, bombardeadas com genes marcadores e seletivos, com posterior seleção das células transformadas e regeneração de plantas transgênicas. Esse processo, entretanto, é trabalhoso e requer longo período de tempo entre o bombardeamento e a obtenção das plantas transformadas. Além disso, a obtenção de cultura de células regeneráveis é de difícil reprodutibilidade e genótipo-dependente. Desta forma, a possibilidade de utilização de sistemas mais simples para a identificação das células transformadas, bem como a utilização da fase gametofítica como via de transformação, poderão facilitar o processo de transformação estável em milho.

O método biolístico tornou-se uma alternativa simples e rápida para a transformação de cereais, tendo sido empregado com sucesso para a transformação de cana de açúcar, trigo, arroz, cevada e milho (Fromm *et al.*, 1990; Gordon-Kamm *et al.*, 1990; Christou *et al.*, 1991; Bower & Birch, 1992 e Vasil *et al.*, 1992).

3.3 - Bombardeamento com micropartículas.

O bombardeamento com micropartículas constitui-se um método direto de transformação, o qual emprega micropartículas de metal pesado para introduzir DNA nas células. A primeira experiência de bombardeamento com micropartículas foi descrita por Klein *et al.* (1987), que demonstraram a atividade transitória de genes marcadores introduzidos em células da epiderme de cebola. O processo envolvido no bombardeamento com micropartículas foi descrito detalhadamente por Sanford (1988), sendo o DNA impregnado em micropartículas de tungstênio, as quais foram aceleradas a altas velocidades (328 a 565 m. s⁻¹) pela transferência de impulso mecânico, utilizando um cartucho de calibre 0,22. Estas

micropartículas puderam ultrapassar a parede celular, membrana plasmática e penetrar no interior celular de maneira não letal. A atividade da β -glucuronidase foi verificada através da reação histoquímica com X-GLUC. Nos anos seguintes, usando este método, foi possível demonstrar a expressão transitória de genes introduzidos em vários tipos de células vegetais (Christou *et al.*, 1988; Klein *et al.*, 1987 e Klein *et al.*, 1989). Foi demonstrado também que o DNA é capaz de integrar-se de forma estável no cromossomo de algumas células bombardeadas, as quais, sob condições ideais de seleção, puderam proliferar-se e posteriormente regenerar plantas transgênicas (Klein *et al.*, 1988). Este procedimento de transformação tem sido utilizado com sucesso para transformar culturas celulares, via bombardeamento de meristema (McCabe *et al.*, 1988), e obtenção de plantas de tabaco transgênicas (Klein *et al.*, 1988 e Tomes *et al.*, 1990).

Sanford *et al.* (1991) desenvolveram um novo sistema de aceleração de micropartículas que representou um grande avanço no método biolístico. O acelerador Biolistic[®] PDS-1000/He, atualmente comercializado pela Bio-Rad, desde então tem sido utilizado para transformar organismos vivos com DNA exógeno. O DNA é introduzido nas células impregnado em micropartículas, as quais são aceleradas através de um choque de gás hélio. Assim, vírus, RNA, DNA ou macromoléculas de um modo geral passaram a ser carregadas para o interior celular (Klein *et al.*, 1987 e Sanford *et al.*, 1987). Além disso, com uma configuração especial, o acelerador de micropartículas tornou-se mais flexível, possibilitando assim a transformação de bactérias, leveduras, células de plantas, cultura de células de animais e tecidos intactos de rato (Klein *et al.*, 1990; Boynton *et al.*, 1988; Johnston *et al.*, 1988; Daniell *et al.*, 1990; Armaleo *et al.*, 1990 e Klein *et al.*, 1992).

3.4 - Transformação de grãos de pólen.

O potencial do pólen como vetor para a transformação genética é conhecido há algum tempo, sendo que nos últimos 10 anos, vários pesquisadores têm-se empenhado neste sentido. Esta estratégia foi primeiramente proposta por Hess (1975). Fragmentos de DNA poderiam ser absorvidos através de "poros" no tubo polínico e possivelmente pela célula espermática, permitindo a incorporação do DNA na célula ovo recém fertilizada. Os procedimentos de transformação envolviam a incubação dos grãos de pólen maduros ou pré-germinados com soluções de DNA genômico. Subseqüentemente os grãos de pólen assim tratados eram utilizados para a fertilização de plantas receptoras através de polinização *in vivo* ou *in vitro* (Ohta, 1986; Tweel *et al.*, 1991).

Uma outra estratégia, denominada de caminho do tubo polínico, foi apresentada por Luo & Wu (1988). Consistia na realização de um corte do estigma de flores recém polinizadas, logo acima do ovário, e aplicação de uma gota de solução de DNA na extremidade do estilo cortado. De acordo com os autores, o DNA alcançaria o ovário junto com o tubo polínico ou poderia ser conduzido ao longo do espaço entre o tubo polínico e o tecido de transmissão.

Vários pesquisadores tentaram a transformação genética mediada por grão de pólen (De Wet *et al.*, 1985; Hess, 1987; Ohta, Y. 1986 e Roeckel *et al.*, 1988). Entretanto, até o momento ainda não foi demonstrado claramente a integração do DNA exógeno no genoma da planta e a sua herança para as progênies. Um dos problemas encontrados nesse procedimento foi a observação de nucleases excretadas durante a germinação do grão de pólen. As nucleases liberadas para o meio de incubação degradariam o DNA rapidamente dentro de 5 a 10 minutos (Matousek & Tupý, 1983; Negrutiu *et al.* 1986). Booy *et al.* (1989) tentaram eliminar a ação das nucleases, através de sucessivas lavagens dos grãos de pólen antes, da adição do DNA, na esperança de reduzir a atividade das nucleases, o que não ocorreu.

A estratégia do caminho do tubo polínico, além de deparar com a questão das nucleases, tem sido contestada devido a formação de "plugs" de calose que selam a via, logo após a passagem do tubo polínico, durante seu crescimento, tornando-se um obstáculo à passagem das moléculas de DNA (Potrykus, 1991 e Roeckel *et al.*, 1992). Por outro lado, tem-se questionado a ausência de critérios claros e conclusivos das análises genéticas e fenotípicas como prova final da transformação integrativa, utilizando-se esta via sexual. Faltam controles nos tratamentos e análises, e fundamentalmente, estreita correlação entre dados físicos ("Southern blot") e fenotípicos (ensaios enzimáticos). As análises de "Southern blot" não são completas, contendo sinais de hibridização em DNA de alto peso molecular para demonstrar: a presença do DNA híbrido, entre o hospedeiro e o exógeno; o gene completo e a ausência de contaminação por fragmentos de DNA (Roeckel *et al.*, 1992).

Apesar das dificuldades encontradas até então, a utilização do pólen como vetor para a transformação genética tem sido considerada potencialmente vantajosa para a introdução de genes nas plantas, por ser de aplicabilidade generalizada. Poderá ser utilizada em qualquer espécie de planta e particularmente para as monocotiledôneas como milho, trigo e cevada que são de difícil manipulação e transformação genética, através de cultura de tecidos. O grão de pólen poderá ser ainda um vetor ideal para a transformação de plantas, visto que ele é o carreador natural do genoma masculino durante o processo de fertilização, permitindo a recuperação de embrião zigótico transformado, não quimérico (Dupuis & Pace, 1993), além de abolir os passos necessários para a cultura de tecidos que consomem tempo e os resultados indesejáveis gerados pela variação somaclonal. Recentemente os procedimentos alternativos de transformação gênica utilizando a rota sexual foram revistos (Potrykus, 1990 e Roeckel *et al.*, 1992). Mediante análises de parâmetros físicos e biológicos, que afetam a introdução de genes exógenos e a presença destes nas células, tem-se sugerido várias alternativas que nos ajudam a entender alguns problemas e a planejar melhores experimentos para o futuro.

3.5 - Transformação de pólen através de bombardeamento com micropartículas

A expressão transitória em grãos de pólen de tabaco (*Nicotiana tabacum*) foi avaliada por Twell *et al.* (1989), utilizando-se construções contendo promotores pólen-específicos, como o do gene *lat52* ou promotores constitutivos como o CaMV35S (Vírus do Mosaico da Couve Flor), fusionados ao gene *uidA* que codifica a β -glucuronidase (GUS) de *E.coli*. Este gene foi empregado porque a atividade de GUS pode ser visualizada em uma única célula, utilizando-se o substrato indogênico X-GLUC (Jefferson *et al.*, 1987). Numerosos grãos de pólen azuis foram visualizados e níveis altos de atividade da β -glucuronidase detectados nos extratos de pólen bombardeados com a construção pLAT52-GUS, confirmando assim a utilização do bombardeamento com micropartículas para a introdução de DNA diretamente em grãos de pólen.

A transformação de grãos de pólen tem sido demonstrada para algumas espécies de plantas: *Nicotiana tabacum* (Twell *et al.*, 1989); *Tradescantia* e *Zea mays* (Hamilton *et al.*, 1992); *Lilium longiflorum*, *Nicotiana rustica* e *Paeonia lactiflora* (Nishihara *et al.*, 1993), restringindo-se a espécies as quais os grãos de pólen suportam as condições experimentais, sem que se rompam e percam a viabilidade, tenham longos períodos de florescimento ou possibilitam o congelamento para posterior manipulação é importante também disponibilidade de seqüências regulatórias específicas para ensaiar a expressão de genes marcadores. Uma vez no interior do grão de pólen, o DNA estaria livre da ação de nucleases. Poderia mover-se dentro do tubo polínico, concomitantemente com os grânulos citoplasmáticos, em direção ao estilo, com chances de participar da fecundação no ovário. Aparentemente isto ocorreria de forma natural, permitindo a fertilização e produção de sementes.

Como em todos os procedimentos de transformação, o bombardeamento de grãos de pólen com micropartículas requer genes marcadores, mediados por

seqüências regulatórias funcionais, que permitam a identificação das células contendo o DNA recém introduzido. Seqüências regulatórias que funcionam em grãos de pólen tornam-se necessárias para averiguar a eficiência do bombardeamento e análise dos seus parâmetros. Além dos genes *lat52*, *lat56* e *lat59*, isolados de tomate (Twell *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1989 e Twell *et al.*, 1990), outros genes específicos para grãos de pólen também foram isolados de milho (Hanson *et al.*, 1989 e Hamilton *et al.*, 1989), *Brassica napus* (Albani *et al.*, 1990), *Oenothera* (Van Tunen *et al.*, 1990) e petúnia (Van Tunen *et al.*, 1989). Os promotores dos genes *lat52* e *zm13* constituem-se de “ferramentas” importantes para investigar a transformação de pólen, inclusive de outras espécies de plantas.

3.6 - Genes reguladores de transcrição como marcadores visuais

O desenvolvimento, diferenciação e a adaptação dos organismos nas condições ambientais de sobrevivência requerem a regulação de processos metabólicos, nos quais os genes envolvidos devem funcionar de forma coordenada no tempo e nos distintos tecidos da planta. O controle da expressão destes genes é realizado principalmente a nível de transcrição, através de fatores protéicos que agem identificando e atuando nas seqüências que promovem a expressão do gene.

A utilização destes reguladores da transcrição gênica, como marcadores visuais para a transformação de células, caracteriza-se por promover a expressão de forma autônoma e diferenciada, de um fenótipo que possa ser visualizado, sem que ocorra algum distúrbio de integridade do tecido ou da planta como um todo (Bowen, 1992).

3.6.1 - Genes reguladores da via biossintética da antocianina

Vários genes marcadores são conhecidos em milho dentre os quais se destacam os da via biossintética da antocianina (Coe *et al.*, 1988 e Dooner *et al.*, 1991). Estes compreendem um sistema muito interessante para o estudo da expressão gênica sob condições ambientais, de desenvolvimento ou regulação, uma vez que a produção do pigmento resulta da interação de uma série de genes. Subdividem-se em dois grupos: os genes estruturais que codificam as enzimas pertencentes a cadeia biossintética da antocianina (Mol *et al.*, 1988) e os genes reguladores, os quais a nível de transcrição, ativam a expressão dos genes estruturais (Ludwig & Wessler, 1990).

A maioria das células de milho é capaz de acumular antocianina (Styles *et al.*, 1973). Alguns dos genes da via biossintética da antocianina têm sido utilizados como marcadores em células não pigmentadas de genótipos apropriados. Experimentos puderam ser conduzidos utilizando-se estes genes em substituição ao da β -glucuronidase, eliminando por completo as interferências geradas pela atividade endógena da β -glucuronidase nos tecidos (Meyer *et al.*, 1987; Klein *et al.*, 1989; Ludwig *et al.*, 1990; Goff *et al.*, 1990; Nash *et al.*, 1990 e Menssen *et al.*, 1990). A visualização da antocianina não é destrutiva e não requer substratos exógenos para a reação enzimática, além de ser um produto de acúmulo natural totalmente intrínseco às plantas. O sistema é particularmente vantajoso, quando utilizado o bombardeamento com micropartículas para introduzir DNA nas células. A expressão transitória destes genes pode ser quantificada através da contagem das células que acumulam o pigmento, devido ao fato deste permanecer unicamente dentro do compartimento celular. Por outro lado, durante o bombardeamento sabe-se que as células que são danificadas pelas micropartículas ainda podem expressar a atividade da β -glucuronidase. Entretanto, no caso da antocianina as células não acumulariam o pigmento visto que este processo requer um vacúolo intacto e a expressão coordenada de vários genes (Bowen, 1992).

A maioria dos trabalhos envolvendo a utilização de genes marcadores da via de síntese das antocianinas tem sido realizada em milho, onde a via biossintética é regulada por duas famílias de genes, a família R e a família C (Ludwig & Wesler, 1990). Estes genes codificam proteínas regulatórias que determinam qual o tecido e em que fase do desenvolvimento da planta os genes estruturais da via biossintética devem funcionar (Paz-Ares *et al.*, 1987; Coe *et al.*, 1988; Chandler *et al.*, 1989).

Dependendo do genótipo da planta, a introdução dos genes reguladores *r* e/ou *c* em células da aleurona, embrião e calos embriogênicos de milho induz a pigmentação de células dos tecidos que originalmente não são pigmentados (Goff *et al.*, 1990; Ludwig *et al.*, 1990). Desta forma, o sistema pode ser utilizado para identificação de células, tecidos ou até mesmo plantas transgênicas por apresentarem a coloração vermelha ou púrpura.

3.6.2 - O gene *opaco-2* de milho

Alguns mutantes de endosperma de milho têm sido descritos (Motto *et al.*, 1989). O mutante *opaco-2* foi primeiramente identificado por Singleton & Jones na década de 30 (Mertz *et al.*, 1964). As sementes apresentam um aspecto farináceo e opaco, ao contrário das sementes selvagens que apresentam aspecto vítreo. O gene *opaco-2* passou inicialmente a ter grande interesse por apresentar cópia simples no genoma de milho, constituindo-se um ótimo marcador genético, empregado em programas clássicos de melhoramento. Posteriormente, tornou-se um modelo de estudo dos mecanismos de controle de expressão gênica em plantas superiores.

O gene *opaco-2* pode ser utilizado para a transformação de milho, pois sementes opaco e vítreas são facilmente identificáveis em uma espiga

segregante. Este gene codifica uma "DNA-binding protein", específica de endosperma, a qual regula a expressão dos genes que codificam as α -zeínas de 22 KDa (Mertz *et al.*, 1964; Soave *et al.*, 1976 e Burr & Burr, 1982). O fenótipo opaco-2 ocorre devido a uma redução na quantidade dessa proteína. Se introduzirmos o gene *opaco-2* selvagem em grãos de pólen de plantas mutantes (genótipo *o2o2*), através de bombardeamento com micropartículas, e fertilizarmos as plantas do mesmo genótipo, o nível da proteína opaco-2 seria elevado e o acúmulo da proteína de reserva de 22 KDa normalizado, caso ocorresse um evento de transformação estável. Por conseguinte, obteríamos uma restituição do fenótipo vítreo, facilmente identificado dentre muitas sementes opacas.

4. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi implementar, no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, “ferramentas” biológicas e moleculares para transformação de plantas, através do bombardeamento com micropartículas, que pudessem ser utilizadas para estudos básicos e aplicados.

A transformação estável de milho tem sido alcançada utilizando-se cultura de células embriogênicas, bombardeadas com genes marcadores seletivos, com posterior seleção das células transformadas e regeneração de plantas transgênicas. Procurou-se desenvolver sistemas mais simples para a identificação das células transformadas, bem como a utilização da fase esporofítica como via de transformação. Neste sentido, explorou-se grãos de pólen de milho como carreadores de DNA exógeno para incorporação no zigoto recém formado.

Este trabalho teve ainda por objetivo, desenvolver um acelerador de micropartículas, bem como explorar uma série de modelos biológicos concomitantemente com o desenvolvimento ou utilização de vetores de expressão, que permitissem a transformação de células de milho. Neste sentido foram avaliados:

- Vetores plasmidiais contendo genes marcadores

- A efetividade do acelerador de micropartículas, construído em nosso laboratório, para transformação das células vegetais
- Os parâmetros físicos e biológicos da transformação, visando a manutenção da integridade dos tecidos-alvo, após o bombardeamento
- A expressão transitória em diferentes tecidos bombardeados com micropartículas
- Transformação estável de células, utilizando-se os marcadores seletivos e visuais
- Estratégias alternativas de transformação, com relação ao tipo de tecido a ser bombardeado e vetores a serem empregados
- A efetividade dos sistemas gênicos da antocianina e opaco-2 responsáveis pela expressão de características qualitativas, que possam propiciar a identificação visual de possíveis sementes ou plantas transgênicas de milho

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 - Material vegetal

Plantas das linhagens de milho CAT100-1, CAT100-6 (Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia - UNICAMP), Hill-A e Hill-B (Armstrong *et al.*, 1991) e os híbridos F1(Hill-A x Hill-B), CAT100-6 x F1(Hill-A x Hill-B), e F352AG (Sementes Agrocere S/A) foram obtidas em condições de campo, na área experimental do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP. As plantas foram obtidas por autofecundação ou cruzamentos entre os mesmos genótipos e utilizadas como fonte de material vegetal para cultura de tecidos, endosperma imaturo, coleta de grãos de pólen e outros tecidos para teste de viabilidade de grãos de pólen bombardeados com micropartículas.

5.2 - Cultura de tecidos

No presente trabalho utilizou-se cultura de calos embriogênicos CAT100-6 x F1(Hill-A x Hill-B), estabelecida em nosso laboratório, a partir do cruzamento dos genótipos CAT100-6 com F1(Hill-A x Hill-B). Esta cultura de calos foi utilizada para ensaios de expressão transitória de GUS, avaliação de parâmetros físicos e

biológicos do bombardeamento com micropatículas, estudos de transformação gênica utilizando-se mediadores da via biossintética da antocianina.

5.2.1 - Calos embriogênicos

Espigas de milho híbrido CAT100-6 X F1(Hill-A x Hill-B) foram coletadas 12 dias após a polinização, esterilizadas superficialmente durante 10 minutos com hipoclorito de sódio 5%, acrescido de uma gota de Tween-20/l, e enxaguada várias vezes com água destilada estéril.

Embriões imaturos de milho, medindo entre 1 e 1,5 mm de comprimento, foram retirados das sementes com auxílio de bisturi e estilete de ponta arredondada. Os embriões foram inoculados em placas de Petri, contendo aproximadamente 20 ml de meio de indução de calos, com o eixo embrionário em contato com o meio de cultura. As placas de Petri foram mantidas em câmara de crescimento a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, no escuro. A formação dos calos embriogênicos ocorreu rapidamente, após uma ou duas semanas de manutenção, sendo os calos selecionados visualmente para realização de subculturas.

O meio de cultura para obtenção e manutenção de calos embriogênicos basicamente é constituído de sais N_6 (Chu,1975), acrescido de vitaminas e fitohormônio conforme descrito na Tabela 1 (Songstad *et al.*, 1992).

Tabela 1 - Composição do Meio de Cultura N6 utilizado para indução e manutenção de calos embriogênicos de milho

Componente	[mg/l]	[g/l]	[mM]	[μ M]
Inorgânicos				
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₄	463,00		3,50	
KNO ₃	2.830,00		27,98	
CaCl ₂	125,33		1,13	
MgSO ₄	90,37		0,75	
KH ₂ PO ₄	400,00		2,90	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80		0,10	
Na ₂ -EDTA	37,30		0,10	
MnSO ₄ .H ₂ O	3,33			19,70
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,50			5,20
H ₃ BO ₃	1,60			5,80
KI	0,80			4,80
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25			1,00
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025			0,10
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025			0,10
Orgânicos				
Glicina-HCl	2,00			18,00
Mio-inositol	100,00			555,00
Thiamina-HCl	5,06			15,00
Ácido nicotínico	0,92			7,50
Piridoxina-HCl	1,54			7,50
2,4D	1,65			7,50
L-prolina	690			
NO ₃ Ag	10			
MgCl ₂	650			
Caseína hidrolisada	100			
Sacarose		30,00		
Phytigel		2,40		

O pH foi corrigido para 5,8 e o meio de cultura foi autoclavado a 120°C 1Kgf/cm² durante 20 minutos e em seguida distribuído em placas de Petri estéreis, colocando-se aproximadamente 20 ml por placa.

5.2.2 - Regeneração de plantas

Calos embriogênicos obtidos do híbrido CAT100-6 X F1(Hill-A x Hill-B) foram transferidos para placas de Petri contendo aproximadamente 20 ml de meio de regeneração. As placas foram mantidas na câmara de crescimento a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, na presença de luz. O desenvolvimento dos embrióides e regeneração das plantas ocorreu após uma ou duas semanas, quando as plântulas puderam ser separadas e transferidas para frascos de vidro contendo aproximadamente 30 ml de meio de regeneração. As plântulas cresceram até 10 ou 15 cm de altura, quando foram transferidas para potes de 500 ml contendo vermiculita, para climatização ambiental em estufa recoberta com sombrite 50% e alta umidade. Após a climatização, as plântulas foram transferida para o campo experimental do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - UNICAMP, onde cresceram até o florescimento e autofecundadas ou cruzadas com plantas de mesmo genótipo, com a finalidade de obtenção de sementes.

O meio de cultura para regeneração de plantas basicamente foi constituído basicamente de sais MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de vitaminas, conforme descrito na Tabela 2.

5.2.3 - Inibição do crescimento dos calos embriogênicos pela higromicina e fosfinotricina

O método seletivo tem sido empregado para obtenção de plantas transgênicas em cultura de tecidos, sendo a concentração do agente seletivo empregado um dos aspectos mais importantes a ser considerado. No caso da

Tabela 2 - Composição do Meio de Cultura MS utilizado para regeneração de plantas de milho

Componente	[mg/l]	[g/l]	[mM]	[μ M]
Inorgânicos				
(NH ₄)NO ₃	1.650,00		13,78	
KNO ₃	1.900,00		18,79	
CaCl ₂	332,20		2,99	
MgSO ₄	180,70		3,50	
KH ₂ PO ₄	170,00		1,2	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80		0,10	
Na ₂ -EDTA	37,30		0,10	
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90			100,00
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60			30,00
H ₃ BO ₃	6,2			22,50
Ki	0,80			4,80
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25			1,00
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025			0,10
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025			0,10
Orgânicos				
Glicina-HCl	2,00			18,00
Mio-inositol	100,00			555,00
Thiamina-HCl	1,00			3,00
Ácido nicotínico	0,50			4,00
Piridoxina-HCl	0,50			2,40
Sacarose		20,00		
Phytigel		2,40		

O pH foi corrigido para 5,8 e o meio de cultura foi autoclavado a 120°C 1Kgf/cm² durante 20 minutos e em seguida distribuído em placas de Petri estéreis, colocando-se aproximadamente 20 ml por placa.

fosfotricina, as concentrações normalmente utilizadas variam entre 2 a 3 mg/l, podendo ser utilizada até 5 mg/l (Fromm *et al.*, 1990). A higromicina tem sido utilizada em concentrações que oscilam em torno de 30 mg/l, sendo efetiva para a seleção de clones tolerantes em concentrações entre 15 e 60 mg/l (Walters *et al.*, 1992).

Pequenas porções de calos medindo aproximadamente 1 mm de diâmetro, estabelecidas como unidades celulares de seleção, foram transferidas para papel Whatman nº 4 em placa de Petri, contendo meio de cultura semi-sólido com quantidades crescentes de agente seletivo. As concentrações de higromicina utilizadas nos tratamentos foram 0, 10, 20, 30, 40 e 50 mg/l de meio de cultura e as de fosfotricina foram 0, 0,5, 1, 2 e 4 mg/l de meio de cultura. Após a inoculação, os calos foram mantidos em câmara de crescimento a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante vários dias, sendo o meio de cultura substituído a cada três dias, para renovação dos nutrientes e do agente seletivo. O efeito seletivo pode ser constatado através de avaliações visuais, comparando-se os vários tratamentos com o controle no decorrer dos ciclos da cultura.

5.3 - Vetores plasmidiais

Os vetores de expressão gênica descritos a seguir foram obtidos através de doações junto à comunidade científica internacional e utilizados como fontes de genes ou promotores para a construção de outros vetores para os estudos de expressão transitória ou estável.

pBI221 (Jefferson, R.A., 1987), pAI-GUSN (Callis *et al.*, 1987) e pMF6-GUS (Mascarenhas *et al.*, 1990) - Vetores utilizados para comparar a força de expressão gênica no estudo dos fatores biológicos que afetam a

expressão transitória no bombardeamento com micropartículas (Figuras 1, 2 e 3).

PAct1-F (McElroy *et al.*, 1990) - Vetor utilizado para demonstrar a expressão transitória em calos embriogênicos e grãos de pólen de milho e para avaliar os parâmetros físicos e biológicos que afetam a expressão transitória no bombardeamento com micropartículas (Figura 4).

P35SI-C1 (Cone *et al.*, 1986) e p35SI-Bperu (Goff *et al.*, 1990) - Vetores utilizados para caracterizar genotipicamente a expressão da antocianina nos diferentes tecidos e genótipos de milho utilizados neste trabalho. Também empregou-se estes vetores como marcadores visuais para monitorar os experimentos de transformação estável de milho, através de bombardeamento de calos embriogênicos e para bombardeamento de grão de pólen de milho nos experimentos de transformação mediada por grãos de pólen de milho (Figura 5 e Figura 6).

pBI221 (5,6 Kb)

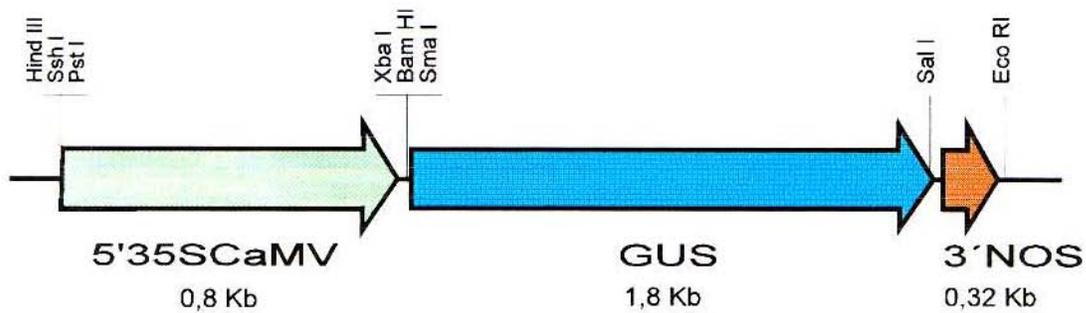


Figura 1 - Representação esquemática do vetor pBI221

O vetor construído no plasmídeo pUC19, contém a região codificadora do gene da β -glucuronidase (GUS) de *E. coli*, sob o controle do promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV) e região de poliadenilação do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* (3'NOS). O número ao lado do nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

pAIGUSN (8,2 Kb)

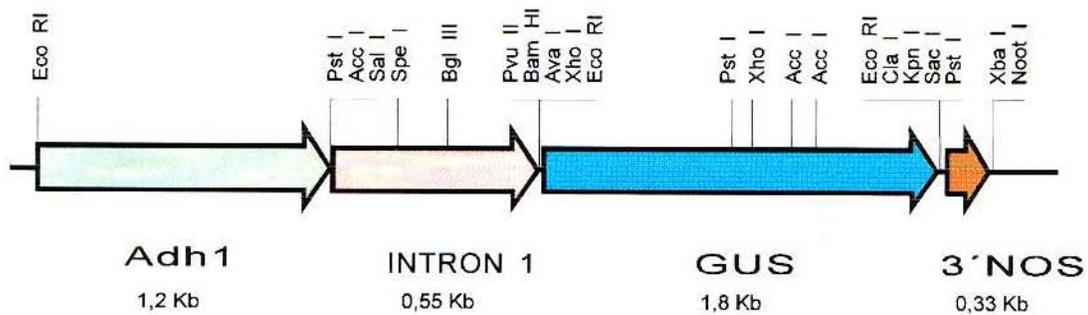


Figura 2 - Representação esquemática do vetor pAIGUSN

O vetor, construído no plasmídeo pUC8, contém a região codificadora do gene da β -glucuronidase (GUS) de *E.coli* sob o controle do promotor e do íntron I do gene da álcool desidrogenase I de milho (*Adh1*) e da região de poliadenilação do gene da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (3'NOS). O número ao lado do nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

pMF6-GUS (5,9 Kb)

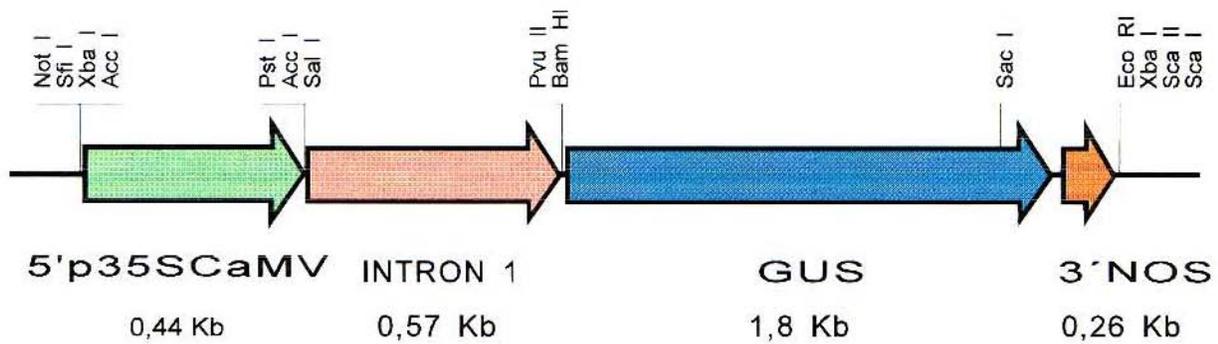


Figura 3 - Representação esquemática do vetor pMF6-GUS

O vetor, construído no plasmídeo pUC8, contém a região codificadora do gene da β -glucuronidase (GUS) de *E.coli* sob o controle do promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV) e do íntron I do gene da álcool desidrogenase I de milho e da região de poliadenilação do gene da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (3'NOS). O número ao lado do nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

pAct1-F (7,1 Kb)

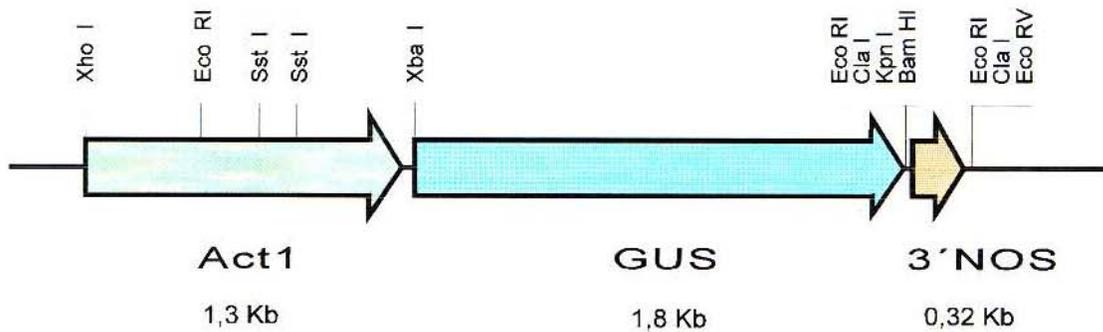


Figura 4 - Representação esquemática do vetor pAct1-F

O vetor, construído no plasmídeo pBluescript II KS(+), contém a região codificadora do gene da β -glucuronidase (GUS) sob o controle do promotor do gene da actina 1 de arroz e da região de poliadenilação do gene da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (3'NOS). O número ao lado do nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

p35SI-C1 (5,2 Kb)

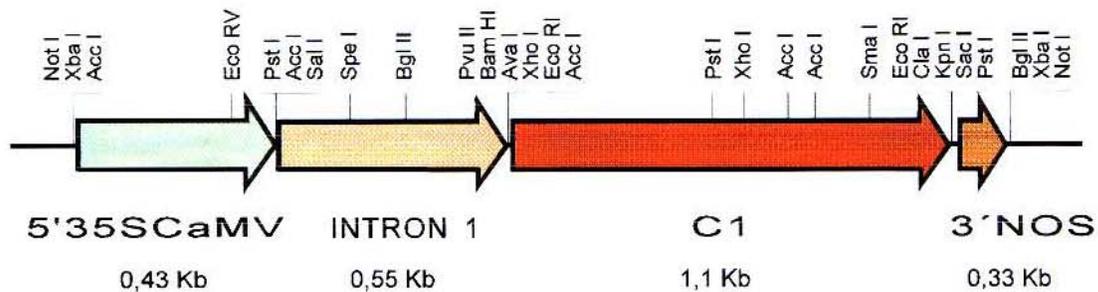


Figura 5 - Representação esquemática do vetor p35SI-C1

O vetor, construído no plasmídeo pUC8, contém a região codificadora do gene *c1*, que codifica uma proteína reguladora de transcrição da via biossintética da antocianina de milho, sob o controle do promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV) e do íntron I do gene da álcool desidrogenase I de milho e da região de poliadenilação do gene da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (3'NOS). O número ao lado do nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

p35SI-Bperu (5,9 Kb)

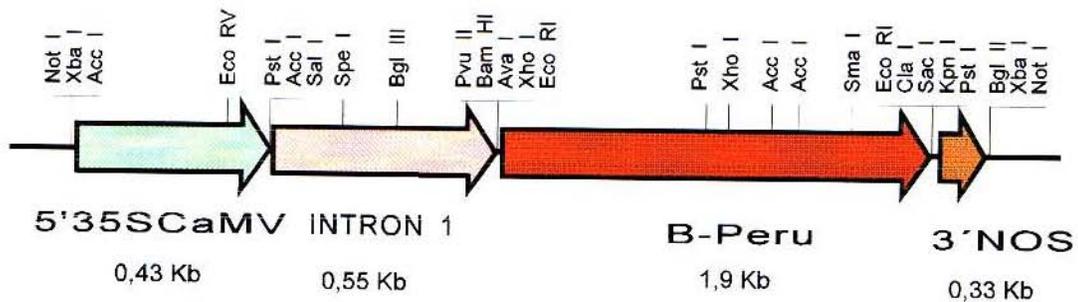


Figura 6 - Representação esquemática do vetor p35SI-Bperu

O vetor, construído no plasmídeo pUC8, contém a região codificadora do gene *b-peru*, que codifica um proteína reguladora de transcrição da via biossintética da antocianina de milho, sob o controle do promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV) e do íntron I do gene da álcool desidrogenase I de milho e da região de poliadenilação do gene da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (3'NOS). O número ao lado do nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

pZm13(-260GN) (Hamilton *et al.*, 1992) - Este vetor foi utilizado para demonstrar a transformação de grãos de pólen de milho através da expressão da atividade histoquímica de GUS e para averiguar a viabilidade *in vitro* e *in vivo* após o bombardeamento (Figura 7).

pLAT52-7 (Twell *et al.*, 1989) - Este vetor foi utilizado para estudar a expressão transitória de GUS em grãos de pólen de milho através de bombardeamento com micropartículas (Figura 8).

pR5'-GUS (Casacuberta *et al.*, 1991) - Este vetor foi utilizado para demonstrar a efetividade *in vitro* do promotor R5' através da expressão da gene da β -glucuronidase em aleurona de sementes imaturas de milho (Figura 9).

p α Z4-GUS (Yunes *et al.*, 1994) - Este vetor foi utilizado para os experimentos de transativação do gene da α -zeína de 22 KDa em sementes imaturas de milho (Figura 10).

5.4 - Purificação de DNA plasmidial

5.4.1 - Transformação de E.coli DH5 α

Linhagem de E.coli DH5 α genótipo relevante: F⁻ supE44 Δ (lacZYA - argF)U169 (Φ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 (Hanahan, 1983). Esta linhagem, defectiva em recombinação (recA1), foi utilizada na preparação de células competentes para os experimentos de transformação, realizados nas construções dos vetores plasmidiais. A deleção

pZm13(-260GN) (5,7 Kb)

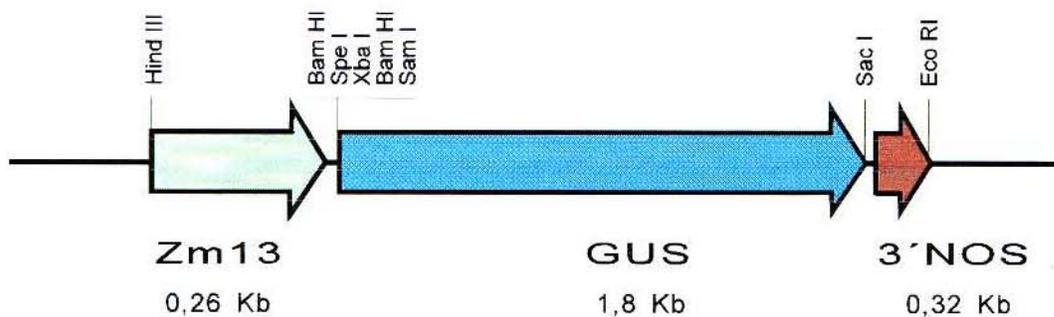


Figura 7 - Representação esquemática do vetor pZM13(-260GN)

O vetor, construído no plasmídeo pBluescript SK(-) (Stratagene), contém a região codificadora do gene da β -glucuronidase (GUS) de *E. coli* sob o controle do promotor do gene ZM13, que apresenta expressão pólen-específica, e da região de poliadenilação do gene da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (3'NOS). O número ao lado do nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

pLAT52-7 (5,7 Kb)

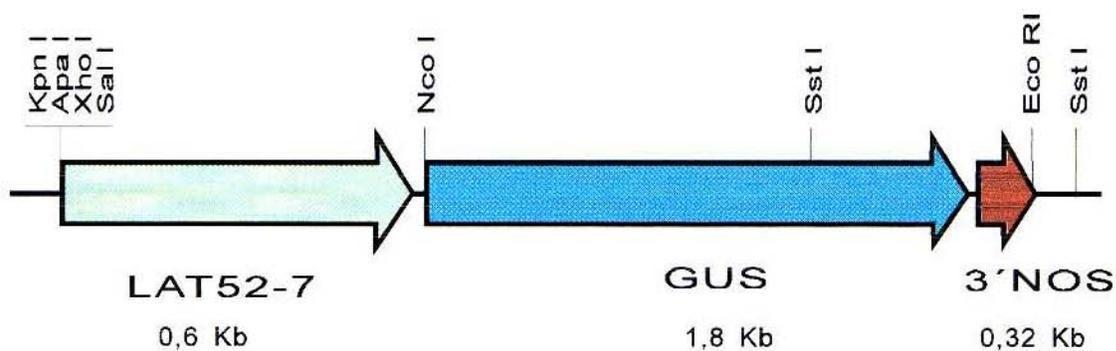


Figura 8 - Representação esquemática do vetor pLAT52-7

O vetor, construído no plasmídeo pBluescript KS(+), contém a região codificadora do gene da β -glucuronidase (GUS) de *E. coli* sob o controle do promotor do gene LAT52-7, que codifica uma proteína antera-específica, e da região de poliadenilação do gene da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (3'NOS). O número ao lado do nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

pR5'-GUS (7,8 Kb)

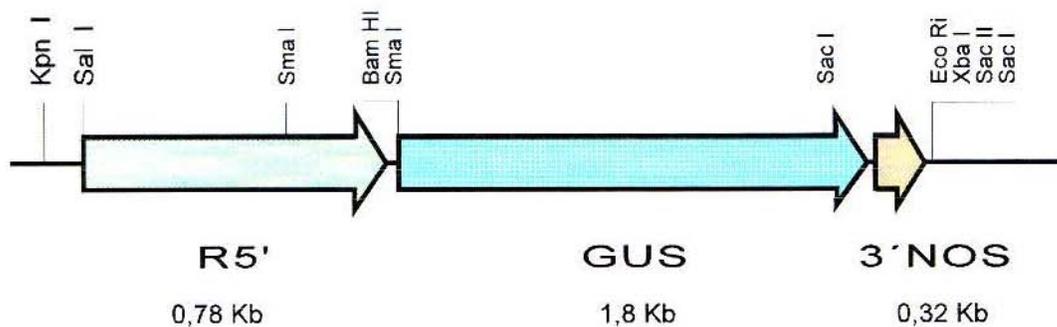


Figura 9 - Representação esquemática do vetor pR5'-GUS

O vetor, construído no plasmídeo pBluescript KS(+), contém a região codificadora do gene da β -glucuronidase (GUS) de *E. coli* sob o controle do promotor do gene R5', que apresenta um padrão de expressão específico da camada de aleurona de milho, e da região de poliadenilação do gene da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (3'NOS). O número ao lado do nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

p α Z4-GUS (5,9 Kb)

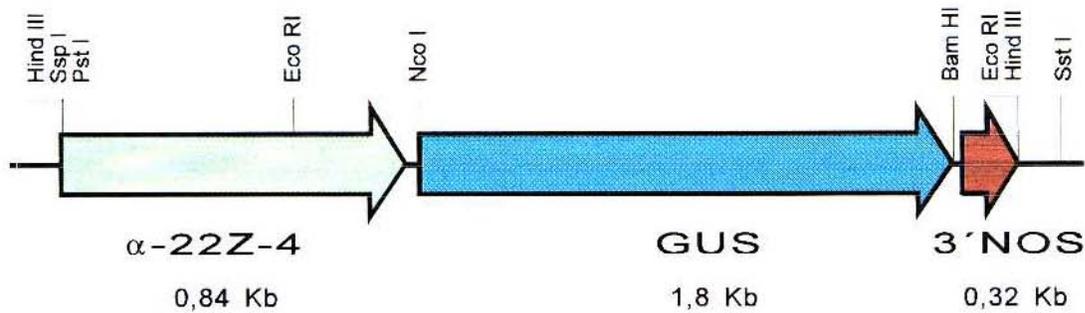


Figura 10 - Representação esquemática do vetor p α Z4-GUS

O vetor, construído no plasmídeo pBluescript KS(+), contém a região codificadora do gene da β -glucuronidase (GUS) de *E. coli* sob o controle do promotor do gene da α -zeína de 22 KDa de milho e da região de poliadenilação do gene da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (3'NOS). O número ao lado do nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

dos genes do operon lac (Δ lacU169) e a presença do fragmento lacZ Δ M15 no profago Φ 80 permite a utilização de α -complementação na seleção de recombinantes. A ausência de superprodução do repressor do operon lac (lac I^q) possibilita a realização do teste de complementação na ausência de IPTG (Hanahan, 1983).

5.4.1.1 - Preparação de células competentes:

Procedimento:

- 01 - Inocular 10 ml de meio de cultura LB pH 7,5 (10 g de bacto-triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl com uma colônia isolada em placa contendo meio sólido
- 02 - Incubar a 37°C durante a noite, sob agitação de 250 rpm
- 03 - Inocular 100 ml de meio de cultura LB com 1 ml do pré-inóculo obtido durante a noite
- 04 - Incubar a 37°C sob agitação até atingir densidade óptica de aproximadamente 5×10^7 células/ml (DO550 = 0,50)
- 05 - Transferir a cultura para dois tubos de polietileno de 50 ml estéreis, resfriar em gelo e centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C
- 06 - Dispensar o sobrenadante e ressuspender as células em 33 ml de solução RF1 pH 5,8 (Acetato de potássio 30 mM; RbCl 100 mM; MnCl₂ 50 mM e Glicerol 15% m/v)
- 07 - Transferir as suspensões para um único tubo Falcon e incubar no gelo durante 15 minutos
- 08 - Centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C
- 09 - Dispensar o sobrenadante e ressuspender as células 8 ml de solução RF2 pH 6,8 (MOPS (ácido 3-(N-morpholino)propano-sulfônico) 10 mM; RbCl 10 mM; CaCl₂ 75 mM e Glicerol 15 % m/v)
- 10 - Incubar a suspensão em gelo durante 15 minutos
- 11 - Distribuir alíquotas de 100 μ l em tubos de polietileno de 2 ml
- 12 - Congelar as alíquotas em N₂ líquido e armazenar a -70°C

5.4.1.2 - Transformação das células competentes:

Procedimento:

- 01 - Remover os tubos de polietileno de 2 ml do freezer -70°C contendo as células competentes e descongelar em gelo
- 02 - Adicionar a 5 -10 µl de DNA plasmidial (10-100 ng) e incubar em gelo durante 30 minutos
- 03 - Incubar a 42°C durante 90 segundos e retornar ao gelo imediatamente
- 04 - Adicionar 800 µl de meio de cultura LB contendo 0,2 M de glicose
- 05 - Incubar a 37°C durante 30 minutos
- 06 - Inocular 100 µl em meio de cultura LB sólido contendo o antibiótico apropriado e espalhar uniformemente com auxílio de alça de Drigalski-Conradi. Para construções plasmidiais novas espalhar 40 µl de X-GAL (5-bromo-4-clor-3-indolil-β-D-galactosídio) , sobre o meio de cultura e deixar secar a 37°C durante 30 minutos, antes do inóculo. As colônias transformadas normalmente com a construção prevista não apresentam coloração azul neste meio
- 07 - Incubar a 37°C durante a noite

Nota:

Solução de X-GAL 2%:

Em uma capela, dissolver o conteúdo de um frasco de 100 mg de X-GAL em 5 ml de dimetil formamida. Distribuir alíquotas de 0,5 ml em tubos de polietileno 2 ml e armazenar a -20°C.

Os plasmídeos foram amplificados em *E. coli* DH5α, isolados por lise alcalina e purificados em gradiente de centrifugação de cloreto de cézio e brometo de etídeo (Sambrook *et al.*, 1989).

5.4.2 - Minipreparação de DNA plasmidial

Para a minipreparação de DNA plasmidial foi utilizada a técnica descrita por Zhon *et al.*, (1990).

Procedimento:

- 01 - Inocular 2,5 ml de meio de cultura líquido LB contendo 60 mg de ampicilina/l e incubar sob agitação a 37°C durante a noite, sob agitação de 300 rpm
- 02 - Transferir 1,5 ml de cultura para um tubo de polietileno de 2 ml, centrifugar a 10.000 rpm durante 10 segundos
- 03 - Dispensar o sobrenadante deixando aproximadamente 100 µl de meio de cultura LB
- 04 - Agitar durante 5 segundos
- 05 - Adicionar 300 µl de TENS (NaOH 80 mM; SDS 0,4%; Tris-HCl 1 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0)
- 06 - Agitar durante 5 segundos
- 07 - Adicionar 150 µl de acetato de sódio 3 M pH 5,2
- 08 - Agitar durante 5 segundos
- 09 - Centrifugar a 10.000 rpm durante 2 minutos
- 10 - Transferir o sobrenadante para outro tubo de polietileno de 2 ml por inversão
- 11 - Adicionar 1 ml de etanol 100% a -20°C
- 12 - Centrifugar a 10.000 rpm durante 2 minutos
- 13 - Dispensar o sobrenadante e adicionar 1 ml de etanol 70% a -20°C
- 14 - Centrifugar a 10.000 rpm durante 2 minutos
- 15 - Dispensar o sobrenadante e liofilizar o sedimento durante 3 minutos
- 16 - Ressuspender o DNA adicionando-se 50 µl de TE-RNase (40 µg/ml)
- 17 - Quantificar o DNA em gel de agarose 0,8% usando 3 µl de DNA. Cem e 200 ng de DNA plasmidial, purificado em gradiente de cloreto de cério, devem ser utilizados como padrão. O rendimento esperado deve ser de aproximadamente 100 ng/ul

5.4.3 - Preparação em larga escala de DNA plasmidial

Para a preparação em larga escala de DNA plasmidial foi utilizado a técnica de lise alcalina descrita em Sambrook *et al.* (1989).

A etapa de amplificação descrita no método original foi dispensada para os plasmídeos contendo origem de replicação derivada de Col E1, como no caso dos plasmídeo originários da família pUC (pBluescript KS+/-). A origem de replicação

Col E1 apresenta um controle mais relaxado de replicação plasmidial, resultando em um alto número de cópias do plasmídeo por célula.

Procedimento:

- 01 - Riscar uma placa de Petri contendo meio de cultura sólido LB acrescido de ampicilina/l (LB/Amp) e inocular a 37°C durante a noite
- 02 - Inocular 25 ml de meio de cultura líquido LB/Amp a partir de apenas uma colônia de bactéria e incubar a 37°C sob agitação de 300 rpm durante o dia
- 03 - Transferir este pré-inóculo para 500 ml de meio líquido LB/Amp e incubar sob agitação de 300 rpm a 37°C durante a noite
- 04 - Centrifugar o cultivo a 7.000 rpm utilizando-se os tubos de polietileno de 200 ml do rotor Beckman JA-14 por 10 minutos a 4°C
- 05 - Dispensar o sobrenadante e ressuspender o sedimento obtido a partir de 500 ml de cultivo em 4 ml de solução I (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; Glicose 50 mM e EDTA 10 mM). Transferir a suspensão para tubo de polietileno de 40 ml do rotor Beckman JA-20
- 06 - Adicionar 1 ml de solução de lisozima (25mg/ml de solução I) recém preparada. Misturar bem e manter à temperatura ambiente durante 10 minutos
- 07 - Adicionar 10 ml de solução II (NaOH 2N e SDS 1%) recém preparada. Misturar bem e manter em gelo durante 10 minutos

- 08 - Adicionar a cada tubo 7,5 ml de solução gelada de acetato de sódio 3M (60 ml de acetato de potássio 5 M; 11,5 ml de ácido acético glacial e 28,5 ml de água destilada). Misturar bem por inversão até o desaparecimento das diferentes fases líquidas. Manter em gelo durante 10 minutos. Um precipitado floculoso se forma. O precipitado é constituído de DNA cromossômico, RNA de alto peso molecular, e complexos de potássio/SDS/proteína/complexos de membrana
- 09 - Centrifugar o lisado a 12.000 rpm durante 10 minutos
- 10 - Filtrar o sobrenadante em 4 camadas de gaze em tubo de 50 ml polipropileno
- 11 - Adicionar 0,6 volume de isopropanol. Misturar bem e manter a temperatura ambiente por 10 minutos
- 12 - Centrifugar a 3.00 rpm durante 20 minutos à temperatura ambiente
- 13 - Lavar o sedimento com 4 ml de etanol 70%. Liofilizar o sedimento
- 14 - Solubilizar o sedimento em 4 ml de TE
- 15 - Adicionar 4,5 g de CsCl. Misturar até a completa dissolução. Adicionar 0,4 ml de solução de brometo de etídeo (10 mg/ml). A densidade final da solução deve ser de 1,55 g/ml, correspondente a um índice de refração de 1,3890
- 16 - Centrifugar a solução a 3.000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente em rotor JA-20. Transferir a solução, livre dos resíduos, para tubos do rotor VTi80 Beckman
- 17 - Centrifugar os gradientes a 60.00 rpm durante 20 horas
- 18 - Com ajuda de seringa munida de agulha 30x12, coletar a banda inferior de DNA, que corresponde ao plasmídeo covalentemente circularizado
- 19 - Transferir a solução de DNA para tubo de 15 ml e adicionar duas vezes o volume de butanol-1 saturado em água
- 20 - Mistura as fases
- 21 - Deixar repousar brevemente e descartar a fase superior
- 22 - Repetir as etapas 19, 20 e 21 várias vezes até que todo o brometo de etídeo seja totalmente removido
- 23 - Remover o CsCl através de diálise em 2.000 ml de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0) durante 24 a 48 horas efetuando-se 3 a 4 trocas do tampão
- 24 - Transferir a solução contendo DNA para tubo de 15 ml e adicionar 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol gelado
- 25 - Deixar a -20°C durante 2 horas e centrifugar a 3.00 rpm a 4°C durante 30 minutos
- 26 - Lavar o sedimento em 5 ml de etanol 70% gelado
- 27 - Centrifugar durante 5 minutos e liofilizar

28 - Ressuspender o sedimento em 1 ml de água estéril

O DNA purificado foi quantificado medindo-se a absorvância a 260 nm pela equação:

$$C = dA \times d \times 50 \text{ ug de DNA.ml}^{-1}$$

dA = absorvância a 260 nm

d = fator de diluição

50 ug de DNA.ml⁻¹ = 1 unidade de densidade óptica

5.4.4 - Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose

O método do papel DEAE-celulose, descrito por Dretzen *et al.* (1981) e Danner, (1982) tem sido o mais empregado para purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose. O papel DEAE-celulose (DE-81 Whatman) em condições de baixa força iônica apresenta uma elevada afinidade pelo DNA que quando ligado pode ser recuperado lavando-se o papel com tampão de elevada força iônica. Este método tem sido empregado na purificação de DNA linear de tamanhos compreendidos entre 100 e 5000 pb. Para DNA super-helicoidal, DNA de cadeia simples ou DNA de dupla cadeia de grande tamanho, os rendimentos apresentam-se pequenos.

Procedimento:

- 01 - Separar os fragmentos de DNA em um gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo para visualizar as bandas de DNA com luz UV
- 02 - Colocar o gel sobre um transiluminador UV de onda longa (302 nm) para visualizar os fragmentos de DNA. Com auxílio de um bisturí fazer uma incisão em frente a banda a ser purificada

- 03 - Com auxílio de uma pinça, abrir a incisão e colocar um retângulo de papel DEAE (Whatman DE-81) na mesma abertura da banda. Pressionar o gel contra o papel para evitar a formação de bolhas
- 04 - Prosseguir a eletroforese
- 05 - Comprovar se todo o DNA aderiu ao papel DEAE visualizando-o com luz UV.
- 06 - Retirar o papel DEAE contendo o DNA e colocá-lo em um tubo de polietileno de 2 ml.
- 07 - Adicionar 800 µl de tampão de eluição (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; EDTA 2 mM e NaCl 1,5 M) e incubar a 68°C durante 30 minutos.
- 08 - Retirar o papel DEAE da solução e centrifugar a 10.000 rpm durante 2 minutos
- 09 - Transferir o sobrenadante para outro tubo de polietileno de 2 ml deixando aproximadamente 10 µl de descarte
- 10 - Adicionar 8 µl de MgCl₂ 1M, no caso de insertos pequenos, e adicionar 1 ml de etanol
- 11 - Incubar a -20°C durante a noite ou a -70°C durante 1 hora
- 12 - Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos
- 13 - Desprezar o sobrenadante e adicionar 1 ml de etanol 70%
- 14 - Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos.
- 15 - Desprezar o sobrenadante e secar o sedimento, liofilizando-o durante aproximadamente 3 minutos
- 14 - Ressuspender o DNA em 20 µl de água estéril
- 15 - Quantificar o DNA em gel de agarose 1% usando 8 µl de DNA. Cem e 200 ng de DNA plasmidial, purificado em gradiente de cloreto de césio, devem ser utilizados como padrão

5.5 - Minipreparação de DNA genômico de folha

Para a minipreparação de DNA genômico de folha foi utilizada a metodologia descrita em Rivin *et al.*, 1982.

Procedimento:

- 01 - Macerar, sob N₂ líquido, aproximadamente 1g de folha em gral e pistilo
- 02 - Transferir 300 mg de macerado para tubo de polietileno de 2 ml
- 03 - Adicionar 800 µl de solução CTAB (Tris-HCl 0,7 M pH 7,5; NaCl 0,7 M; EDTA 0,01M pH 8,0; β-mercaptoetanol 0,1M; CTAB 1%) recém preparada
- 04 - Incubar a 60°C durante 60 minutos. Agitar lentamente
- 05 - Deixar esfriar a temperatura ambiente
- 06 - Adicionar 800 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1)
- 07 - Agitar durante 3 minutos
- 08 - Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos
- 09 - Transferir a fase aquosa para outro tubo de polietileno de 2 ml
- 10 - Adicionar 600 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1)
- 11 - Agitar durante 3 minutos
- 12 - Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos
- 13 - Transferir a fase aquosa para outro tubo de polietileno de 2 ml
- 14 - Adicionar 0,6 vol. de álcool isopropílico a 4°C
- 15 - Precipitar o DNA
- 16 - Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos
- 17 - Desprezar o sobrenadante
- 18 - Adicionar 1 ml de etanol 70% a -20°C
- 19 - Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos
- 20 - Desprezar o sobrenadante
- 21 - Adicionar 1 ml de etanol 70% a -20°C
- 22 - Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos
- 23 - Desprezar o sobrenadante
- 24 - Liofilizar durante 3 minutos
- 25 - Ressuspender o DNA em 100 µl de TE-RNase (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0; RNase 2,5 µg/ml)

5.6 - Bombardeamento com micropartículas

A precipitação do DNA plasmidial, sobre as micropartículas de ouro, foi essencialmente realizada conforme descrito por Sanford *et al.*, 1993.

5.6.1 - Preparação de micropartículas

Procedimento:

01 - Pesar 60 mg de partículas de ouro em um tubo de polietileno de 2 ml siliconizado

02 - Adicionar 1 ml de etanol 70%

03 - Agitar

04 - Centrifugar as partículas de ouro durante 1 minuto

05 - Eliminar o sobrenadante

06 - Adicionar 1 ml de água destilada estéril, agitar para lavar as micropartículas

07 - Centrifugar e repetir a lavagem por 3 vezes

08 - Ressuspender as micropartículas em 1 ml de glicerol 50%

Notas:

Micropartículas de ouro de 1 a 3 μm (Alpha[®] Johnson Matthey)

Cuidado para não eliminar muitas partículas durante as lavagens.

Após a preparação, conservar as partículas à temperatura ambiente ou 4°C por uma semana no máximo.

5.6.2 - Precipitação de DNA com micropartículas

Procedimento:

01 - Em um tubo de polietileno de 2 ml estéril e siliconizado, sob agitação, adicionar:

50 μl de micropartículas de ouro.

5 μl de DNA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

50 μl de CaCl_2 2,5M

20 μl de espermidina 0,1M (Free-base)

- 02 - Agitar durante 5 minutos
- 03 - Centrifugar durante 15 segundos a 6.000 rpm
- 04 - Eliminar o sobrenadante com pipeta de 200 μ l
- 05 - Lavar o sedimento com 140 μ l de etanol 70%
- 06 - Centrifugar
- 07 - Eliminar o sobrenadante com pipeta de 200 μ l
- 08 - Lavar o sedimento com 140 μ l de etanol absoluto
- 09 - Centrifugar
- 10 - Eliminar o sobrenadante com pipeta de 200 μ l
- 11 - Ressuspender o sedimento em 50 μ l de etanol absoluto
- 12 - Sonicar em banho com água 3 vezes durante 3 segundos
- 13 - Dispersar 5 μ l das micropartículas sobre as telas carreadoras
- 14 - Deixar secar o etanol sob vácuo e transferir as telas para um dessecador

Notas:

Todas as soluções devem ser esterilizadas.

Preparar a solução de espermidina, dividir em alíquotas de aproximadamente 500 μ l em tubos de polietileno de 2 ml e conservar a -70°C por um período máximo de 2 meses. Não voltar a congelar uma alíquota já utilizada.

5.6.3 - Bombardeamento de tecidos

O bombardeamento dos vários tecidos utilizados neste trabalho foi realizado com um acelerador de micropartículas que utiliza o gás hélio para acelerar as micropartículas (Sanford *et al.*, 1987 e 1991). A câmara de disparo e componentes internos do acelerador de micropartículas foram esterilizados pulverizando-se álcool 70% e deixando secar em condições estéreis. As telas de aço inox (malha 50) foram esterilizadas através de autoclavagem a 121°C e 1 kgf/cm² durante 20 minutos. Os disparos foram realizados a 800, 1.200 ou 1.600 psi variando-se as distâncias entre o tecido alvo e a ponta do canhão; nível 1, nível 2 ou nível 3. Para efetuar-se os disparos, os tecidos foram distribuídos uniformemente em placas de Petri contendo meio de cultura. Cada placa foi

transferida para a câmara de disparo e os tecidos bombardeados conforme tratamento preestabelecido, sendo cada placa utilizada como réplica dentro de cada experimento idealizado. Após o bombardeio, as placas de Petri foram mantidas em câmara de crescimento durante 48 horas, para dar prosseguimento a avaliação de atividade de GUS nos experimentos de expressão transitória ou manutenção da cultura para os experimentos de transformação estável.

Para cada disparo foi realizado vácuo de 710 mmHg na câmara de disparo e o gás hélio liberado no interior do canhão até que o disco de ruptura se rompesse. Imediatamente o vácuo foi desfeito permitindo a entrada de ar no interior da câmara de disparo.

5.7 - Ensaio histoquímico de GUS

A atividade da β -glucuronidase foi analisada histoquimicamente de acordo com a metodologia descrita por Jefferson (1987) e Jefferson *et al.* (1987). Após 48 horas do bombardeamento com micropartículas co-precipitadas com DNA contendo o gene da β -glucuroninadase, as amostras de tecidos foram incubadas com tampão de revelação X-GLUC (Tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0; DTT 1mM; Na₂EDTA 10 mM; Triton X-100 0,1%; K₃Fe(CN)₆ 5 mM; K₄Fe(CM)₆.3H₂O 5 mM e X-GLUC 1 mM) a 37°C durante 24 horas. Após a revelação, os tecidos foram conservados em glicerol 50% a 4°C. Em alguns experimentos foi adicionado 20% de metanol ao tampão X-GLUC para inibir a degradação endógena de X-GLUC nos tecidos analisados (Kosugi *et al.*, 1990 e Li *et al.*, 1993). Os pontos azuis, visualizados nos tecidos decorrentes da atividade de GUS estão diretamente correlacionados com as células que receberam uma ou mais micropartículas e que expressaram a atividade da enzima (Morrish *et al.*, 1992). As contagens dos pontos azuis foram realizadas com auxílio de um estereoscópio.

5.8 - Análise de “Southern blot”

A análise molecular das plantas supostamente transformadas foi realizada através de “Southern blot”, a partir de DNA extraído das folhas das plantas. As folhas das plantas foram congeladas e estocadas a -70°C e o DNA foi extraído empregando-se a metodologia de minipreparação de DNA genômico. A concentração de DNA foi estimada em gel de agarose. Aproximadamente $15\ \mu\text{g}$ de DNA foram digeridos com a enzima de restrição apropriada para cada análise. Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 0,8% através de eletroforese a 5V/cm, utilizando-se “DNA 1 Kb Ladder” (Gibco BRL) como marcador de peso molecular (Sambrook *et al.*, 1989).

5.8.1 - Transferência do DNA para membrana de Nylon Hybond-N - Amersham

6 Procedimento:

- 01 - Depurar parcialmente o DNA transferindo-se o gel para solução de HCl 0,25 N durante 10 minutos.
- 02 - Lavar o gel com água destilada
- 03 - Desnaturar o DNA em solução de NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 N durante 15 minutos
- 04 - Substituir a solução de desnaturação e deixar durante 15 minutos
- 05 - Lavar o gel com água destilada
- 06 - Neutralizar o DNA em solução de NaCl 1,5 M, Tris-HCl 1,0 M, pH 7,4 durante 15 minutos
- 07 - Substituir a solução de neutralização e deixar durante 15 minutos
- 08 - Lavar o gel em água destilada
- 09 - Transferir o DNA para membrana de “Nylon Hybond-N” por capilaridade durante 16 horas, utilizando-se solução SSC 10x pH 7,4 (NaCl 1,5 M e Citrato trissódico.2H₂O 0,15 M)

- 10 - Remover a membrana e lavá-la em solução SSC 2x (NaCl 0,3 M e Citrato trissódico.2H₂O 0,03 M) e incubar a 80°C durante 2 horas

5.8.2 - Marcação de sonda radioativa

Neste trabalho utilizou-se a técnica de “Random Primer”, para preparar cópias marcadas de DNA. Seguiu-se o procedimento descrito no manual do Kit “Megaprime DNA Labeling System” RPN 160415 da Amersham. O protocolo baseia-se na utilização de 17 pmol de (α -³²P)dCTP de atividade específica de 3.000 Ci/mol.

Procedimento:

- 01 - Em um tubo de polietileno de 2 ml adicionar:

- 11 μ l de água destilada

- 10 μ l de sonda (25 ng de DNA)

- 5 μ l de “Primer” (Hexanucleotídeos de seqüências variadas em uma solução aquosa com BSA livre de nucleases)

- 02 - Desnaturar o DNA durante 5 minutos a 100°C

- 03 - Manter em temperatura ambiente e acrescentar:

- 4 μ l de solução dTTP (100 μ M)

- 4 μ l de solução dGTP (100 μ M)

- 4 μ l de solução dATP (100 μ M)

- 5 μ l de Tampão de Reação

- 2 μ l de Klenow DNA polimerase (5U/ μ l)

- 5 μ l de solução (α -³²P)dCTP

- 04 - Incubar a reação durante 1 hora a 37°C

- 05 - Adicionar 5 μ l de EDTA 0,2 M pH 8,0

- 06 - Remover os nucleotídeos não incorporados através de coluna de 1 ml de sephadex G50 equilibrada com tampão STE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM e NaCl 100 mM)

- 07 - Quantificar a incorporação de radioatividade em 1 μ l da solução radioativa em papel Whatman DE-81 (1 cm²)

- 08 - Efetuar a leitura em Cherenkov (leitura de P32 no canal de trítio) e comparar as soluções antes e depois de passada pela coluna de sephadex G50. Para utilização da sonda a reação de marcação deve apresentar no mínimo 50% de incorporação

5.8.3 - Hibridização

Procedimento:

- 01 - Reidratar a membrana em solução SSC 2x
- 02 - Transferir para um tubo de hibridização e préhibridizar em solução 5x SSC; 10x Solução de Denhardt's; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 1% de SDS; 50% de formamida e 100 µg/ml de esperma de salmão, a 42°C durante a noite
- 03 - Descartar a solução de préhibridização e acrescentar a sonda radioativa previamente desnaturada a 100°C durante 5 minutos
- 04 - Incubar a 42°C durante a noite
- 05 - Descartar a solução de hibridização e lavar a membrana por duas vezes durante 15 minutos em solução SSC 2x acrescida de 0,1% de SDS
- 05 - Repetir a lavagem em solução 0,1x SSC acrescida de 0,1% de SDS
- 06 - Acondicionar a membrana em filme de PVC
- 07 - Expor a membrana a filme de Raio X em cassete radiográfico munido de intensificador. Colocar a -70°C
- 08 - Revelar o filme de Raio-X

6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 - Construção do acelerador de micropartículas

Um acelerador de micropartículas foi construído durante a realização deste trabalho. O projeto foi desenvolvido em nosso laboratório e executado pela INCIBRAS - Instrumentação Científica Brasileira Comércio e Indústria Ltda. O protótipo utiliza o gás hélio para acelerar as micropartículas (Figura 11). Basicamente ele é constituído de um canhão e uma câmara de disparo na qual fica depositado o tecido alvo. O canhão de disparo contém um reservatório que é preenchido com gás hélio. A ponta do canhão é previamente vedada com membrana de acetato de celulose (Disco de Ruptura), a qual rompe-se a uma dada pressão interna, liberando um forte pulso de gás hélio para o interior da câmara. A câmara de disparo constitui-se de um ambiente fechado para realização de vácuo (710 mmHg), que minimiza a violência da expansão do gás hélio e retém a propagação da forte onda sonora gerada durante o disparo. Por outro lado, o vácuo tem por finalidade diminuir o atrito do ar com as micropartículas, evitando a redução drástica da velocidade das mesmas. O mecanismo de aceleração das micropartículas neste aparelho é versátil podendo ser utilizado o sistema Kapton (Ye G-N. *et al.*, 1990 e Sanford *et al.*, 1991) ou o sistema direto de disparo.

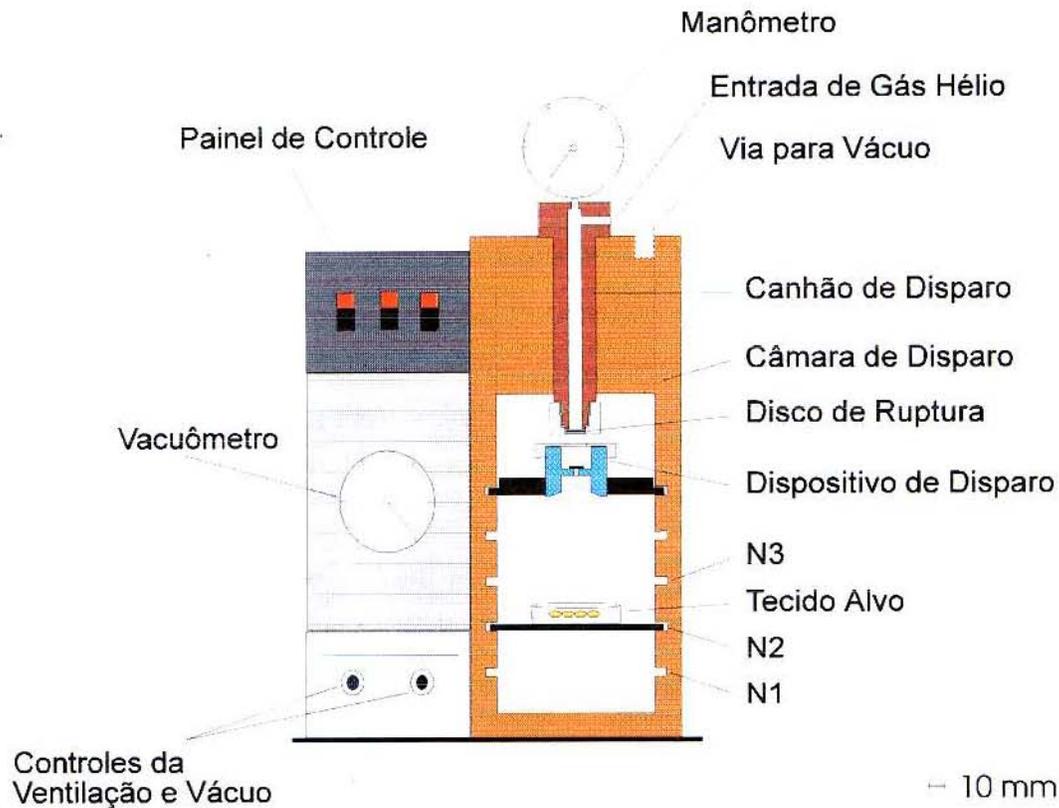


Figura 11 - Diagrama do acelerador de micropartículas

Acelerador de micropartículas construído neste trabalho. O equipamento possui um painel de controle para realização de vácuo de 710 mm Hg na câmara de disparo e injeção de gás hélio no canhão de disparo. O gás hélio é liberado progressivamente no interior do canhão que é vedado previamente com uma membrana de acetato de celulose (Disco de Ruptura). As micropartículas são aceleradas pelo pulso de gás hélio quando o disco de ruptura se rompe devido a alta pressão do gás. A pressão de disparo depende do número de discos de ruptura, podendo variar entre 400 e 2.000 psi. O tecido pode ser posicionado dentro da câmara de disparo a 12 cm (N1), 9 cm (N2) ou 6 cm (N3) em relação ao dispositivo de disparo.

Na versão inicial, o sistema kapton que atualmente é comercializado pela Bio-Rad, possui um dispositivo de disparo das micropartículas. Este dispositivo situa-se dentro da câmara de disparo, logo abaixo da ponta do canhão onde é gerado o choque de gás hélio. A membrana Kapton, contendo as micropartículas, é presa na parte superior do dispositivo de disparo que é acelerada pelo gás, sendo projetada livremente para baixo até ser retida por uma tela de aço inox (malha 16). Esta tela fica posicionada na base do dispositivo de disparo alinhada com um orifício de 10 mm de diâmetro. As micropartículas, que são aceleradas juntamente com a membrana kapton, passam através da tela e são projetadas contra o tecido colocado logo abaixo (Figura 12-A).

Algumas inovações foram realizadas no acelerador de micropartículas visando torná-lo mais prático e diminuir a variabilidade dos disparos durante os experimentos. Eliminando-se a membrana Kapton (“flyng disk”) as micropartículas passaram a ser aceleradas diretamente pelo choque de gás hélio. Assim, na parte inferior do dispositivo de disparo há um orifício de 3 mm de diâmetro onde é colocada uma tela de aço inox (malha 50). Previamente, as micropartículas são dispersas nesta tela em uma área também com 3 mm de diâmetro e ficam alinhadas com o orifício do dispositivo de disparo. Assim, o choque de gás hélio acelera as micropartículas que passam pela tela e são projetadas contra o tecido logo abaixo (Figura 12-B).

A velocidade das micropartículas pode ser alterada dependendo do número de discos de ruptura que são utilizados para cada disparo. Assim, cada disco de ruptura suporta 400 psi permitindo pressões de disparo de 400, 800, 1.200, 1.600 psi e 2.000 psi. Quanto maior a pressão, maior será a velocidade. A dispersão das micropartículas é proporcionada principalmente

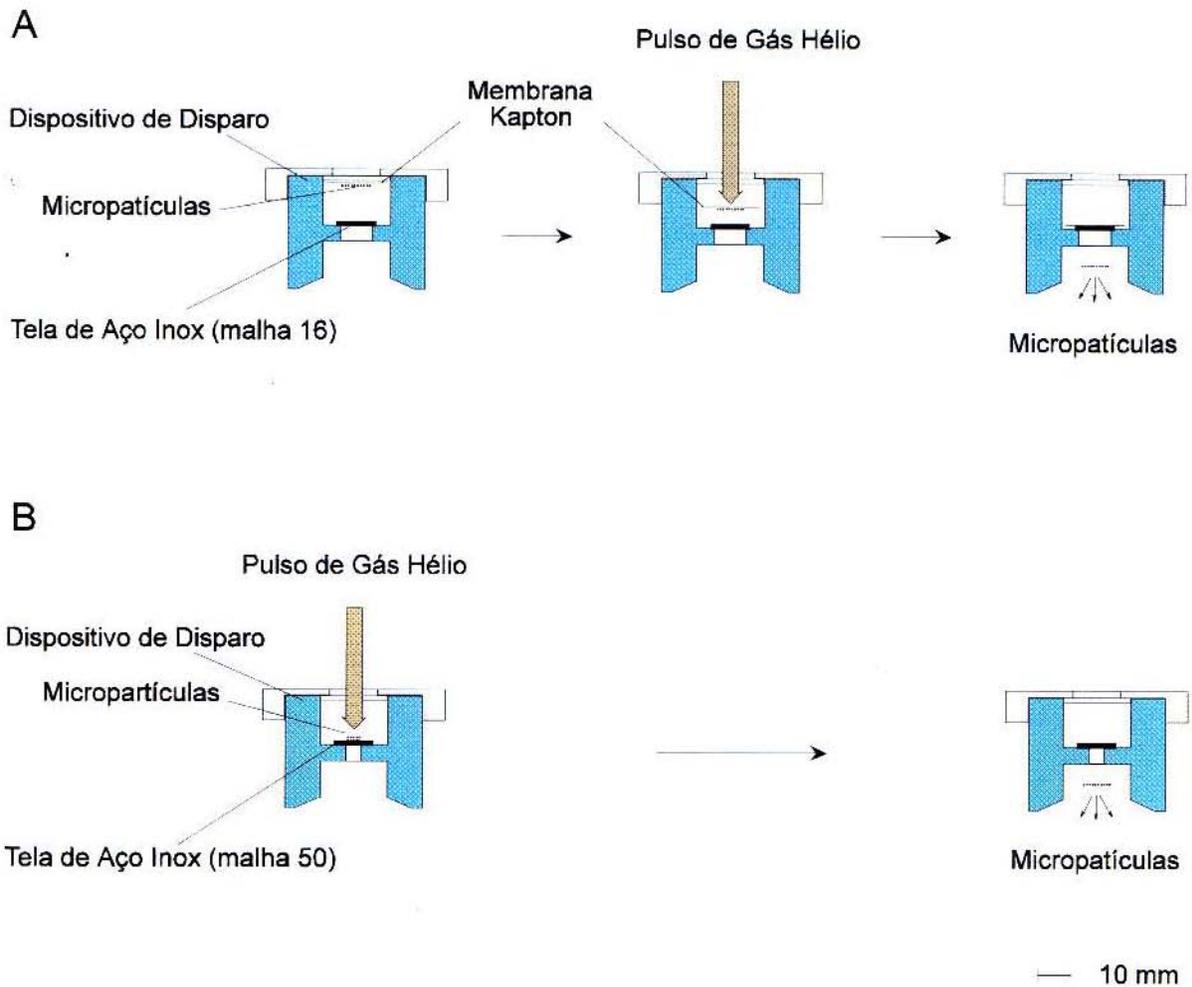


Figura 12 - Comparação dos Mecanismos de Disparo

(A) Sistema kapton: Uma membrana de acetato de celulose (Kapton), é posicionada sobre uma plataforma circular no interior do dispositivo de disparo. Esta membrana atua como macrocarregador das micropartículas que são previamente depositadas na face inferior da membrana. Durante o disparo, o choque de gás hélio acelera a membrana que voa livremente para baixo percorrendo uma distância de 10 mm. A membrana choca-se então com uma tela de aço inox (malha 16) que fica posicionada sobre um orifício de 10 mm de diâmetro no dispositivo de disparo. Com o choque, as micropartículas são lançadas em direção ao tecido alvo. (B) Sistema direto: As micropartículas são depositadas diretamente em uma tela de aço inox (malha 50), posicionada na base inferior do dispositivo de disparo, sobre um orifício de 3 mm de diâmetro. No momento do disparo, o pulso de gás hélio acelera diretamente as micropartículas que são lançadas através do pequeno orifício, em direção ao tecido alvo.

pela aproximação ou distanciamento do tecido alvo em relação ao dispositivo de disparo. O Nível 1 é o mais distante (12 cm), o Nível 2 é uma distância intermediária (9 cm) e o Nível 3 é o menos distante (6 cm), conforme descrito por Ye *et al.* 1990. A capacidade de penetração das micropartículas no tecido é diretamente proporcional à velocidade dos mesmos e inversamente proporcional à dispersão. Para se conseguir o ponto ideal de dispersão e penetração das micropartículas, cada tecido a ser bombardeado deve ser testado para as diferentes pressões e níveis de disparo, otimizando assim a eficiência de transformação.

Outra inovação realizada no acelerador de micropartículas foi um dispositivo elaborado para o bombardeamento de grãos de pólen maduros. Fundamentalmente, o dispositivo contém uma base de apoio, onde é colocado um papel de filtro Whatman N° 4 com 4,25 cm de diâmetro. Sobre este papel de filtro, aproximadamente 50 mg de grãos de pólen são espalhados uniformemente e recobertos com uma tela de nylon TK81 (malha 150) colada em um suporte de PVC. Todo o sistema é preso por duas presilhas laterais (Figura 13). Assim as micropartículas podem passar através da tela de nylon e atingir os grãos de pólen sem que estes sejam espalhados pela câmara de disparo. Após o disparo o sistema é desmontado e os grãos de pólen facilmente recuperados, podendo ser utilizados para germinação em meio de cultura ou para polinização das plantas.

Utilizando o acelerador de micropartículas, procedeu-se à avaliação do seu desempenho para os experimentos de transformação estável e estudos de regulação de expressão gênica em milho.

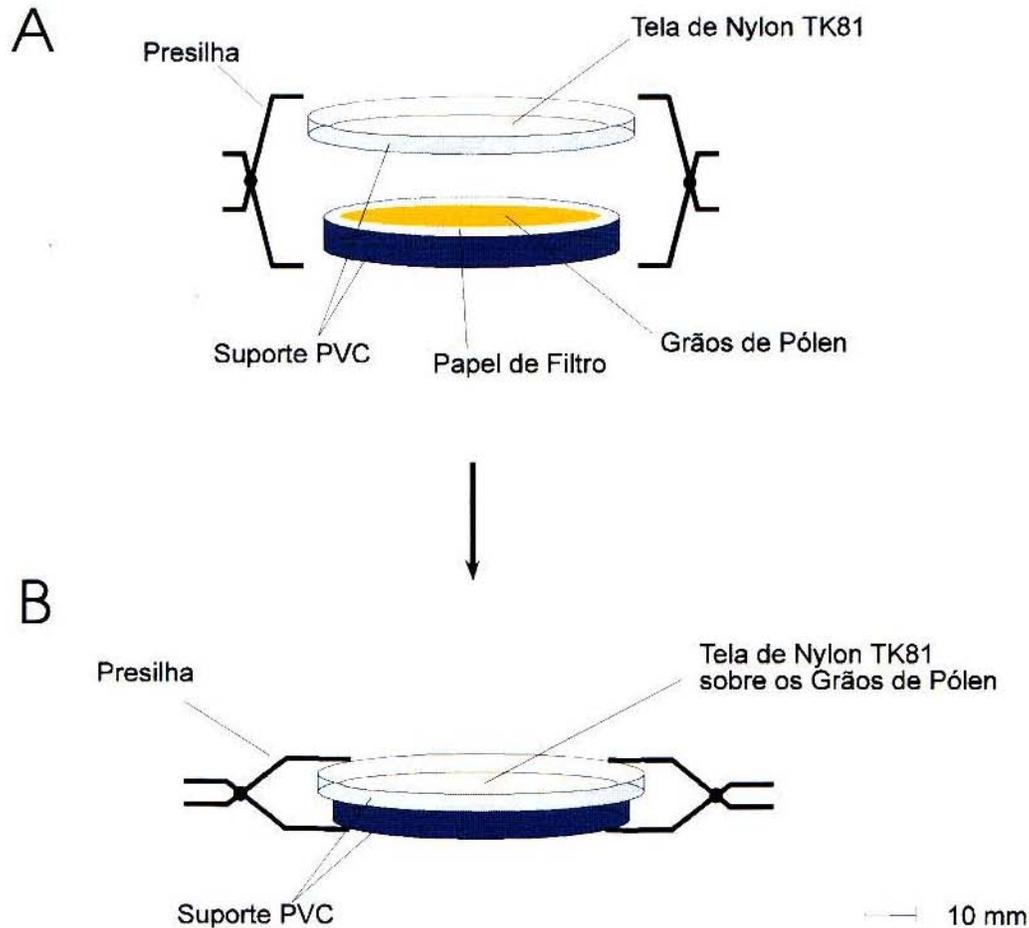


Figura 13 - Dispositivo para bombardeamento de grãos de pólen maduros

Aproximadamente 50 mg de grãos de pólen são espalhados uniformemente sobre papel de filtro Whatman N° 4. Este é colocado sobre um suporte de PVC e coberto com uma tela de nylon TK81 (malha 150) a qual é fixada no suporte de PVC com auxílio de duas presilhas. Durante o bombardeamento as micropartículas passam através dos orifícios da tela de nylon TK81 e atingem os grãos de pólen. Após os disparos o sistema é desmontado e os grãos de pólen são facilmente recuperados. (A) Pré-montagem. (B) Montagem do sistema de fixação dos grãos de pólen para o bombardeamento com micropartículas.

6.2 - Avaliação de parâmetros físicos do bombardeamento com micropartículas

Objetivando transformar células em diversos tecidos de milho, procurou-se determinar as melhores condições de bombardeamento. Assim sendo, foi estabelecido que as condições ideais de bombardeamento seriam aquelas que alcançassem o máximo de células transformadas. Além disso, a manutenção da integridade dos tecidos bombardeados foi de fundamental importância para a sobrevivência das células.

6.2.1 - Comparação entre os sistemas de bombardeamento Kapton e direto

Alguns sistemas para aceleração de micropartículas utilizando o gás hélio têm sido desenvolvidos e testados em vários laboratórios de pesquisa (Finer *et al.*, 1992; Vain *et al.*, 1993 e Brown, *et al.*, 1994). Devido as modificações introduzidas para eliminar a membrana Kapton, tornou-se necessário averiguar a eficiência do nosso acelerador de micropartículas. Procedeu-se à comparação entre o sistema Kapton e o sistema direto através do bombardeamento de calos embriogênicos de milho e a análise da expressão transitória do gene da β -glucuronidase (GUS) (Jefferson, 1987). A expressão transitória de GUS foi avaliada quantitativamente utilizando-se o vetor de expressão pAct1-F, que contém o gene *uidA* (GUS) sob o controle do promotor do gene *act1* (Actina 1 de arroz). Esta construção gênica foi escolhida devido à sua alta eficiência em arroz e em monocotiledôneas de um modo geral, sendo demonstrado que a atividade do promotor da actina de arroz é 5 a 10 vezes mais eficiente do que o promotor da álcool desidrogenase 1 de milho em condições de anaerobiose (McElroy *et al.*, 1990). A comparação entre os dois sistemas de aceleração das

micropartículas foi realizada através da contagem do número de pontos azuis, decorrentes da atividade transitória de GUS, verificada após a revelação histoquímica dos tecidos bombardeados.

Placas de Petri contendo Meio de Cultura N6 foram montadas para o bombardeamento, contendo 25 calos embriogênicos de milho de aproximadamente 2 mm de diâmetro. O experimento foi realizado em dias distintos, utilizando-se três repetições para o sistema Kapton e outras três para o sistema direto de disparo. Os calos foram bombardeados com uma pressão de 1.200 psi de gás hélio e no nível 3. Após o bombardeamento, os calos foram mantidos na câmara de crescimento durante 48 horas e a atividade de GUS revelada histoquimicamente.

Após análise estatística por blocos totalmente ao acaso, os dados obtidos indicaram que o método direto de bombardeamento com micropartículas é mais eficiente para a transformação das células quando comparado com o método Kapton, além de apresentar menor variação entre disparos consecutivos. Verificou-se uma média de 653,17 (SD39,93) pontos azuis por placa bombardeada com o sistema direto e 513,00 (SD48,32) pontos azuis por placa bombardeada com o sistema Kapton. Dados que originaram uma diferença estatística a nível de 1% em Teste F (Steel & Torrie, 1980) (Figura 14).

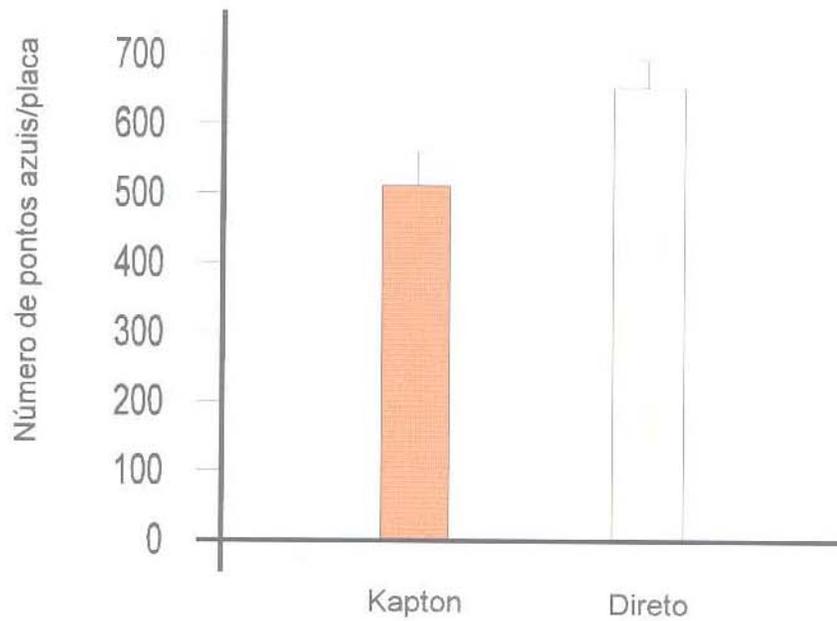


Figura 14 - Comparação entre os mecanismos de bombardeamento Kapton e direto

Calos embriogênicos de milho foram bombardeados com micropartículas co-precipitadas com DNA plasmidial contendo o vetor pAct1-F. O método direto mostrou-se mais eficiente para a transformação das células além de apresentar menor variação entre os disparos. Dados obtidos a partir de dois experimentos com três repetições para cada tratamento, sendo as diferenças significativas a nível de 1% em Teste F (Steel & Torrie, 1980)

6.2.2 - Efeito da pressão de disparo e distância do tecido alvo sobre a eficiência de transformação de células

A capacidade de penetração das micropartículas nos tecidos e nas células está relacionada com velocidade e dispersão das mesmas durante os disparos. A dinâmica do funcionamento deste sistema é traduzida pela maior ou menor taxa de transformação das células. Para um dado tecido mais tenro, são esperados melhores resultados de transformação das células quando empregam-se condições físicas para menores velocidades das micropartículas. Ao contrário, tecidos mais compactos ou duros, exigem maiores velocidades com maior poder de penetração das micropartículas (Sanford *et al.*, 1987; Klein *et al.*, 1987; Christou, 1993 e Kemper *et al.*, 1996). Visando estabelecer a dinâmica das micropartículas em nosso aparelho foi realizado um experimento variando-se a pressão do gás hélio e a distância do tecido alvo em relação ao dispositivo de disparo. Assim, as células foram bombardeadas a pressões que variaram entre 800, 1.200 e 1.600 psi, enquanto que os tecidos variaram entre os níveis 1, 2 e 3.

A análise estatística dos dados obtidos indicaram diferenças significativas a nível de 1% em teste SNK (Steel & Torrie, 1980). Observou-se que a pressão de 1.200 psi foi superior para obtenção de células transformadas, sobre as pressões de 800 e 1.600 psi. Por outro lado, analisando-se as distâncias entre o tecido alvo e o dispositivo de disparo, o nível 3 foi superior ao nível 2 e este por sua vez superior ao nível 1 (Figura 15).

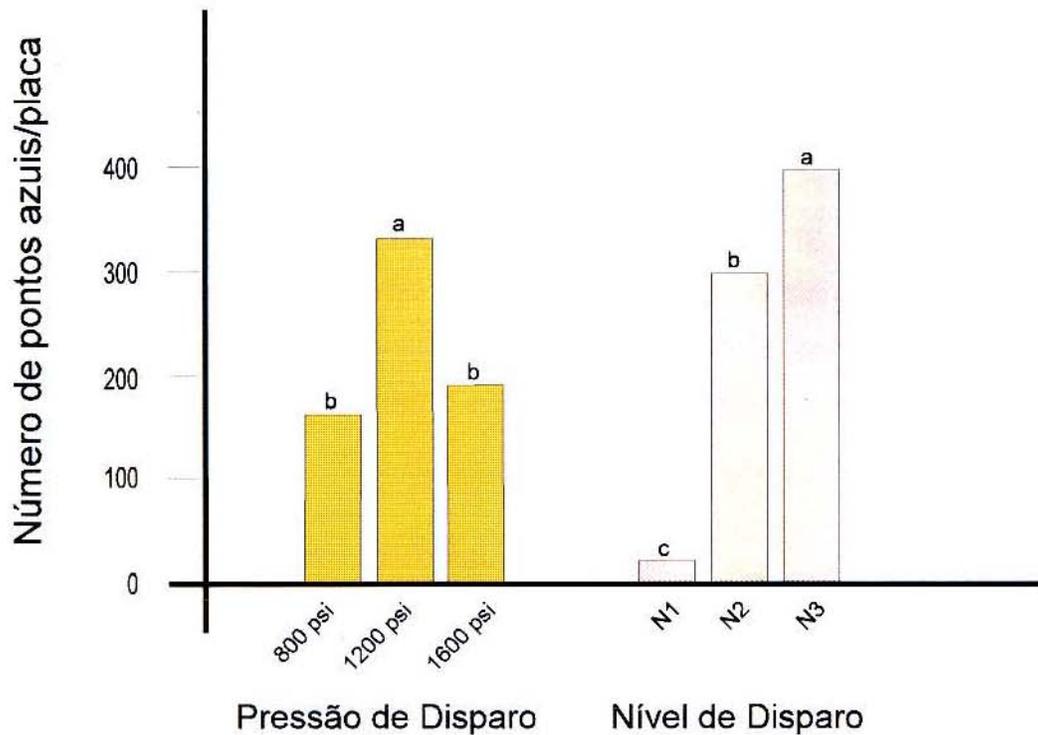


Figura 15 - Efeito da pressão de disparo e distância do tecido alvo na transformação transitória

Calos embriogênicos de milho foram bombardeados com micropartículas co-precipitadas com DNA plasmidial contendo o vetor pAct1-F. Os tecidos foram bombardeados a 800, 1.200 e 1.600 psi e a distâncias correspondentes aos níveis N1, N2 e N3. Três repetições para cada tratamento foram realizadas. Colunas seguidas de letras iguais não diferem significativamente a nível de 1% em teste F (Steel & Torrie, 1980).

A interação entre a pressão e o nível de disparo foi analisada através dos resultados deste experimento fatorial. Observando-se a Figura 16 foi possível verificar que 1.200 psi de pressão e o nível 3 compõem as melhores condições para a transformação de células, através do bombardeamento com micropartículas e o sistema direto de aceleração. Cabe ressaltar que correu redução de 50% na eficiência de transformação, quando empregou-se a pressão de 1.600 psi e o nível 3. A causa para este efeito provavelmente foi o dano acentuado do tecido, gerado pelo acelerador de micropartículas, nestas condições o índice de penetração das micropartículas no tecido é maior (Kemper *et al.*, 1996). Por outro lado, o nível 1 foi extremamente ineficiente para a transformação, provavelmente devido a redução da velocidade das micropartículas ao atritarem com o ar, durante o trajeto até atingir as células do tecido.

Considerando os parâmetros físicos avaliados durante o bombardeamento com micropartículas, verificou-se que as micropartículas penetraram nas células e foram capazes de carrear o DNA exógeno, permanecendo este em condições hábeis de ser transcrito e traduzido pelas células. Assim sendo, o acelerador de micropartículas desenvolvido neste trabalho mostrou-se eficaz e passível de utilização para todos experimentos de transformação delineados para os estudos subseqüentes, sendo inclusive utilizado em outros trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (CBMEG).

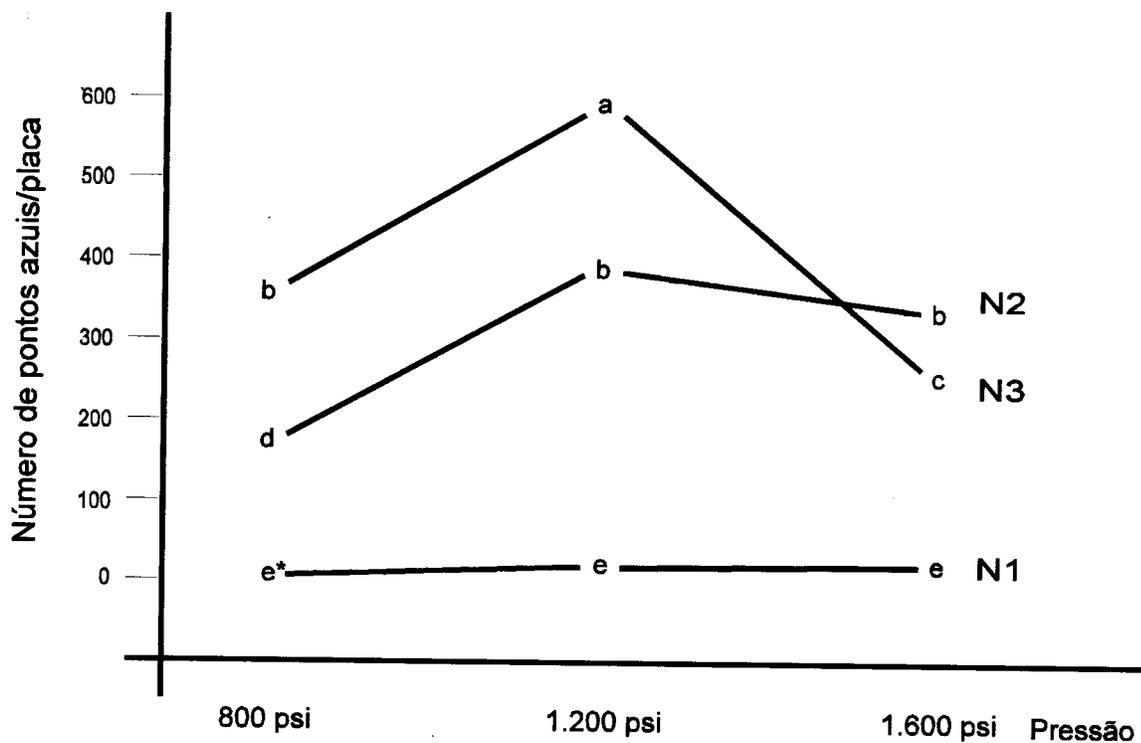


Figura 16 - Interação entre a pressão e o nível dos disparos

Médias de pontos azuis obtidos por placa bombardeada com micropartículas co-precipitadas com o vetor pAct1-F. A interação entre a pressão e o nível dos disparos é visualizada claramente quando são comparados os níveis N2 com N3 a 800, 1.200 e 1.600 psi de pressão. As curvas são ascendentes de 800 psi para 1.200 psi, tornando-se descendentes de 1.200 psi para 1.600 psi. Ocorre acentuada redução do número de pontos azuis em N3. Observa-se o melhor tratamento para N2 e 1.200 psi. (*) Letras iguais não diferem significativamente a nível de 1%, em Teste S-N-K (Steel & Torrie, 1980).

6.3 - Avaliação de parâmetros biológicos do bombardeamento com micropartículas

6.3.1 - Genes marcadores

Vários vetores têm sido descritos para a transformação e expressão em sistemas heterólogos em plantas. Objetivando estabelecer condições para a transformação e expressão gênica em milho foi realizada uma avaliação de vetores plasmidiais contendo genes marcadores a serem utilizados neste trabalho.

Um bom gene marcador caracteriza-se pela facilidade com que o seu produto pode ser identificado ou testado e que pouco interfira no metabolismo celular. Dentre os genes normalmente utilizados em plantas existem aqueles que codificam enzimas para substratos específicos, e que podem ser monitorados por compostos radioativos, cromógenos histoquímicos, fluorimétricos e luminescentes (Jefferson 1987). Durante o estabelecimento e o estudo de transformação gênica de milho, optou-se pela utilização do gene marcador repórter GUS. O gene GUS tem sido extremamente utilizado para monitorar a expressão de genes quiméricos em plantas. Caracteriza-se pela facilidade e rapidez com que se pode detectar seu produto. O substrato 5-bromo-4-3-indolil gucuronideo (X-GLUC) é utilizado correntemente para detectar a localização histoquímica da atividade de GUS em experimentos de transformação em células de plantas.

Considerando-se a metodologia de transformação e expressão gênica em milho, além dos vetores pBI221, pAIGUSN, pMF6-GUS, pAct1-F, p35SI-C1, p35SI-Bperu, pZM13(-260GN), pLAT52-7, pR5'-GUS e p α Z4-GUS apresentados em Material e Métodos, novas fusões gênicas foram desenvolvidas neste trabalho. Os vetores de expressão gênica descritos a seguir foram construídos empregando-se vários promotores e genes obtidos

através de doações junto à comunidade científica internacional ou identificados e clonados em nosso laboratório de pesquisa. Basicamente foram utilizados nos estudos de expressão gênica transitória para avaliação de parâmetros físicos e biológicos de utilização do acelerador de micropartículas, comparação dos promotores constitutivos ou tecido-específicos, viabilidade celular após o bombardeamento com micropartículas e transformação estável de milho.

6.3.2 - Genes seletivos

Devido a baixa frequência de transformação gênica das células correntemente obtida, da ordem de 1×10^{-5} a 1×10^{-3} , (Armstrong *et al.*, 1991 e Klein *et al.*, 1989), tem-se procurado estratégias metabólicas para recuperar as células transformadas. Vários vetores de plantas têm sido utilizados para introduzir marcas seletivas nas células de plantas. A inativação de um agente seletivo pode ser alcançada pelas células que tiverem recebido um gene de resistência, correspondente ao agente seletivo empregado. Procurou-se determinar sistemas de seleção que fossem efetivos para a obtenção de clones celulares. Clones estes, que apresentassem a aquisição de uma característica correlacionada àquela introduzida pelo sistema de transformação delineado. Idealizando estratégias de seleção a partir de tecidos bombardeados com micropartículas, foram desenvolvidas fusões gênicas para utilização em sistemas seletivos em cultura de tecidos de milho.

O vetor pAct-GUSNPT, apresentado na Figura 17, possui além de um promotor de alta expressão, uma fusão gênica GUS-NPTII. O gene NPTII é de origem bacteriana que confere resistência a kanamicina, um antibiótico

pAct-GUSNPT (6,9 Kb)

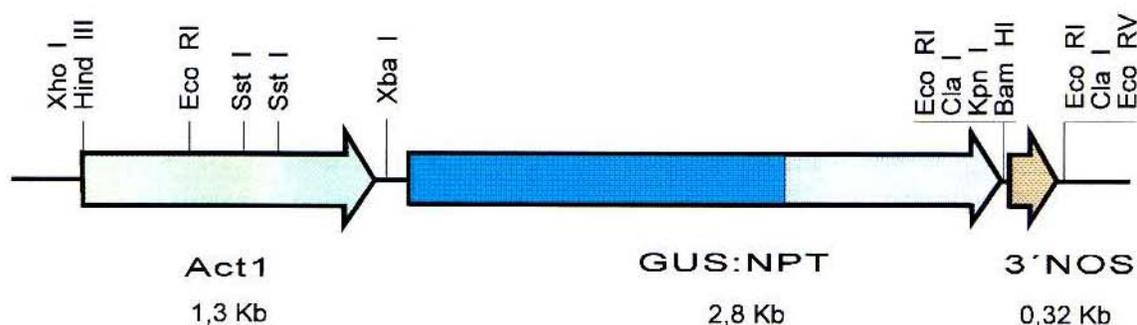


Figura 17 - Representação esquemática do vetor pAct-GUSNPT

O vetor, construído no plasmídeo pUC8, contém a região codificadora do gene da β -glucuronidase (GUS) de *E. coli*, ligada transcricionalmente ao gene da neomicina fosfotransferase II de *E. coli*, sob o controle do promotor do gene da actina 1 de arroz e da região de poliadenilação do gene da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (3'NOS). Este vetor foi construído neste trabalho a partir da substituição do promotor do vetor pBI426 (Datla *et al.*, 1990) pelo promotor Act1-F (McElroy *et al.*, 1990) e expressa uma proteína bifuncional resultante da fusão dos genes GUS e NPT). O número em frente ao nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

efetivo em tecidos de plantas, que permite a seleção de células transformadas. A kanamicina é um aminoglicosídeo que inibe a síntese protéica ligando-se a unidade 30S ribossomal (Wilmink & Dons, 1993). Assim, o vetor pAct-GUSNPT gera um produto bifuncional que permite correlacionar os clones obtidos, ao final do processo seletivo, com a atividade de GUS. Invariavelmente as células que receberem o DNA e forem tolerantes à kanamicina também apresentarão a atividade da β -glucuronidase. Além disso, os clones falso positivos poderão facilmente ser identificados e eliminados do processo, pois apesar de tolerarem o agente seletivo não apresentarão a atividade de GUS.

O vetor p35S-HPH, apresentado na Figura 18, possui o gene da higromicina fosfotransferase B de *Streptomyce hygrocopicus*. A higromicina é um aminoglicosídeo que inibe a síntese protéica de bactérias por ocupar o sítio EF-2 ribossomal responsável pela elongação da cadeia proteína (Kors, 1991). Os ribossomos mitocondriais e dos cloroplastos das plantas superiores são semelhantes aos das bactérias, sendo susceptíveis aos antibióticos (Wilmink & Dons, 1993).

p35S-HPH (9,4 Kb)

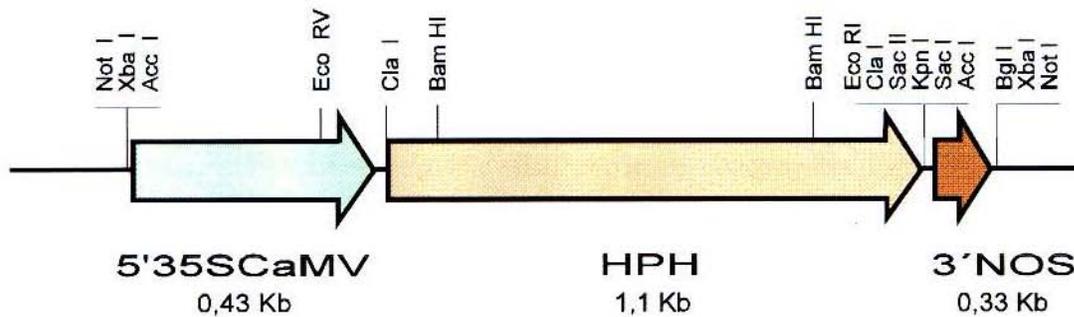


Figura 18 - Representação esquemática do vetor p35S-HPH

O vetor, construído no plasmídeo pUC19, contém a região codificadora do gene da higromicina fosfotransferase B de *Streptomyces hygroscopicus* (*hph*) (Gritz & Davies, 1983), sob o controle do promotor do gene 35 S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV) e da região de poliadenilação do gene da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (3'NOS). O número em frente ao nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

O vetor pActBARGUS, apresentado na Figura 19, possui o promotor constitutivo da actina 1 de arroz e os genes GUS e BAR. O gene *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* codifica a enzima fosfinotricina acetil transferase (PAT) que inativa a fosfinotricina (PPT), um potente inibidor da glutamina sintetase (GS), através de uma reação de acetilação (Murakami *et al.*, 1986). A glutamina sintetase é a única enzima que detoxifica a amônia produzida durante a redução do nitrato, fotorrespiração e degradação de aminoácidos nas plantas. A aplicação de PPT nos tecidos causa uma elevação da amônia a níveis fitotóxicos no interior celular. A ação herbicida do PPT pode ser revertida nas células recém transformadas com o gene *bar* através da atividade da fosfinotricina acetil transferase. Assim setores transgênicos podem desenvolver-se mesmo em meio de cultura contendo o agente seletivo (D'Halluin *et al.*, 1992).

O vetor pActBARGUS foi desenvolvido para propiciar altos níveis de expressão tanto da enzima PAT quanto da β -glucuronidase. A seleção de células com o gene *bar* requer a expressão da enzima PAT em níveis elevados para que ocorra a inibição da enzima glutamina sintetase (Stewart *et al.*, 1980). Clones selecionados em Meio de Cultura N6 contendo PPT poderão ser testados com relação a presença da atividade de GUS, sendo também possível distinguir os clones transgênicos devido a correlação entre a tolerância ao PPT e a presença da atividade de GUS.

pActBARGUS (8,2 Kb)

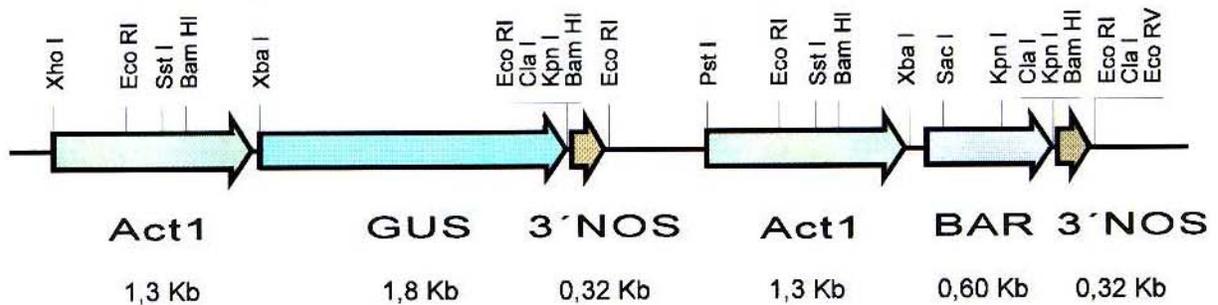


Figura 19 - Representação esquemática do vetor pActBARGUS

O vetor, construído no plasmídeo pUC19, contém as regiões codificadoras dos genes da β -glucuronidase (GUS) de *E. coli* e da fosfotricina acetil transferase de *Streptomyces hygrosopicus* (White *et al.*, 1990), sob o controle do promotor do gene da actina 1 de arroz (Act1-F) (McElroy *et al.*, 1990) e da região de poliadenilação do gene da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (3'NOS). O número em frente ao nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

6.3.3 - Genes reguladores de expressão gênica

Recentemente, genes que codificam fatores de regulação transcricional têm proporcionado a idealização de estratégias para obtenção de plantas transgênicas. Estes fatores de regulação podem estar envolvidos direta ou indiretamente em vias metabólicas que resultam em marcas visuais facilmente identificadas. Neste trabalho algumas fusões foram realizadas utilizando-se estes genes.

A Figura 20 e a Figura 21 apresentam os vetores pR5'-C1 e pR5'-Bperu, respectivamente, que foram construídos a partir dos vetores p35SI-C1, p35SI-Bperu e pR5'-GUS. O gene *c1* e *b-peru* pertencem às famílias de genes reguladores da via biossintética da antocianina em milho. Empregou-se o promotor R5' pertencente ao gene *prms* de milho. A proteína Prms é uma "PR-like protein" (proteína de resposta a infecção por patógenos), que acumula-se naturalmente no escutelo e camada de aleurona durante a germinação da semente, sendo também induzida pelo fungo *Fusarium moniliforme* (Casacuberta *et al.*, 1991 e 1992 e Raventós *et al.*, 1995). Estes vetores foram utilizados para caracterizar o acúmulo de antocianina na camada de aleurona em sementes imaturas de milho F352AG e nos experimentos de bombardeamento de grãos de pólen.

A Figura 22 e a Figura 23 apresentam os genes *opaco-2* de milho e de *Coix*, que são genes responsáveis pela manutenção do fenótipo vítreo das sementes maduras. Estes genes foram utilizados em estudos comparativos de atividade e tecido-especificidade realizados.

pR5'-C1 (5.2 Kb)

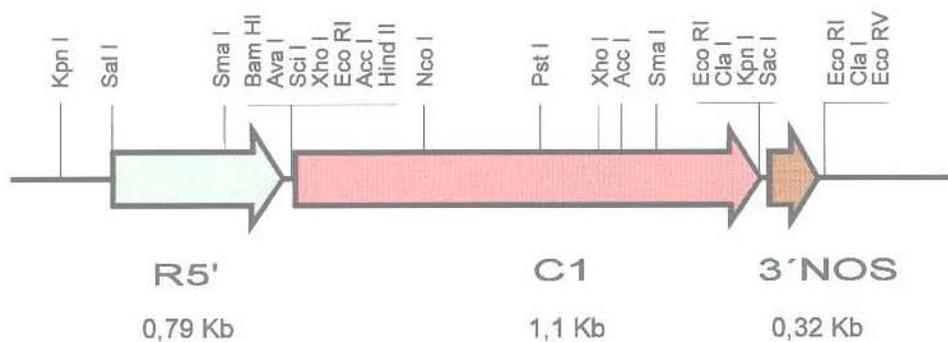


Figura 20 - Representação esquemática do vetor pR5'-C1

O vetor, construído no plasmídeo pBluescript KS(+), contém a região codificadora do gene C1 (Cone *et al.*, 1986 e Paz-Ares *et al.*, 1986), sob o controle do promotor do gene R5' que apresenta um padrão de expressão específico da camada de aleurona de milho (Casacuberta *et al.*, 1991) e da região de poliadenilação do gene da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (3'NOS). O número em frente ao nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

pR5'-Bperu (6,0 Kb)

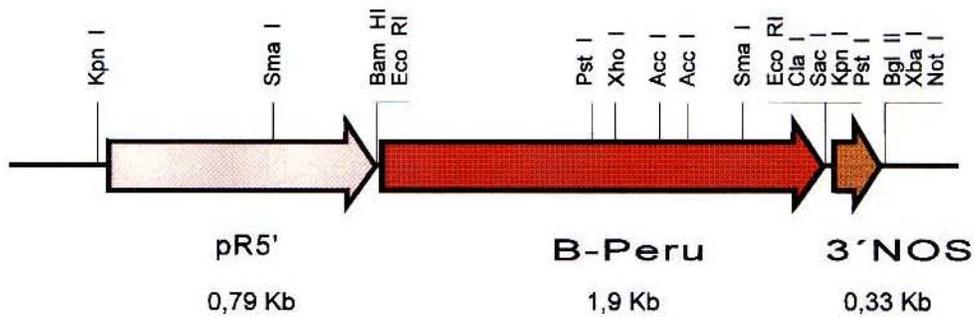


Figura 21 - Representação esquemática do vetor pR5'-Bperu

O vetor, construído no plasmídeo pBluescript KS(+), contém a região codificadora do gene *b-Peru*, sob o controle do promotor do gene R5' que apresenta um padrão de expressão específico da camada de aleurona de milho (Casacuberta *et al.*, 1991) e da região de poliadenilação do gene da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (3'NOS). O número em frente ao nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

pRT101-O2 (5,1 Kb)

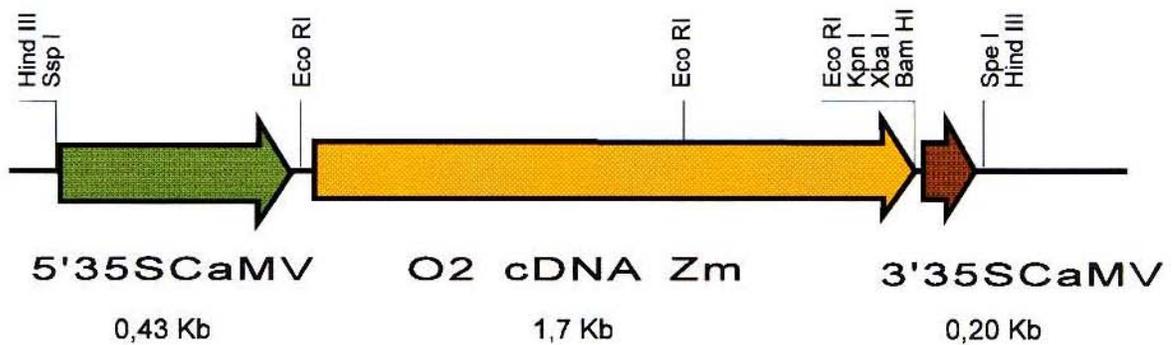


Figura 22 - Representação esquemática do vetor pRT101-O2

O vetor, construído no plasmídeo pUC18, contém a região codificadora do gene *opaco-2* de milho, sob o controle do promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV) e da região de poliadenilação do mesmo gene. O número em frente ao nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

pPO2O2Coix (5,6 Kb)

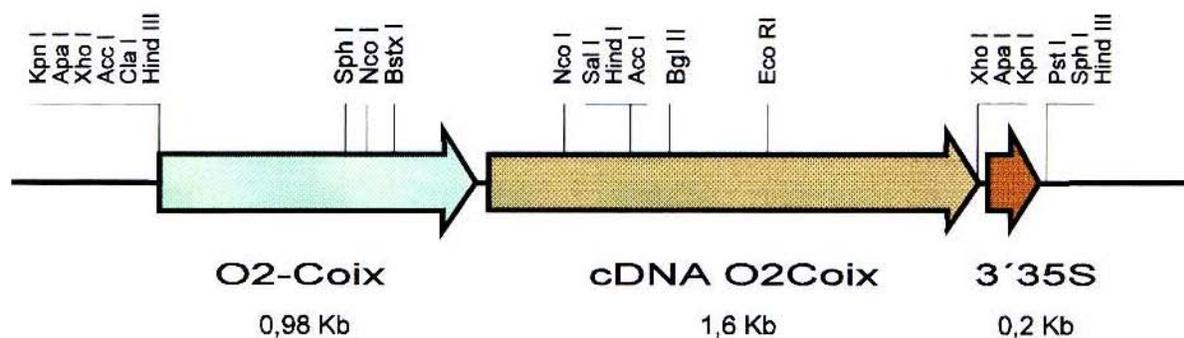


Figura 23- Representação esquemática do vetor pPO2O2Coix

O vetor, construído no plasmídeo pUC18, contém o gene integral da proteína Opaco-2 de *Coix lacryma jobi* (Vettore *et al.*, 1996), sob o controle da região 3' de poliadenilação do gene 35S do vírus do masaico da couve flor (3'35S) CaMV. O número em frente ao nome do vetor corresponde ao tamanho do plasmídeo. Os sítios de restrição mais comuns da construção do vetor estão apontados. Kb = quilo base.

6.4 - Tecidos de milho

6.4.1 - Expressão transitória de GUS em calos embriogênicos de milho

Nos experimentos preliminares de utilização do acelerador de micropartículas empregou-se basicamente o gene da β -glucuronidase (Jefferson *et al.* 1987), monitorando-se a ocorrência de transformação celular através da atividade histoquímica da enzima em calos embriogênicos de milho. Utilizou-se o vetor plasmidial pAct1-F, devido a alta eficiência do promotor da actina de arroz, sendo 10 a 20 vezes mais ativo do que o promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV), quando comparados em cultura de células de arroz (McElroy *et al.*, 1990). Obedecendo rigorosamente ao protocolo de precipitação de DNA para impregnação em micropartículas de ouro, descrito em Material e Métodos, calos embriogênicos de milho foram bombardeados em Meio de Cultura N6, acrescido de 425 mM de manitol. A elevação da osmolaridade do meio de cultura matém as células plasmolizadas durante o bombardeio. Isto influencia significativamente a eficiência de transformação transiente e estável, devido principalmente a não extrusão do citoplasma das células (Russel *et al.*, 1992 e Vain *et al.*, 1993). Foram preparadas três placas de Preti contendo 25 calos de aproximadamente 3 mm de diâmetro cada um, dispostos sobre papel de filtro Whatman nº 4. Os disparos foram realizados a uma pressão de 1.200 psi e as células foram alvejadas a uma distância de 6 cm, nível N3.

Após o bombardeamento os calos foram mantidos em câmara de crescimento por 48 horas, para em seguida procederem-se os ensaios de expressão gênica transitória. Houveram níveis visualmente detectáveis de atividade da β -glucuronidase, pelo aparecimento de pontos azuis, representando uma ou mais células juntas que receberam o DNA exógeno e expressaram a atividade enzimática de GUS (Figura 24).

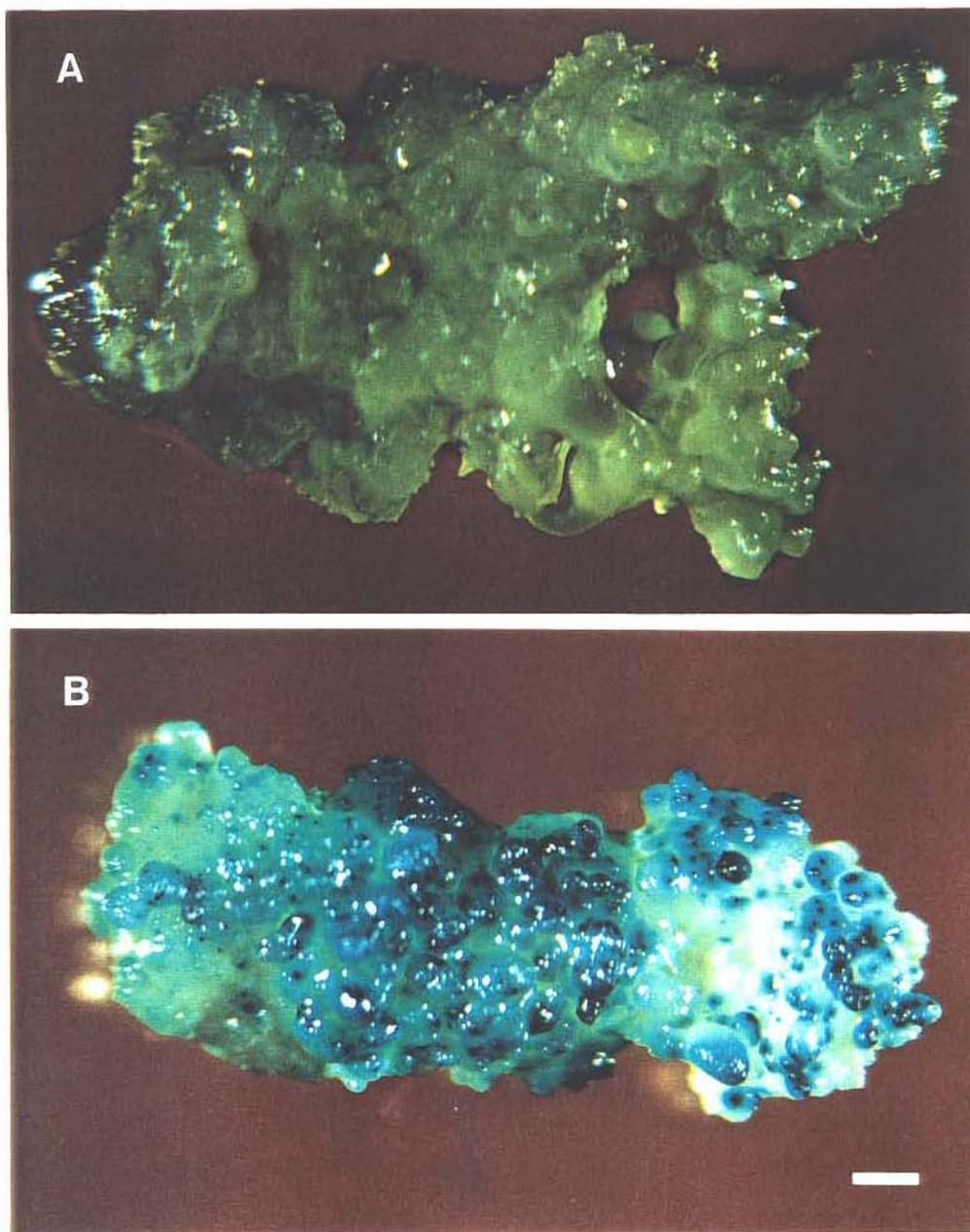


Figura 24 - Expressão transitória da β -glucuronidase em calos embriogênicos de milho

Calos embriogênicos de milho foram bombardeados com micropartículas co-precipitadas com DNA plasmidial contendo o vetor pAct1-F. Os pontos azuis indicam a atividade da β -glucuronidase. (A) Bombardeamento com micropartículas livre de DNA. (B) Bombardeamento com micropartículas co-precipitadas com DNA plasmidial. Barra = 0,5 mm

6.4.2 - Expressão transitória de GUS em embrião imaturo recém induzido em cultura de milho

Uma grande dificuldade em se obter plantas transgênicas de milho consiste da perda da capacidade de regeneração das células durante o processo prolongado de derivação "*in vitro*" dos subclones celulares (Vasil, 1994). Estrategicamente procurou-se inocular os embriões imaturos e cultivá-los por períodos curtos, suficientes para a induzir as células proliferativas da segunda e terceira camadas da subepiderme do escutelo.

Embriões imaturos foram coletados com 12 ou 13 dias após a polinização e inoculados em Meio de Cultura N6 para indução de calos. Após 5 a 10 dias os embriões, em plena proliferação celular, foram utilizados para o bombardeamento com micropartículas. Disparos com 1.200 psi de pressão em N3 foram realizados e a atividade transitória de GUS foi revelada histoquimicamente. A Figura 25, em A, B e C, mostra embrião imaturo recém inoculado e com 5 dias após inoculação, estágio ideal para o bombardeamento com micropartículas; e em D, E e F, calos embriogênicos com longo período de cultivo, derivados dos embriões que foram bombardeados com o vetor pAct1-F, apresentando raros setores transgênicos com atividade de GUS.

A expressão transitória em embriões, durante o processo de indução da cultura de tecidos, foi demonstrada através do bombardeamento com micropartículas e revelação da atividade de GUS. Além disso, as células proliferativas do embrião, aquelas que originam a cultura de tecidos, também foram transformadas, tendo sido demonstrada a integração do gene GUS. A atividade de GUS foi revelada em setores completos, após alguns meses de cultura. Ao contrário da expressão transitória, que ocorre apenas nas células individuais que receberam diretamente o DNA durante o bombardeio,

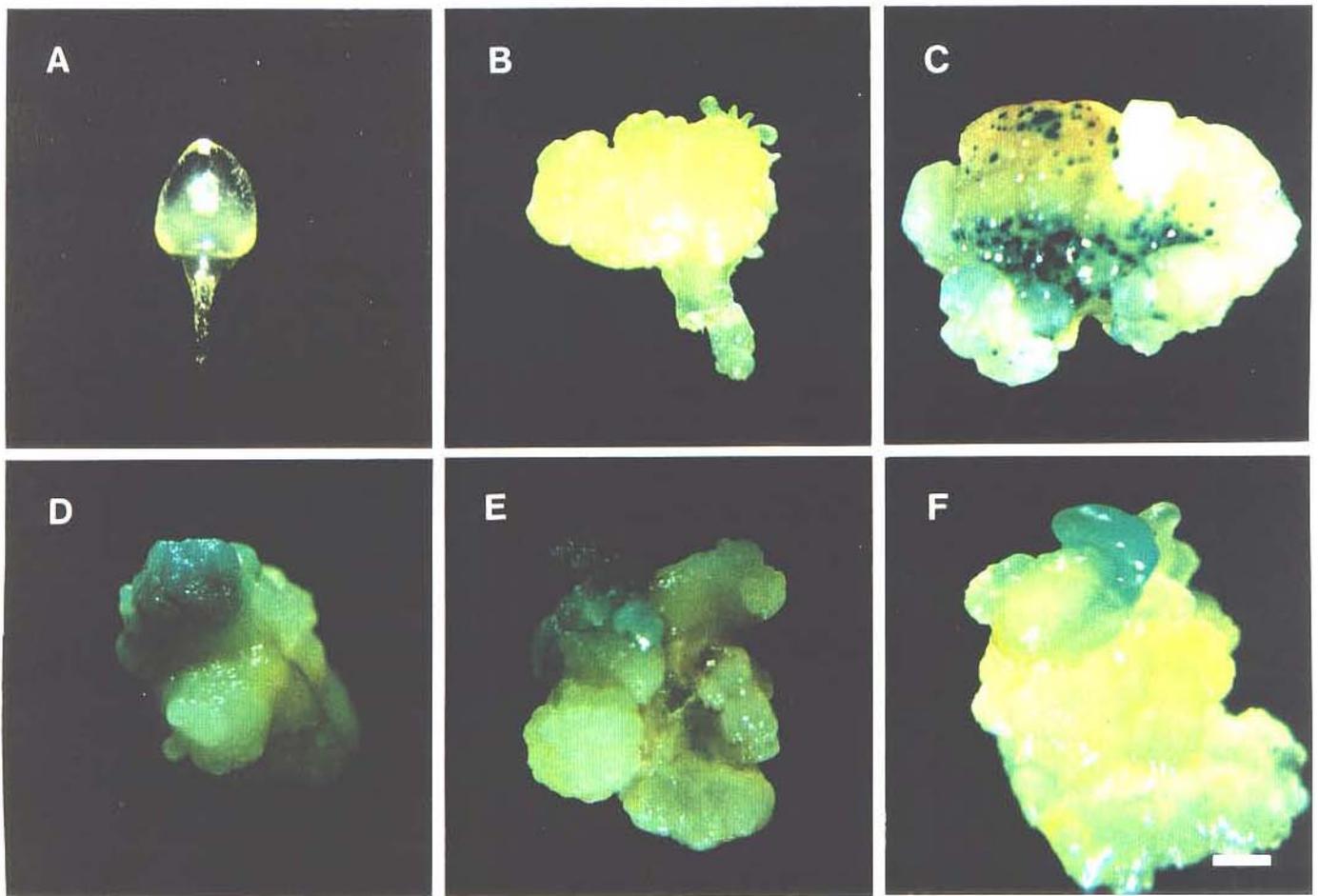


Figura 25 - Transformação de embriões imaturos

Embriões imaturos de milho inoculados em meio de cultura para indução de calos foram bombardeados com micropartículas co-precipitadas com DNA plasmidial contendo o vetor pAct1-F. (A) Embrião com 2 dias após a inoculação. (B) Embrião com 5 dias após a inoculação apresentando setores altamente regenerativos e proembriões (C) Embrião com 5 dias após a inoculação, após bombardeamento com o vetor pAct1-F, apresentando expressão transitória de GUS. (D), (E) e (F) Calos embriogênicos com 3 a 4 meses após a inoculação seguida de bombardeamento com o vetor pAct1-F apresentando setores transgênicos com atividade de GUS. Barra = 1 mm

sem a transmissão da característica para as células descendentes, os setores transgênicos se tornaram completamente azuis.

6.4.3 - Expressão transitória de GUS em endosperma imaturo de milho

O endosperma imaturo de milho é um tecido em pleno desenvolvimento onde ocorre alta atividade celular, podendo ser utilizado para estudos de expressão transitória. Durante a maturação das sementes ocorre a biossíntese e armazenamento das proteínas de reserva da semente. Este processo é determinado por genes reguladores de expressão gênica que basicamente atuam a nível de transcrição gênica (Schmidt *et al.*, 1987 e Motto *et al.*, 1988). A transformação gênica das células do endosperma torna-se um sistema interessante para o estudo dos mecanismos de regulação de expressão em organismos superiores, bem como, para o desenvolvimento de metodologia alternativa para a transformação gênica, utilizando-se o gene *opaco-2* como marcador de característica qualitativa.

Para determinar se as células do endosperma imaturo de milho eram passíveis de transformação, através de bombardeamento com micropartículas, empregou-se o bombardeamento com micropartículas co-precipitadas com os vetores de expressão gênica pAct1-F e p α Z4-GUS. O pAct1-F contém um promotor constitutivo de alta expressão e o p α Z4-GUS contém um promotor tecido-específico, que dirige a expressão da α -zeína de 22kDa, uma proteína de reserva do endosperma de milho.

Sementes imaturas de milho F352AG foram coletadas 13 dias após a polinização, esterilizadas superficialmente e cortadas no sentido látero-longitudinal. Foram transferidas para placas de Petri contendo Meio de Cultura MS e posicionadas com a face cortada para cima. Micropartículas

foram preparadas com os vetores de expressão gênica pAct1-F ou p α Z4-GUS. Procedeu-se ao bombardeamento com micropartículas e as sementes foram mantidas em câmara de crescimento, para subsequente revelação da atividade histoquímica de GUS. O vetor de expressão pAct1-F constitutivamente promoveu a expressão nas células do endosperma, camada de aleurona e subaleurona, escutelo, eixo embrionário, pericarpo e pedicelo da semente (Figura 26-A). A expressão mediada pelo promotor da zeína de 22kDa (α Z4), tecido-específico, promoveu a expressão de GUS discriminadamente no endosperma, aleurona e subaleurona (Figura 26-B).

O desenvolvimento da transformação de células específicas do endosperma imaturo, permitiu idealizar um novo modelo de marcação visual para a transformação estável de milho. Genes envolvidos na expressão das proteínas de reserva puderam ser testados *in vitro* e averiguar a efetividade do modelo proposto.

6.4.4 - Expressão transitória de GUS em grãos de pólen de milho

Protocolos para a transformação de grãos de pólen através de bombardeamento com micropartículas têm sido descritos para *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*, *Paeonia lactiflora*, *Lirium longiflorum*, *Tradescantia sp* e *Lycopersicon esculentum* (Twell *et al.*, 1989; Hamilton *et al.*, 1992 e Nishihara *et al.*, 1993). Normalmente os grãos de pólen são misturados em meio líquido de cultura, quantificados utilizando-se câmaras de contagens e dispersos uniformemente sobre papel de filtro em placas de Petri, contendo meio sólido de cultura. Sobre este filtro, os grãos de pólen são bombardeados com micropartículas, incubados e revelada a atividade de GUS através da adição do Tampão de Revelação X-GLUC.

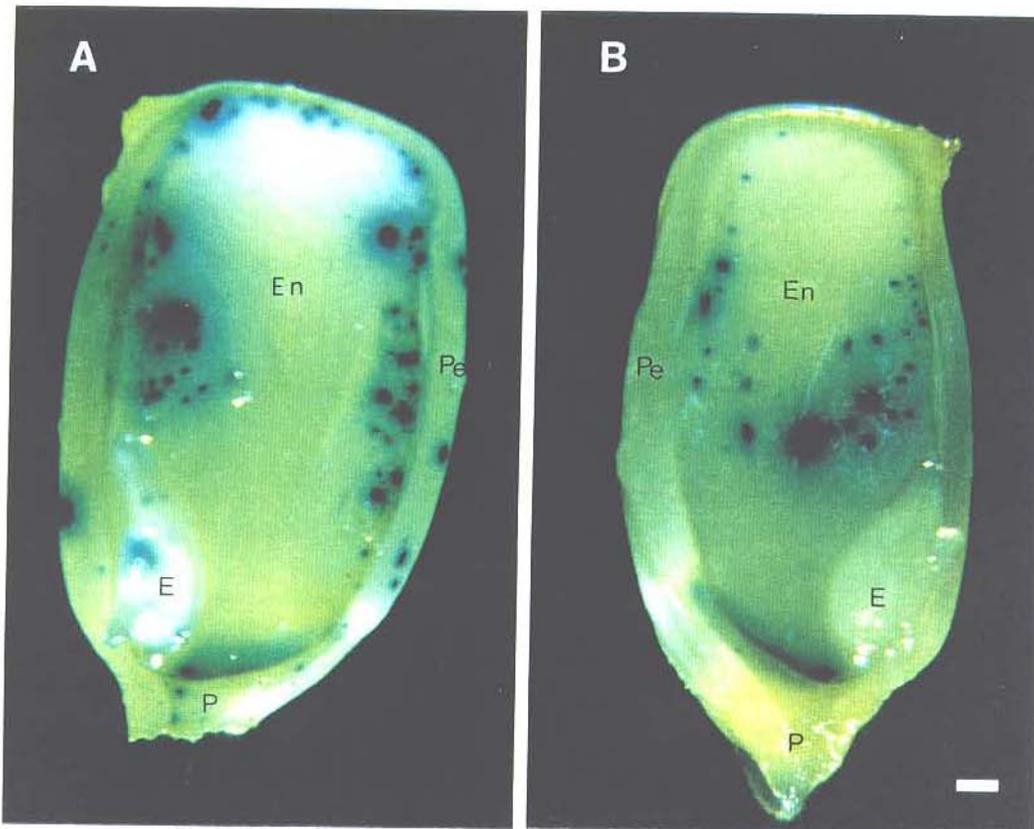


Figura 26 - Expressão transitória de GUS em endosperma imaturo de milho

Sementes de milho com 13 dias após a polinização foram colhidas, esterilizadas superficialmente, cortadas no sentido látero-longitudinal e transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura MS. As sementes foram bombardeadas com micropartículas co-precipitadas com DNA plasmidial contendo os vetores pAct1-F e p α Z4-GUS. (A) Endosperma bombardeado com o vetor pAct1-F mostrando a constitutividade do promotor, evidenciada pela presença de atividade da β -glucuronidase no escutelo, camada de aleurona e subaleurona, endosperma, eixo embrionário, pericarpo e pedicelo. (B) Endosperma bombardeado com o vetor p α Z4-GUS mostrando a tecido-especificidade do promotor, evidenciada pela presença de atividade da β -glucuronidase somente nas células do endosperma. E = embrião, En = endosperma, P = pedicelo e Pe = pericarpo. Barra = 0,5 mm

Este procedimento não tem dado resultados satisfatórios para milho devido ao fato dos grãos de pólen romperem-se facilmente (Hamilton *et al.*, 1992).

Grãos de pólen de milho puderam ser transformados rotineiramente através do dispositivo de bombardeamento de grãos de pólen maduros, desenvolvido neste trabalho. Ao contrário dos protocolos descritos até então, procurou-se bombardear os grãos de pólen antes de embebê-los em meio de germinação (Ca(NO₃) 0,03%; H₃BO₃ 0,01%; MgSO₄ 0,02%; KNO₃ 0,01%; Tris-HCl 0,01%; Phytigel 0,5% e sacarose 10% pH 6,5) (Waldron 1987), permitindo as condições fisiológicas ideais de expressão do gene recém introduzido. A atividade de GUS foi revelada recobrando-se a placa de Petri papel de filtro embebido em Tampão de Revelação X-GLUC.

A Figura 27 mostra a expressão transitória de GUS em grãos de pólen de milho. A germinação dos grãos de pólen ocorreu rapidamente e o tubo polínico alongou-se através do meio de germinação (Figura 27-A). Parte dos grãos de pólen que foram bombardeados romperam-se devido ao bombardeamento com micropartículas, perdendo a viabilidade (Figura 27-B). Apesar da injúria sofrida, parte dos grãos de pólen não perderam a viabilidade e germinaram (Figura 27-C). A atividade enzimática de GUS foi observada nos grãos de pólen, demonstrando que houve transcrição e tradução do gene da β -glucuronidase introduzido (Figura 27-D).

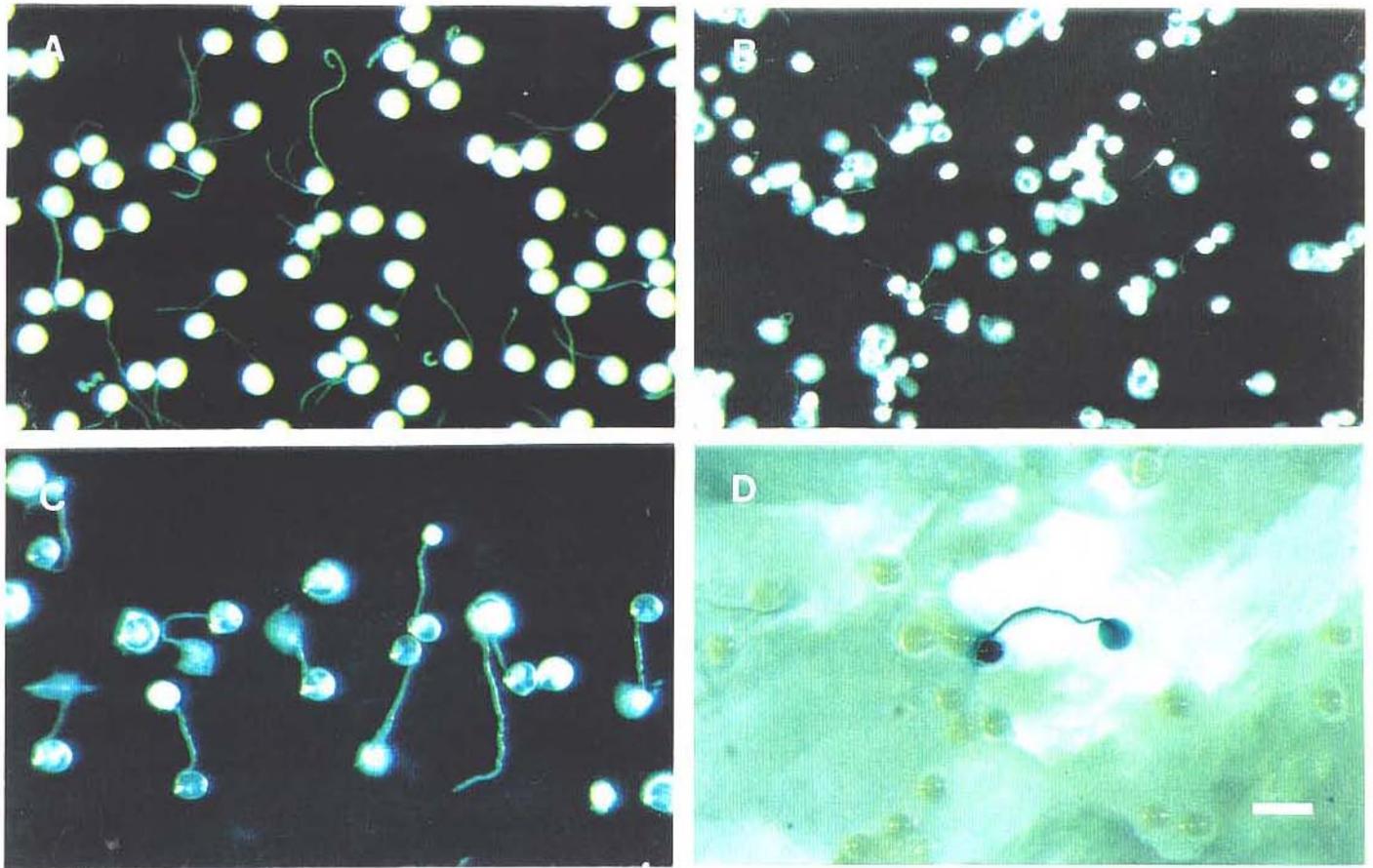


Figura 27 - Expressão transitória de GUS em grãos de pólen

Utilizando-se um dispositivo desenvolvido neste trabalho, grãos de pólen de milho foram bombardeadas ou não com micropartículas co-precipitadas com DNA plasmidial contendo o vetor pAct1-F. (A) Grãos de pólen inoculados em meio de germinação, sem bombardeamento com micropartículas. (B) Grãos de pólen inoculados em meio de germinação, após o bombardeamento com micropartículas. Nota-se a diminuição da viabilidade dos grãos de pólen, conseqüência direta do bombardeamento. (C) Grãos de pólen inoculados em meio de germinação, após o bombardeamento com micropartículas. Mesmo em baixa freqüência os grãos de pólen viáveis germinam e alongam o tubo polínico durante várias horas. (D) Grão de pólen, intensamente azul, expressando a atividade de GUS. Barra = 200 μ m

6.5 - Análise comparativa dos promotores de expressão gênica contidos nos vetores plasmídias pBI221, pAIGUSN, pMF6-GUS e pAct1-F

O promotor escolhido deve assegurar a expressão do gene por ele dirigida, quando introduzido nas células. Assim, a construção de bons vetores de expressão gênica em monocotiledôneas é um dos fatores fundamentais para incrementar os níveis de expressão transitória, e conseqüentemente, a obtenção de plantas transgênicas de milho. Alguns promotores derivados de vírus ou plantas foram utilizados para estudos comparativos neste trabalho. Estes promovem níveis altos e constitutivos de muitos genes em células de plantas, tais como nos vetores pBI221 (Jefferson *et al.*, 1987), pAIGUSN (Callis *et al.*, 1987), pMF6-GUS (Mascarenhas *et al.*, 1990) e pAct1-F (McElroy *et al.*, 1990).

Os DNAs foram coprecipitados individualmente com as micropartículas de ouro. Após o bombardeamento procedeu-se à revelação histoquímica da atividade de GUS, descrito anteriormente.

Os resultados obtidos na determinação da força destes promotores em calos embriogênicos de milho são apresentados na Figura 28. Os tratamentos com os vetores pBI221 e pAI-GUSN revelaram baixa atividade de GUS apresentando respectivamente 22,33 (SD12,06) e 24,33 (SD11,17) pontos azuis por placa. Assim sendo, foram considerados não satisfatórios para a transformação de calos embriogênicos de milho. A construção pMF6-GUS apresentou alta taxa de transformação das células, 533,67 (SD49,80) pontos azuis por placa, enquanto que a construção pAct1-F foi a que apresentou melhores resultados com 743,00 (SD36,59) pontos azuis por placa.

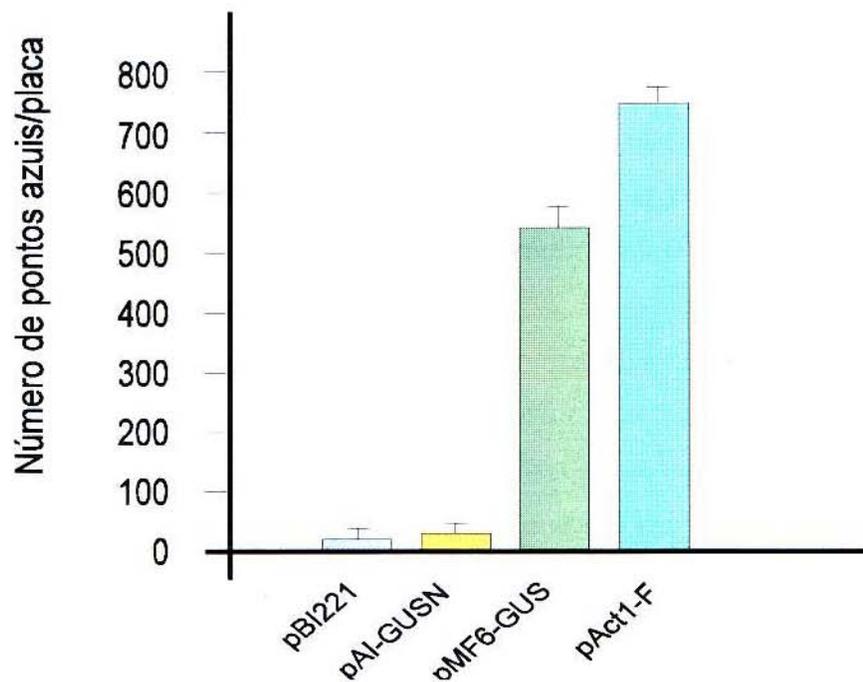


Figura 28 - Efeito dos promotores 35SCaMV, Adh1-Intron1, 35SCaMV-Intron1 e Act1-F na expressão transitória da β -glucuronidase em calos embriogênicos de milho

Calos embriogênicos de milho foram bombardeados com micropartículas co-precipitadas com DNA plasmidial, contendo os vetores pBI221, pAIGUSN, pMF6-GUS e pAct1-F. Utilizou-se uma pressão de 1.200 psi e o tecido alvo foi posicionado a distância correspondente ao nível N3. Foram realizados dois experimentos com três repetições para cada tratamento.

6.6 - Método seletivo de transformação genética de milho através de cultura de tecidos

A partir de calos embriogênicos mantidos em Meio de Cultura N6, foi avaliado o efeito da higromicina e fosfinotricina sobre o crescimento celular. Após inoculação em meio seletivo, procedeu-se à avaliação do efeito do agente seletivo sobre o crescimento dos calos embriogênicos. Porções de calos com aproximadamente 1 a 2 mm foram transferidas para papel Whatman N° 4 depositado em placa de Petri sobre meio de cultura semi-sólido contendo concentrações crescentes de higromicina (0, 10, 20 30, 40 ou 50 mg/l) ou fosfinotricina (0, 0,5, 1, 2, ou 4 mg/l). A cada três dias os filtros foram transferidos para meio de cultura fresco contendo agente seletivo. Concentrações mais baixas pouco inibem o crescimento dos calos de um modo geral, enquanto que concentrações acima de 30 mg de higromicina/l ou 2 mg de fosfinotricina/l inibem consideravelmente o crescimento dos calos em meio de cultura, após três semanas de inoculação. A Figura 29 e Figura 30 mostram os efeitos contrastantes dos agentes seletivos sobre o crescimento dos calos embriogênicos.

Embora seja claro o efeito seletivo dos agentes, ocorreu crescimento de setores celulares mesmo em concentrações elevadas do agente seletivo no meio de cultura. Este fato é bem conhecido em cultura de tecidos, devido a variação somaclonal, ou pela dificuldade de translocação dos agentes seletivos através do tecido, permitindo que muitos setores não sofram a ação seletiva. Embora seja o método utilizado para a transformação de milho, limitando-se a poucos genótipos (Gordon-Kamm *et al.*, 1990; Form *et al.*, 1990; Koziel *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994 e Wan *et al.*, 1995), o sistema seletivo de células em cultura de tecidos tem sido muito trabalhoso, e levado a grandes experimentos sem sucesso na obtenção de plantas transgênicas em milho.

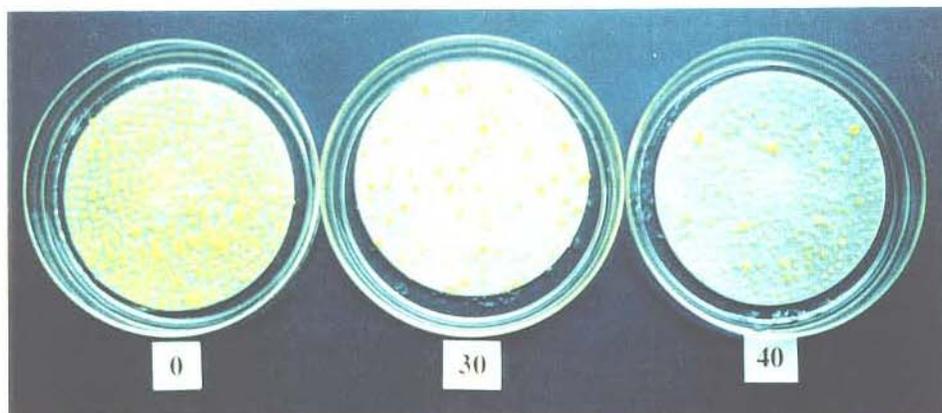


Figura 29 - Efeito da higromicina no crescimento de calos embriogênicos

Porções de calos com aproximadamente 1 a 2 mm foram transferidas para papel Whatman N° 4 depositado em placa de Petri sobre meio de cultura semi-sólido contendo concentrações crescentes de higromicina. A cada três dias os filtros foram transferidos para meio de cultura fresco contendo agente seletivo. Concentrações acima de 30 mg de higromicina/l inibiram consideravelmente o crescimento dos calos, quando comparado com o controle. Setores "tolerantes ao agente seletivo", também conhecidos como "escapes", ocorreram mesmo em tratamentos com altas concentrações do agente seletivo. Apenas os tratamentos contrastantes são mostrados, 0, 30 ou 40 mg de higromicina/l.

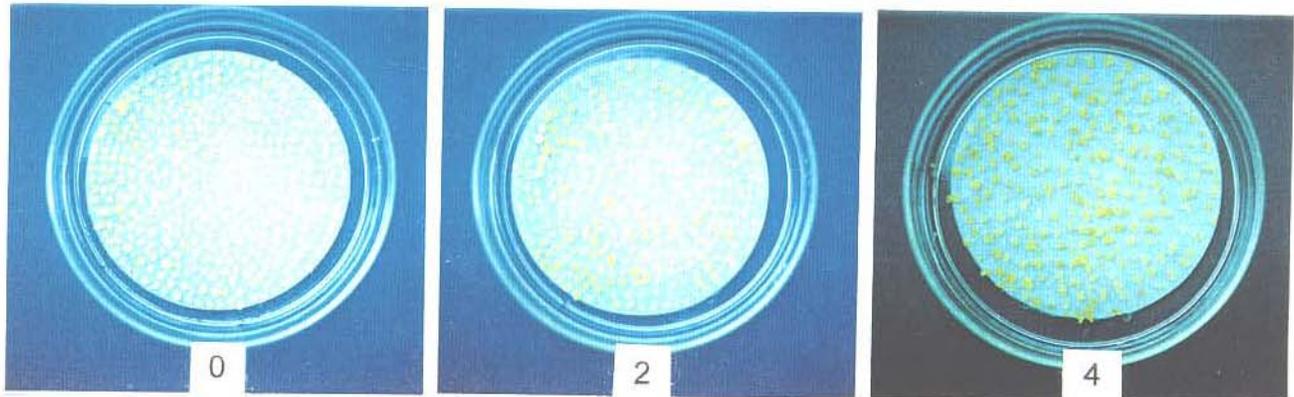


Figura 30 - Efeito da fosfotricina no crescimento de calos embriogênicos

Porções de calos com aproximadamente 1 a 2 mm foram transferidas para papel Whatman N° 4 depositado em placa de Petri sobre meio de cultura semi-sólido contendo concentrações crescentes de fosfotricina. A cada três dias os filtros foram transferidos para meio de cultura fresco contendo agente seletivo. Concentrações acima de 2 mg de fosfotricina/l inibiram consideravelmente o crescimento dos calos, quando comparado com o controle. Setores “tolerantes ao agente seletivo”, também conhecidos como “escapes”, ocorreram mesmo em tratamentos com altas concentrações do agente seletivo. Apenas os tratamentos contrastantes são apresentados, 0, 2 ou 4 mg de fosfotricina/l.

6.7 - Genes reguladores da antocianina como marcadores visuais

A produção do pigmento da antocianina nos tecidos de milho depende da interação de uma série de genes estruturais e reguladores de expressão. Nesta espécie a via biossintética da antocianina é regulada por duas famílias de ativadores transcricionais, as proteínas das famílias gênicas R e C (Ludwig & Wessler, 1990). Na ausência da expressão dos genes das famílias R e/ou C os genes estruturais que codificam as enzimas da via biossintética são silentes e não há o acúmulo do pigmento. Assim, a coexpressão dos genes das famílias R e/ou C é necessária para a formação do pigmento, indiferentemente das proteínas R ou C estarem presentes devido a expressão dos genes endógenos ou através de DNA introduzido (Coe *et al.*, 1988). Assim sendo, possivelmente tanto os genes das famílias R e/ou C podem ser utilizados como marcadores visuais para a transformação de milho, dependendo do genótipo da planta.

A marcação gênica através dos genes das famílias C e R utilizada neste trabalho visou exatamente introduzir reguladores da via biossintética da antocianina para promover a expressão do pigmento em vários tecidos da planta. A começar pela cultura de tecidos de milho, transformando-se células de calos embriogênicos com os genes *c1* e/ou *bperu* possivelmente seriam obtidos setores transgênicos facilmente identificados pelo fenótipo. Numa segunda etapa, as plântulas recém regeneradas poderiam apresentar um padrão de pigmentação diferenciado. Finalmente, plantas adultas e as sementes originadas destas plantas poderiam também apresentar fenótipo vermelho ou púrpura, devido ao acúmulo de antocianina em várias partes da planta ou semente. Esta marcação visual permitiria facilmente identificar possíveis eventos de transformação gênica.

Com a finalidade de verificar passo a passo a expressão da antocianina, desde a cultura de tecidos, primeiros estágios da regeneração, até a obtenção de plantas e sementes, procedeu-se à uma série de estudos de caracterização genotípica e de expressão temporal e espacial dos genes reguladores da via biossintética da antocianina.

6.7.1 - Caracterização genotípica dos reguladores da biossíntese da antocianina em calos de milho através de transformação com os genes *c1* e *bperu*

Usando os procedimentos de bombardeamento com micropartículas, células vermelhas puderam ser detectadas em calos embriogênicos de milho. Para caracterizar o genótipo dos calos embriogênicos CAT100-6 x F1 (Hill-A x Hill-B) utilizou-se as construções contendo os genes para as respectivas proteínas transativadoras. As micropartículas foram co-precipitadas com os vetores de expressão gênica p35SI-C1 e p35SI-Bperu. Estes vetores contêm os genes *c1* e *bperu* que codificam proteínas transativadoras pertencentes as famílias gênicas C e R respectivamente.

Placas de Petri contendo calos embriogênicos de milho foram bombardeadas com micropartículas contendo os vetores p35SI-C1, p35SI-Bperu independentemente ou juntos na proporção 1:1. A expressão transitória nos calos bombardeados foi visualizada rapidamente. Células vermelhas puderam ser detectadas com até 12 horas de manutenção na câmara de crescimento e com 24 horas grande quantidade de células foram evidenciadas com coloração púrpura acentuada. O acúmulo de antocianina não foi observado quando introduzido somente o gene *c1* nas células dos calos (Figura 31-A), o mesmo ocorrendo com o gene *b-peru* (Figura 31-B).

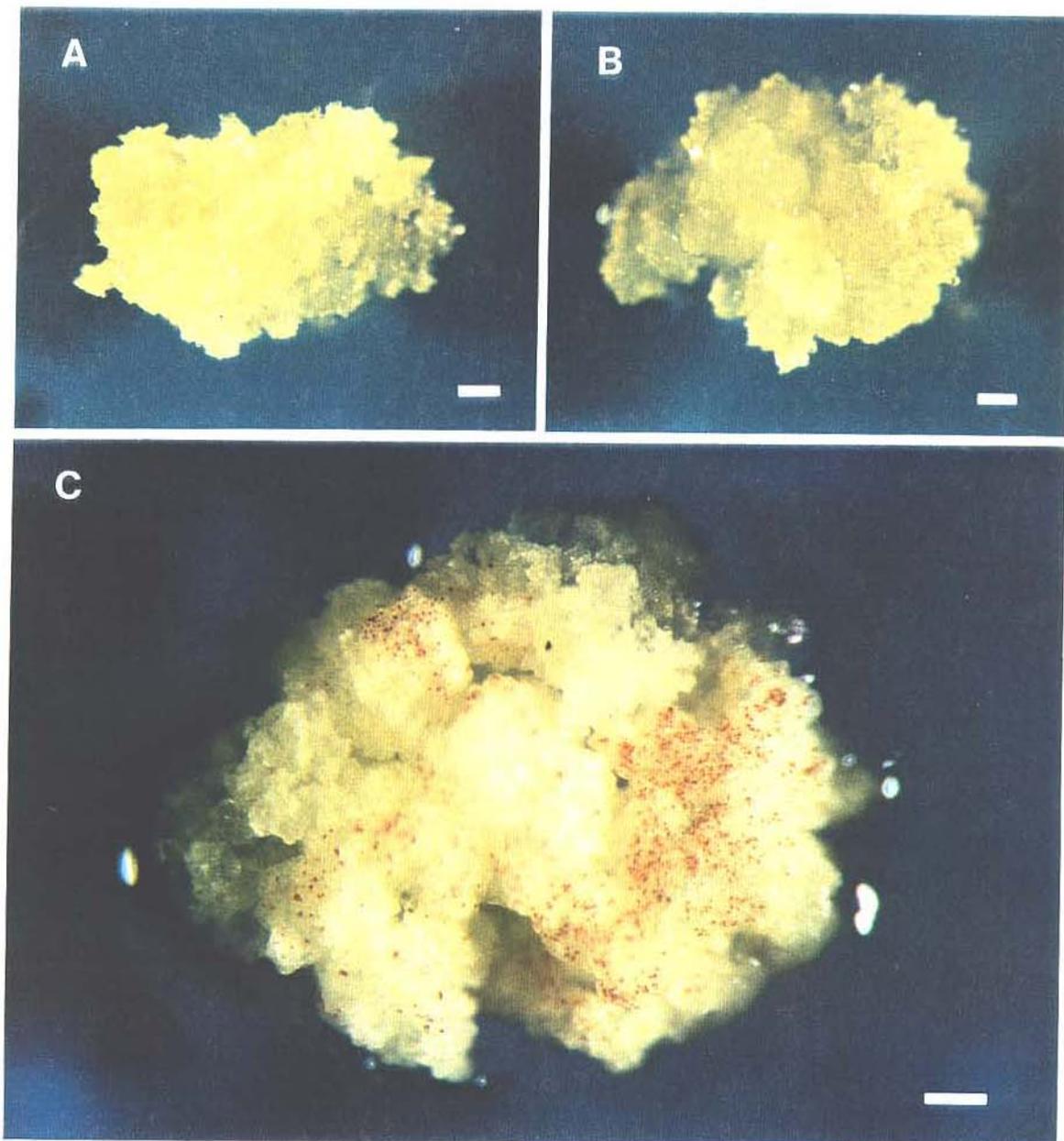


Figura 31 - Expressão dos genes reguladores da via biossintética da antocianina em calos embriogênicos de milho

Calos embriogênicos de milho foram bombardeados com micropartículas co-precipitadas com DNA plasmidial contendo os vetores p35SI-C1 e p35SI-Bperu. (A) Calo bombardeado com o vetor de expressão p35SI-C1. (B) Calo bombardeado com o vetor de expressão p35SI-Bperu e (C) Calo bombardeado com uma mistura 1:1 dos vetores p35SI-C1 e p35SI-Bperu. A biossíntese de antocianina só ocorreu na presença dos dois genes reguladores. Barra = 1 mm

Por outro lado, observou-se o acúmulo da antocianina em calos embriogênicos CAT100-6 x F₁ (Hill-A x Hill-B) quando os genes *c1* e *bperu* foram introduzidos nas células simultaneamente (Figura 31-C). Assim sendo, ficou estabelecido que para os experimentos de transformação de calos ou estudo de expressão gênica em calos, o acúmulo de antocianina para o genótipo CAT100-6 x F₁ (Hill-A x Hill-B) é dependente da introdução dos dois genes reguladores da via biossintética da antocianina, *c1* e *bperu*.

6.7.2 - Acúmulo de antocianina durante o processo de regeneração das plantas

Tendo sido caracterizado o genótipo dos reguladores da via biossintética da antocianina em calos embriogênicos, passou-se a averiguar a expressão transitória destes genes durante o processo de regeneração, para monitorar precocemente a transformação gênica logo nos primeiros estágios de desenvolvimento das plantas. Utilizando-se os vetores p35SI-C1 e p35SI-Bperu nas preparações de micropartículas, plântulas recém regeneradas foram bombardeadas e mantidas em câmara de crescimento durante 48 horas. A pigmentação vermelha foi observada em várias partes da plântula devido ao acúmulo da antocianina (Figura 32). A maior frequência de expressão ocorreu no escutelo, sendo observada a transformação das células epidérmicas do coleóptile e folhas. Assim sendo, nos experimentos de transformação estável, seria esperado a visualização abundante da antocianina nos referidos tecidos, resultante da introdução dos genes *c1* e *bperu* logo nos primeiros estágios da regeneração, podendo discriminar-se facilmente as plântulas transgênicas pela coloração púrpura.



Figura 32 - Expressão dos genes reguladores da via biossintética da antocianina em plântulas em processo de regeneração

Plântulas em início de regeneração foram bombardeadas com micropartículas co-precipitadas com DNA plasmidial contendo os vetores p35SI-C1 e p35SI-Bperu. A expressão ocorreu predominantemente nas células do escutelo, sendo também observada a pigmentação na epiderme do coleóptile e das primeiras folhas. As setas indicam pontos de acúmulo de antocianina. Barra = 1 mM

6.7.3 - Acúmulo de antocianina durante o desenvolvimento das sementes imaturas de milho

O acúmulo da antocianina ocorre em diversos tecidos da semente de milho dependendo do genótipo: pericarpo, camada de aleurona e subaleurona, escutelo e eixo embrionário, sendo que sua biossíntese ocorre nos últimos estágios do desenvolvimento das sementes. Para avaliar a expressão dos genes *c1* e *bperu* nas sementes de milho, procedeu-se à transformação celular das sementes imaturas de milho bombardeando as com os vetores de expressão p35SI-C1 e p35SI-Bperu.

As espigas de milho CAT100-6 x F1(Hill-A x Hill-B) foram coletadas 13 dias após a polinização, esterilizadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio 5% e lavadas em água estéril várias vezes. As sementes foram destacadas da espiga e cortadas ao meio no sentido látero-longitudinal. Placas de Petri contendo Meio de Cultura MS foram montadas, contendo 16 metades de semente, e bombardeadas. Após os disparos, as sementes foram mantidas a 28°C em câmara de crescimento, no escuro e em ambiente com alta umidade evitando-se desta forma o dessecação das faces expostas ao ar devido ao corte das sementes.

As células vermelhas foram observadas com 12 a 24 horas após o bombardeamento com micropartículas, devido ao acúmulo de antocianina (Figura 33-B). Observou-se grande quantidade de células expressando antocianina na camada de aleurona e toda a região da subaleurona. Células do pericarpo, escutelo e embrião também apresentaram acúmulo do pigmento.

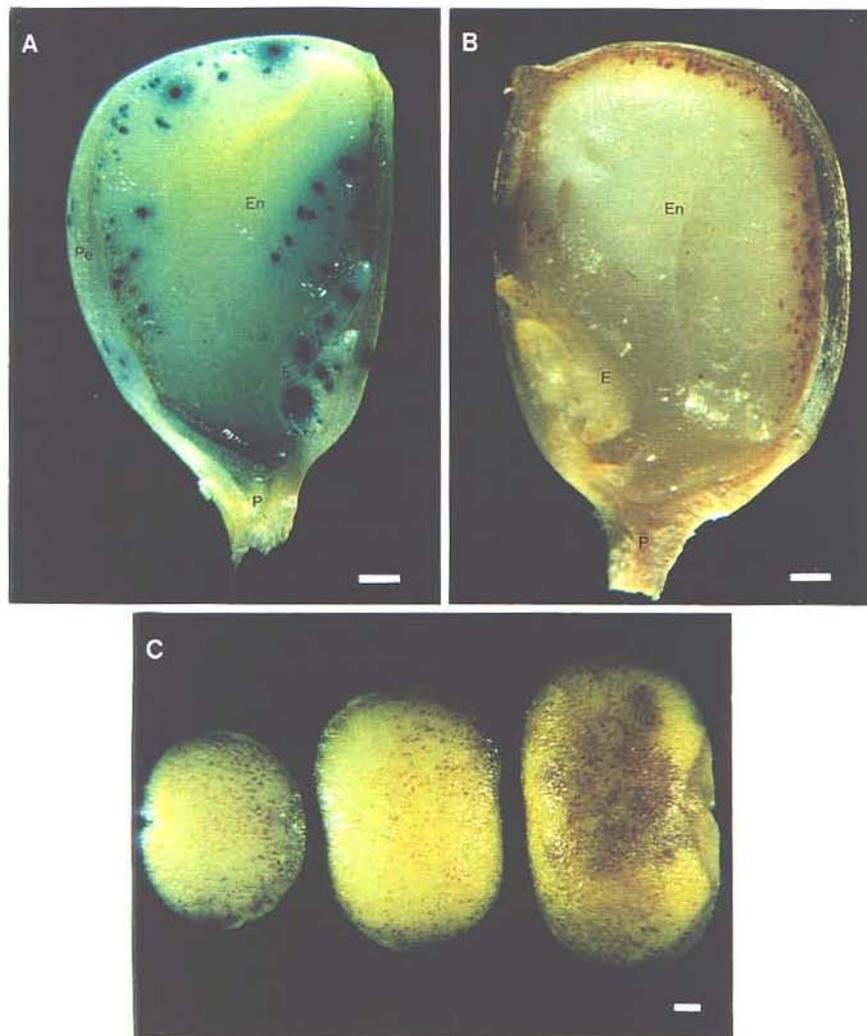


Figura 33 - Expressão dos genes reguladores da via biossintética da antocianina em sementes

Sementes imaturas de milho, CAT100-6 x F1(Hill-A x Hill-B) 13 dias após a polinização, foram cortadas no sentido longitudinal-frontal e bombardeadas com micropartículas co-precipitadas com DNA plasmidial (A) Controle de transformação, semente bombardeada com o vetor pAct1-F, mostrando atividade em todos os tecidos da semente, inclusive nas células do interior do endosperma. (B) Semente bombardeada com os vetores p35SI-C1 e p35SI-Bperu. Nota-se que a expressão no endosperma localiza-se exclusivamente nas camadas de aleurona e subaleurona. Podendo observar-se também no pericarpo e escutelo. (C) A porção distal de sementes 13, 18 e 23 dias após a polinização. E = embrião, En = endosperma, P = pedicelo e Pe = pericarpo. Barra = 0,5 mm

Para avaliar a expressão temporal da antocianina durante o desenvolvimento das sementes utilizou-se as células da camada de aleurona. Espigas de milho CAT100-6 x F1(Hill-A x Hill-B) 13, 18 e 23 dias após a polinização foram colhidas e esterilizadas superficialmente. A parte distal das sementes foi cortada e o pericarpo removido cuidadosamente para expor a camada de aleurona a ser bombardeada com micropartículas co-precipitadas com os vetores p35SI-C1 e p35SI-Bperu (Figura 33-C). Verificou-se o acúmulo de antocianina os três estágios de desenvolvimento da sementes. No estágio mais avançado de 23 dias após a polinização, o bombardeamento com micropartículas danificou parte do tecido, embora não tenha inviabilizado a transformação e expressão gênica das células. Desta forma fica evidente que sementes de plantas transgênicas contendo os genes *c1* e *b-peru* possivelmente seriam púrpuras devido ao acúmulo de antocianina durante o desenvolvimento das sementes.

6.8 - Transformação estável de calos embriogênicos com os genes *c1* e *bperu*

Tendo sido caracterizado o genótipo com relação aos genes reguladores *c1* e *b-peru* da via biossintética da antocianina e verificada a continuidade da expressão do marcador visual, desde os primeiros estágios da regeneração das plântulas até os estágios finais do desenvolvimento das sementes, procedeu-se aos experimentos de transformação com as construções dos genes *c1* e *bperu*.

6.8.1 - Obtenção de calos apresentando acúmulo de antocianina

Placas de Petri contendo Meio de Cultura N6 foram montadas contendo 25 calos embriogênicos CAT100-6 x F1(Hill-A x Hill-B) de aproximadamente 5 milímetros de diâmetro. O experimento foi realizado em dias consecutivos procurando variar os tratamentos de disparo. Os calos foram mantidos em câmara de crescimento a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ e no escuro para as subculturas. Logo nas primeiras 24 horas, as células vermelhas puderam ser visualizadas indicando o acúmulo de antocianina mediada pelos genes introduzidos (Figura 34-A). As culturas foram observadas diariamente para a identificação dos possíveis setores transgênicos. Nas semanas subseqüentes, inicialmente verificou-se o desenvolvimento natural dos calos e a proliferação de algumas células e setores vermelhos (Figura 34-B e Figura 34-C). Posteriormente, foi possível o isolamento de calos inteiros com acúmulo de antocianina (Figura 34-D). Estando esta característica correlacionada diretamente com o sistema de transformação empregado neste trabalho, passou-se a considerar a ocorrência de transformação estável para os tecidos que proliferaram e mantiveram a característica, ao longo das subculturas.

6.8.2 - Regeneração de plantas a partir de tecidos apresentando alta expressão de antocianina

Todo tecido bombardeado com os vetores contendo os genes *c1* e *bperu* que apresentaram desenvolvimento normal na cultura de tecidos foi submetido ao processo de regeneração transferido para de Meio de Regeneração MS e exposto à luz. Observou-se o acúmulo acentuado de antocianina de forma generalizada nos tecidos, logo no primeiro ou segundo

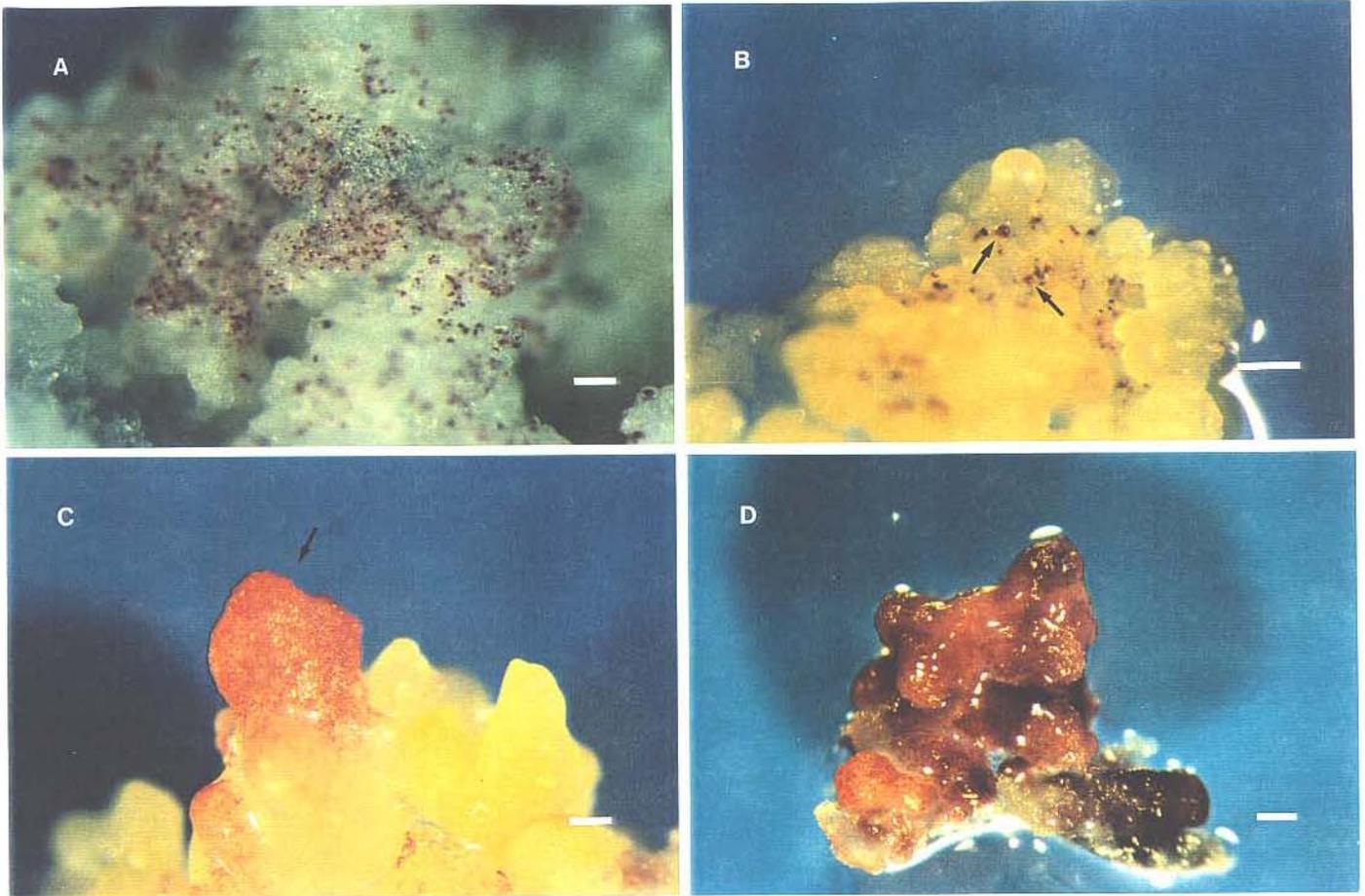


Figura 34 - Transformação de calos embriogênicos com os genes reguladores da via biossintética da antocianina

Calos embriogênicos foram bombardeadas com micropartículas co-precipitadas com DNA plasmidial contendo os vetores p35SI-C1 e p35SI-Bperu na proporção de 1:1 e mantidos em câmara de crescimento. (A) Calos embriogênicos 12 horas após o bombardeamento. (B) Calos embriogênicos com algumas semanas de crescimento após o bombardeamento. As setas apontam glúmulos celulares que deram origem a setores transgênicos. (C) Setores transgênicos acumulando antocianina. (D) Calos transgênicos acumulando antocianina. Barra = 0,5 mm

dia do processo de regeneração. Após uma ou duas semanas, setores e calos inteiros tornaram-se vermelhos devido ao acúmulo de antocianina (Figura 35-A). Em continuidade ao processo de regeneração, várias plântulas foram obtidas, sendo que algumas delas apresentaram acúmulo de antocianina, principalmente nos estágios iniciais da regeneração (Figura 35-B, C, D e E).

A Tabela 3 mostra os resultados deste experimento, desde os tratamentos e a eficiência de transformação até a obtenção das plantas regeneradas, a partir dos setores considerados transgênicos. Quinhentas e oito plantas foram obtidas a partir de calos embriogênicos bombardeados com micropartículas. Durante o experimento alternou-se os vetores utilizados, a quantidade, o nível e a pressão dos disparos. A eficiência de expressão transitória estimada pelo número de células vermelhas observado por placa variou consideravelmente. Basicamente pode-se destacar um grupo de tratamentos com baixa eficiência de até aproximadamente 800 células vermelhas por placa. Um outro grupo intermediário que oscilou em torno de 4.000 células vermelhas por placa e um grupo com alta eficiência, sendo de aproximadamente 13.000 células vermelhas por placa.

Todos os tecidos bombardeados foram mantidos considerando que uma baixa eficiência de expressão transitória pode ocorrer, basicamente, devido a duas possibilidades. Primeira, quando poucas micropartículas atingem velocidade suficiente para penetrarem nas células. Nesta condição, apenas as células mais superficiais e em menor número são atingidas. Segunda, quando emprega-se condições mais severas de disparo, as micropartículas são aceleradas excessivamente, destruindo as células mais superficiais e atingindo em menor número as células mais profundas. Nesta condição, embora a eficiência de expressão transitória seja reduzida, ainda resta a possibilidade de transformação estável, pois em milho as células

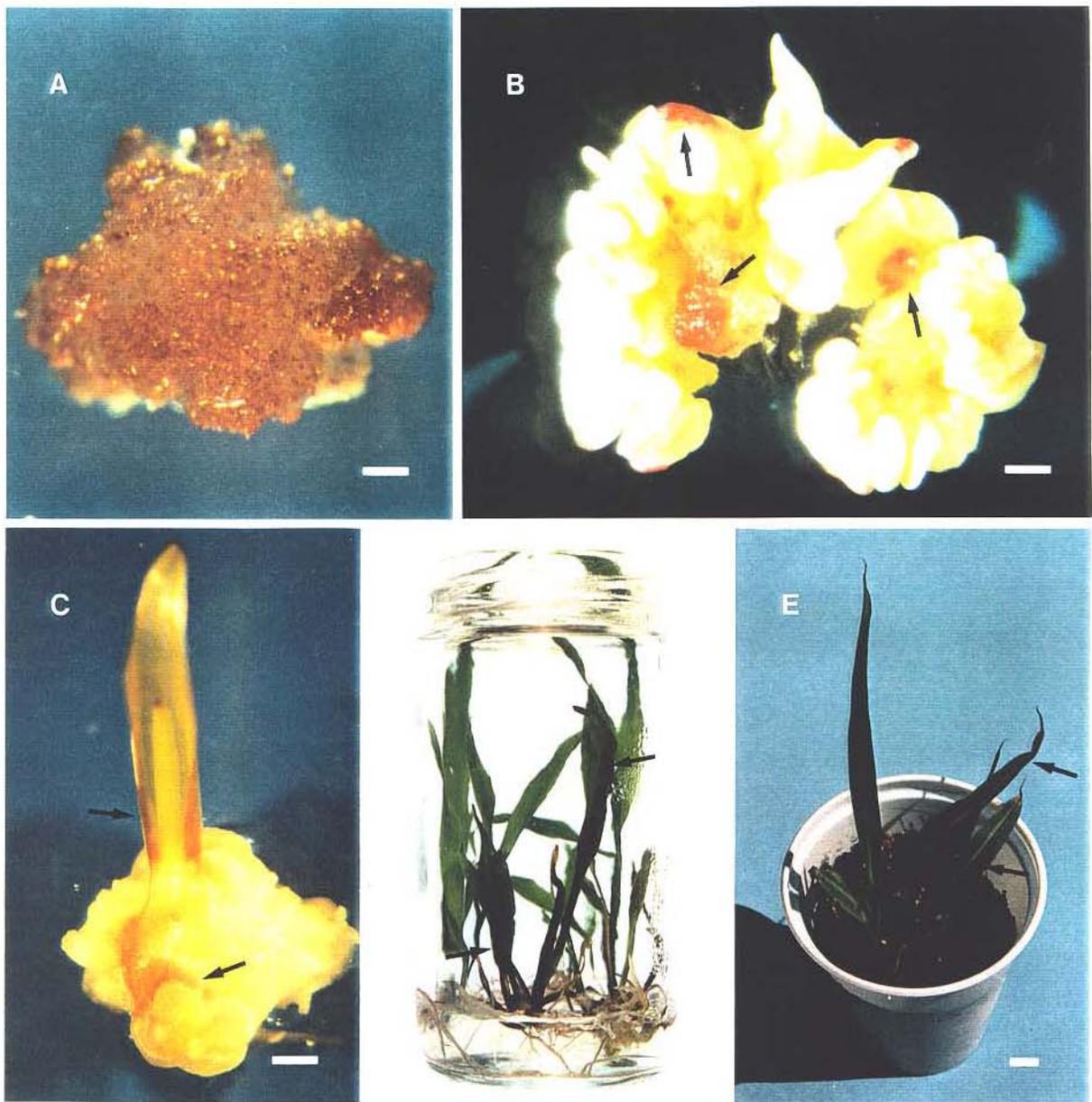


Figura 35 - Regeneração de plantas a partir de calos transformados com genes reguladores da via biossintética da antocianina

(A) Calos transgênicos acumulando antocianina transferidos para meio de regeneração (Barra = 0,5 mm). (B) Formação de embriões a partir dos calos mostrando regiões com acúmulo de antocianina (Barra = 0,5 mm). (C) Plântulas em processo de regeneração mostrando acúmulo de antocianina no escutelo e coleóptile (Barra = 0,5 mm). (D) Plântulas regeneradas mostrando folhas com acúmulo de antocianina (Barra = 1 cm). (E) Planta no estágio de climatização apresentando folhas com acúmulo de antocianina (Barra = 1 cm).

Tabela 3 - Transformação de calos embriogênicos com os genes marcadores visuais

	Tratamento	Número e Nível de disparo	Pressão (psi)	Nº de células vermelhas por placa	Nº de plantas obtidas por tratamento
1	p35SC1 + p35SI-Bperu	2xN1	800	685	30
2	p35SC1 + p35SI-Bperu	2xN1	800	199	18
3	pAct-C1+ pAct-Bperu	2xN1	800	522	8
4	p35SC1 + p35SI-Bperu	2xN2	800	445	20
5	p35SC1 + p35SI-Bperu	2xN2	800	392	φ
6	pAct-C1+ pAct-Bperu	2xN2	800	724	φ
7	p35SC1 + p35SI-Bperu	2xN3	800	417	4
8	p35SC1 + p35SI-Bperu	2xN3	800	627	φ
9	pAct-C1+ pAct-Bperu	2xN3	800	426	φ
10	p35SC1 + p35SI-Bperu	2xN2	1.600	171	φ
11	pAct-C1+ pAct-Bperu	2xN2	1.600	14	φ
12	pAct-C1+ pAct-Bperu	2xN2	1.600	15	φ
13	pAct-C1+ pAct-Bperu	3xN2	1.200	4.679	6
14	pAct-C1+ pAct-Bperu	2xN2	1.200	φ	φ
15	pAct-C1+ pAct-Bperu	4xN2	1.200	4.168	60
16	pAct-C1+ pAct-Bperu	3xN4	1.600	φ	φ
17	pAct-C1+ pAct-Bperu	3xN4	1.600	φ	φ
18	pAct-C1+ pAct-Bperu	2xN2	1.600	3.663	φ
19	pAct-C1+ pAct-Bperu	4xN3	1.200	12.129	116
20	pAct-C1+ pAct-Bperu	2xN2	1.200	5.030	38
21R1	pAct-C1+ pAct-Bperu	2xN2	1.600	807	φ
21R2	pAct-C1+ pAct-Bperu	2xN2	1.600	722	φ
22R1	pAct-C1+ pAct-Bperu	2xN3	1.200	12.748	46
22R2	pAct-C1+ pAct-Bperu	2xN3	1.200	12.552	44
22R3	pAct-C1+ pAct-Bperu	1xN3	1.600	621	φ
22R4	pAct-C1+ pAct-Bperu	1xN3	1.600	4.145	φ
23	p35SC1 + p35SI-Bperu	2xN3	1.200	12.854	54
24	p35SC1 + p35SI-Bperu	2xN3	1.200	13.306	30
25	p35SC1 + p35SI-Bperu	2xN3	1.600	557	2
26	p35SC1 + p35SI-Bperu	2xN3	1.600	752	φ
27	p35SC1 + p35SI-Bperu	3xN3	1.600	652	2
28	p35SC1 + p35SI-Bperu	3xN3	1.600	346	φ
29	p35SC1 + p35SI-Bperu	4xN3	1.200	13.611	28
30	p35SC1 + p35SI-Bperu	5xN3	1.600	617	2
Total de plantas obtidas					508

φ zero

totipotentes ocorrerem exatamente nas camadas mais profundas (Franz & Schel, 1987; Franz & Schel; 1990 e Birch & Franks, 1991).

6.8.3 - Acúmulo de antocianina nas plantas regeneradas

Durante o processo de regeneração procurou-se observar cuidadosamente alguma característica que se relacionasse diretamente com a expressão dos genes introduzidos através do bombardeamento com micropartículas e que não ocorresse nas plantas controles. Observou-se freqüentemente forte acúmulo de antocianina nas pontas das raízes (Figura 36-B). Algumas plantas apresentaram estigmas roxos, os quais naturalmente são amarelos para o genótipo utilizado para inoculação dos embriões durante o estabelecimento das culturas e observados nas plantas regeneradas (Figura 36-D). Além disso, outras plantas apresentaram acúmulo de antocianina nas sementes, o que jamais ocorreu nas plantas controles (Figura 36-F).

A Tabela 4 apresenta uma relação das plantas com padrão diferenciado de acúmulo de antocianina contrastando-se com os controles. Cabe salientar que a característica estigma roxo mostrou-se bizarra. A planta P170-2 apresentou um único estigma roxo, a planta P170-3 apresentou aproximadamente 50% dos estigmas roxos e a planta P217-3, apresentou uma fase do desenvolvimento com os estigmas roxos e uma segunda fase com os estigma amarelos.

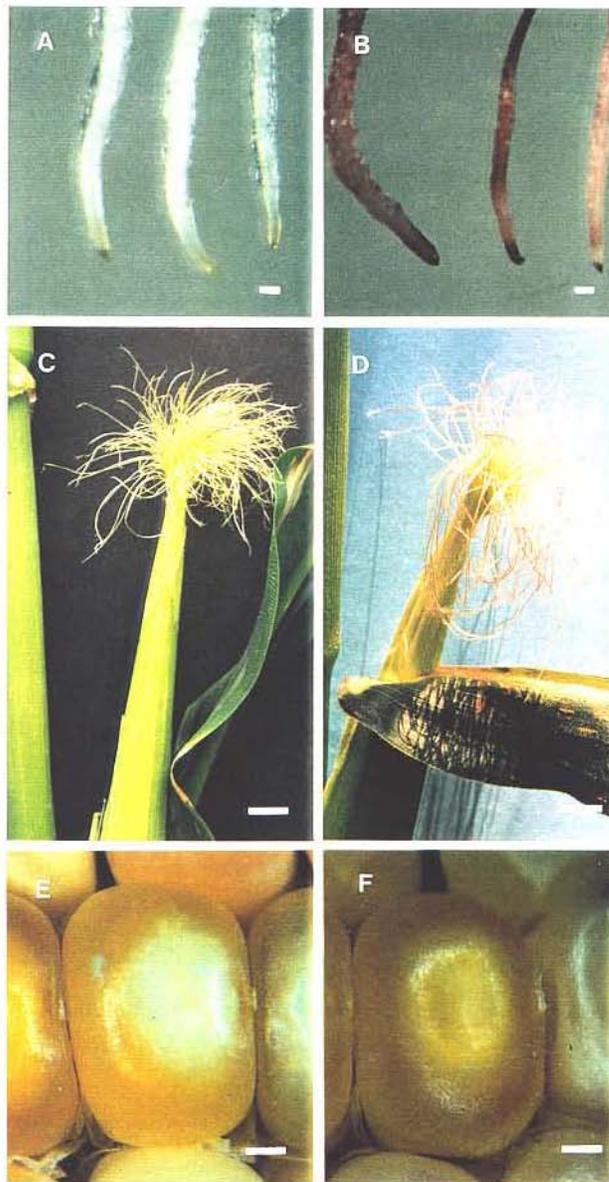


Figura 36 - Acúmulo de antocianina nas plantas regeneradas partir de calos transformados com genes reguladores da via biossintética da antocianina

(A) Pontas de raízes de plantas controles, mostrando a ausência de antocianina (Barra = 1 mm). (B) Pontas de raízes de plantas regeneradas a partir de calos transformados com os vetores p35SI-C1 e p35SI-Bperu apresentando acúmulo de antocianina (Barra = 1 mm). (C) Espiga de planta controle apresentando estigmas com ausência de antocianina (Barra = 1 cm). (D) Espigas de planta regenerada a partir de calos transformados com os vetores p35SI-C1 e p35SI-Bperu apresentando acúmulo de antocianina nos estigmas (Barra = 1 cm). (E) Sementes de planta controle, mostrando a ausência de antocianina (Barra = 1 mm). (F) Sementes de planta regenerada a partir de calos transformados com os vetores p35SI-C1 e p35SI-Bperu apresentando acúmulo de antocianina (Barra = 1 mm).

Tabela 4 - Plantas que apresentaram expressão de antocianina contrastando com o controle.

Planta	Tratamento*	Característica	Observação
P170-2	23	Estigma roxo	A planta apresentou um estigma roxo.
P170-3	23	Estigma roxo	A planta apresentou 50% dos estigmas roxos.
P217-3	29	Estigma roxo	A planta apresentou uma fase com os estigmas roxos e depois outra fase com os estigmas amarelos.
P168	23	Semente roxa	A espiga apresentou 52 sementes roxas.
P195	18	Semente roxa	A espiga apresentou 18 sementes roxas.
P133	15	Ponta de raiz roxa	
P178-3	22R2	Ponta de raiz roxa	
P215	29	Ponta de raiz roxa	
P241	24	Ponta de raiz roxa	

* tratamentos referentes à Tabela 3

6.8.4 - Análise molecular das plantas regeneradas de calos bombardeados com os genes *c1* e *bperu*

Sementes obtidas a partir de autofecundação das plantas regeneradas, que tiveram o padrão diferenciado do acúmulo de antocianina, foram germinadas e as plântulas utilizadas para extração de DNA genômico. Quinze microgramas de DNA de cada amostra foram digeridos com a enzima de restrição Xho I. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 0,8% e transferidos para membranas de nylon e hibridizados com a sonda C1-0,8 Kb (Figura 37).

As amostras 1 e 2, consideradas controles de hibridização, correspondem ao vetor p35SI-C1 digerido com a enzima de restrição Xho I, equivalem a uma e dez cópias por genoma respectivamente. Observou-se hibridização entre a sonda utilizada e o fragmento de 870 pb, separado do vetor utilizado para introduzir DNA através do bombardeamento de calos embriogênicos. A amostra 3 corresponde ao controle negativo, representa plantas regeneradas a partir de calos não bombardeados. As amostras de 4 a 12 correspondem às plantas analisadas. A presença do fragmento de 870 pb não foi observado nas amostras testadas para comprovação de transformação estável neste experimento.

A ocorrência de estigmas roxos nas plantas P170-2, P170-3 e P217-3, relacionadas na Tabela 4, foi considerada uma variação do tecido materno, não tendo correlação com o sistema de transformação empregado. Por outro lado, a ocorrência de sementes roxas nas espigas das plantas P168 e P195, relacionadas na Tabela 4, apresentou-se como forte indicação da integração do gene *c1*. As sementes apresentaram acúmulo de antocianina na camada de aleurona de forma segregante instável, sugerindo silenciamento da expressão gênica durante a formação dos gametas. Este fato é comum em

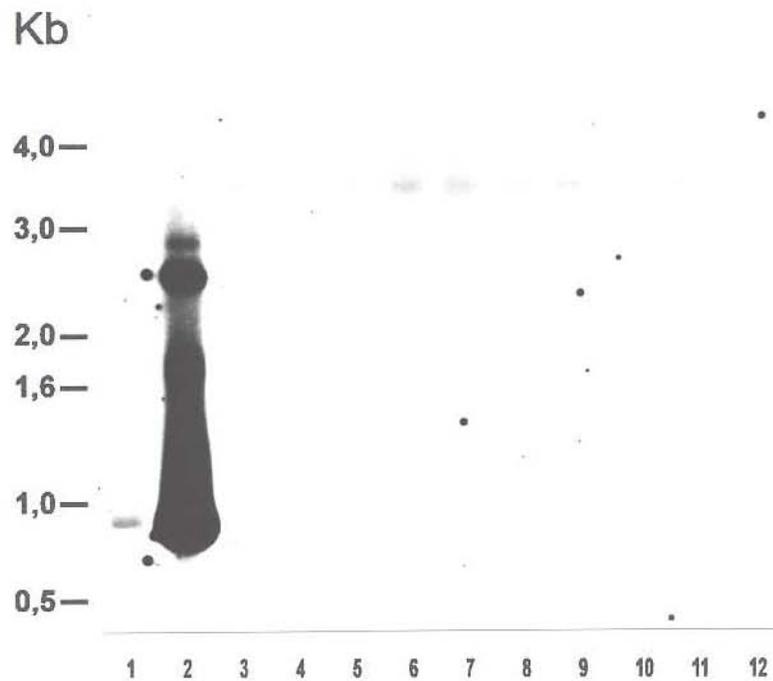


Figura 37 - “Southern blot” das plantas regeneradas de calos bombardeados com os genes *c1* e *bperu*

Amostras de DNA digeridas com enzima de restrição Xho I. (1) Vetor p35SI-C1, uma cópia por genoma. (2) Vetor p35SI-C1, dez cópias por genoma. (3) Planta controle regenerada a partir de calos embriogênicos não bombardeados. (4 a 12) DNA extraído das progênies das plantas que tiveram o padrão de acúmulo de antocianina alterado. Observa-se que nenhuma das progênies testadas apresentou o fragmento de 0,87 Kb presente no vetor pRT101O2.

transgênese de plantas (Jorgensen 1991 e 1993; Spencer *et al.* 1992; Register III *et al.*, 1994 e Finnegan & McElroy, 1994). Enfim, com os resultados da análise de “Southern blot”, evidenciou-se que o acúmulo de antocianina, nas plantas regeneradas e nas sementes obtidas, deveu-se a algum fator epigenético, ou mesmo genético, não diretamente relacionado com a presença do gene *c1*, conforme esperado neste experimento.

A utilização desta estratégia para obtenção de plantas transgênicas de milho foi considerada vantajosa por empregar uma marcação visual, agilizando-se o processo seletivo na cultura de tecidos, além de reduzir consideravelmente o número de plantas a serem analisadas molecularmente. Possivelmente plantas transgênicas de milho poderão ser obtidas se assegurarmos a integração do gene *c1* nas células regenerativas, o que pareceu não ter ocorrido durante a cultura de tecidos.

6.9 - Desenvolvimento da transformação de pólen

Hamilton *et al.* (1992) demonstraram a expressão de GUS em grãos de pólen de milho a partir de plantas, 2 a 3 dias antes da deiscência. Os grãos de pólen foram espalhados sobre meio de cultura e bombardeados com micropartículas contendo o vetor ZM13-100-GUS-NOS, sendo o ZM13-100 um promotor pólen-específico de milho. Entretanto, este protocolo não foi considerado satisfatório experimentalmente para desenvolver um sistema de transformação de milho. Os grãos de pólen se romperam facilmente, além de se encontrarem em estágio pré-maturo para a germinação e possível fertilização de plantas.

Neste trabalho, a despeito das dificuldades citadas, grãos de pólen de milho puderam ser testados como modelo para a transformação via

bombardeamento com micropartículas. Isto foi possível por ter sido idealizado e construído um dispositivo para o bombardeamento de grãos de pólen maduros. A recuperação dos grãos de pólen, após o bombardeamento, permitiu avaliações de parâmetros intrínsecos ao bombardeamento e fertilização de plantas receptoras em condições de campo experimental. Foi possível demonstrar a expressão de GUS em grãos de pólen a partir de plantas deiscuentes, utilizando-se a construção pAct1-F. Além disso, recorrendo-se às construções gênicas para milho, contendo promotores específicos e constitutivos fundidos a genes marcadores, desta forma importantes passos necessários no desenvolvimento desta tecnologia foram elucidados.

6.9.1 - Efeito do trauma físico e choque acústico gerado pelo acelerador de micropartículas sobre os grãos de pólen

Embora o método biolístico tenha sido rapidamente adotado para uma variedade de novas aplicações, claramente se vê a necessidade de melhorar esta tecnologia para torná-la mais eficiente. Para muitas espécies de plantas, a expressão transitória é relativamente fácil de se obter, mas normalmente apenas uma pequena parte das células que recebe as micropartículas mantém a sua viabilidade. Um dos fatores limitantes para recuperação de transformantes estáveis é a injúria sofrida pelas células durante os disparos.

O pólen de milho consiste de um excelente material para verificar-se o efeito do trauma físico e choque acústico gerado pelo acelerador de micropartículas. As células podem ser visualizadas individualmente, facilitando desta forma uma avaliação de sua viabilidade após o bombardeamento através da capacidade de germinação e alongamento do tubo polínico.

Neste trabalho, foram realizados bombardeamentos com e sem micropartículas, mantendo-se no nível 2 e variando-se as pressões de disparo. Verificou-se que a injúria causada influenciou a taxa de germinação dos grãos de pólen. O bombardeamento com 800 psi de pressão reduziu em 24% o número de grãos de pólen germinados, sendo de 264,83 (SD12,47) para 187,83 (SD28,25). O bombardeamento a 1.200 psi e 1.600 psi teve um efeito drástico, reduzindo 49% (135,33 SD16,53) e 56% (118,00 SD20,82) a taxa de germinação dos grãos de pólen, respectivamente (Figura 38).

O choque acústico, gerado pelo acelerador de micropartículas, pode ser avaliado quando os grãos de pólen foram submetidos às mesmas condições de disparo, porém sem utilização das micropartículas de ouro. O tratamento com 800 psi reduziu 33% a taxa de germinação dos grãos de pólen, sendo de 263,17 (SD21,37) para 174,83 (SD26,14). Os tratamentos com 1.200 psi e 1.600 psi pouco diferiram do tratamento com 800 psi, sendo 34% (173,50 SD24,46) e 38% (162,17 SD33,74) (Figura 37). Nota-se que com o disparo, o choque acústico gerado pela onda de gás hélio reduz a taxa de germinação dos grãos de pólen, embora não haja diferença entre os diferentes tratamentos. Por outro lado, foi possível comparar os tratamentos contendo ou não as micropartículas. Observou-se que a taxa de germinação dos grãos de pólen, em parte é reduzida devido ao choque acústico, e em parte devido ao trauma físico gerado pelas micropartículas. Este fato foi evidenciado nos tratamentos com 1.200 psi e 1.600 psi, o aumento da pressão tende a reduzir a viabilidade dos grãos de pólen.

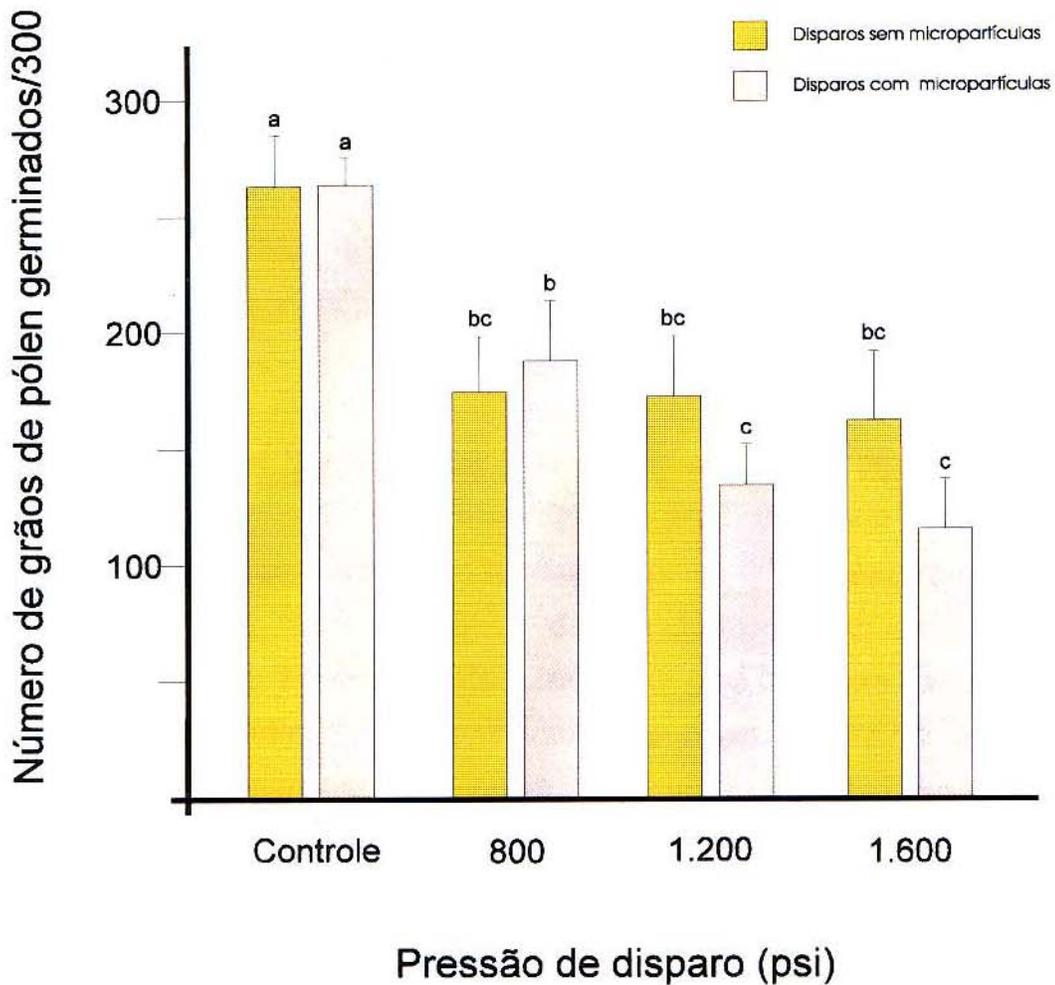


Figura 38 - Efeito do trauma físico e do choque acústico gerado pelo acelerador de micropartículas sobre os grãos de pólen.

Grãos de pólen maduros de milho foram bombardeadas com e sem micropartículas, utilizando-se o nível 2 e diferentes pressões de disparo. O trauma físico gerado pelas micropartículas reduziu drasticamente a germinação dos grãos de pólen, sendo em parte devido ao choque acústico gerado pelo acelerador de micropartículas. Controle = número de grãos de pólen germinados/300 sem disparar. Dados obtidos a partir de dois experimentos com três repetições para cada tratamento. Diferenças estatísticas a nível de 5% em Teste SNK (Steel & Torrie, 1980).

6.9.2 - Determinação da eficiência de transformação dos grãos de pólen

Nenhum dado tem sido relatado na literatura científica sobre a eficiência de transformação de grãos de pólen de milho. Visando melhorar as chances de sucesso na obtenção de plantas transgênicas, desejou-se avaliar e incrementar ao máximo a eficiência de transformação. Tomou-se indispensável a definição de parâmetros físicos e biológicos de otimização do sistema.

A eficiência de transformação de grãos de pólen de milho foi determinada através da expressão transitória de GUS, utilizando-se o vetor pZm13-GN. Os grãos de pólen foram bombardeados a diferentes pressões e níveis de disparo. A maior frequência de transformação foi de 0,69%, observada para o Nível 2 e pressão de 1.600 psi (Figura 39). Esta frequência de transformação obtida, embora aparentemente baixa, estava de acordo com os resultados disponíveis na literatura. Nishihara *et al.* (1993) relataram uma taxa de 0,74% de transformação de grãos de pólen de *Lilium longiflorum*, bombardeados com o vetor pLAT52-GUS, sendo LAT52 um promotor tecido-específico de antera de tomate.

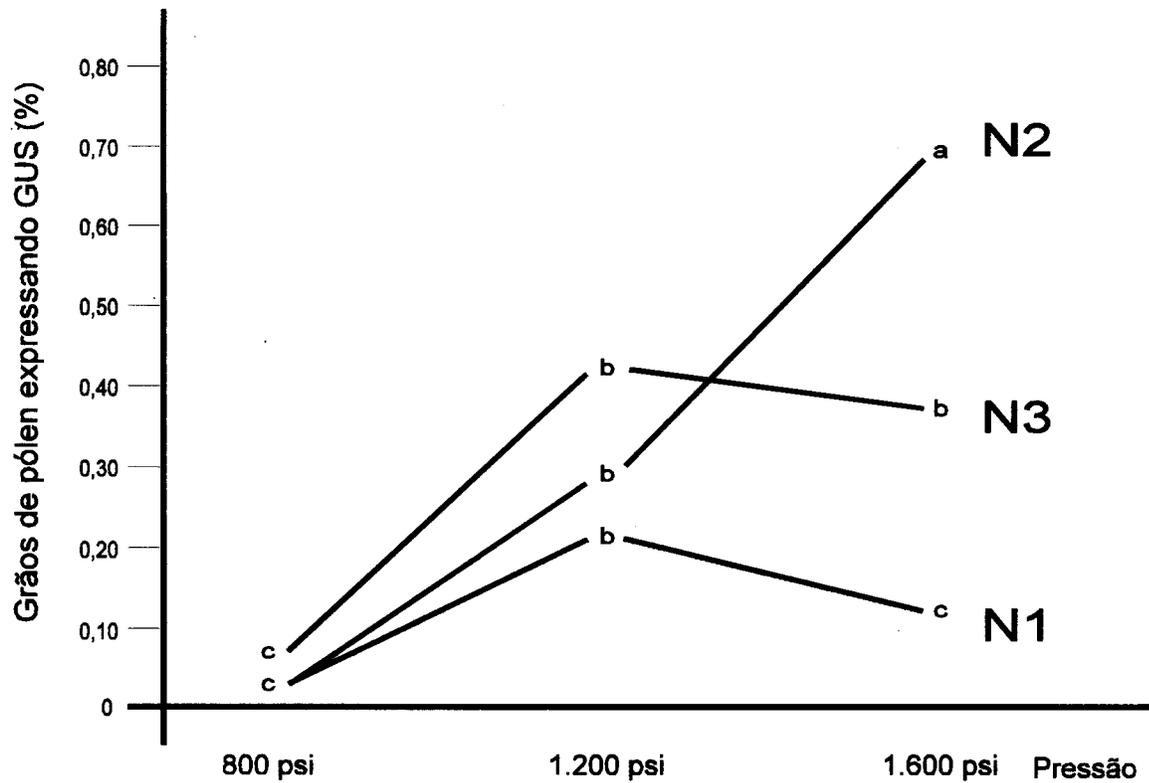


Figura 39 - Eficiência de transformação de pólen de milho.

Os grãos de pólen maduros de milho foram bombardeados com micropartículas co-precipitadas com o vetor pZm13-GN, utilizando-se diferentes pressões e níveis de disparo. A maior frequência de transformação foi de 0,69%, observada para o Nível 2 e pressão de 1.600 psi. Dados obtidos a partir de 6 experimentos com duas ou três repetições cada. Letras diferentes diferem significativamente de acordo com o Teste S-N-K ao nível de 1% cv 0.15 (Steel & Torrie, 1980). N1 = Nível 1, N2 = Nível 2 e N3 = Nível 3.

6.9.3 - Viabilidade *in vitro* e *in vivo* dos grãos de pólen transformados

Na maioria das plantas, a germinação do pólen ocorre muito rapidamente e a taxa de alongamento do tubo polínico é extremamente alta. Em milho, a germinação do pólen ocorre 5 minutos após a deposição sobre o estigma, e o tubo polínico se alonga numa velocidade de 1 cm por hora (Barnabas & Fridvalszky, 1984). Este processo inclui regulação de atividade gênica, a construção e crescimento da parede do tubo polínico, a formação do citoesqueleto e interações entre o tubo polínico com as estruturas femininas da flor ou do meio ambiente. Este processo é complexo e facilmente leva a perda da viabilidade das células (Nasrallah & Nasrallah, 1993). Durante o bombardeamento, os grãos de pólen são submetidos a extrema injúria, o que leva à perda da viabilidade reduzindo a expressão transitória e a fertilidade dos mesmos.

Biologicamente, o padrão de expressão da atividade de GUS, que depende de seqüências regulatórias das construções, neste caso também depende do estágio de desenvolvimento e hidratação dos grãos de pólen. Além disso, a viabilidade dos mesmos sob as condições de bombardeamento e pós bombardeamento afeta os resultados nos experimentos. Faz-se necessário avaliar se a injúria causada pelo acelerador de micropartículas, durante os disparos, não inviabiliza a expressão transitória nos grãos de pólen transformados.

A viabilidade *in vitro* e *in vivo* dos grãos de pólen transformados foi averiguada através da revelação da atividade de GUS, sob condições ótimas para a germinação. A maioria dos grãos de pólen que apresentou atividade de GUS deve-se ao fato de terem recebido DNA e não terem sido impedidos na sua habilidade de germinar e alongar seus tubos polínicos. Os grãos de pólen recém bombardeados com o vetor pZm13-GN foram espalhados uniformemente em placas de Petri contendo meio de germinação. Após 12

horas de manutenção em câmara de crescimento procedeu-se à revelação da atividade de GUS cobrindo-se as placas de Petri, contendo os grãos de pólen germinados, com papel de filtro embebido em Tampão de Revelação X-GLUC. Os grãos de pólen e respectivos tubos polínicos transformados puderam ser identificados pela coloração azul intensa (Figura 40-A e Figura 40-B).

Outro passo muito importante foi saber se a viabilidade *in vivo* dos grãos de pólen transformados era mantida. Para demonstrar a função *in vivo* dos grãos de pólen transformados após o bombardeamento, os grãos de pólen foram utilizados para polinização de plantas não transformadas no campo experimental. A habilidade dos grãos de pólen transformados germinarem e estenderem seus tubos polínicos no estigma foi testada através da reação histoquímica submetendo os tecidos à revelação histoquímica de GUS. Observou-se os grãos de pólen e respectivos tubos polínicos transformados com atividade de GUS sobre os estigmas (Figura 40-C). Desta forma admitiu-se a possibilidade de que os grãos de pólen carreando DNA exógeno estariam em condições de competir com os demais, fecundar o ovário e produzir sementes transgênicas.

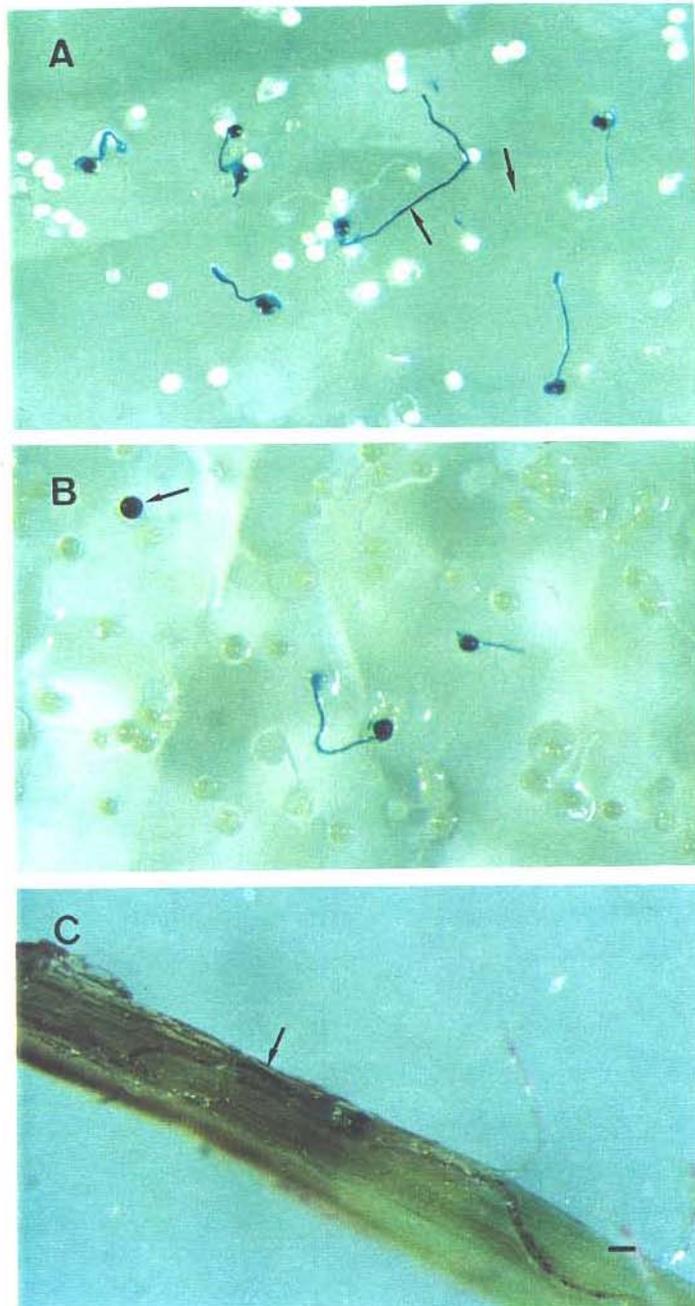


Figura 40 - Germinação *in vitro* e *in vivo* de grãos de pólen transformados

Grãos de pólen foram bombardeadas com micropartículas co-precipitadas com o vetor pZM13-GN, para em seguida revelar para atividade de GUS. (A) Grãos de pólen expressando GUS. As setas indicam que alongamento dos tubos polínicos, independentemente de serem transgênicos ou não. Nota-se que o tubo polínico é capaz de alongar-se até aproximadamente 20 vezes o tamanho do grão de pólen. (B) Grãos de pólen expressando GUS. A seta mostra um grão que apesar de transformado perdeu a capacidade de germinação. (C) Germinação *in vivo* dos grãos de pólen expressando GUS no estigma de milho. A seta mostra um grão de pólen transgênico que alongou o tubo polínico sobre o estigma da planta. Barra = 100 μ m

6.10 - Avaliação dos genes *c1* e *opaco-2* para transformação mediada por grãos de pólen

Tendo sido demonstrado que grãos de pólen bombardeados com micropartículas co-precipitadas com o plasmídeo pZm13-GN mantiveram a capacidade de germinação e alongamento do tubo polínico tanto *in vitro* com *in vivo*, tornou-se razoável esperar eventos de integração estável a partir de grãos de pólen bombardeados. Assim, foram idealizadas duas estratégias para obtenção de plantas transgênicas de milho, mediadas por grãos de pólen, onde o critério seleção dos transformantes fosse uma característica fenotípica qualitativa, passível de visualização. Os genes *c1* e *opaco-2*, isolados de milho, compreendem os genes reguladores de expressão mais bem estudados em plantas superiores. São responsáveis por fenótipos facilmente reconhecidos na semente madura.

Idealizando o estabelecimento de uma via alternativa de transformação gênica, empregou-se os vetores pR5'-C1, pRT101O2 e pO2O2Coix (Figura 20, Figura 22 e Figura 23) para transformar grãos de pólen e polinizar plantas F352AG e plantas *opaco-2* como receptoras de DNA.

6.10.1 - Transformação de plantas com o vetor pR5'-C1

A via biossintética da antocianina na camada de aleurona de milho requer a presença dos genes *c1* e *r*. Estes genes regulam a expressão dos genes estruturais *bz1* e *c2* na camada de aleurona púrpura da semente (Dooner & Nelson, 1979). A maioria dos genótipos utilizados em milho normalmente não apresenta expressão da antocianina nas sementes. Em experimento preliminar, os genótipos CAT100-1, Cat100-6, CAT100-6 x F1(Hill-A x Hill-B) e F352AG foram avaliados com relação a expressão da

antocianina na camada de aleurona. Espigas com 13 dias após a polinização foram esterilizadas, cortada a parte distal das sementes e o pericarpo removido cuidadosamente, para expor a camada de aleurona a ser bombardeada. Utilizando-se os vetores pR5'-C1 e/ou pR5'-Bperu (Figura 20 e Figura 21) os genótipos foram caracterizados. Observou-se a expressão da antocianina na camada de aleurona dos genótipos CAT100-1, Cat100-6, F352AG quando bombardeados com micropartículas co-precipitadas com o vetor pR5'-C1 (Figura 41), enquanto que o genótipo CAT100-6 x F1(Hill-A x Hill-B) requer a coprecipitação das micropartículas com os vetores pR5'-C1 e pR5'-Bperu.

O genótipo F352AG foi considerado apropriado para a transformação gênica, por requerer apenas um gene marcador e apresentar plantas com alto vigor híbrido. Procurou-se variar as condições de pressão e nível dos disparos utilizando-se aquelas que apresentaram melhores taxas de expressão transitória de GUS, quando a eficiência de transformação foi avaliada. Os experimentos foram conduzidos em dias consecutivos, polinizando-se as plantas com os grãos de pólen bombardeados com o vetor pR5'-C1. Esperou-se o desenvolvimento completo das sementes para a coleta das espigas e análise das sementes. A Tabela 5 resume os tratamentos com os grãos de pólen e os resultados obtidos. Neste experimento variou-se os níveis e pressões de disparo, sendo obtido 41.495 sementes para serem avaliadas. Nenhuma delas apresentou acúmulo de antocianina na camada de aleurona, conforme esperado caso ocorresse algum evento de integração do gene *c1* no embrião recém formado.

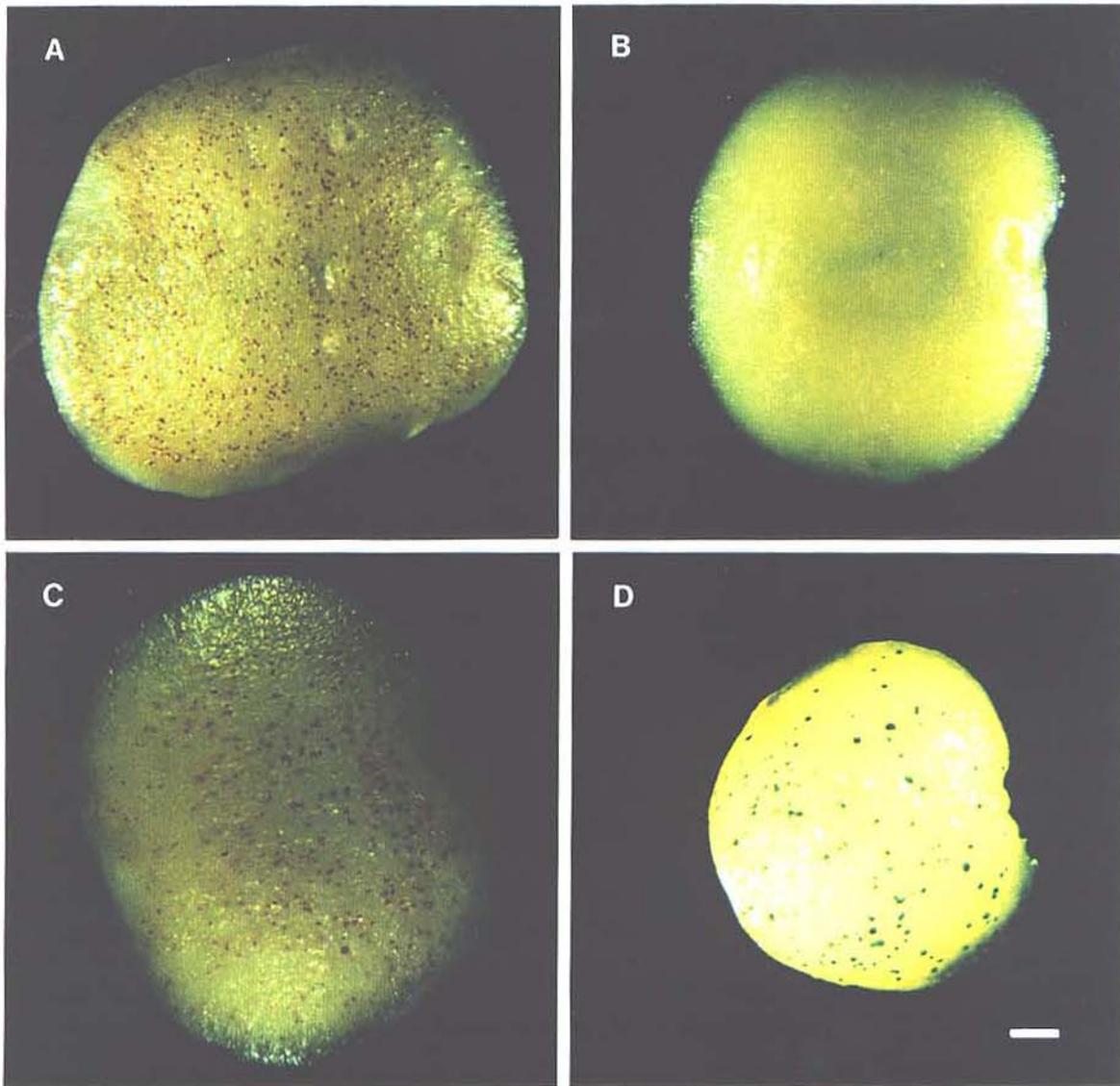


Figura 41 - Caracterização da expressão da antocianina na camada de aleurona de sementes F352AG imaturas

Espigas de milho F352AG 13 dias após a polinização foram colhidas e esterilizadas. A parte distal das sementes foram cortadas e tiveram o pericarpo removido cuidadosamente para expor a camada de aleurona a ser utilizada no bombardeamento com micropartículas. P acúmulo de antocianina foi verificada 12 a 24 horas após os disparos. (A) Camada de aleurona da semente de milho bombardeada com o vetor pR5'-C1. (B) Camada de aleurona da semente de milho bombardeada com o vetor pR5'-Bperu. (C) Camada de aleurona da semente de milho bombardeada com os vetores pR5'-C1 e pR5'-Bperu (D) Camada de aleurona da semente de milho bombardeada com o vetor pR5'-GUS. Barra = 0,5 mm

Tabela 5 - Transformação de milho F352AG através de bombardeamento de grãos de pólen com micropartículas contendo o vetor pR5'-C1

Tratamento	Condições de disparo		Nº de espigas obtidas	Análise fenotípica	
	Nível de disparo	Pressão (psi)		Nº de sementes normais	Nº de sementes roxas
pR5'-C1	N2	1.600	45	14.355*	φ
pR5'-C1	N3	1.200	35	14.810	φ
pR5'-C1	N3	1.600	30	12.330	φ
Número total de sementes				41.495	φ

* Número de sementes obtidas por tratamento
 φ zero

Basicamente, tendo sido confirmada a viabilidade *in vivo* dos grãos de pólen transformados, o insucesso decorreu da não fertilização do ovário por grão de pólen transgênico ou inativação do gene *c1* após sua integração no genoma do embrião.

Seguramente seria desejável maior taxa de expressão transitória dos grãos de pólen durante o bombardeamento com micropartículas, pois quanto maior número de grãos de pólen carreando DNA exógeno, maior seria a possibilidade de integração estável. A frequência de integração em cultura celular é estimada em aproximadamente 1 por cento da expressão transitória, quando utiliza-se o processo seletivo. Embora não exista dados de integração gênica via bombardeamento de grãos de pólen (Dupuis & Pace, 1993 e Christou, 1994), se considerarmos a taxa de expressão transitória neste experimento entre 0,37 e 0,69, citados na Figura 39 e considerarmos a mesma taxa de integração gênica citada para cultura de células, poderemos estimar a chance de transformação de 1:20.000 sementes obtidas, ou seja, pelos menos 2 sementes transgênicas em todo o experimento. Assim sendo, seria ideal uma maior frequência de transformação dos grãos de pólen para que aumentassem as chances de integração gênica.

6.10.2 - Transformação de plantas com o gene *opaco-2* selvagem

O gene *opaco-2* codifica uma “DNA-binding protein” específica de endosperma que regula a expressão dos genes que codificam as α -zeínas de 22 KDa. O fenótipo *opaco-2* é devido a redução na quantidade desta proteína (Soave *et al.*, 1976 e Burr & Burr, 1982). Se introduzirmos o gene *opaco-2* em grãos de pólen originários de plantas homozigotas mutantes (*opaco-2 opaco-2*), através de bombardeamento com micropartículas e fertilizarmos plantas

opaco-2, obteremos uma reversão do fenótipo opaco para vítreo, caso ocorra um evento de transformação estável. Para testar esta hipótese utilizou-se os vetores pRT101O2 e p α Z4-GUS, os quais foram primeiramente testados em endospermas imaturos, para verificar a ocorrência de transativação do promotor da α -zeína de 22 KDa pela proteína opaco-2. O processo de transativação *in vitro* consiste em cotransformar as células com o gene da proteína opaco-2 para que esta medie a expressão de GUS que está sob o controle do promotor α -zeína de 22 KDa. Após a revelação histoquímica de GUS é possível visualizar os pontos azuis no endosperma das sementes (Figura 42). Como pode ser visto na Tabela 6, sementes imaturas de genótipo opaco-2 bombardeadas com o vetor p α -Z4GUS apresentaram uma redução de aproximadamente 50% da atividade de GUS em relação à observada para sementes normais. Quando transativadas com a proteína opaco-2, as sementes apresentaram atividade de GUS similar a observada para as sementes normais, mostrando claramente que é possível a reversão do fenótipo.

Tendo sido demonstrado a efetividade da proteína opaco-2 em endosperma imaturo de milho opaco-2 nos experimentos de transativação, foram realizados vários experimentos onde grãos de pólen de plantas de milho opaco-2 foram bombardeados com micropartículas co-precipitadas com o vetor pRT101O2 ou pPO2O2Coix, sendo em seguida utilizados para fertilizar as plantas. Após o desenvolvimento e maturação das sementes, as espigas foram colhidas e analisadas visualmente para a ocorrência de fenótipo vítreo.

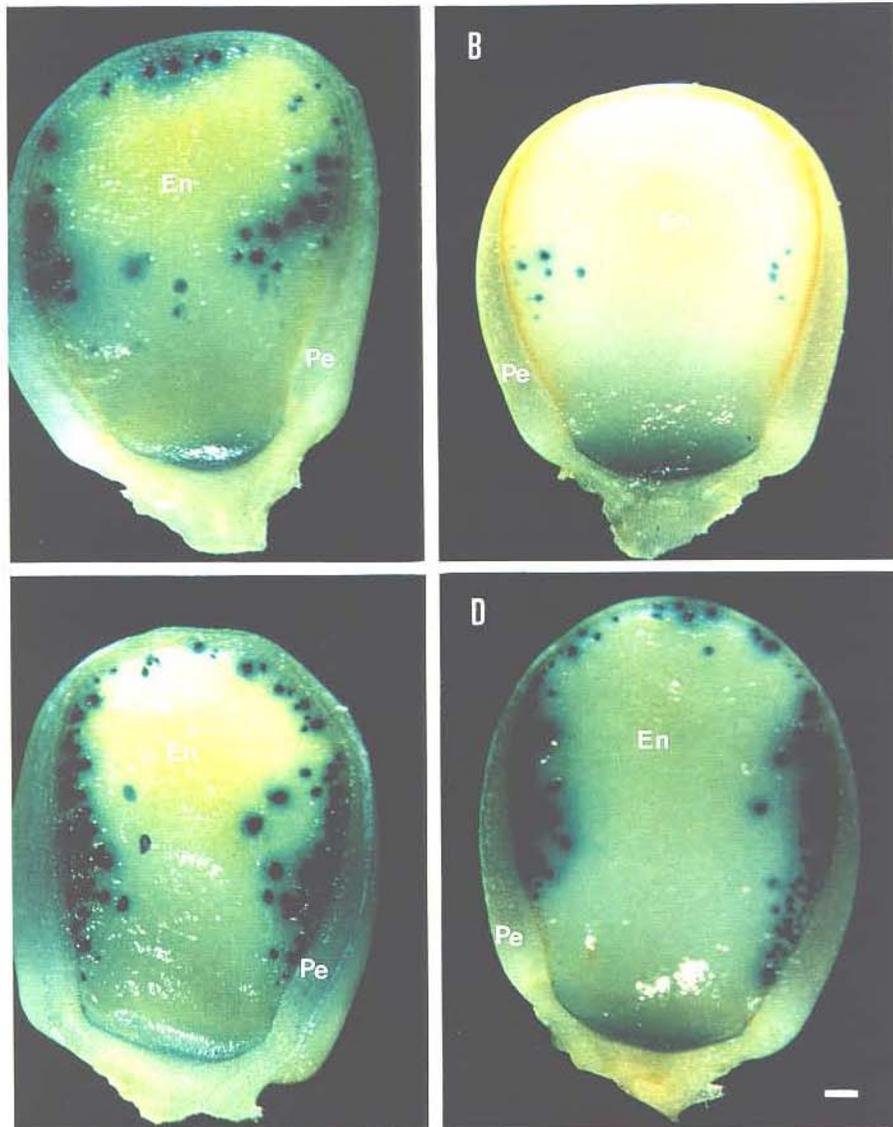


Figura 42 -Transativação do gene da α -zeína de 22 KDa pela proteína opaco-2

Utilizando-se o vetor pRT101O2 foi possível demonstrar a efetividade *in vitro* da proteína opaco-2. (A) Endosperma imaturo de milho normal bombardeado com o vetor p α -Z4GUS. (B) Endosperma imaturo de milho opaco-2 bombardeado com o vetor p α -Z4GUS. (C) Endosperma imaturo de milho normal bombardeado com os vetores p α -Z4GUS e pRT101O2 na proporção 1:1. (D) Endosperma imaturo de milho opaco-2 bombardeado com os vetores p α -Z4GUS e pRT101O2. En = endosperma, Pe = pericarpo. Barra = 1 mm

Tabela 6 - Restituição *in vitro* da expressão gênica opaco-2

Tratamento	Número de pontos azuis*	
	Endosperma vítreo	Endosperma opaco
p α Z4-GUS	213 (SD7,1)	133 (SD21,1)
p α Z4-GUS + pRT101O2	423 (SD16,2)	413 (SD7,1)

* Número de pontos azuis em 9 endospermas bombardeados.
Dados obtidos a partir de 3 experimentos com duas repetições para cada tratamento.

Como pode ser visto na Tabela 7, procurou-se utilizar as melhores condições de disparo para bombardear os grãos de pólen a serem empregados na fertilização das plantas. Entre as sementes analisadas algumas apresentaram reversão do fenótipo opaco-2 para vítreo na proporção de aproximadamente 1:1.800, considerando-se as 17 sementes vítreas dentre as 31.108 sementes analisadas. Plantas adultas obtidas das sementes vítreas foram autofecundadas para análise de segregação nas progênies (Tabela 8). A Figura 43-A mostra semente tipicamente vítrea obtida na primeira geração após fertilização das plantas com grãos de pólen bombardeados com o vetor pRT101O2. A maioria das progênies segregou de forma tipicamente mendeliana 3:1 (Figura 43-B) e as progênies P4.5 e P148-1 segregaram de forma não mendeliana, aproximadamente 5:1 (Figura 43-C).

Tabela 7 - Transformação de milho opaco-2 através de bombardeamento de grãos de pólen com micropartículas contendo o gene *opaco-2*

Tratamento	Condições de disparo			Análise fenotípica	
	Nível	Pressão (psi)	Nº de espigas obtidas	Nº de sementes opaco-2	Nº de sementes vitreas
1-pRT101O2	N2	1.600	31	8.922	9
2-pPO2O2Coix	N2	1.600	9	2.716	φ
3-pRT101O2	N3	1.200	25	7805	7
4-pPO2O2Coix	N3	1.200	5	1.463	φ
5-pRT101O2	N3	1.600	23	7.681	1
6-pPO2O2Coix	N3	1.600	9	2.504	φ
Número total de sementes				31.091	17

φ zero

Tabela 8 - Análise genética das progênes obtidas de plantas polinizadas com grãos de pólen bombardeados com o vetor pRT101O2

Tratamento	Planta	Análise fenotípica*	
		Opaco-2	Vitreas
1	P1.1	75	188
1	P1.2	25	95
1	P4.1	33	124
1	P4.2**		
1	P4.3**		
1	P4.4**		
1	P4.5	7	36
1	P120.1**		
1	P126.1**		
	P126.2	45	173
2	P89.1**		
2	P89.2**		
2	P14.1	36	116
2	P92.1**		
2	P92.2**		
2	P92.3**		
2	P92.4**		
3	P148.1	77	409

* Número de sementes por espiga analisada

** A planta não produziu sementes. Foi cruzada com a linhagem original

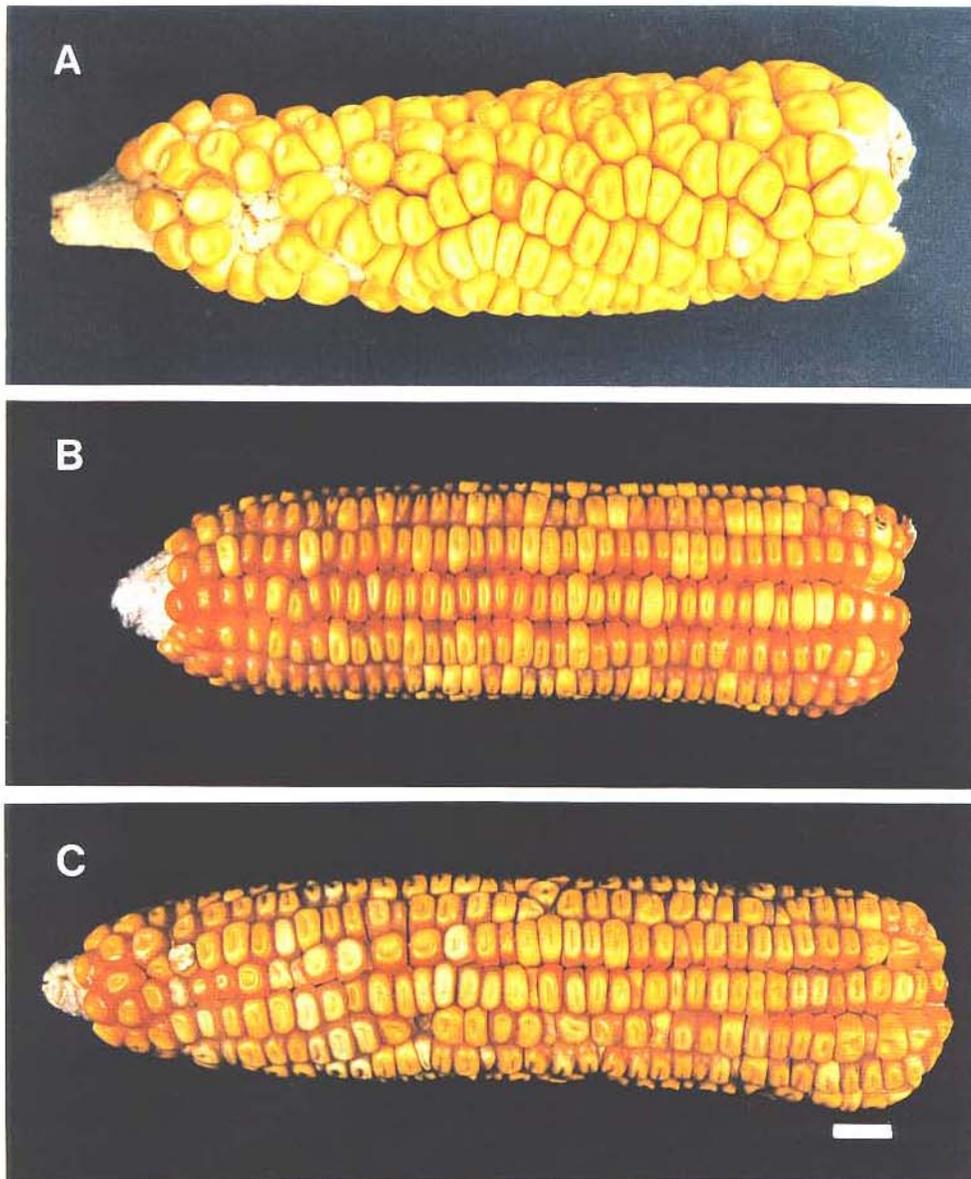


Figura 43 - Restituição do fenótipo vítreo a partir de plantas polinizadas com grãos de pólen transformados com o gene *opaco-2*

(A) Semente vítreo em espiga *opaco-2* observada na primeira geração (B) Espiga com sementes segregando vítreo-opaco-2 na proporção 3:1 observada na segunda geração. (C) Espiga com sementes segregando vítreo-opaco-2 na proporção aproximadamente 5:1 observada na segunda geração. Barra = 1 cm

6.10.3 - Análise molecular das progênes bombardeados com o gene *opaco-2*

Folhas das progênes que apresentaram restituição do fenótipo vítreo foram utilizadas para extração de DNA genômico e análise molecular para comprovação da possível integração de DNA exógeno. Quinze microgramas de DNA de cada amostra foram digeridos com a enzima de restrição Eco RI e separadas em gel de agarose 0,8%. Os DNAs foram transferidos para membranas de nylon e hibridizados com a sonda O2-0,9 Kb (Figura 44).

As amostras 1 e 2 correspondem ao vetor pRT101O2 digerido com a enzima de restrição Eco RI. Estas amostras são controle de hibridização e equivalem a dez e uma cópia por genoma, respectivamente. Pode-se observar que houve plena homologia entre a sonda utilizada e o fragmento de 964 pb separado do vetor, utilizado para introduzir DNA através do bombardeamento de grãos de pólen. As amostras 3 e 4 são plantas controles *opaco-2* e vítreas, respectivamente. As amostras de 5 a 22 são plantas testadas, sendo que nenhuma das amostras apresentou o fragmento de 964 bp. O fenótipo vítreo apresentado decorreu do cruzamento com outras plantas normais existentes no campo durante a realização do experimento. As hibridizações da sonda com DNA de alto peso molecular se devem a existência do gene *opaco-2* endógeno de milho. Nas canaletas 3 e 4 são vistas as hibridizações correspondentes aos alelos mutante e normal. Pode-se notar a existência de variabilidade genética no material mostrado, devido a outros genótipos vítreos não mostrados como controle. Pelos menos três alelos podem ser verificados. O primeiro na canaleta 7, que tem o mesmo peso molecular do controle mutante *opaco-2*. O segundo na canaleta 10, que apresenta o peso molecular acima do controle mutante e abaixo do controle normal. Por último na canaleta 16, que tem o peso molecular abaixo do controle mutante.

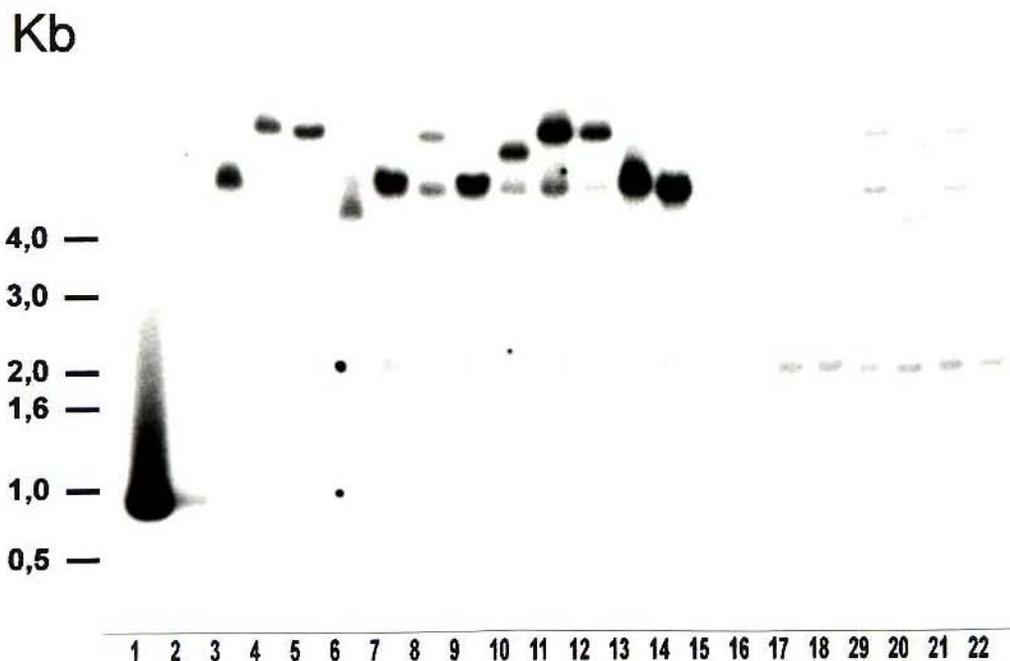


Figura 44 - Análise molecular das progênies opaco-2 que apresentaram restituição do fenótipo vítreo

Amostras de DNA digeridas com enzima de restrição Eco RI. (1) Vetor pRT101O2 dez cópias por genoma. (2) Vetor pRT101O2 uma cópia por genoma. (3) Plantas controle mutantes opaco-2. (4) Plantas controle normais. (5 a 14) DNA extraído de plântulas germinadas a partir de sementes vítreas obtidas por autofecundação (Geração-1). (15 a 22) DNA extraído diretamente das plantas obtidas das sementes que tiveram o fenótipo vítreo restituído (Geração-0). Observa-se que nenhuma das progênies testadas apresentou o fragmento de 0,9 Kb presente no vetor pRT101O2.

6.11 - Publicações científicas

No Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do CBMEG tem-se realizado estudos básicos e aplicados sobre o controle de expressão gênica de proteínas de reserva e transformação de milho. Com o desenvolvimento do acelerador de micropartículas e implementação das “ferramentas” biológicas e moleculares para transformação de plantas, realizado neste trabalho, foi possível os estudos elaborados *in vitro* de algumas teses e publicações científicas, conforme segue:

1. DA SILVA, M.J.; LEITE, A. & ARRUDA, P. (1992). Studies on the transient expression from a γ -kafirin promoter sequence in maize endosperm. Proceedings of the First Workshop on Plant Transformation from the Plant Genetic Engineering Network BIOLAC/UNU.
2. FREITAS, F. A. (1993). Clonagem e caracterização dos genes que codificam as γ -prolaminas de *Coix* e sorgo. Instituto de Biologia - UNICAMP (Tese de Mestrado).
3. SOUZA FILHO, G.A. (1994). Análise da região promotora de um Gene de α -Coixina de 25 KDa. Instituto de Biologia - UNICAMP (Tese de Mestrado).
4. VETTORE, A.L. (1994). Clonagem e caracterização do fator de transativação opaco-2 de *Coix lacryma-jobi*. Instituto de Biologia - UNICAMP (Tese de Mestrado).

5. YUNES, J.A.; CORD NETO, G.; DA SILVA, M.J.; LEITE, A.; OTTOBONI, L.M.M & ARRUDA, P. (1994). The transcriptional activator opaque-2 recognizes a second target site in 22-KD α -prolamin genes. *The Plant Cell* **6**:237-249.
6. FREITAS, F.A.; YUNES, J.A.; DA SILVA, M.J.; ARRUDA, P. & LEITE, A. (1995). Structural characterization and promoter analysis of the γ -kafirin gene from sorghum. *Mol. Gen. Genet.*, **245**:177-186.
7. CORD NETO, G.; YUNES, J.A.; VETTORE, A.; DA SILVA, M.J.; ARRUDA, P. & LEITE, A. (1995). The involvement of Opaque-2 on β -prolamin gene regulation in maize and *Coix* suggest a more general role for this transcriptional activator. *Plant Mol. Biol.* **27**:1015-1029.
8. SOUZA FILHO, G.A.; DA SILVA, M.J.; YUNES, J.A.; LEITE, A.; ARRUDA, P. & OTTOBONI, L.M.M. (1996). Identification of a DNA-binding factor that recognizes a specific fragment in the 22 KDa-like α -coixin promoter and interacts with the Opaque-2 protein. *Plant Mol. Biol.* (submitted)
9. KEMPER, E.L. (1996). Transformação de Milho através de Bombardeamento com Micropartículas. Otimização de Parâmetros Físicos e Biológicos. Instituto de Biologia - UNICAMP (Tese de Mestrado)
10. KEMPER, E.L.; DA SILVA, M.J. & ARRUDA, P. (1996). Effect of microprojétil bombardment parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed culture immature maize (*Zea mays* L.) embryos. *Plant Science* (in press)

7 - CONCLUSÃO

- Um acelerador de micropartículas foi construído e testado em nosso laboratório. Mostrou-se eficiente para carrear o DNA exógeno para o interior celular, através da expressão transitória de GUS em cultura de tecidos de milho. As melhores condições para aceleração e dispersão das micropartículas foram considerados o nível 3 e disparos a 1.200 psi.
- O sistema direto de aceleração de micropartículas foi superior ao sistema Kapton, tanto em relação ao número de pontos azuis resultante da atividade histoquímica de GUS quanto ao índice de variação entre os tratamentos
- A expressão transitória de GUS pode ser demonstrada em vários tecidos de milho: calos embriogênicos, embriões imaturos, endosperma imaturo e grãos de pólen
- Os vetores pMF6-GUS e pAct1-F apresentaram os melhores índices de expressão transitória quando calos embriogênicos foram bombardeados com micropartículas, sendo o promotor da actina de arroz o mais indicado para promover alta eficiência de expressão

- A seleção de células em cultura de tecidos através do uso de antibiótico ou herbicida não foi considerada ideal para transformação, utilizando-se o genótipo CAT100-6 x F₁ (Hill-A x Hill-B), devido a ocorrência de muitos setores tolerantes mesmo em altas concentrações do agente seletivo
- As transformações de células com os genes *c1* e *bperu* promoveram a ativação da via biossintética da antocianina em calos embriogênicos de milho, tendo sido utilizados para selecionar visualmente setores transgênicos.
- Grãos de pólen maduros puderam ser transformados através de bombardeamento com micropartículas, tendo sido considerado um sistema satisfatório para estudo de expressão, viabilidade celular e transformação gênica, através de bombardeamento com micropartículas.
- Foi alcançada uma taxa 0,69% de transformação de grãos de pólen de milho, compatível com aquelas demonstradas para outras espécies de plantas mais facilmente manipuladas, utilizando-se o nível 2 a 1.600 psi de pressão.
- Os grãos de pólen transformados mantiveram a habilidade de germinarem e estenderem o tubo polínico *in vitro* e *in vivo* demonstrando a possibilidade de fertilização do ovário e produção de sementes transgênicas.
- Foi demonstrada a efetividade da expressão dos genes *c1* e *opaco-2* em sementes imaturas de milho, sendo possível a utilização destes dois marcadores visuais qualitativos, para a identificação de possíveis sementes ou plantas transgênicas.

- As análises de “Southern blot” indicaram que plantas transgênicas de milho não foram obtidas, embora tenha sido observado o acúmulo de antocianina durante a cultura de tecidos. Possivelmente devido a não integração do gene *c1* e *b-peru* nas células totipotentes. Por outro lado, melhores taxas de transformação de grãos de pólen e estudos de compatibilidade, a nível de ovário, poderão levar à transformação estável utilizando-se esta via.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah, R.; Cocking, E.C. & Thompson, J.A. (1986). Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. *Bio/Tech.* **4**:1087-1090.
- Albani, D.; Robert, L.S.; Donaldson, P.A.; Altosaar, I.; Arnison, P.G. & Fabijanski, S.F. (1990). Characterization of a pollen-specific gene from *Brassica napus* which is activated during early microspore development. *Plant Mol. Biol.* **15**:605-622.
- Armaleo, D.; Ye, G-N.; Klein, T.M.; Shark, K.B.; Sanford, J.C. & Johnston, S.A. (1990). Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Curr. Genet.* **17**:97-103.
- Armstrong, C.L. & Green, C.E. (1985). Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* **164**:207-214.
- Armstrong, C.L.; Green, C.E.; Phillips, R.L. (1991). Development and availability of germplasm with high type II culture formation response. *Maize Gen. Coop. News Lett.* **65**:92-3.
- Barnabas, G. & Fridvalsky, L. (1988). Adhesion and germination of differently treated maize pollen grains on the stigma. *Acta Bot. Hungar.* **30**:329-332.
- Barton, K.A.; Binnis, A.N.; Matzke, A.J.M. & Chilton, M.D. (1983). Regeneration of intact tobacco plants containing full length

- copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell* **32**:1033-1037.
- Birch, R.G. & Franks, T. (1991). Development and optimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. *Aust. J. Plant Physiol.* **18**:453-469.
- Bóoy, G.; Krens, F. & Huizing, H.J. (1989). Attempted pollen-mediated transformation of maize. *J. Plant Physiol.* **135**:319-324.
- Boyton, J.E.; Gillham, N.W.; Harris, E.H.; Hosler, J.P.; Johnson, A.M.; Jones, A.R.; Randolph-Anderson, B.L.; Robertson, D.; Klein, T.M.; Shark, K.B. & Sanford, J.C. (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* **240**:1534-1538.
- Bowen, B. (1992). Anthocyanin genes as visual markers in transformed maize tissues. In: GUS Protocols: Using Gene as a Reporter of Gene Expression. (Stinson, J.R. & Datt, K eds.) Copyright. Academic Press, Inc. Madison, Wis, pp 154-231.
- Bower, R. & Birch, R.G. (1992). Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant J.* **2**:409-416.
- Brown, S.M. & Crouch, M.L. (1990). Characterization of a gene family abundantly expressed in *Oenothera organensis* pollen that shows sequence similarity to polygalacturonase. *Plant Cell* **2**:263-274.
- Burr, B. & Burr, F.A. (1982). Three mutations in *Zea mays* affecting zein accumulation: A comparison of zein polypeptides, *in vitro* synthesis and processing, mRNA levels and genomic organization. *J. Cell Biol.* **94**:201-206.
- Callis, J.; Formm, M. & Walbot, V. (1987). Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev.* **1**:1183-1200.
- Casacuberta, J.M.; Puigdomènech, P & Segundo, B.S. (1991). A gene coding for a basic pathogenesis-related (PR-like) protein from *Zea mays*. Molecular cloning and induction by a fungus (*Fusarium moniliforme*) in germinating maize seeds. *Plant Mol. Biol.* **16**:527-536.

- Casacuberta, J.M.; Raventós, D.; Puigdomènech, P & Segundo, B.S. (1992). Expression of the gene encoding the PR-like protein Prms in germinating maize embryos. *Mol. Gen. Genet.* **234**:97-104.
- Chandler, V.L.; Radicella, J.P.; Robbins, T.P.; Chen, J. & Turks, D. (1989). Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: Isolation of *B* utilizing *R* genomic sequences. *Plant Cell* **1**:1175-1183.
- Christou, P. (1992). Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *The Plant Journal* **2**(3):275-281.
- Christou, P. (1993). Particle gun mediated transformation. *Curr. Opin. Biotech.* **4**:135-141.
- Christou, P.; Ford, T.L. and Kofron, M. (1991). 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/Tech.* **9**:957-62.
- Christou, P.; McCabe, D.E. Swain, W.F. (1988). Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. *Plant Physiol.* **87**:671-4.
- Christou, P. (1994). Genetic engineering of crop legumes and cereals: current status and recent advances. *Agro-Food-Industry Hi - Tech.* **21**:17-27.
- 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. Sin.* **18**:659-68.
- Coe, E.H.; Neuffer, M.G. & Hoisington, D.A. (1988). The genetics of corn. In: Corn and Corn Improvement (Spague, G.F. and Dudley, J. eds.), American Agronomy Society, Madison, Wis, pp 81-268.
- Cone, K.C.; Burr, F.A.; & Burr, B. (1986). Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus *c1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:9631-9635.

- D'Halluin, K.M.; Bossut, E.; Bonne, B.; Mazur, B.; Leemans, J & Botterman, J. (1992). Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in trasgenic plants. *Bio/Tech.* **10**:309-314.
- Daniell, H.; Vivekananda, J.; Nielsen, B.L.; Ye, G.N.; Tewari, K.K. & Sanford, J.C. (1990). Transient foreing gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of cloroplast vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**:88-91.
- Danner, D.B. (1982). Recovery of DNA fragments from gels by transfer to DEA-paper in electrophoresis chamber. *Anal. Biochem.* **125**:139-142.
- Datla, R.S.S.; Hammerlindl, J.K.; Pelcher, L.E.; Selvaraj, G. & Crosby, W.L. (1990). A bifuncional gene fusion between neomycin-phosphotransferase and β -glucuronidase: a broad spectrum genetic marker for plants. *UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology. J. Cell Biochem.* **14(E)**:279-283.
- Datta, S.K.; Peterhans, A.; Datt, K. & Potrykus, I. (1990). Genetically engineered fertile Indica-rice recovered from protoplasts. *Bio/Tech.* **8**:736-780.
- De Wet, J.M.J.; Bergquist, R.R.; Harlan, J.R.; Brink, D.E. ; Cohan, C.E.; Newel, C.A. & De Wet, A.E. (1985). Exogenous gene transfer in maize (*Zea mays*) using DNA-treated pollen. In: Experimental Manipulation of Ovule Tissue (G.P. Chapman, S.H. Mantell and R.W. Daniels eds.), Longman, New York. pp 197-209.
- DeBlock, M.: Herrera-Estrella, L.; Van Montagu, M.; Schell, J. & Zambryski, P. (1984). Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *EMBO J.* **3**:1681-1689.
- Dooner, H.K. & Nelson, O.E. (1979). Interation among C, R, and Vp in the control of the Bz glucosyltransferase during endosperm development in maize. *Genetics* **91**:309-315.

- Dooner, H.K.; Robbins, T.P. & Jorgensen, R.A. (1991). Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* **25**:173-199.
- Dretzen, G.; Bellard, M.; Sassone-Corsi, P. & Cambon, P. (1981). A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **112**:295-298.
- Dupuis, I. & Pace, G.M. (1993). Gene transfer to maize male reproductive structure by particle bombardment of tassel primordia. *Plant Cell Rep.* **12**:607-611.
- Finer, J.J.; Vain, P.; Jones, M.W.; McMullen, M.D. (1992). Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep.* **11**:323-328.
- Finnegan, J. & McElroy, D. (1994). Transgene inactivation: Plants fight back! *Bio/Tech.* **12**:883-888.
- Fionnuala, M.M. & Fromm, M. (1992). Cereal transforamtion methods. *Curr. Opin. Biotech.* **3**:141-146.
- Fraley, R.T.; Rogers S.G.; Horsch, R.B.; Sanders, P.R.; Flick, J.S.; Fink, C.; Hoffman, N.; Sanders, P. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:4803-7.
- Franz, P.F.; Schel, J.H.N. (1987). An ultrastrutural study on early callus development from immature embryos of the maize strains A188 and A632. *Acta Bot. Neerl.* **36**:247-260.
- Franz, P.F.; Schel, J.H.N. (1990). Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*). *Can. J. Bot.* **69**:26-33.
- Fromm, M.E.; Morrish, F.; Armstrong, C.; Williams, R.; Thomas, J.; Klein, T.M. (1990). Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Tech.* **8**:883-9.
- Fromm, M.E.; Taylor, L.P. & Walbot, V. (1986). Stable transformation of maize after gene transfer by eletroporation. *Nature* **319**:791-793.

- Fujimura, T.; Sakurai, M.; Akagi, H.; Negishi, T. & Hirose A. (1985).
Regeneration of rice plants from protoplasts. *Plant Tissue Cult. Lett.*
2:74-75.
- Gasser, C.S. & Fraley, R.T. (1989). Genetically engineering plants for crop
improvement. *Science* **244**:1293-1299.
- Goff, S.A.; Klein, T.M.; Roth, B.A. Fromm, M.E.; Cone, K.C.; Raducella, J.P.
& Chander, V.L. (1990). Transactivation of anthocyanin biosynthetic
genes following transfer of B regulatory genes into maize tissues. *EMBO*
J. **9**:2517-2522.
- Gordon-Kamm, W.J.; Spencer, T.M.; Mangano, M.L.; Adams, T.R.; Daines,
R.J.; Start, W.G.; O'Brien, J.V.; Chambers, S.A.; Adams Jr W.R.;
Willettts, N.G.; Rice, T.B.; Mackey, C.J.; Krueger, R.W.; Kausch, A.P.;
Lemaux, P.G. (1990). Transformation of maize cells and regeneration of
fertile transgenic plants. *Plant Cell* **2**:603-619.
- Gritz, L. & Davies, J. (1983). Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the
sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression
in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **25**:179-188.
- Hamilton, D.A.; Bashe, D.M.; Stinson, J.R. & Mascarenhas, J.P. (1989).
Characterization of a pollen-specific genomic clone from maize. *Sex*
Plant Report **2**:208-212.
- Hamilton, D.A.; Roy, M.; Rueda, J.; Sindhu, R.K.; Sanford, J. &
Mascarenhas, J.P. (1992). Dissection of a pollen-specific promoter from
maize by transient transformation assays. *Plant Mol. Biol.* **18**:211-218.
- Hanaham, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with
plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-563.
- Hanson, D.D.; Hamilton, D.A.; Travis, J.L.; Bashe, D.M. & Mascarenhas, J.P.
1989). Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *Zea mays*
and its expression. *Plant Cell* **1**:173-179.
- Hess, D. (1975). Genetic Manipulations with Plant Material . *Int. Rev. Cytol.*
98: 519-537

- Hess, D. (1987). Pollen-based technique in genetic manipulation. *Int. Rev. Cytol.* **107**:367-395.
- Jefferson, R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol.* **5**:387-405.
- Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A. & Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**:3901-3907.
- Johnston, s.A.; Anziano, P.Q.; Shark, K.; Sanforad, J.C. e Bitoe, R.A. (1988). Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science* **240**:1538-1541.
- Jorgensen, R. (1991). Silencing of plant genes by homologous transgenes. *AgBiotech News Inf.* **4**:265-273.
- Jorgensen, R. (1993). The germinal inheritance of pigenetic information in plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **339**:173-181.
- Kemper, E.L.; Da Silva, M.J. & Arruda, P. (1996). Effect of microprojetele bombardment parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed culture immature maize (*Zea mays* L.) embryos. *Plant Science (in press)*
- Klein, T.M.; Goff, S.A.; Roth, B.A. & Fromm, M.E. (1990). Applications of the particle gun in plant biology. In: Progress in Plant Cellular and Molecular Bilogy (Nujkamp, H.J.J.; van der Plas, L.H.W.& van Aartrijk. J. eds.) Kluwer Academic Publishers. Pp. 56-66.
- Klein, T.M.; Arentzen, R.; Lewis, A. & Fitzpatrick-McElligott,S. (1992). Transformation of microbes, plants and animals by particle bombadment. *Bio/Tech.* **10**:286-291.
- Klein, T.M.; Harper, E.C.; Svab, Z.; Sanford, J.C. Fromm, M.E. & Maliga. P. (1988). Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**:8502-8505.

- Klein, T.M.; Roth, B.A. & Fromm, M.E. (1989). Regulation of anthocyanin biosynthetic genes introduced into intact maize tissues by microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:6681-6685.
- Klein, T.M.; Wolf, E.D.; Wu, R.; Sanford, J.C. (1987). High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**:70-73.
- Kors, F.T.M. (1991). Antibiotics, mode of action, spectrum, resistance, solubility, sterization, stability. Haarlem: Duchefa Biochemicals B.V.
- Kosugi, S.; Ohashi, Y.; Nakajima, K.; Arai, Y. (1990). An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: Methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Sci.* **70**:133-140.
- Kozziel, M.G.; Beland, G.L.; Bowman, C.; Carozzi, N.B.; Crenshaw, R. Crossalnd, L.; Dawson, J.; Desai, N. Hill, M.; Kadwell, S.; Launis, K.; Lewis, K.; Maddox, D.; McPherson, K.; Meghji, M.R.; Merlin, E.; Rhodes, R., Warren, G.W.; Wright, M. & Evola, S.V. (1993). Field performance of elite transgenic plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thurigiensis*. *Bio/Tech.* **11**:194-200.
- Li, L.; Qu, R.; Kochko, A.de; Fauquet, C. e Beauchy, R.N. (1993). An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep.* **12**: 250-255.
- Lörz, H.; Backer, B. & Schell, J. (1985). Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Mol. Gen. Genet.* **199**:178-182..
- Ludwig, S.R. & Wessler, S.R. (1990). Maize R gene family: tissue-specific helix-loop-helix proteins. *Cell* **62**:849-851.
- Ludwig, S.R.; Bowen, B.; Beach, L & Wessler, S.R. (1990). A regulatory gene as a novel visible marker for maize transformation. *Science* **247**:449-450.
- Luo, Z. & Wu, R. (1988). A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. *Plant Mol. Biol. Rep.* **6(3)**:165-174.

- Mascarenhas, D.; Mettler, I.J.; Pierce, D.A. & Lowe, H.W. (1990). Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize. *Plant Mol. Biol.* **15**:913-920.
- Matousek, J. & Tupý, J. (1983). The release of nucleases from various pollen species. *Plant Sci. Lett.* **30**:83-89.
- McCabe, D.E.; Swain, W.F.; Martinell, B.J.; Christou, P. (1988). Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Tech.* **6**:923-6.
- McElroy, D.; Zhang, W.; Cao, J.; Wu, R. (1990). Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell* **2**:163-71.
- Menssen, A.; Hohmann, S.; Martin, W.; Schanble, P.S.; Peterson, P.A.; Saedler, H. & Gierl, A. (1990). The En/Spm transposable element of *Zea mays* contains splice sites at the termini generating a novel intron from a dSpm element in the A2 gene. *EMBO J.* **9**:3051-3057.
- Mertz, E.T.; Bates, L.S. & Nelson, O.E. (1964). Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* **145**:279-280.
- Meyer, P.; Heidman, I.; Forkman, G. & Saedler, H. (1987). A new petunia flower color generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* **330**:677-678.
- Mol, J.N.M.; Stuitje, A.R.; Gerats, A.G.M. & Koes, R.E. (1988). Cloned genes of phenylpropanoid metabolism. *Plant Mol. Biol. Rep.* **6**:274-279.
- Morrish, F.M. & Fromm, M.E. (1992). Cereal transformation methods. *Curr. Opin. Biotech.* **3**:141-146.
- Motto, M.; Maddaloni, M.; Ponziani, G.; Brembilla, M.; Martta, R.; Di Fonzo, N.; Soave, C. Thompson, R & Salamini, F. (1988). Molecular cloning of the *o2-m5* allele of *Zea mays* using transposon marking. *Mol. Gen. Genet.* **212**:488-494.
- Murakami, T.; Anzai, H.; Imai, S.; Satoh, A.; Nagaoka, K. & Thompson, C.J. (1986). The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygrosopicus*:

- Molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* **205**:42-50.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**:473-497.
- Nash, J.; Luehrsen, K.R, & Walbot, V. (1990). Bronze-2 gene of maize: Reconstruction of a wild-type allele and analysis of transcription and splicing. *Plant Cell* **2**:1039-1049.
- Nasrallah, J.B. & Nasrallah, M.E. (1993). Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* **5**:1325-1335.
- Negrutiu, T.; Azhang, W. Cao, J. & Wu, R. (1986). Attempts to transform for kanamycin-resistance in mature pollen of tobacco. In: Biotechnology and ecology of pollen (Mulcahy, D.L., Bergamini-Mulcahy, G. & Ottaviano, C. eds.). Springer, New York. pp 65-70.
- Nishihara, M.; Ito, M.; Tanaka, I.; Kyo, M.; Ono, K.; Irifune, K & Morikawa, H. (1993). Expression of the β -glucuronidase gene in pollen of Lily (*Lilium longiflorum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), *Nicotiana rustica*, and peony (*Paeonia lactiflora*) by particle bombardment. *Plant Physiol.* **102**:357-361.
- Ohta, Y. (1986). High-efficiency genetic transformation of maize by a mixture of pollen and exogenous DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:715-719.
- Paz-Ares, J.; Ghosal, D.; Wienand, U.; Peterson, P.A. & Saedler, H. (1987). The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *myb* proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J.* **6**:3553-3558.
- Peng, J.; Kononowicz, H. & Hodges, T.K. (1992). Transgenic indica rice plants. *Theor. Appl. Genet.* **83**:855-863.
- Potrykus, I. (1989). Gene transfer to cereals: an assessment. *Trends Bioth.* **7**:269-273.
- Potrykus, I. (1990). Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/Tech.* **8**:535-542.

- Potrykus, I. (1991). Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **42**:205-25.
- Raventós, D.; Jensen, A.B.; Rask, M-B.; Casacuberta, J.M.; Mundy, J. & Segundo, B.S. (1995). A 20 bp *cis*-acting element is both necessary and sufficient to mediate elicitor response of a maize *PRms* gene. *The Plant J.* **7**(1):147-155.
- Register III, J.C.; Peterson, D.J.; Bell, P.J.; Bullock, W.P.; Evans, I.J.; Frame, B.; Greenland, A.J.; Higgs, N.S.; Jepsen, I.; Jiao, S.; Lewnau, C.J.; Sillick, J.M. e Wilson, H.M.; (1994). Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardement *Plant Mol. Biol.* **25**:951-961.
- Rhodes, C.A.; Pierce, D.A.; Mettler, I.J.; Mascarenhas, D. & Detmer, J.J. (1988). Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science* **240**:204-206.
- Rivin, C.J.; Zimmer, E.A. & Walbot, V. (1982). Isolation of DNA and recombinants from maize. In: Maize for Biological Research. Plant Molecular Biology Association, Charlottesville, Va. p p 34-39.
- Roeckel, P.; Dupuis, I.; Detchepare, S.; Matthys-Rochon, E. & Dumas, C. (1988). In: Plant Sperm Cells as Tools for Biotechnology (Wilns, H.J. & Keijzer, C.J. eds.). Pudoc, Wageningen. pp 105-110.
- Roeckel, P.; Moloney, M.M.; Drevet, J.R. (1992). Plant transformation using the sexual route. *Inter. Rev. Cytol.* **140**:425-446.
- Rogers, S.G.; Horsch, R.B. & Fraley R.T. (1986). Gene transfer in plants: production of transformed plants using Ti plasmid vectors. *Meth. Enzymol.* **118**:627-659.
- Russel, J.A.; Roy, M.K. & Sanford, J.C. (1992). Major improvements in biolistic transformation of suspension-cultured tobacco cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **28**:97-105.

- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. 3 vol. 2^a ed Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sanford, J.C. (1988). The biolistic process. *Trends Bioth.* **6**:299-302.
- Sanford, J.C.; Devit, M.J.; Russel, J.A; Smith, F.D.; Harpending, P.R; Roy, M.K. & Johnston, S.A. (1991). An improved, helium-driven biolistic device. *Technique - J. Meth. Cell Mol. Biol.* **3**(1):3-16.
- Sanford, J.C.; Klein, T.M.; Wolf, E.D. & Allen, N. (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Partic. Sci. Tech.* **5**:27-37.
- Sanford, J.C.; Smith, F.D. & Russell, J.A. (1993). Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods. Enzym.* **217**:483-509.
- Schmidt, R.J.; Burr, F.A. & Burr, B. (1987). Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus *opaque-2*. *Science* **238**:960-963.
- Shillito, R.D.; Carswell, G.K.; Johnson, C.M.; DiMaio, J.J.; Harms, C.T. (1989). Regeneration of fertile plants from protoplasts of elite inbred maize. *Bio/Tech.* **7**:581-587.
- Shimamoto, K.; Terada, R.; Izawa, T. & Fugimoto, H. (1989). Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts *Nature* **338**:274-276.
- Soave, C.; Righetti, P.G.; Lorenzoni, C. Gentinetta, E. & Salamini, E. (1976). Expressivity of *opaque-2* gene at the level of zein molecular componente. *Maydica* **21**:61-75.
- Songstad, D.D.; Petersen, W.L.; Armstrong, C.L. (1992). Establishment of friable embryogenic (type II) callus from immature tassels of *Zea mays* (Poaceae). *Am. J. Bot.* **79**:761-4.

- Spencer, T.M.; O'Brien, J.V.; Start, W.G.; Adams, T.R.; Gordon-Kamn, W.J. & Lemaux, P.G. (1992). Segregation of transgens in maize. *Plant Mol. Biol.* **18**:201-210.
- Steel, G.D. & Torrie, J.U. (1980). Principles and procedures of statistics approach. McGraw-Hill Book Company, New York, USA.
- Stewart, G.R.; Mann, A.F. & Fentem, P.A. (1980). Enzymes of glutamate formation: Glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, and glutamate synthase. In: *The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise* (Stumpf, P.K. & Conn, E.E. eds). Academic Press, New York. pp 271-327.
- Styles, E.D.; Ceska, O. & Seah, K.T. (1973). Developmental differences in action of R and B alleles in maize. *Can. J. Genet. Cytol.* **15**:59-72.
- Tachibana, K.; Watanabe, T.; Sekizawa, Y.; Takematsu, R. (1986). Inhibition of glutamine synthetase and quantitative changes of free amino acids in shoots of bialophos-treated Japanese barnyard millet. *J. Pesticider Sci.* **11**:27-31.
- Tomes, D.T.; Weissinger, A.K.; Roos, M.; Higgins, R.; Drummond, B.J.; Schaaf, S.; Malone-Schoneberg, J. Staebell, M.; Flynn, P.; Andrrson, J. & Howard, J. (1990). Transgenic tobacco plants and their progeny derived by microprojectile bombardement of tobacco leaves. *Plant. Mol. Biol.* **14**:261-268.
- Twel, D.; Yamaguchi, J. & McCormick, S. (1990). Polen-specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during micropsorogenesis. *Development* **109**:705-713.
- Tweel, D.; Klein, T.M. & McCormick, S. (1991). Transformation of pollen by particle bombardement. *Plant Tissue Culture Manual* **D2**:1-14.
- Twel, D.; Wing, R.A.; Uamaguci, J. & McCormick (1989). Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Mol. Gen. Genet.* **217**:240-245.

- Vain, P.; McMullen, M.D. e Finer, J.J. (1993). Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Rep.* **12**:84-8.
- Van Tunen, A.J.; Hartman, S.A.; Mur, L.A. & Mol, J.N.M. (1989). Regulation of chalcone flavone isomerase (CHI) gene expression in *Petunia hybrida*: The use of alternative promoters in corolla, anthers and pollen. *Plant Mol. Biol.* **12**:539-551.
- Van Tunen, A.J.; Mur, L.A.; Brouns, G.S.; Rienstra, J.D.; Koes, R.E & Mol, J.N.M. (1990). Pollen- and anther-specific *chi* promoters from petunia: tandem promoter rgulation of de *chiA* gene. *Plant Cell* **2**:393-401.
- Vasil, I.K. (1988). Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *Bio/Tech.* **6**:397-402.
- Vasil, I.K. (1994). Molecular improvement of cereals. *Plant Mol. Biol.* **25**:925-937.
- Vasil, V.; Castillo, A.M.; Fromm, M.E., Vasil, I.K. (1992). Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Tech.* **10**: 667-75.
- Vettore, A.L.; Yunes, J.A.; Arruda, P. & Leite, A. (1996). Isolation and characterization of *opaque-2* gene of *Coix*. *Plant Mol. Biol.* (*submeted*)
- Walden, R. & Schell, J. (1991). Tissue culture and the use of transgenic plants to study plant development. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **27**:1-10.
- Waldron, J.C. (1987). Control of *in vitro* germination and tube extension of maize pollen. *Maize Genet. Coop. News Lett.* **61**:36-37.
- Walters, D.A.; Vetsch, C.S.; Pttis, D.E. & Lundquist, R.C. (1992). Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. *Plant Mol. Biol.* **18**:189-200.
- Wan, Y.; Widholm, J.M. & Lemaux, P.G. (1995). Type I callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (*Zea mays* L.). *Planta* **196**:7-14.

- Wang, A.S.; Bra,bila, E. & Evans, R.A. (1994). Rapid production of transgenic corn by microprojectile bombardment of high type II immature embryos. *In Vitro Cel. Dev. Biol.* **30(A)**:67-70.
- Wang, Y-C., Klein, T.M.; Fromm, M.; Cao, J.; Sanford, J.C. & Wu, R. (1989). Transient expression of foreing genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. *Plant Mol. Biol.* **11**:433-439.
- White, J.; Chand, S-Y.P. & Bibb, M.J. (1990). A cassette containing the *bar* gene of *Streptomyces hygrosopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucl. Acid Res.* **18**:1062-1065.
- Wilmink, A & Dons, J.J.M. (1993). Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11(2)**:165185.
- Yang, H.; Zhang, M.H.; Davey, M.R.; Mulligan B.J. & Cocking, E.C. (1988) Production of kanamycin-resistant rice tissues following DNA uptake into protoplast. *Plant Cell Rep.* **7**:421-425.
- Ye, G.-N.; Daniell, H. Sanford, J.C. (1990). Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* **15**:809-19.
- Yunes, J.A.; Cord Neto, G.; Leite, A.; Ottoboni, L.M.M. & Arruda, P. (1994). The role of the Opaque2 transcriptional factor in the regulation of protein accumulation and amino acid metabolism in maize seeds. *An. Acad. Brs. Ci.*, **66(1)**: 227-237.
- Zhang, H.M.; Yang, H.; Rech, E.L.; Golds, T.J.; Davis, A.S.; Muligan, B.J.; Cocking E.C. & Davey, M.R. (1988). Trangenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. *Plant Cell Rep.* **7**:379-384.
- Zhang, W. & Wu, R. (1988). Efficient regeneration of transgenic rice plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of foreigen genes in the plants. *Theor. Appl. Genet.* **75**:835-840.

Zhon, C.; Yang, Y. & Joug, A.Y. (1990). Miniprep in ten minutes. *Biotechniques* **8(2):9**.