

**BC/27266**  
**IB/80686**

T/UNICAMP

K323<sub>t</sub>

90080

**Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP**

**Instituto de Biologia**

**Departamento de Genética e Evolução**

**Transformação de Milho através de Bombardeamento com  
Micropartículas. Otimização de Parâmetros  
Físicos e Biológicos.**

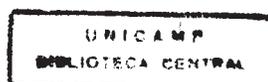
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a) <i>Edson Luis Kemper</i> e aprovada pela Comissão Julgadora <i>Arruda</i> 22/02/96
---

**Edson Luis Kemper**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Arruda**

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

1996



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

K323t Kemper, Edson Luís  
Transformação de milho através de bombardeamento  
com micropartículas. Otimização de parâmetros físicos e  
biológicos / Edson Luís Kemper. -- Campinas, SP : [s.n.],  
1996.

Orientador: Paulo Arruda.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Biologia.

1. Milho. 2. Células-Transformação. 3. Genética.  
\* 4. Biolística. I. Arruda, Paulo. II. Universidade Estadual  
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 22 de fevereiro de 1996.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. PAULO ARRUDA (Orientador)

Handwritten signature of Paulo Arruda in cursive script, written over a horizontal line.

Assinatura

Prof. Dra. LAUDENIR M. PRIOLI

Handwritten signature of Laudénir M. Prioli in cursive script, written over a horizontal line.

Assinatura

Prof. Dr. LUIZ G. SANTORO

Handwritten signature of Luiz G. Santoro in cursive script, written over a horizontal line.

Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dra. IONE SALGADO MARTINS

A horizontal line representing a blank space for a signature.

Assinatura

**APROVADA**

À minha Mãe,  
que através do carinho e da coragem,  
fez-me homem.

Estava mais angustiado/  
que um goleiro na hora do gol/  
quando você entrou em mim/  
como um sol num quintal

Belchior

À Janaina,  
pelo seu conforto e companheirismo

Aparentemente Ele falou para o deserto...

...porém sua voz ecoa em uma platéia

numerosa, intelectualmente viva e de

coração enfevecido!

Agradeço:

Ao Prof. Dr. Paulo Arruda, amigo e orientador, pela inestimável contribuição à minha formação científica e pela oportunidade de trabalho.

Ao Dr. Adilson Leite, pelo exemplo de cultivo à úlceras e amor à primeira geração.

À Profa. Dra. Laura M.M.Ottoboni e Dra Anete P. de Souza, pelas dicas valiosas e prestatividade.

À Profa Dra. Laudénir M. Prioli, pelas dicas e pelo uso da câmara de crescimento do Barracão.

À Dra. Marycilda P. de Mello, e às Profas Dra. Yoko B. Rosato e Dra. Ana Maria A. Espin, por terem composto a banca do meu exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Luiz G. Santoro, e às Profas Dra. Ione S. Martins e Anete P. de Souza, pela criteriosa análise e sugestões sobre a forma e conteúdo deste trabalho.

A José Andrés Yunes e Germano Cord Neto, pela amizade dentro e fora de laboratórios desde os tempos do LCTV de Floripa.

A contribuição especial de todas as pessoas da república: Jorge, Nicola, Luzão, Fagoni, Kcal, Maria Elena, Vigilê, Nancy, Brochi, Camilo, Bia, Ana Maria, Eliane, Alessandra, Germano, Andrés e Gonçalo.

Ao Gonçalo e Nicola pelas horas de bate papo regadas a cerveja e gargalhadas.

Ao grande Luzão, primeiro amigo verdadeiro destas terras.

Ao Marcião, companheiro de fluxo e de objetivos, pela introdução da metodologia “Le coxambré”.

Ao Dante e André, não apenas pelas discussões futebolísticas das segundas-feira, mas pela amizade que sempre demonstraram.

A Sílvia, Kcal e Bia, por liderarem o meu entusiasmado fã-clube.

Aos amigos “teens” Felipe, Tita e Emi, pelo bom humor e prontidão em ajudar em tudo o que for preciso.

Às lauretas do apocalipse, Marildinha, Tereza e Lyriam, tão distantes (dois corredores), porém próximas (azucrinando).

Ao Fernandinho, Xico, Edson baiano, Marymar, Agostinho e David, amigos que passaram por este laboratório.

Ao Mano, Celso, Karen, Fábio e Adriana, que mesmo fazendo parte a pouco tempo da família *Plantae*, já estão no peito.

Ao “Seu Chico”, por cuidar muito bem das minhas plantas transgênicas putativas e pelo exemplo de honestidade e humildade.

Ao Maurício, que através do seu suor, colaborou significativamente para o desenvolvimento desta tese.

À Sandrinha, Claudinha e Tânia pelos trabalhos de secretaria e bom humor em “me aturar”.

Ao Sibov, Luciana e Berê pelo sorriso e alegria no trabalho.

À galera da Yoko, Humanas e Animal, por tornarem o ambiente de trabalho um local agradável.

Ao Xico, Andrés, Maria Elena, Marymar e Germano por mostrarem-me que Ele está em tudo...

Ao meu padrinho Hilson, por acreditar em mim e pela sua amizade.

Ao “Tio Toni”, não apenas pelo apoio durante a época de faculdade, mas pelo seu exemplo de vida.

Aos meus parentes pela sua torcida, em especial aos meus irmãos Edna e Erlon e aos meus avós Bertoldo (*in memorian*) e Ida.

À Capes e CNPq, pelo apoio financeiro.

## Abreviações

Ø	Diâmetro
Ω	Seqüência codificadora de peptídio sinal para plastídios
<i>act1</i>	Gene da actina 1 de arroz
<i>adh1</i>	Gene da álcool desidrogenase 1 de milho
ARS1	Seqüência SAR de levedura
<i>bar</i>	Gene codificador da PAT de <i>Streptomyces hygrosopicus</i>
BSA	Albumina sérica bovina
DHDPS	Dihidrodipicolinato sintetase
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Força centrífuga em relação à aceleração gravitacional
GE	“Gas entrainment”
GS	Glutamina sintetase
GUS	β-glucoronidase
<i>gusA(uidA)</i>	Gene codificador da GUS de <i>Escherichia coli</i>
He	Gás Hélio
hs	Número de horas
kDa	Kilodaltons
Ki	Constante de inibição

Km	Constante de Michaelis
M	Molaridade
MHB	Ácido 4-metilfosfinico-2-hidroxi-butanóico
MPP	Ácido 3-metilfosfinico-propanóico
PAT	Fosfinotricina acetil transferase
<i>pat</i>	Gene codificador da PAT de <i>Streptomyces viridochromogemes</i>
PCR	“Polymerase chain reaction”
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PPO	Ácido 4-metil-fosfinico-2-oxi-butanóico
PPT	Fosfinotricina
psi	“Pounds per square inch”
rpm	rotações por minuto
S-N-K	Teste de distribuição múltipla de Student-Newman-Keuls
SAR	“Scaffold attachment region”
SDS	Dodecil sulfato de sódio
tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
<i>ubi1</i>	Gene da ubiquitina 1 de milho
v/v	Relação volume/volume
X-gluc	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurônico

## Índice de Figuras e Tabelas

Figura 1 - Representação esquemática dos plasmídeos utilizados	40
Figura 2 - Diagrama ilustrativo do acelerador de micropartículas	44
Figura 3 - Origem da embriogênese somática	55
Figura 4 - Análise funcional de pACTBARGUS e pBARGUS	56
Figura 5 - Comparação da aceleração de micropartículas pelos métodos GE e Kapton®	58
Figura 6 - Efeito do tamanho das micropartículas, distância entre o alvo e o disco de ruptura e pressão de disparo na transformação transiente e penetração do tecido escutelar	60
Figura 7 - Perfil de distribuição de células transformadas no tecido escutelar	62
Figura 8 - Danos causados ao escutelo após o bombardeamento	63
Figura 9 - Influência da concentração de manitol na transformação transiente e na profundidade de penetração das micropartículas	66
Figura 10 - Influência da concentração de manitol nos danos causados pelas micropartículas no tecido escutelar	67
Figura 11 - Influência do tipo de vedação, número de disparos e dias em cultura na transformação transiente	69
Figura 12 - Inibição do crescimento de calos da linhagem Cat-100-6 pelo PPT e manitol	71

Figura 13 - Correlação negativa entre células com atividade de GUS e regiões de crescimento ativo	74
Figura 14 - Coloração histoquímica para a atividade de GUS após diferentes ciclos seletivos	75
Figura 15 - Coloração histoquímica para a atividade de GUS em raízes transgênicas	77
Figura 16 - Análise molecular através de PCR do DNA de plantas regeneradas	78
Figura 17 - Análise da atividade de PAT na progênie de plantas regeneradas	79
Figura 18 - Esquema da degradação de PPT em plantas transgênicas e não-transformadas	93
Tabela 1 - Composição dos meios de cultura utilizados	33
Tabela 2 - Resposta quantitativa do crescimento de calos ao meio de cultura	53
Tabela 3 - Resumo dos procedimentos de seleção utilizados para a transformação de gramíneas com o gene <i>bar</i>	82
Tabela 4 - Afinidade relativa de entrada dos aminoácidos em células vegetais	94

## ÍNDICE GERAL

1. RESUMO	16
2. ABSTRACT	17
3. INTRODUÇÃO	18
3.1. O milho	18
3.2. Transformação genética	18
3.3. Bombardeamento com micropartículas	20
3.3.1. Otimização das condições físicas e biológicas para o bombardeamento	22
3.3.2. Cultura de tecidos	24
3.3.3. Genes seletivos	26
3.3.4. Genes marcadores	27
3.3.5. Vetores utilizados para a transformação	28
3.3.6. Identificação do transgene	29
4. OBJETIVO	31
5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	32
5.1. Material vegetal	32
5.2. Cultura de tecidos	32
5.3. Origem da embriogênese somática em tecido escutelar de embriões imaturos da linhagem Cat-100-6	35
5.4. Microscopia	35
5.5. Ensaio histoquímico de GUS	37

5.6. Ensaio da atividade de PAT	37
5.7. Plasmídeos utilizados	38
5.8. Bombardeamento	41
5.8.1. Preparo das micropartículas	41
5.8.2. Co-precipitação de DNA com as micropartículas	41
5.8.3. Disparo	42
5.9. Otimização dos parâmetros de bombardeamento	43
5.9.1. Comparação entre os métodos GE e Kapton®	43
5.9.2. Estudo das condições adequadas de bombardeamento	45
5.10. Estabilização osmótica dos tecidos	46
5.11. Inibição do crescimento pela fosfotricina	47
5.12. Inibição do crescimento pelo manitol	47
5.13. Transformação estável	48
5.14. Regeneração	49
5.15. Resistência ao herbicida Basta™	49
5.16. PCR	50
5.17. Análise estatística	51
6. RESULTADOS	52
6.1. Cultura de tecidos	52
6.2. Origem da embriogênese somática em embriões imaturos da linhagem Cat-100-6	54
6.3. Expressão dos genes <i>uidA</i> e <i>bar</i> em coleóptilo	55
6.4. Otimização dos parâmetros de bombardeamento	57
6.4.1. Comparação entre GE e Kapton®	57

6.4.2. Variação das condições físicas ide bombardeamento	59
6.5. Efeito do manitol nos tecidos bombardeados	64
6.6. Variáveis biológicas envolvidas no bombardeamento	68
6.7. Otimização das condições de seleção	69
6.7.1. Efeito da concentração de PPT no crescimento de calos tipo I derivado da linhagem Cat-100-6	69
6.7.2. Efeito da concentração de manitol no crescimento de calos	70
6.8. Transformação estável	72
7. DISCUSSÃO	80
8. CONCLUSÕES	98
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

## 1. RESUMO

Alguns parâmetros físicos e biológicos relacionados a transformação de milho através de bombardeamento com micropartículas foram estudados. A qualidade da cultura de tecidos é o primeiro fator a ser considerado no estabelecimento de metodologia reproduzível de transgênese. Vários fatores, como a inibição da produção de etileno e a adição de nitrogênio reduzido na forma de aminoácidos, influenciaram significativamente a qualidade da cultura. Foi demonstrado que a embriogênese somática tem origem em aglomerados de células localizadas nas camadas sub-epidérmicas e, que em condições de bombardeamento ideais para a transformação eficiente destas células, danos severos foram causados ao tecido alvo. Estes danos puderam ser evitados através da adição de manitol ao meio de cultura. A proteção pelo manitol pôde ser claramente observada tratando-se o tecido com safranina e "fast green". Os testes de obtenção de transformantes estáveis demonstraram a ineficiência da seleção em meio contendo fosfotricina (PPT), determinada provavelmente pela interferência na absorção de PPT pelos aminoácidos do meio de cultura. Apesar da ineficiência, calos transgênicos foram obtidos os quais, entretanto, não originaram plantas transgênicas. Isto pode ter sido devido ao fato do PPT ser um inibidor mais eficiente para a glutamina sintetase do cloroplasto e/ou inibição da fotossíntese. Plantas regeneradas após a retirada do PPT do meio seletivo não apresentaram expressão de GUS, PAT nem presença do DNA transferido. Os resultados obtidos indicaram que o bombardeamento com micropartículas pode ser utilizado eficientemente na obtenção de calos transformados de milho. Também são discutidas alternativas para aumentar a eficiência de seleção, como o uso de bialaphos ao invés de PPT, e a retirada do agente seletivo do meio de cultura durante a fase de regeneração.

## 2. ABSTRACT

Several physical and biological parameters related to maize transformation through particle bombardment were studied. An important factor to be considered is the tissue culture quality. The use of reduced nitrogen, in amino acid form, and the inhibition of ethylene production improved the culture quality. Microscopy of embryos revealed that somatic embryogenesis arose from sub epidermal cell layers and, that under conditions for high transformation rates, these cells are severely damaged. The bombardment damage was dramatically reduced by addition of mannitol to the culture medium. This was clearly demonstrated by safranin/fast green staining. Experiments carried out to obtain stable transformation demonstrated that the PPT based selection is inefficient due to the interference of amino acids with the herbicide activity. Some transgenic callus was obtained, but plants could not be regenerated from them, mainly due to the PPT inhibition of chloroplast glutamine synthetase and photosynthesis. Plants regenerated in the absence of PPT did not express the expected genes as determined by functional analysis of GUS and PAT and molecular analysis. The overall data indicated that particle bombardment could be efficiently used to obtain transgenic maize callus. Some alternatives to increase the selection efficiency are discussed, as to change PPT to bialaphos and to omit selective agents from regenerative steps.

### 3. INTRODUÇÃO

#### 3.1. O milho

O milho é uma gramínea de origem centro e sul-americana, pertencente a tribo Andropogoneae, que engloba também o sorgo, o *trypsaicum* e o coix (Claynton, 1973; 1983). No mundo, o milho responde sozinho por 25% do consumo direto e indireto de alimentos pelo homem (FAO, 1988), e no Brasil, a produção deste cereal corresponde a mais de 30% da produção total de grãos (Pinazza, 1993). O milho também tem importância destacada como planta modelo para pesquisa básica em genética e bioquímica, devido a gama de mutantes conhecidos e a facilidade de efetuar-se cruzamentos controlados (Chasan, 1994).

A transformação genética deste cereal é uma ferramenta poderosa para ajudar a responder importantes questões biológicas básicas e uma importante técnica auxiliar para a melhoria das características agronômicas da cultura.

#### 3.2. Transformação Genética

Transformação é a introdução, integração e expressão estável de genes exógenos ou modificados, que podem alterar características morfológicas e/ou bioquímicas da planta recipiente. A era da transformação de plantas começou em 1983 com o sistema *Agrobacterium* (Fraley *et al.*, 1983). Este método de transformação, inicialmente limitado às solanáceas, vem sendo utilizado atualmente para a transformação de diferentes espécies, incluindo alguns cereais (Lindsey, 1992).

Entretanto, a transformação mediada por *Agrobacterium* apresenta ainda sérias limitações para a transformação de monocotiledôneas. A *Agrobacterium* é aparentemente inábil para transformar monocotiledôneas. Vários estudos foram

conduzidos para transformar monocotiledôneas pelo sistema *Agrobacterium*, como teste de linhagens de bactéria mais virulentas e novas linhagens de plantas recipientes, manipulação da fisiologia do explante, modificação das condições de co-cultivo e uso de sistemas seletivos adequados (Godwin *et al.*, 1992). As tentativas de utilizar este sistema para a transformação de cereais foram insatisfatórias ou as publicações não provaram a integração estável e a segregação mendeliana dos transgenes (Hess *et al.*, 1990; Gould *et al.*, 1991; Chan *et al.*, 1993). Apenas uma publicação relata a transformação de arroz pelo sistema *Agrobacterium* com resultados convincentes de transgênese (Hiei *et al.*, 1994). Já no caso do milho, o metabólito secundário dimboa parece inibir o crescimento de *Agrobacterium* (Sahi *et al.*, 1990).

Uma das razões pela qual os cereais não são transformados facilmente pela *Agrobacterium* deve-se ao fato destas plantas não serem hospedeiras naturais de *Agrobacterium* ssp, não exibindo, deste modo, todo o conjunto de fatores necessários à infecção pela bactéria (Potrykus, 1991; Zupan & Zambryski, 1995). Este fato indica que o uso desta bactéria para transformação de cereais está longe de ser uma metodologia rotineira e reproduzível (Songstad *et al.*, 1995)

Vários métodos de transformação direta foram e/ou estão sendo desenvolvidos para contornar este problema (Potrykus, 1991), porém apenas a transformação de protoplastos, a eletroporação de tecidos intactos e o bombardeamento com micropartículas produziram plantas transgênicas férteis de milho (Fromm *et al.*, 1990; Gordom-Kamm *et al.*, 1990; D'Halluin *et al.*, 1992; Omirulleh *et al.*, 1993). A transformação de protoplastos foi o primeiro método direto de transferência de genes utilizado em plantas (Paszkowski *et al.*, 1984). A vantagem deste método é o grande número de células que podem ser manipuladas e o processo de transformação que é relativamente simples. A maior desvantagem é que em milho e outras espécies, a regeneração de plantas férteis a partir de protoplastos é difícil e altamente genótipo dependente

(Mórocz, *et al.*, 1990; Lazzeri & Shewry, 1993). A eletroporação de tecidos intactos não necessita técnicas refinadas de cultura de tecidos, porém é de pouco reprodutível, sendo uma metodologia dominada por poucos laboratórios (D'Halluin *et al.*, 1992; Vasil, 1994).

A metodologia mais utilizada até o momento para a transformação de cereais, incluindo o milho, é o bombardeamento com micropartículas. Após o trabalho pioneiro de Sanford *et al.*, (1987) e Klein *et al.*, (1987), o método passou a ser utilizado em vários laboratórios (Christou, 1992). Plantas férteis de milho foram obtidas a partir do bombardeamento de células em suspensão (Fromm *et al.*, 1990; Gordom-Kamm *et al.*, 1990) e embriões zigóticos imaturos (Koziel *et al.*, 1993).

Um método de transformação somente pode ser considerado eficiente após ser utilizado na transformação de várias espécies. Com base nesta premissa, somente o bombardeamento com micropartículas pode ser considerado um método eficiente de transformação de cereais, tendo em vista a obtenção de plantas transgênicas de milho (Fromm *et al.*, 1990; Gordon-Kamm *et al.*, 1990; Aves *et al.*, 1992; Walters *et al.*, 1992; Spencer *et al.*, 1992; Murry *et al.*, 1993; Koziel *et al.*, 1993; Register III *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 1995), trigo (Vasil *et al.*, 1992, 1993; Weeks *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1994; Nehra *et al.*, 1994), arroz (Christou *et al.*, 1991; Cao *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993), cevada (Ritala *et al.*, 1994; Wan & Lemaux, 1994), aveia (Somers *et al.*, 1992), centeio (Castillo *et al.*, 1994) e sorgo (Cassas *et al.*, 1993).

### 3.3. Bombardeamento com micropartículas

O bombardeamento com micropartículas permite a introdução de substâncias em células ou tecidos intactos através do uso de micropartículas aceleradas a alta velocidade (Sanford, 1990). Klein *et al.*, (1987) observaram que micropartículas de tungstênio podem ser utilizadas para introduzir DNA ou

RNA em células da epiderme de cebola, com subsequente expressão transitória dos genes introduzidos. Esta tecnologia foi empregada por Christou *et al.*, (1988) para produzir transformantes estáveis de soja e por Fromm *et al.*, (1990) e Gordon-Kamm *et al.*, (1990) para produzir as primeiras plantas transgênicas férteis de milho.

O bombardeamento com micropartículas é genótipo-independente, ao contrário do sistema *Agrobacterium* e de protoplastos, e não necessita de técnicas sofisticadas de cultura de tecidos. Assim, existem vantagens inerentes desse método, como a transformação de tecidos organizados, rápida obtenção de transformantes, sistema universal de transformação, capacidade de transformação de espécies recalcitrantes e estudos genéticos e bioquímicos através da transformação transiente de tecidos organizados (Christou, 1992). A transformação transiente ocorre em mais de 90% dos casos quando a micropartícula penetra o núcleo da célula (Yamashita *et al.*, 1991). A fase do ciclo celular também é um importante fator a ser considerado para a transformação em alta eficiência. Em células embriogênicas de tabaco a eficiência de transformação transiente é 4 a 6 vezes maior nas fases M e G2 do que nas fases G1 e S (Iida *et al.*, 1991). O bombardeamento pode ser efetuado como material genético em diferentes formas, como a utilização de RNA ou DNA (Klein *et al.*, 1987), DNA em forma circular ou linear, simples ou dupla-fita (Blowers *et al.*, 1989).

A primeira geração de equipamentos utilizados para bombardeamento com micropartículas, utilizava pólvora como agente propulsivo (Klein *et al.*, 1987). Embora este sistema seja efetivo, existem problemas sérios de reprodutibilidade devido as variações da carga de pólvora e de dispersão das micropartículas. A segunda geração inclui uma série de sistemas com propulsão eletrostática, pneumática e a gás comprimido (Lazzeri & Shewry, 1993). Destes sistemas, o mais utilizado é o equipamento PDS 1000-He, comercializado pela Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA. Em nosso laboratório foi construído um

equipamento com propulsão de gás Hélio comprimido, similar ao PDS 1000-He (Márcio J. da Silva, dados não publicados).

Duas estratégias podem ser utilizadas para a obtenção de transformantes pelo bombardeamento com micropartículas. O bombardeamento de meristemas apicais com a posterior regeneração via organogênese, após tratamento com citocininas (McCabe *et al.*, 1988; Christou *et al.*, 1989) e o bombardeamento de culturas celulares e posterior seleção de transformantes (Klein *et al.*, 1988; Finer & McMullen, 1990). A primeira estratégia tem sido utilizada com sucesso para a transformação de leguminosas (McCabe *et al.*, 1988; Christou *et al.*, 1989) e a segunda para a obtenção de cereais transgênicos (Morrish & Fromm, 1992).

O estabelecimento de uma metodologia eficiente e reproduzível para a transformação de milho requer estudos preliminares para a otimização de culturas celulares regeneráveis, definição das condições físicas e biológicas do bombardeamento, utilização de vetores que permitam expressão adequada dos genes introduzidos, obtenção de sistema marcador e seletivo rápido e eficiente, e padronização de técnicas moleculares para análise de transgenes.

### *3.3.1. Otimização das condições físicas e biológicas para o bombardeamento*

Os parâmetros físicos e biológicos do bombardeamento devem ser otimizados para que permitam a transformação com o mínimo de danos ao tecido alvo. A otimização desses parâmetros pode ser monitorada através da expressão transiente de um gene repórter (Morrish *et al.*, 1992; Russel *et al.*, 1992). O tamanho da micropartícula, a distância entre o tecido-alvo e a fonte de aceleração, o número de bombardeamentos, o vácuo aplicado, a pressão de gás hélio utilizada para a aceleração das micropartículas, e o uso de estabilizadores osmóticos influenciam na transformação transiente e devem ser estudados para cada espécie e tecido a ser transformado (Morrish *et al.*, 1992; Russel *et al.*, 1992b; Vain *et al.*, 1993).

*Tamanho e composição da micropartícula:* A micropartícula deve ser quimicamente inerte e ter massa suficiente para, quando acelerada, possuir um momento para penetrar apropriadamente no tecido-alvo sem causar destruição excessiva (Christou, 1992). Estas condições são satisfeitas com o uso de micropartículas de ouro de 0.6 a 3.0  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Morrish *et al.*, 1993). As micropartículas de tungstênio, embora sejam utilizadas por alguns autores, são tóxicas e de difícil dispersão no bombardeamento (Russel *et al.*, 1992a).

*Distância entre o tecido alvo e a ponta do canhão, vácuo e pressão de gás hélio:* Estes parâmetros influenciam a velocidade de impacto das micropartículas no tecido alvo, a qual depende diretamente da resistência do ar residual na câmara de disparo (Morrish *et al.*, 1993). A velocidade por sua vez, está diretamente correlacionada com a profundidade de penetração no tecido, o que é decisivo para a obtenção de transgenes em tecidos onde a embriogênese somática origina-se de camadas relativamente profundas (Christou *et al.*, 1992).

*Número de disparos:* O número de células transformadas está diretamente correlacionado com o número de disparos efetuados. Entretanto existe um limite, que é dado pelo número de células do explante bombardeado e pelos danos provocados no tecido alvo (Birch & Franks, 1991).

*Uso de estabilizadores osmóticos:* O uso de substâncias osmoticamente ativas, antes e depois do bombardeamento, aumentam a transformação transiente e estável. Este fenômeno é devido a plasmólise do tecido antes do bombardeamento, a qual evita a extrusão do citoplasma no momento da penetração da micropartícula na célula (Russel *et al.*, 1992b; Vain *et al.*, 1993).

A otimização desses parâmetros é fundamental e deve ser anterior a análise funcional da expressão gênica ou seleção para a obtenção de transformantes, em cada espécie e tecido a ser transformado (Morrish *et al.*, 1993).

### 3.3.2. Cultura de Tecidos

A cultura de tecidos vegetal tem como base o princípio de que as células vegetais podem ser cultivadas axenicamente e são totipotentes (Lazzeri & Shewry, 1993). O milho, assim como outras gramíneas, foi considerado recalcitrante para a obtenção de culturas celulares *in vitro*. A baixa competência celular para a desdiferenciação e embriogênese somática nas gramíneas é correlacionada com a resposta a ferimentos, onde áreas danificadas são isoladas e não são reparadas por divisão celular *de novo*, como em dicotiledôneas (Kahl, 1982).

Esta determinação celular foi contornada pela utilização de tecidos imaturos, que são permissivos à indução de embriogênese somática (Vasil, 1985). Deste modo, o explante é o fator determinante para o sucesso da embriogênese somática em milho. O tecido escutelar de embriões imaturos tem sido o principal explante utilizado para iniciar culturas embriogênicas (Duncan *et al.*, 1985; Close & Ludeman, 1987; Armstrong & Green, 1985).

O genótipo tem importante papel no sucesso da obtenção de embriogênese somática. Diferenças significativas tem sido encontradas em termos quantitativos e qualitativos entre diferentes linhagens de milho (Duncan *et al.*, 1985; Prioli, 1987; Armstrong & Green, 1985).

Outro fator determinante na obtenção de embriogênese somática de milho é o uso de 2,4-D ou picloran no meio de cultura (Lu *et al.*, 1982; Vasil *et al.*, 1985). O meio de cultura mais utilizado para a obtenção de alta frequência de embriogênese somática é o meio N6 (Chu *et al.*, 1975; Duncan *et al.*, 1985). Vários fatores coadjuvantes podem ser otimizados para potencializar a embriogênese somática. Fontes de nitrogênio reduzido na forma de aminoácidos, notadamente prolina, foram demonstradas ser importantes para a obtenção de culturas friáveis (Duncan *et al.*, 1985; Claparols *et al.*, 1993; Dennehey *et al.*, 1994). A adição de nitrato de prata no meio de cultura inibe a

produção endógena de etileno que prejudica quantitativamente e qualitativamente a obtenção de culturas embriogênicas friáveis (Vain *et al.*, 1989a, 1989b). Por sua vez, a fonte de carbono utilizada influencia na qualidade da cultura obtida. Por exemplo, a utilização de sorbitol e glicose em conjunto ou não com a sacarose aumenta a frequência de culturas celulares friáveis com maior capacidade de regeneração (Duncan *et al.*, 1985; Swedlund & Locy, 1993). A manipulação desse conjunto de fatores nutritivos tem possibilitado a obtenção de culturas embriogênicas e de alta capacidade de regeneração em um número elevado de linhagens de milho (Duncan *et al.*, 1985; Armstrong, 1994).

A embriogênese somática em milho pode ser classificada em tipos I e II. Esses dois tipos de cultura podem ser distinguidos pela friabilidade, taxa de crescimento e grau de diferenciação. Os calos embriogênicos tipo I não são friáveis, apresentam baixa taxa de crescimento e contém estruturas altamente diferenciadas, com embriões somáticos desenvolvidos até o estágio escutelar e coleóptilar. O calos tipo II são altamente friáveis, apresentam elevada taxa de crescimento e, contém estruturas pouco diferenciadas, com os embriões somáticos desenvolvidos até o estágio globular. Esta classificação pode ser flexível e, as culturas obtidas podem ter características de ambos os tipos (Armstrong, 1994; Claparols *et al.*, 1993).

Para a transformação através de bombardeamento com micropartículas é de fundamental importância a origem uni ou multicelular e a profundidade das células que dão origem aos embriões somáticos. Existe controvérsia na bibliografia quanto a natureza das células que dão origem aos embriões somáticos de cereais (Vasil *et al.*, 1985; Fransz & Schel, 1987, 1990a, 1990b).

### 3.3.3. Genes Seletivos

Devido a baixa frequência ( $1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-3}$ ) de células transformadas estavelmente quando bombardeadas com microparticulas (Armstrong *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1989), várias estratégias de seleção metabólica e/ou visual tem sido utilizadas para a obtenção de transformantes (Morrish *et al.*, 1993). Um sistema seletivo ideal deve discriminar as células transgênicas das não transgênicas, gerar poucos escapes e não possuir efeito adverso na regeneração e fertilidade das plantas transgênicas (Morrish *et al.*, 1993; Lazzery & Shewry, 1993). O antibiótico kanamicina é utilizado como agente seletivo principalmente para plantas dicotiledôneas. Já em milho, embora tenham sido obtidos transformantes com o uso deste antibiótico (D'Halluin *et al.*, 1992), muitos escapes são obtidos, o que limita a utilização deste agente seletivo (Register III *et al.*, 1994).

Gordon-Kamm *et al.*, (1990) demonstraram que o herbicida bialaphos<sup>®</sup> pode ser empregado como agente seletivo efetivo na obtenção de plantas transgênicas de milho. Dekeiser *et al.* (1989) também demonstraram que a fosfitotricina, um análogo do bialaphos<sup>®</sup>, é o agente seletivo mais adequado para a seleção de plantas transgênicas de arroz. O bialaphos<sup>®</sup> é um antibiótico tripeptídeo produzido pelo fungo *Streptomyces hygroscopicus*. Consiste de uma molécula de fosfitotricina (PPT), um análogo do ácido L-glutâmico e dois resíduos de L-alanina. Após a remoção destes resíduos por peptidases endógenas o PPT torna-se um potente inibidor irreversível da glutamina sintetase (GS) do citoplasma e do cloroplasto (De Block *et al.*, 1987; D'Halluin *et al.*, 1992; Coruzzi, 1991; Zollner, 1993). A glutamina sintetase possui um papel central na assimilação de amônia e na regulação do metabolismo do nitrogênio nas plantas (Mifflin & Lea, 1976; Skokut *et al.*, 1978). A GS é a principal enzima vegetal que utiliza a amônia produzida pela redução de nitrito, degradação de aminoácidos e fotorrespiração (Coruzzi, 1991). Após a aplicação do herbicida, ocorre rápida acumulação de amônia, deficiência de glutamina e inibição da

fotossíntese, levando a planta à morte (Bayer *et al.*, 1972; Tachibana *et al.*, 1986a, 1986b; Sauer *et al.*, 1987).

O mesmo organismo que produz o PPT, produz também uma enzima, a fosfinotricina-*N*-acetiltransferase (PAT) que inativa o PPT por acetilação, utilizando acetil-coenzima A como cofator (Thompson *et al.*, 1987). Os genes *bar*, isolado de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson *et al.*, 1987) e *pat*, isolado de *S. viridochromogenes* (Wohlleben *et al.*, 1988), codificam a enzima PAT e podem ser utilizados para a seleção de células resistentes aos herbicidas bialaphos<sup>®</sup> e fosfinotricina.

Apesar dos genes *bar* e *pat* serem utilizados como genes seletivos na transformação de cereais, é necessário um estudo das condições de seleção, como a concentração do herbicida, o nível de expressão do gene marcador seletivo e a composição do meio seletivo, as quais são específicas para cada espécie, variedade ou linhagem (D'Halluin *et al.*, 1992).

#### 3.3.4. Genes Marcadores

Um gene marcador (também denominado de gene repórter) é utilizado no processo de transformação para se analisar as atividades de diferentes promotores, monitorar a eficiência do bombardeamento, da de seleção e para estudar a herança em gerações subseqüentes das plantas transformadas (McElroy *et al.*, 1995). O gene marcador, deve apresentar baixa atividade inespecífica em plantas, não possuir nenhum efeito deletério no metabolismo vegetal e ter um sistema de monitorização de sua atividade quantitativo, rápido, sensível, versátil, simples, barato e não destrutivo (Jefferson *et al.*, 1987; Jefferson, 1993).

O locus *uidA* de *Escherichia coli* (também descrito como *gusA*), que codifica a enzima  $\beta$ -glucoronidase (GUS), é o gene repórter mais utilizado na transformação de plantas (Jefferson *et al.*, 1987; Jefferson & Wilson, 1991) A

enzima  $\beta$ -glucoronidase, catalisa a hidrólise de uma série de  $\beta$ -glucoronídeos, os quais podem ser facilmente ensaiados em reações fluorométricas e histoquímicas (Jefferson, 1987; 1993). Em milho, os genes que regulam a biossíntese de antocianinas podem ser utilizados também como genes marcadores, com a vantagem de não serem destrutivos, e servirem para a seleção visual de calos transgênicos (Klein *et al.*, 1989; Roth *et al.*, 1991).

### 3.3.5. Vetores utilizados para a Transformação

Um plasmídeo utilizado para a transformação direta de milho é constituído por um ou mais conjuntos de genes, incluindo um gene seletivo, um gene marcador e/ou um gene de interesse. Cada conjunto possui, pelo menos, um promotor, o gene a ser expresso e uma seqüência sinal de poliadenilação. O conjunto pode conter ainda outros elementos reguladores além do promotor, como introns, seqüências de ligação a ribossomos e sinais para trânsito intercelular da proteína imatura. Estes elementos adicionais podem aumentar significativamente a expressão de um determinado gene (Lazzery & Shewry, 1993).

Para que a seleção seja eficiente é necessário que a expressão dos genes seletivo e marcador ocorra em níveis elevados. Isso pode ser conseguido através do uso de um promotor constitutivo adequado (Wilmink & Dons, 1993). Entretanto, a expressão destes genes não depende apenas da força do promotor, mas também do número de cópias inseridas e da posição de inserção no genoma. O uso de seqüências de DNA chamadas SAR, caracterizadas por ligarem-se à matriz protéica do núcleo, reduz o efeito de posição e do número de cópias na expressão dos transgênes (Grosveld *et al.*, 1987). Como exemplo, o uso da seqüência SAR ARS-1 de levedura aumentou em mais de 20 vezes a expressão estável de GUS em plantas transgênicas de tabaco (Allen *et al.*, 1993).

O promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (Guilley *et al.*, 1982), embora bastante utilizado em dicotiledôneas para a produção de plantas transgênicas, é relativamente fraco em monocotiledôneas (Hauptmann *et al.*, 1988). Algumas seqüências tem demonstrado alta eficiência para a expressão de genes em monocotiledôneas e obtenção de transformantes. As principais seqüências promotoras utilizadas são: (i) Os promotores do gene da álcool desidrogenase 1 (*adh1*) de milho, do gene da actina 1 (*act1*) de arroz, do gene da ubiquitina (*ubi1*) de milho, junto com os respectivos introns Adh1, Act1 e Ubi1, (ii) o promotor recombinado pEmu, e (iii) a duplicação do promotor 35S (Vasil, 1994).

A caracterização e análise funcional de promotores tecido-específico é importante para a construção de cassetes que promovam a expressão tecido-específica dos genes introduzidos. Estes promotores são importantes para a expressão de proteínas em sítios específicos, como o endosperma para a expressão de proteínas de reserva (Morrish *et al.*, 1993). O uso de introns tem demonstrado aumentos de 2 a 1000 no nível de mRNA e proteína em tecidos transformados. O fenômeno não é bem conhecido, porém especula-se que os introns aumentem a estabilidade dos pré-mRNAs (Luehersen, 1994).

### 3.3.6. Identificação do Transgene

Existem vários métodos para se comprovar a integração do gene transferido no genoma da planta. Os dados devem ser moleculares, genéticos e fenotípicos e nenhuma análise isolada pode ser aceita como prova definitiva da transgênese (Potrykus, 1991).

Os métodos moleculares incluem a análise por PCR (Chee *et al.*, 1991), o "Southern blotting" (Potrykus, 1991) e o "Dot blotting" (Morrish *et al.*, 1993). O PCR e "Dot Blotting" permitem a análise rápida de muitas plantas, mas não

demonstram a integração do gene de interesse no genoma, o que só é possível com “Southern blotting” (Morrish *et al.*, 1993).

As análises fenotípicas incluem todos os testes que podem ser realizados com os genes seletivo, marcador e de interesse (Chee *et al.*, 1991). Para o gene *uidA* por exemplo, ensaios fluorométricos e histoquímicos podem ser realizados com amostras das plantas regeneradas (Jefferson, 1987). Os genes *bar* e *pat* por sua vez, permitem verificar a atividade direta do gene pulverizando-se a planta regenerada com os herbicidas Herbiace® ou Basta® (Gordon-Kamm *et al.*, 1990). As atividades de *bar* e *pat* podem ser demonstradas ainda através de ensaios de acetilação do PPT *in vitro*, utilizando-se extratos protéicos preparados a partir de pequenas porções das plantas regeneradas (Spencer *et al.*, 1990). Alternativamente a atividade de PAT pode ser demonstrada cultivando-se amostras de folha em meio de cultura contendo o indicador de pH vermelho de clorofenol (Kramer *et al.*, 1993; Wright *et al.* 1994).

Finalmente, a segregação das características conferidas pelo transgene, em cruzamentos de plantas transgênicas com não transformadas, deverá resultar em padrões mendelianos de herança, o que confirma em definitivo a integração e funcionalidade dos genes introduzidos (Morrish *et al.*, 1993).

#### 4. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo identificar os pontos críticos para a obtenção de plantas transgênicas de milho, linhagem CAT-100-6, através do bombardeamento com micropartículas de embriões zigóticos imaturos ou calos embriogênicos tipo I.

Abordagem:

Para atingir o objetivo proposto foram estudados os seguintes parâmetros:

- Condições de cultura de tecidos para obtenção de calos com alta qualidade para produção de embriogênese somática e regeneração.

- Localização das células responsáveis pela origem dos embriões somáticos no escutelo de embriões imaturos.

- Condições de bombardeamento, como: Tamanho da micropartícula, pressão de disparo, distância do alvo e efeito destes fatores nos danos causados pelo bombardeamento.

- Efeito de agentes osmóticos adicionados ao meio de cultura nos danos causados pelo bombardeamento.

- Efeito do número de ciclos seletivos e da pressão de seleção na obtenção de calos transgênicos.

## 5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 5.1. *Material vegetal*

Plantas das linhagens homozigóticas CAT-100-6, CAT-100-1 (Prioli, 1987), Hill-A, Hill-B (Armstrong *et al.*, 1991) e dos cruzamentos Hill-A x Hill-B e (Hill-A x Hill-B) x CAT-100-6 foram obtidas em condições de campo, na área experimental do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - UNICAMP. As linhagens foram mantidas por autofecundação ou cruzamentos entre plantas da mesma linhagem.

### 5.2. *Cultura de tecidos*

Espigas foram coletadas entre 11 e 15 dias após a polinização, desinfestadas superficialmente durante 15 minutos com álcool comercial 70%, 30 minutos em solução comercial de hipoclorito de sódio 0.75% contendo algumas gotas de Tween 20<sup>®</sup> e enxaguadas duas vezes com água destilada estéril.

Sob condições assépticas, embriões imaturos, medindo entre 0.75 a 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 20 a 25 ml de meio de indução de calos, com o eixo embrionário em contato com o meio de cultura. O meio de cultura variou de acordo com o experimento e o material genético. Nos experimentos preliminares com as linhagens Cat-100-6 e CAT-100-1, utilizou-se o meio de indução e manutenção de calos CM1 (Prioli, 1987; Tabela 1). Para aumentar a frequência de embriogênese somática da linhagem CAT-100-6, foi formulado o meio de indução e manutenção ML1 (Tabela 1). Para os cruzamentos Hi-II A x Hi-II B e (Hi-II A x Hi-II B) x CAT-100-6 foi utilizado o meio N6 1-100-25-Ag (Songstad *et al.*, 1992; Tabela 1). As culturas foram mantidas no escuro a temperatura de

**Tabela 1** - Composição dos meios de cultura utilizados:

Componente	Meio de cultura				
	CM1 <sup>a</sup>	ML1 <sup>b</sup>	N6 1-100-25-Ag <sup>c</sup>	RM2 <sup>a</sup>	RM <sup>a</sup>
Sais <sup>d</sup>	N6	N6	N6	MS	MS
Glicina	2 mg/l	2 mg/l	2 mg/l	-	-
Mio inositol	100 mg/l	100 mg/l	-	100 mg/l	100mg/l
Tiamina	5 mg/l	0.1 mg/l	1 mg/l	5 mg/l	5 mg/l
Nicotinamida	1 mg/l	0.2 mg/l	0.5 mg/l	1 mg/l	1 mg/l
Piridixina	1.5 mg/l	0.2 mg/l	0.5 mg/l	1.5 mg/l	1.5 mg/l
Colina	-	0.1 mg/l	0.1 mg/l	-	-
Riboflavina	-	50 µg/l	50 µg/l	-	-
Biotina	-	0.1 mg/l	0.1 mg/l	-	-
Ácido fólico	-	50 µg/l	50 µg/l	-	-
Pantotenato	-	0.1 mg/l	0.1 mg/l	-	-
Cianocobalamina	-	0.15 µg/l	0.15 µg/l	-	-
Ácido aminobenzóico	-	50 µg/l	50 µg/l	-	-
L-Prolina	-	690 mg/l	2,9 g/l	-	-
Caseína hidrolisada	-	100 mg/l	100 mg/l	-	-
Nitrato de prata	-	10 mg/l	1.7 mg/l <sup>e</sup>	-	-
Cloreto de Magnésio	-	650 mg/l	-	-	-
2,4-D	2.2 mg/l	2.2 mg/l	1.0 mg/l	0.25 mg/l	-
BAP	-	-	-	5 mg/l	-
Sacarose	30 g/l	20 g/l	20 g/l	30 g/l	30 g/l
Gelrite <sup>g</sup>	3 g/l	3 g/l	3 g/l	2.4 g/l	2.4 g/l
pH <sup>f</sup>	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

<sup>a</sup>Meio formulado por Prioli (1987). <sup>b</sup>Meio formulado neste trabalho a partir de Trigiano et al. (1992) e Vain et al. (1989a), contendo as vitaminas de Horn et al. (1983). <sup>c</sup>Meio formulado por Songstad et al. (1991). <sup>d</sup>Formulação básica de sais: N6 - Chu et al. (1975); MS - Murashigue & Skoog, (1962). <sup>e</sup>Filtroesterelizado e adicionado ao meio de cultura após autoclavagem a 121°C por 20 minutos. <sup>f</sup>pH ajustado com KOH 2 M. <sup>g</sup>Adicionado após o ajuste do pH.

25±1°C. Subculturas foram realizadas entre 10 e 20 dias, dependendo do crescimento dos calos.

#### *5.2.1. Embriogênese somática em calos derivados das linhagens CAT-100-6 e CAT-100-1*

Para verificar a ocorrência de possíveis diferenças qualitativas na resposta à indução de embriogênese somática, foram inoculados aproximadamente 800 embriões imaturos das linhagens CAT-100-1 e CAT-100-6 em meio CM1. A resposta foi avaliada visualmente entre 5 e 30 dias após o inóculo para a produção de calo embriogênico tipo I, calóides e calo mucilaginoso (Prioli,1987).

#### *5.2.2. Efeito dos meios CM1 e ML1 na qualidade das culturas derivadas da linhagem CAT-100-6*

Cerca de 60 embriões imaturos foram inoculados em cada meio de cultura. A qualidade dos calos foi avaliada entre 5 e 30 dias após o inóculo. Como medida da qualidade da cultura os calos foram classificados em “não desenvolvido” quando não ocorreu embriogênese e/ou houve a formação de calóides ou de culturas mucilaginosas, “desenvolvido” quando o número de embriões somáticos foi normal e “excelente” quando ocorreu desenvolvimento de número superior de embriões somáticos por escutelo em relação a classe “desenvolvido”.

#### *5.2.3. Efeito dos meios N6 1-100-25-Ag e ML1 na qualidade das culturas derivadas das linhagens CAT-100-6 e os híbridos Hill-A x Hill-B e (Hill-A x Hill-B) x CAT-100-6*

Foram inoculados aproximadamente 350 embriões Hill-A x Hill-B em meio N6 1-100-25-Ag, 100 embriões (Hill-A x Hill-B) x CAT-100-6 nos meios N6 1-100-25-Ag e ML1 e 50 embriões CAT-100-6 nos meios N6 1-100-25-Ag e ML1. A qualidade das culturas foi avaliada visualmente entre 5 e 30 dias após o inóculo em termos de produção de calos tipo I e calos tipo II.

### *5.3. Origem da embriogênese somática em tecido escutelar de embriões imaturos da linhagem CAT-100-6*

Apesar da existência de controvérsia a respeito da origem celular da embriogênese somática em cereais, alguns autores indicam que, em milho, estas células localizam-se em camadas sub-epidérmicas do escutelo (Vasil et al., 1985; Fransz & Schel, 1987, 1990a, 1990b). Um estudo foi conduzido para responder esta questão na linhagem CAT-100-6. Para este estudo, coletou-se amostras de embriões inoculados em meio CM1 de 1 a 14 dias após o inóculo. Os embriões foram fixados, seccionados e corados com safranina e Fast Green, e analisados sob microscópio óptico.

### *5.4. Microscopia*

A coloração dos embriões em cultura foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Schneider (1981). Os tecidos foram fixados em solução aquosa de etanol 50% (v/v) contendo 5% (v/v) de ácido acético e 3.7% (v/v) de formaldeído por 3 a 4 hs. Em seguida o material foi desidratado pela passagem em uma série de soluções de etanol (60, 70, 85, 95 e 2 x 100%). Os tecidos foram incubados por 30 minutos em cada solução. As amostras foram então clareadas pela passagem em uma série de soluções de etanol/xileno (75/25, 50/50, 25/75 e 0/100). Novamente, os tecidos foram incubados por 30 minutos em cada solução. Em seguida o tecido foi infiltrado com Paraplast<sup>®</sup>+. As amostras foram montadas em blocos de madeira e seccionadas em micrótomo,

efetuando-se cortes de 10 µm de espessura. As fitas de Paraplast®+ contendo os cortes foram fragmentadas em pedaços de aproximadamente 1.5 cm. Estes fragmentos foram mergulhados em banho a 42°C e coletados em lâminas tratadas com poli-L-lisina. As lâminas foram desparafinadas pela passagem em uma série de soluções de etanol/xileno (0/100, 15/85, 30/70, 50/50, 70/30, 85/15, 5/95 e 0/10), a temperatura ambiente, por 10 minutos em cada solução. Em seguida, as lâminas foram hidratadas em série de soluções de etanol/água destilada (100/0, 95/5, 85/15, 70/30, 50/50, 30/70, 15/85, 0/100 e 0/100), por 10 minutos para cada solução.

A coloração foi realizada incubando-se as lâminas em solução aquosa de ácido tânico a 1% por 30 segundos, seguida de 3 lavagens em água destilada, por 2 minutos cada uma. As lâminas foram transferidas para solução de cloreto férrico a 3%, seguida de 3 lavagens em água destilada por 2 minutos cada. As lâminas foram transferidas, em série alcoólica (0/100, 15/85, 30/70 e 50/50) até a concentração de 50% de etanol. Cada lâmina foi mergulhada lenta e repetidamente por 30 vezes em cada solução de etanol. Em seguida, as lâminas foram coloridas por 30 minutos em safranina a 1% em etanol 50%. Após a coloração, o material foi lavado rapidamente em etanol 70% acidulado (1 gota de HCl 50% em 100 ml de etanol 70) e, transferido em série alcoólica de etanol (70/30, 95/5, 100/0) até a concentração de 100%. Novamente, cada lâmina foi mergulhada lenta e repetidamente por 30 vezes em cada solução de etanol. Em seguida, foi realizada a coloração com "Fast Green FCF". Este corante foi preparado dissolvendo-se 0.2 g de "Fast Green FCF" em 100 ml de óleo de cravo e diluindo-se em 100 ml de solução 4/6 de etanol e xileno. As lâminas foram coloridas em 200 ml de etanol/xileno 50/50 com 10 ml do corante concentrado. Para esta coloração cada lâmina foi mergulhada lenta e repetidamente por 20 a 25 vezes. Após a coloração com "Fast Green", as lâminas foram transferidas para xileno 100% e montadas em Permount® com o auxílio de lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio invertido ICM

405 (Karl Zeiss) e espécimes representativos fotomicrografados, com filme Kodak Gold Plus 100 e Kodak Ektachrome 160T para fotos e diapositivos, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante.

### 5.5. Ensaio histoquímico de GUS

A atividade de GUS foi analisada histoquimicamente de acordo com a metodologia descrita por Jefferson (1987). Amostras de tecidos foram incubadas com uma solução contendo 10 mg de X-gluc dissolvido em 100  $\mu$ l de DMSO e diluído em 40 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7.0, contendo 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 10 mM de Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.0, 0.1% de sarcosyl, 0.1% de Triton X-100, 5 mM de ferrocianato de potássio e 5 mM de ferricianato de potássio. Em alguns experimentos foi adicionado de 20 a 25% de metanol à solução de revelação da atividade de GUS, para inibir a degradação endógena de X-gluc nos tecidos analisados (Kosugi *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1993).

### 5.6. Ensaio da atividade de PAT

Sementes da linhagem CAT-100-6 foram desinfestadas com álcool/hipoclorito de sódio e germinadas assepticamente em papel de germinação. Dois dias após a germinação, os coleótilos foram utilizados para experimentos de expressão transitória através do bombardeamento com micropartículas. Foram utilizados no bombardeamento os plasmídeos pBARGUS, pACTBARGUS e ACT1-F (Fig. 1). Foi realizado um experimento com 9 repetições por plasmídeo, sendo que cada repetição constou de 9 coleótilos inoculados em placa de petri contendo meio CM1. Os coleótilos foram bombardeados com micropartículas de ouro de 1-3  $\mu$ m de  $\varnothing$ , a uma pressão de 1200 psi e a 9 cm entre o alvo e o disco de ruptura. Quarenta e oito horas após o bombardeamento, 100 mg de tecido foi macerado em 100  $\mu$ l de tampão de extração, constituído de 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 0.15

mg/l leupeptidina, 0.15 mg/l PMSF, 0.3 mg/l BSA, 0.3 mg/l DTT. O extrato foi centrifugado por 7 minutos a 10.000g, e o sobrenadante transferido para um novo tubo eppendorf®. O ensaio para a atividade de PAT foi realizado em uma mistura contendo 20 µl do sobrenadante, 2 µl de Basta™ 10% em tampão de extração e 3 µl de [1-<sup>14</sup>C]-Acetil-Coenzima A a 2 mM (58.1 mCi/mmol). Todos os procedimentos foram conduzidos no gelo. A reação foi incubada por 30 minutos a 37°C. Após o término da reação, 5 µl foram plotados em placa de sílica gel e a mistura resolvida em cromatografia líquida ascendente por 4 a 7 horas, em 150 ml de uma solução contendo 1-propanol : NH<sub>4</sub>OH (25% NH<sub>3</sub>) 3:2 (v/v). A concentração de proteína do sobrenadante foi determinada através do método de Bradford (1976), empregando-se o kit Bio-Rad Protein Assay. Após a corrida, a placa foi secada e autoradiografada em filme Hyperfilm™-MP. A intensidade relativa das bandas correspondentes ao PPT acetilado foi resolvida em um densitômetro a laser. A intensidade relativa das bandas e a concentração de proteína foram utilizadas para determinar a atividade específica de PAT em µmoles de PPT acetilado/µg proteína/hora.

### 5.7. Plasmídeos utilizados

pACT1-F - Plasmídeo que possui o gene *uidA*, que codifica a enzima β-glucoronidase (Jefferson, 1987), sob o controle do promotor constitutivo do gene da actina 1 (*Act 1*) de arroz (McElroy *et al.*, 1990) e da seqüência de poliadenilação da nopalina sintetase (3' NOS) do plasmídeo pTiC58 de *Agrobacterium tumefaciens* (Fralely *et al.*, 1983). O gene *Act1* codifica um transcrito encontrado com relativa abundância em todos os tecidos e estágios de desenvolvimento de arroz, e pode ser empregado como promotor constitutivo forte para expressão do gene marcador *uidA* (McElroy *et al.*, 1990). O plasmídeo pACT1-F (Figura 1-A) foi utilizado em experimentos de otimização dos

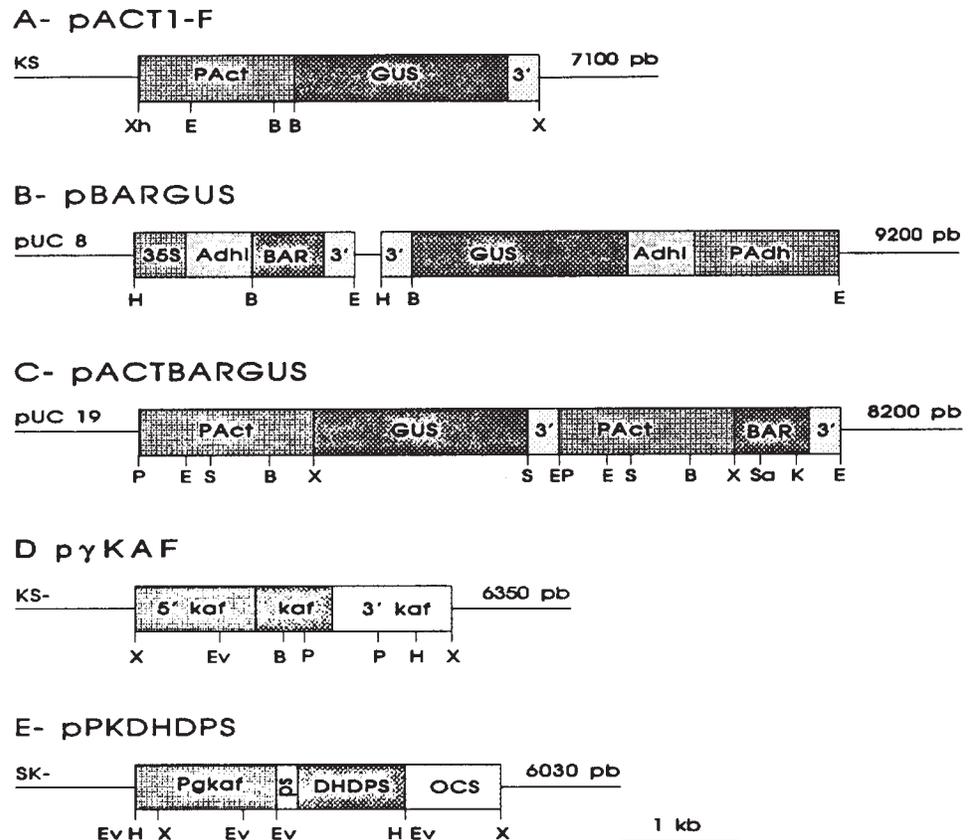
parâmetros de bombardeamento em embriões imaturos e culturas embriogênicas de milho.

pBARGUS - Plasmídeo construído por Fromm *et al.*, (1990), possui o gene *bar* sob o controle do promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve-flor, seguido do íntron 1 do gene da álcool desidrogenase 1 (*Adh1*) de milho. O plasmídeo possui ainda o gene *uidA* sob o controle do promotor e do íntron 1 do gene *Adh1*. Ambos os cassetes possuem a seqüência terminadora 3' NOS de *Agrobacterium tumefaciens* (Fraley *et al.*, 1983). O gene *bar* codifica a enzima fosfinotricina acetil transferase (PAT) (Thompson *et al.*, 1987) que inativa o PPT por acetilação. Este plasmídeo (Figura 1-B), foi utilizado para testar a funcionalidade e comparar as atividades dos genes *bar* e *uidA* do plasmídeo pACTBARGUS.

pACTBARGUS - Plasmídeo construído em nosso laboratório pelo estudante Luciano Arturo Glavina (dados não publicados), a partir dos plasmídeos pBI221, pUNI1 e pACT1-F (McElroy *et al.*, 1990). Possui os genes *bar* e *uidA* sob o controle do promotor do gene *Act1* de arroz e da seqüência terminadora 3' NOS de *Agrobacterium tumefaciens* (Fraley *et al.*, 1983). Este plasmídeo (Figura 1-C) foi utilizado como fonte dos genes seletivo (*bar*) e marcador (*uidA*) nos experimentos de transformação estável.

p $\gamma$ KAF - Possui o gene integral da  $\gamma$ -kafirina, que codifica a  $\gamma$ -prolamina de 28 kDa de sorgo (Freitas *et al.*, 1994). Devido ao produto do gene da  $\gamma$ -kafirina, ser diferenciável em gel de SDS-PAGE das  $\gamma$ -zeínas de 16 e 27 kDa (Freitas, 1993), este plasmídeo (Figura 1-D) foi utilizado para estudar possíveis eventos de co-transformação e produção da proteína em um sistema homólogo.

pPKDHDPS - Possui o gene *dapA* de *Escherichia coli* que codifica a enzima dihidrodipicolinato sintase (DHDPS)(Richaud *et al.*, 1986). Este plasmídeo foi utilizado para estudar o envolvimento da DHDPS na síntese/degradação de lisina em sementes de milho. O gene *dapA* foi



**Figura 1** - Representação esquemática das construções utilizadas neste trabalho.

**(A)** pACT1-F - Contém o gene *uidA* (GUS) mais o sinal poli(A) 3' NOS sob o controle do promotor da Actina 1 e intron 1 da Actina 1 de arroz (McElroy et al. 1990).

**(B)** pBARGUS - Contém o gene *uidA* (GUS) mais o sinal poli(A) 3' NOS sob o controle do promotor da Adh 1 e intron 1 da Adh 1 de milho e o gene *bar* mais o sinal poli(A) 3' NOS sob o controle do promotor 35S e intron 1 da Adh 1 de milho (Fromm et al. 1990).

**(C)** pACTBARGUS - Contém o gene *uidA* (GUS) mais o sinal poli(A) 3' NOS sob o controle do promotor da Actina 1 e intron 1 da Actina 1 de arroz e o gene *bar* mais o sinal poli(A) 3' NOS sob o controle do promotor da Actina 1 e intron 1 da Actina 1 de arroz (Luciano A. Glavina, dados não publicados).

**(D)** p $\gamma$ KAF - Contém o gene estrutural da  $\gamma$ -kafirina de sorgo (Fernando A. Freitas, dados não publicados).

**(E)** pPKDHDPS - Contém a sequência  $\Omega$  de atracamento de ribossomos, o gene codificador para a enzima DHDPS mais o sinal poli(A) 3' OCS sob o controle do promotor da  $\gamma$ -kafirina de sorgo (Germano Cord Neto, dados não publicados).

posicionado sob o controle do promotor do gene da  $\gamma$ -kafirina (Freitas *et al.*, 1994) e sobre a seqüência terminadora 3' NOS de *Agrobacterium tumefaciens* (Fraley *et al.*, 1983). O plasmídeo possui ainda a seqüência  $\Omega$  correspondente a um peptídeo sinal direcional para proteína para cloroplastos (Gallie *et al.*, 1989). Esse plasmídeo (Figura 1-E) foi construído em nosso laboratório por Germano Cord Neto (dados não publicados) a partir do plasmídeo pGA492 (Shaul e Galili, 1992) e p $\gamma$ KAF (Freitas *et al.*, 1994).

Os plasmídeos foram amplificados em *E. coli* DH5 $\alpha$ , isolados por lise alcalina e purificados em gradiente de centrifugação de cloreto de céσιο e brometo de etídeo (Sambrook *et al.*, 1989). O DNA purificado foi ressuspendido na concentração de 1 mg/ml em tampão TE (1 mM Tris HCl pH 8.0; 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA) e armazenado a -20°C.

## 5.8. Bombardeamento

### 5.8.1. Preparo das micropartículas

Sessenta mg de micropartículas de ouro de 1.0, 1.6 ou 1-3  $\mu$ m de diâmetro foram colocadas em tubo de microcentrífuga, lavadas vigorosamente com 1 ml de etanol 70% e deixadas em repouso por 15 minutos. As micropartículas foram centrifugadas por 10 segundos em microcentrífuga de mesa e, o sobrenadante descartado sob condições assépticas. O pellet foi lavado 3 vezes com 1 ml de água milli-Q estéril e as micropartículas ressuspendidas em 1 ml de glicerol 50% estéril.

### 5.8.2. Co-precipitação de DNA com micropartículas

Todas as soluções foram filtro-esterilizadas e as manipulações realizadas em condições assépticas. O DNA plasmídeo foi co-precipitado com as

micropartículas adicionando-se sequencialmente a um tubo de microcentrífuga estéril, 5  $\mu$ l de DNA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 50  $\mu$ l de micropartículas recém-preparadas, 50  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> (2.5 M, estéril) e 20  $\mu$ l de espermidina (0.1 M). O tubo foi agitado por 10 minutos, centrifugado por 10 segundos a 10.000 g e o sobrenadante eliminado. As micropartículas foram lavadas com 140  $\mu$ l de etanol 70% seguida de 140  $\mu$ l de etanol absoluto e ressuspendidas em 50  $\mu$ l de etanol absoluto. Em seguida, efetuou-se 3 sonicagens de 3 segundos alternadas com agitação vigorosa. Aliquotas de 5  $\mu$ l da suspensão de micropartículas/DNA, foram distribuídas por tela de aço inoxidável (1.6 cm de  $\varnothing$ , 20 fios por cm e 0.1 mm de  $\varnothing$  de fio) ou membrana Kapton® (DuPont), conforme o experimento. As telas (ou membranas) foram secas sob vácuo e armazenadas em dessecador contendo sílica gel até o bombardeamento.

### 5.8.3. Disparo

O bombardeamento foi efetuado com um acelerador de micropartículas construído em nosso laboratório por Márcio José da Silva (dados não publicados), de acordo com Sanford *et al.*, (1991). Antes dos disparos a câmara e os componentes do acelerador foram desinfestados com álcool 70%. As telas de aço inoxidável foram esterilizadas a 121°C por 15 minutos e as membranas Kapton® desinfestadas em isopropanol. Para efetuar o bombardeamento um ou mais discos de ruptura (membrana Kapton®), de acordo com a pressão desejada, foram fixados na ponta da câmara de Hélio com porca de fixação (Figura 2-A). O dispositivo de disparo foi montado de duas formas. No método tradicional (Kikkert, 1993), uma tela de aço inoxidável foi disposta no dispositivo de disparo sob a membrana Kapton® contendo as micropartículas dispersas em sua face inferior (Figura 2-B). No método GE (“Gas entrainment”), as micropartículas foram dispensadas diretamente na tela de aço inoxidável (Figura 2-C). Após a montagem completa, o dispositivo de disparo foi posicionado na

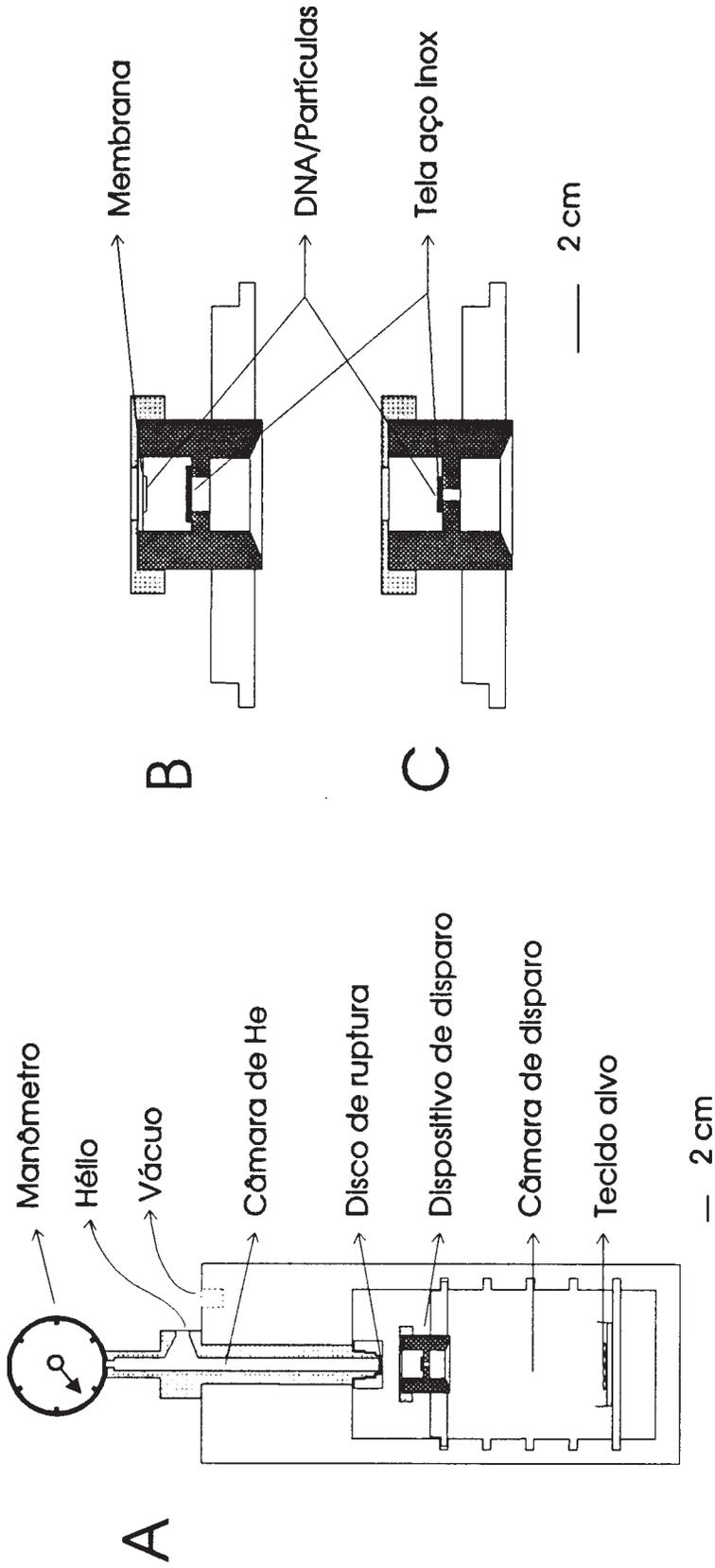
câmara de disparo. Uma placa de petri, com o tecido-alvo disposto na região central, foi posicionado na câmara de disparo a uma distância da ponta da câmara de Hélio selecionada de acordo com o experimento (Figura 2-A).

Para efetuar-se o disparo foi aplicado vácuo de 25 pol.Hg na câmara de disparo e a uma pressão selecionada de acordo com o experimento. A membrana de ruptura estoura quando a pressão de Hélio atinge pressão crítica de resistência da mesma, liberando uma onda de gás. No método tradicional, a onda de gás impulsiona a membrana Kapton<sup>®</sup> com as micropartículas para baixo, até que esta seja retida pela tela de aço inoxidável, permitindo que somente as micropartículas continuem em alta velocidade para penetrar nos tecidos alvo posicionados logo abaixo (Figuras 2-A e 2-B). No método GE as micropartículas, precipitadas diretamente na tela de aço inoxidável, são aceleradas a alta velocidade diretamente pela onda de gás (Figuras 2-A e 2-C).

## *5.9. Otimização dos parâmetros de bombardeamento*

### *5.9.1. Comparação entre os métodos GE e Kapton<sup>®</sup>*

O acelerador de micropartículas tipo PDS/1000-He permite o bombardeamento através da aceleração indireta das micropartículas precipitadas em uma membrana Kapton<sup>®</sup>, ou a aceleração direta, quando as micropartículas são colocadas em uma tela de aço inoxidável (Figuras 2-B e 2-C). Estas duas formas de aceleração foram testadas quanto à eficiência de transformação transiente, danos causados no bombardeamento e penetração no tecido escutelar. Para isso foram realizadas 5 repetições para cada tipo de bombardeamento. Cada repetição constou de 1 placa de petri contendo 10 embriões imaturos dois dias após a inoculação em meio CM1. As placas foram bombardeadas 1 vez com micropartículas co-precipitadas com DNA do plasmídeo pACT1-F. O bombardeamento foi efetuado com micropartículas de



**Figura 2** - Diagrama ilustrativo do protótipo do acelerador de micropartículas utilizado no bombardeamento.

(A) Esquema geral do aparelho mostrando as câmaras de Hélio e de vácuo, as entradas de Hélio e vácuo e a disposição do disco de ruptura, dispositivo de disparo e o tecido alvo na câmara de disparo.

(B) Imagem ampliada do dispositivo de disparo montado para bombardeamento através do sistema Kapton. São indicadas as posições relativas da membrana Kapton com as micropartículas/DNA e a tela de retenção de aço inox.

(C) Imagem ampliada do dispositivo de disparo montado para bombardeamento através do sistema PIG. São indicadas as posições relativas da tela de aço inox com as micropartículas/DNA.

1.6  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$ , 1200 psi de pressão de gás Hélio e 9 cm de distância entre o disco de ruptura e o alvo.

A eficiência de transformação transiente foi monitorada através da análise histoquímica da atividade de GUS, 24 hs após o bombardeamento. Os danos causados pelo bombardeamento e a profundidade de penetração das micropartículas foram avaliadas através de cortes histológicos do tecido escutelar. A profundidade de penetração das micropartículas foi convertida em índice de penetração que corresponde a soma dos produtos entre o percentual de células expressando GUS por camada celular por um número que duplica a cada camada celular e que é igual a 0.5 para a primeira camada celular. Este índice tem como objetivo, diferenciar os tratamentos com métodos estatísticos e identificar facilmente os tratamentos mais eficientes quanto à profundidade de penetração.

#### *5.9.2. Estudo das condições adequadas de bombardeamento*

Para cada espécie de planta e tecido a ser transformado é necessário alterar a velocidade das micropartículas para se obter taxas ótimas de transformação, as quais dependem da resistência da parede celular e do número de camadas celulares a penetrar (Birch & Franks, 1991). Embora ocorra variações consideráveis entre disparos consecutivos, a velocidade de impacto das micropartículas no tecido-alvo pode ser controlada alterando-se a força de aceleração, o vácuo na câmara de disparo, a distância percorrida pelas micropartículas e o tamanho e composição das micropartículas (Birch & Franks, 1991).

As taxas ótimas de transformação foram estudadas através de um experimento multifatorial utilizando-se dois níveis de pressão de gás Hélio (1200 e 1800 psi de Hélio), micropartículas de ouro de 1.0; 1.6 e de 1-3  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$  e distância entre o disco de ruptura e o alvo de 6 e 9 cm. Foram realizadas 2

repetições para cada tratamento, sendo que cada repetição constou de 1 placa de petri com 10 embriões imaturos, dois dias após o inóculo em meio CM1, bombardeadas 1 vez com DNA do plasmídeo pACT1-F. A eficiência de transformação transiente foi avaliada através da análise histoquímica da atividade de GUS, 24 hs após o bombardeamento. Os danos causados pelo bombardeamento e o índice de penetração do tecido escutelar foram avaliados através de cortes histológicos.

#### *5.10. Estabilização osmótica dos tecidos*

O uso de agentes que aumentam a osmolaridade do meio de cultura permite o aumento da eficiência de transformação transiente e estável. Um meio com alta osmolaridade causa plasmólise nas células, prevenindo a extrusão do seu conteúdo intracelular durante a penetração da micropartícula. Desta forma ela permite maior sobrevivência das células devido à redução dos danos causados pelo bombardeamento. Estes benefícios levam a um aumento no número de transformantes transientes e estáveis (Russell *et al.*, 1992; Vain *et al.*, 1993).

O efeito de agentes osmóticos foi estudado através da adição de concentrações crescentes de manitol (0; 0.05; 0.1; 0.2; 0.4 e 0.8 M) no meio de cultura. Adicionalmente, estudou-se o efeito do agente osmótico em bombardeamentos realizados com micropartículas de 1.6 e de 1-3  $\mu\text{m}$  de  $\emptyset$ . Cada tratamento constou de 3 repetições para as micropartículas de 1.6  $\mu\text{m}$  de  $\emptyset$ , e de 6 repetições para as micropartículas de 1-3  $\mu\text{m}$  de  $\emptyset$ . Cada repetição constou de 1 placa de petri com 10 embriões imaturos dois dias após o inóculo em meio CM1, bombardeadas 1 vez com DNA do plasmídeo pACT1-F. O experimento foi avaliado quanto a eficiência de transformação transiente, através de análise histoquímica da atividade de GUS, 36 hs após o

bombardeamento. Os danos causados pelo bombardeamento e o índice de penetração no tecido escutelar foram avaliados através de cortes histológicos.

#### 5.11. *Inibição do Crescimento de calos pela Fosfinotricina*

Um dos passos críticos na obtenção de plantas transgênicas é o método seletivo utilizado, sendo a concentração do agente inibidor empregado, um dos aspectos mais importantes. No caso da fosfinotricina, a concentração geralmente utilizada gira em torno de 5,0 mg/l (Fromm *et al.*, 1990). Porém neste trabalho, foi necessário realizar um experimento para demonstrar o nível de inibição do herbicida no desenvolvimento de calos embriogênicos da linhagem CAT-100-6, devido a possibilidade de diferenças no nível de resistência entre diferentes linhagens de milho.

Para isso foi realizado um experimento com 4 repetições por tratamento, onde adicionou-se 6 concentrações, 0, 0.5, 1, 2, 4, e 8 mg/l de fosfinotricina. Cada repetição constou de 15 embriões imaturos inoculados por placa de petri em meio CM1. O experimento foi avaliado visualmente, e através de peso seco após 16 dias de cultura. O peso seco foi obtido deixando-se os tecidos em estufa a 80°C por 4 dias. A curva de inibição foi realizada através da taxa de crescimento relativa, obtida através da seguinte fórmula:

$$TCR = (\ln P_2 - \ln P_1) / (t_2 - t_1) ; \text{ onde:}$$

$P_1$  = Peso inicial;  $P_2$  = Peso final;  $t_1$  = Tempo inicial e  $t_2$  = Tempo final.

#### 5.12. *Inibição do crescimento pelo Manitol*

A alta osmolaridade do meio de cultura inibe o crescimento de células em cultura (Sanford *et al.*, 1993). Deste modo o uso de agentes osmóticos, como por exemplo o manitol, em concentrações reduzidas pode reduzir o crescimento de todas as células em cultura, transformadas ou não. Porém Sanford *et al.*

(1993) observaram que células transformadas crescem mais rapidamente nestas condições, favorecendo o processo de seleção.

Com o objetivo de identificar o nível de inibição ideal, sem prejudicar a qualidade da cultura, foi realizado um experimento adicionando-se 0; 0.1; 0.2; 0.4 e 0.8 M de manitol no meio de cultura. Foram realizados 4 repetições por tratamento, sendo que cada repetição constou de 10 embriões com 10 dias de cultura em meio ML1. A cada 14 dias os calos foram pesados e repicados em meio novo, até 52 dias após o inóculo. A avaliação foi realizada através da estimativa do peso fresco e da análise visual da qualidade da cultura obtida. a curva de inibição foi realizada com dados de TCR.

### *5.13. Transformação estável*

Com as condições de cultura de tecidos, bombardeamento, estabilização osmótica e seleção otimizadas, realizou-se experimentos visando a obtenção de transformação estável de células e plantas.

Embriões da linhagem CAT-100-6 foram inoculados em meio ML1 e bombardeados entre 2 e 10 dias após o inóculo. Porções dos calos medindo aproximadamente 3 mm de diâmetro, foram repicadas na parte central de placas de petri contendo meio ML1, suplementado com 0.5 M de manitol, 5 a 6 horas antes do bombardeamento. As culturas bombardeadas foram repicadas 18 a 24 horas após o bombardeamento e posteriormente em intervalos de 10 a 14 dias para meio novo contendo concentrações crescentes do agente seletivo ou mantido na mesma concentração. A cada repique somente os tecidos que demonstraram algum crescimento foram repicados com auxílio de pinça de ponta fina. O tecido restante e amostras do tecido repicado foram revelados para a atividade de GUS.

#### 5.14. Regeneração

Após vários ciclos de seleção foi iniciado o processo de regeneração. O primeiro ciclo regenerativo foi desenvolvido em meio RM2 (Tabela 1) com e sem 3 mg/l de PPT, em fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os demais ciclos regenerativos foram desenvolvidos em meio RM1 (Tabela 1) sem PPT. Os calos com crescimento e regeneração mais vigorosos foram repicados para frascos de 7 cm de altura e 5 cm de  $\varnothing$ , contendo 25 ml de meio RM1 sem PPT. As plantas regeneradas foram repicadas individualmente, quando possível, em frascos de 12 cm de altura e 6.5 cm de  $\varnothing$ , contendo 50 ml de meio RM1. Neste passo, foram retiradas amostras de folha e raiz de cada planta para análise da expressão de GUS. Quando as plantas atingiram o topo do frasco, foram transferidas para copos plásticos de 500 ml, contendo vermiculita esterilizada. As plantas foram acondicionadas em caixa de plástico medindo 60 x 40 x 24 cm e, a caixa coberta com filme de PVC. As plantas foram gradualmente aclimatadas às condições de umidade da sala de crescimento através da abertura gradual do filme de PVC sobre a caixa de plástico. Após este passo as plantas foram aclimatadas à condição de sol pleno através do uso de sombrite 50%. Novamente este processo foi gradual e demorou em torno de 5 - 7 dias. Após este período de aclimação, as plantas foram transferidas, individualmente ou em grupo de no máximo 3 plantas, para local definitivo. As plantas férteis resultantes foram autofecundadas ou cruzadas entre si ou com plantas CAT-100-6 para permitir a obtenção de sementes para análises posteriores.

#### 5.15. Resistência ao herbicida Basta™

Este ensaio foi realizado para identificar rapidamente possíveis plântulas transgênicas oriundas das sementes obtidas das plantas regeneradas. A concentração do herbicida necessária para matar plântulas controle da linhagem

CAT-100-6, foi determinada através da aplicação de 0; 0.2; 0.5; 1.0 e 2.0% de Basta™ em água com algumas gotas de Tween 20®. Foram realizadas 4 repetições por tratamento. Cada repetição constou de 5 sementes semeadas em copo plástico de 500 ml, mantidos sob sombrite. As plântulas foram pulverizadas no estágio de 3 a 4 folhas abertas. O experimento foi avaliado para a resistência entre 7 e 14 dias após a aplicação do herbicida.

#### 5.16. PCR

O DNA utilizado para as reações de PCR foi extraído segundo a metodologia de Edwards *et al.*, (1991), com algumas modificações. Na regeneração, durante a transferência das plantas para frascos isolados, amostras de folha foram coletadas em tubos Eppendorf® e mantidas em gelo. O tecido foi macerado a temperatura ambiente, sem tampão, por 10 a 15 segundos. A seguir foi adicionado 400 µl de tampão de extração, constituído de 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, e o tubo agitado vigorosamente. Em seguida o tubo foi incubado a temperatura ambiente por pelo menos uma hora e centrifugado a 10.000 g por 3 minutos. Trezentos µl do sobrenadante foram transferidos a um tubo Eppendorf® novo e adicionou-se 300 µl de isopropanol. O tubo foi agitado vigorosamente e centrifugado a 10.000 g a temperatura ambiente por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado duas vezes com etanol 70%. O sedimento foi seco ao ar e dissolvido em 100 µl de TE. Este DNA foi então utilizado nas reações de PCR.

A reação de PCR foi otimizada para os vários componentes. A otimização foi realizada com uma mistura de DNA de 15 plantas tomadas ao acaso. Para a otimização e análise das plantas regeneradas foi utilizada a enzima Taq polimerase e todos os tampões fornecidos pela Gibco BRL. As reações foram realizadas em aparelho Perkin Elmer Cetus 9600. A desnaturação inicial foi de 5 minutos a 94°C. Em seguida foram realizados 30 ciclos, sendo que cada ciclo foi

composto de 90 segundos a 94°C, 60 segundos a 60°C e 120 segundos a 72°C. A extensão final foi de 10 minutos a 72°C. As reações foram otimizadas para volume de reação de 25 µl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 a 25°C, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM dNTPs, 1.2 µl de cada oligonucleotídeo (120 pmol), 1 µl de DNA e 1 U Taq polimerase. Para a amplificação do gene codificador da  $\gamma$ -zeína de 27 kDa, foram utilizados os oligonucleotídeos KAF1234 (TGCTCGTTGC CCTCGCTC), e KAF 1532 (GCACTGGCCCAGGATCGG). Já para a amplificação do gene *bar*, utilizou-se os oligonucleotídeos BARP (GCCGACATCCGCCTGCCACCG), e BARN (ATACTCCACATCACCAC GCTTG).

#### 5.17. Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi totalmente ao acaso, com delineamento fatorial conforme o experimento. Apenas para a análise da atividade do gene *bar* em coleótilos bombardeados com os plasmídeos pBARGUS e pACTBARGUS utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso. O teste F e a separação múltipla de médias através do teste S-N-K foi realizada segundo a metodologia descrita por Steel & Torrie (1980).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Cultura de Tecidos

Os embriões da linhagem CAT-100-6 produziram maior número de calos embriogênicos tipo I em relação a linhagem CAT-100-1, conforme análise visual realizada entre os dias 5 e 30 após o inóculo. Os embriões inoculados da linhagem CAT-100-1 produziram em sua maioria apenas calóides (Prioli, 1987). Devido a esta resposta diferencial das linhagens quanto a produção de calo embriogênico, utilizou-se apenas embriões da linhagem CAT-100-6 nos experimentos subseqüentes.

A qualidade das culturas, obtidas a partir de embriões imaturos, diferiu significativamente entre os meios CM1 e ML1 (Tabela 2). O meio ML1 promoveu a formação de embrióides de excelente qualidade, na superfície escutelar em 22% dos embriões imaturos, contra nenhuma resposta similar no meio CM1. Houve também uma redução de 40 para 19% de embriões que não desenvolveram nenhum crescimento ou que desenvolveram culturas mucilaginosas e calóides do meio CM1 para o meio ML1 (Tabela 2). O meio ML1 difere do meio CM1 por apresentar em sua composição prolina, caseína hidrolisada, nitrato de prata, cloreto de magnésio e vitaminas de Horn *et al.*, (1983). O meio ML1 foi formulado a partir dos trabalhos de Trigiano *et al.*, (1992) e Vain *et al.*, (1989b). Tendo em vista os resultados deste experimento foi utilizado somente o meio ML1 para os experimentos subseqüentes. É importante observar que, como os trabalhos descritos nesta tese não foram desenvolvidos na ordem em que estão apresentados. Deste modo, experimentos com referência ao meio CM1, foram desenvolvidos antes deste experimento.

**Tabela 2** - Efeito do meio de cultura na qualidade da embriogênese somática obtida a partir da superfície escutelar de embriões imaturos da linhagem Cat-100-6.

Qualidade	Meio CM1 <sup>b</sup> (%)	Meio ML1 <sup>b</sup> (%)
Excepcional <sup>a</sup>	0	22
Desenvolvido	60	59
Não desenvolvido	40	19

<sup>a</sup>Ver a definição das classes em Materiais e Métodos, item 5.2.2, página 34.

<sup>b</sup>Ver a formulação dos meios de cultura na seção Material e Métodos, tabela 1, página 33.

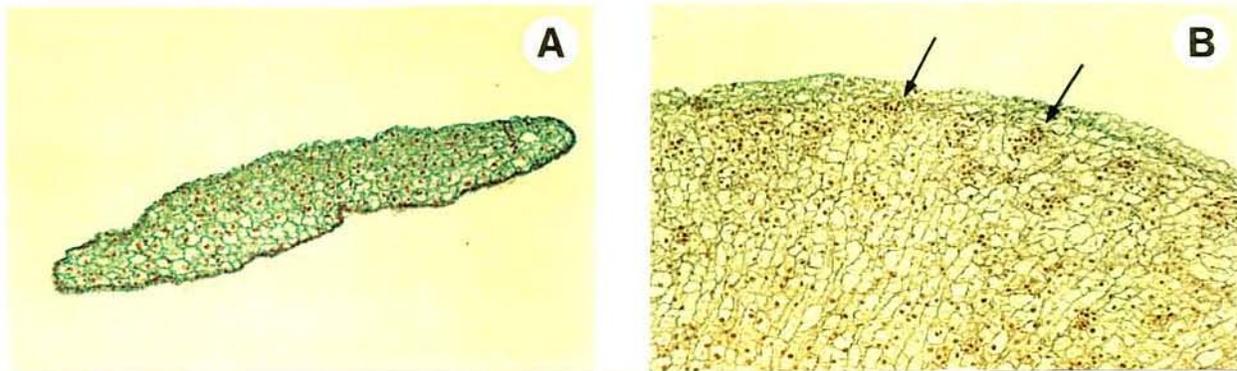
A formação de calo tipo I é relativamente fácil na maioria dos genótipos milho, em contraste com a iniciação de calo tipo II, que é altamente genótipo dependente (Armstrong, 1994; Wan *et al.*, 1995). O calo tipo I é caracterizado por estruturas embriogênicas compactas, altamente diferenciadas e com baixa taxa de crescimento. Por sua vez, o calo tipo II apresenta estruturas altamente friáveis, pouco diferenciadas e com elevada taxa de crescimento (Armstrong, 1994; Claporols *et al.*, 1993). As linhagens Hill-A e Hill-B foram desenvolvidas por Armstrong *et al.*, (1991) a partir do cruzamento entre as linhagens A188 e B73. Embriões F2 deste cruzamento foram inoculados em meio N6 1-100-25-Ag, resultando em 9% de resposta a formação de calos tipo II. Plantas regeneradas de duas linhagens desses calos produziram próximo de 100% de resposta a formação de calos tipo II e foram mantidas por autopolinização, originando as linhagens Hill-A e Hill-B (Armstrong *et al.*, 1991).

Apesar de haver certa flexibilidade quanto a classificação de calos como tipo I ou tipo II, todos os embriões imaturos da linhagem CAT-100-6 inoculados em meio ML1 desenvolveram apenas calos com características do tipo I. Em contraste embriões imaturos de plantas F2 do cruzamento Hill-A x Hill-B inoculados em meio N6 1-100-25-Ag desenvolveram apenas calos com características de tipo II. Já os embriões imaturos provenientes do cruzamento

características de tipo II. Já os embriões imaturos provenientes do cruzamento entre a linhagem CAT-100-6 e o F1 (Hill-A x Hill-B) responderam de maneira diferenciada aos meios ML1 e N6 1-100-25-Ag. Os embriões inoculados em meio ML1 produziram somente calos tipo I, ao passo que os embriões inoculados em meio N6 1-100-25-Ag produziram somente calos tipo II. Embriões da linhagem CAT-100-6 inoculados em meio N6 1-100-25-Ag, desenvolveram apenas calos tipo I. É importante ressaltar que estes experimentos com o material Hi-li, foram desenvolvidos no período final da tese, e não foram incluídos em experimentos de transformação estável.

## *6.2. Origem da embriogênese somática em embriões imaturos da linhagem CAT-100-6*

O estudo da origem da embriogênese somática é de importância fundamental para a transformação de monocotiledôneas através do bombardeamento com micropartículas (Birch & Franks, 1991a, 1991b). Em milho, a iniciação da embriogênese somática ocorre a partir das células sub-epidérmicas do escutelo de embriões imaturos (Fransz e Schel, 1987). Para estudar a origem da embriogênese somática na linhagem CAT-100-6 foram realizados cortes histológicos de embriões cultivados em meio CM1 entre 1 e 14 dias após o inóculo (Figura 3-A). A análise histológica revelou que as células embriogênicas originam-se a partir da terceira camada de células em relação a superfície escutelar dos embriões (Figura 3-B). Como pode ser visto, as células que darão origem aos embriões somáticos (indicadas pelas setas na Figura 3-B) formam agrupamentos com predominância da cor vermelha determinada pela safranina. Estes agrupamentos de células também espalham-se por todo o escutelo, porém a concentração dos mesmos diminui sensivelmente da superfície para o interior do escutelo. Estes aglomerados celulares originam estruturas ovais e amareladas, que se desenvolvem até originar os embriões somáticos.



**Figura 3** - Origem da embriogênese somática em tecido escutelar na linhagem Cat-100-6 de milho.

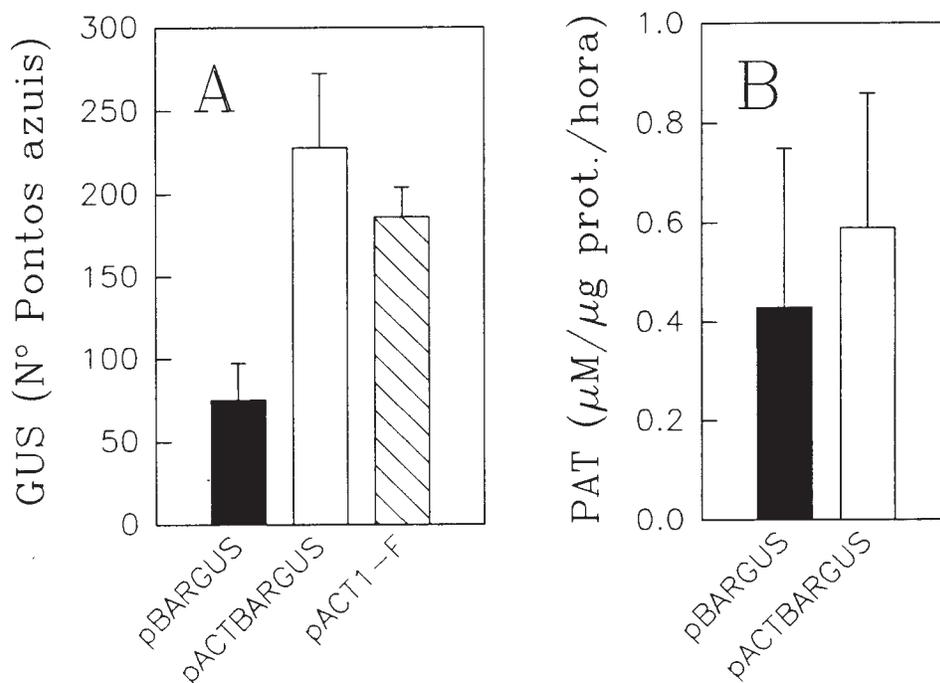
(A) Corte longitudinal de embrião imaturo no momento do inóculo em meio CM1.

(B) Corte transversal do tecido escutelar de embrião imaturo 12 dias após o inóculo em meio CM1. As setas indicam aglomerados de células localizadas nas camadas sub-epidermais, que darão origem aos embriões somáticos.

### 6.3. Expressão dos genes *uidA* e *bar* em coleóptilo

Para estudar a funcionalidade do plasmídeo pACTBARGUS e compará-la com aquela do plasmídeo pBARGUS, amplamente empregado na transformação de cereais, foi realizado um experimento onde utilizou-se DNA dos dois plasmídeos para transformar transientemente coleóptilos de milho. O plasmídeo pACTBARGUS contém os genes *uidA* e *bar* sob o controle do promotor do gene *Act1* de arroz e sobre a seqüência 3' NOS de *Agrobacterium tumefaciens*. O plasmídeo pBARGUS (Fromm *et al.*, 1990) possui o gene *uidA* sob o controle do promotor e do íntron 1 do gene *adh1* e o gene *bar* sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor e do íntron 1 do gene *adh1*. Para complementar a análise da expressão do gene *uidA*, foi também utilizado o plasmídeo pACT1-F, que possui o gene *uidA* sob o controle do promotor do gene *act1* de arroz. Não houve diferença significativa na expressão do gene *uidA* (GUS) dirigida pelos plasmídeos pACT1-F e

pACTBARGUS, enquanto que a expressão dirigida pelo plasmídeo pBARGUS foi significativamente menor que aquela dos outros dois plasmídeos (Figura 4-A). Já a expressão do gene *bar* foi estatisticamente semelhante para os plasmídeos pBARGUS e pACTBARGUS (Figura 4-B).



**Figura 4** - Análise funcional dos plasmídeos pBARGUS, pACTBARGUS e pACT1-F através de ensaios de expressão transiente da atividade dos genes *uidA* e *bar* em coleóptilos de milho.

(A) Expressão transiente do gene *uidA*, medida pela atividade de GUS. A atividade foi mensurada através do número de pontos azuis.

(B) Expressão transiente do gene *bar*, medida pela atividade de PAT. ( $\mu\text{M}$  de PPT acetilado /  $\mu\text{g}$  de proteína total / hora)

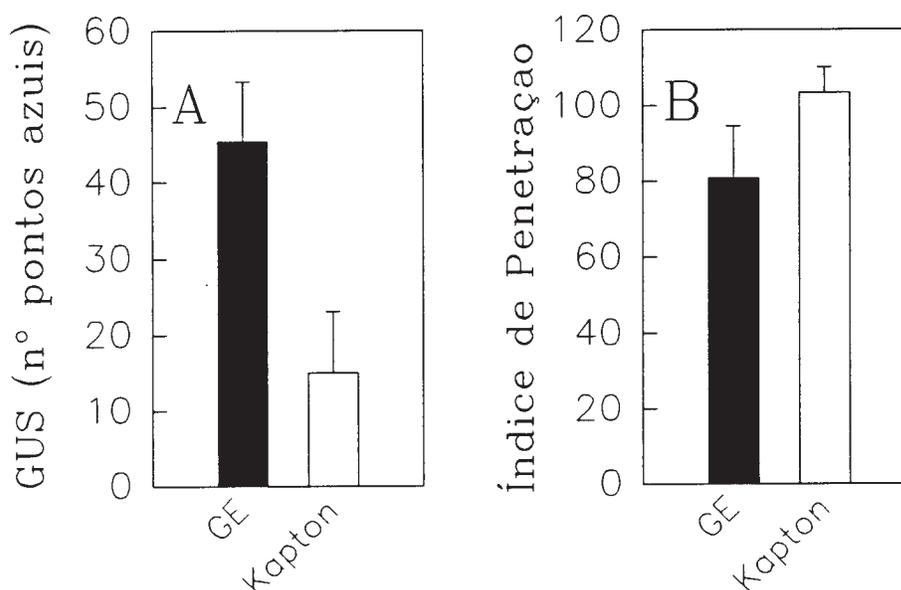
## 6.4. Otimização dos parâmetros de bombardeamento

### 6.4.1. Comparação entre GE e Kapton®

O equipamento utilizado neste trabalho permite o bombardeamento através da aceleração das micropartículas indiretamente, pela aceleração de uma membrana Kapton®, ou a aceleração pode ser conduzida diretamente, quando a onda de gás Hélio passa por uma tela de aço inoxidável, onde as micropartículas estão depositadas (GE). A comparação entre os métodos de aceleração foi realizada através da análise histoquímica da expressão transiente de GUS e análise histológica da profundidade atingida pelas micropartículas e danos causados no tecido escutelar. O número de pontos azuis decorrentes da atividade de GUS em um dado tecido está positivamente correlacionado com o número de células transformadas (Morrish *et al.*, 1992). Deste modo, a contagem do número de pontos mostrou claramente, que o método GE foi cerca de 3.75 vezes mais eficiente que o método tradicional de bombardeamento que utiliza a membrana Kapton® (Figura 5-A). É interessante notar que no método GE, o coeficiente de variação é cerca de 3 vezes menor que no método Kapton® (Figura 5-A).

Tendo em vista que as células que dão origem a embriogênese somática na linhagem CAT-100-6 ocorrem a partir da terceira camada de células, a partir da epiderme do escutelo (Figura 3-B), as células transformadas na primeira e segunda camadas de células certamente não são úteis para a transformação estável. O índice de penetração informa a maior ou menor penetração do tecido em um dado tratamento. Os resultados observados neste experimento indicaram que os métodos de aceleração não diferem significativamente quanto ao índice de penetração (Figura 5-B). A associação do número de pontos azuis e a penetração indica que o método GE é superior ao método Kapton®, para a

transformação estável e, para experimentos de transformação transiente, devido principalmente a redução significativa da variação entre bombardeamentos. A grande maioria das células transformadas no experimento acima descrito, estavam localizadas na primeira a segunda camadas celulares. Assim, para verificar condições que permitissem a penetração das micropartículas em camadas celulares mais profundas, foi realizado um experimento variando-se alguns parâmetros do equipamento utilizado neste trabalho.



**Figura 5** - Comparação entre os métodos GE e Kapton para a transformação transiente e penetração das micropartículas no tecido escutelar de embriões imaturos da linhagem Cat-100-6 em cultura .

**(A)** Número de células transformadas expressando GUS na superfície escutelar após o bombardeio pelos métodos GE ou Kapton.

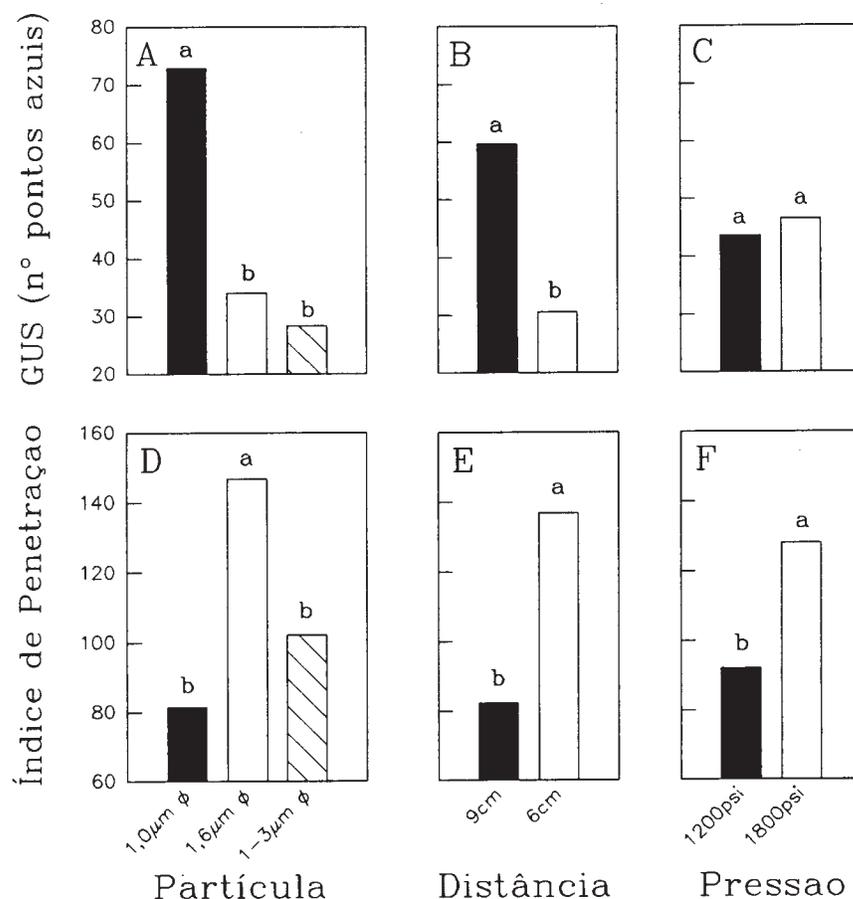
**(B)** Índice de penetração das micropartículas no tecido escutelar de embriões imaturos bombardeados através dos métodos GE e Kapton.

#### 6.4.2. *Variação das condições físicas de bombardeamento*

Para cada espécie de planta e tecido a ser transformado é necessário alterar a velocidade das micropartículas para se alcançar taxas ótimas de transformação, as quais dependem da resistência da parede celular e do número de camadas celulares a serem penetradas (Birch & Franks, 1991). No caso do tecido escutelar de milho utilizado neste estudo, as micropartículas devem penetrar pelo menos três camadas celulares para atingir as células que dão origem aos embriões somáticos. Para se estabelecer as condições de transformação dessas células eficientemente, foi realizado um experimento variando-se o tamanho das micropartículas, a pressão de gás Hélio, e a distância entre o alvo e o disco de ruptura, tendo em vista que estes fatores são determinantes na profundidade atingida pelas micropartículas.

A análise da atividade transiente de GUS mostrou que micropartículas de 1,0  $\mu\text{m}$  de  $\emptyset$  são mais eficientes quanto ao número de células transformadas que as micropartículas de 1,6 e de 1 - 3  $\mu\text{m}$  de  $\emptyset$  (Figura 6-A). Das duas distâncias entre o alvo e o disco de ruptura testadas neste trabalho, a distância de 9 cm foi significativamente superior a distância de 6 cm quanto ao número de células transformadas (Figura 6-B). As diferentes pressões utilizadas, 1200 e 1800 psi, não diferiram significativamente quanto ao número de células transformadas (Figura 6-C). O conjunto dos resultados deste experimento fatorial, indicam que para estudos de transformação transiente das células localizadas na superfície escutelar, podem ser utilizadas as seguintes condições: Micropartículas de 1,0  $\mu\text{m}$  de  $\emptyset$ , 9 cm de distância entre o alvo e o disco de ruptura e pressão de 1200 psi.

Por sua vez, quando objetiva-se a transformação estável, as condições de bombardeamento são diferenciadas. Isto é devido ao fato que provavelmente a condição de alta taxa de transformação estável coincide com a condição de transformação eficiente das células que dão origem à embriogênese somática. Os resultados obtidos neste trabalho comprovam esta teoria. A micropartícula



**Figura 6** - Efeito do tamanho das micropartículas, distâncias entre o tecido alvo e o disco de ruptura e pressões de disparo na eficiência da transformação transiente e na penetração do escutelo pelas micropartículas.

(A) Efeito das micropartículas de 1,0; 1,6 e de 1 - 3 mm de  $\phi$  no número de células transformadas.

(B) Efeito das distâncias de 9 e 6 cm entre o alvo e o disco de ruptura no número de células transformadas.

(C) Efeito das pressões de 1200 e 1800 psi no número de células transformadas.

(D) Efeito das micropartículas de 1,0; 1,6 e de 1 - 3 mm de  $\phi$  no índice de penetração.

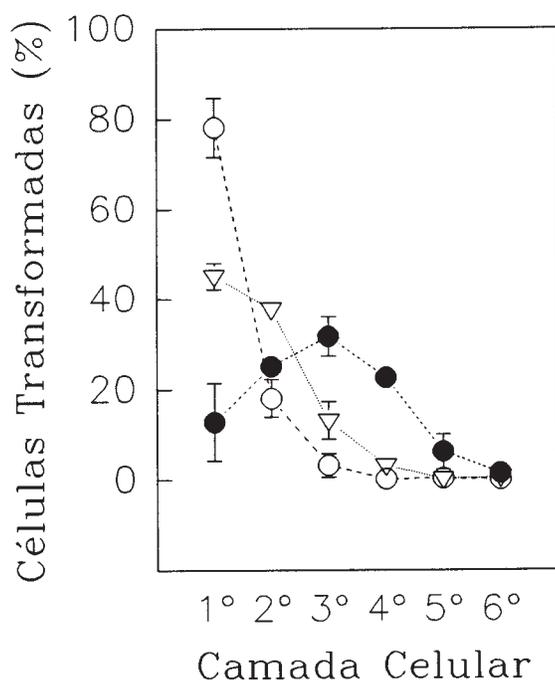
(E) Efeito das distâncias de 9 e 6 cm entre o alvo e o disco de ruptura no índice de penetração.

(F) Efeito das pressões de 1200 e 1800 psi no índice de penetração.

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística a nível de 1% entre os tratamentos.

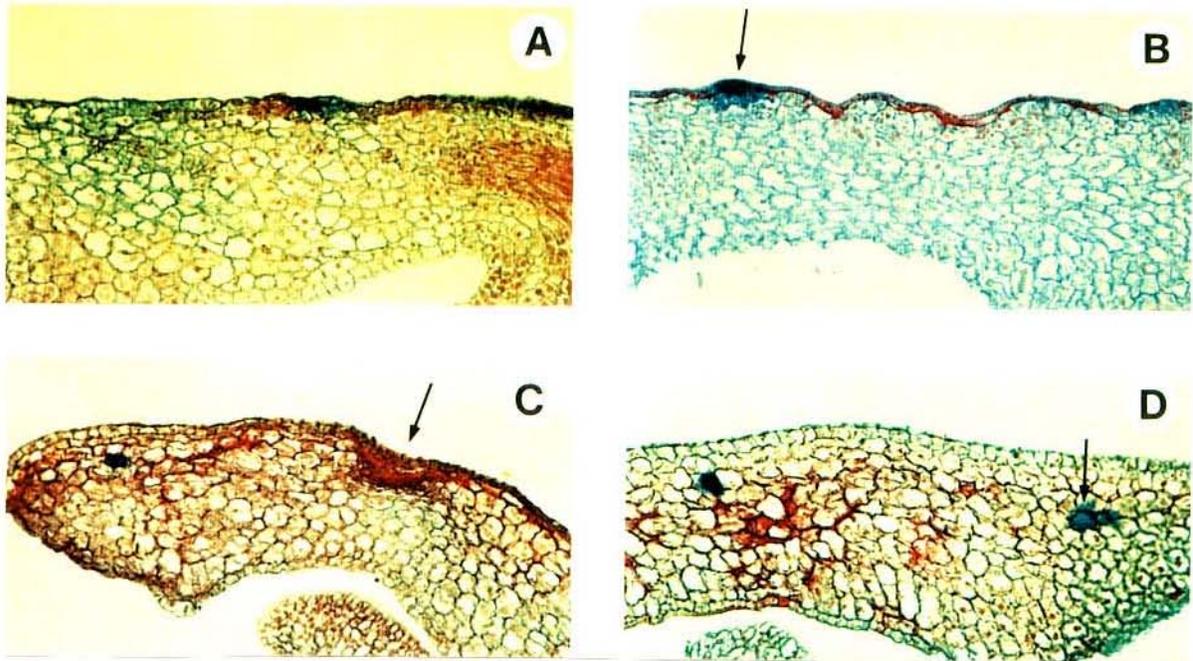
de 1,6  $\mu\text{m}$  de  $\emptyset$  foi significativamente superior, em termos de penetração, que as micropartículas de 1,0 e de 1 - 3  $\mu\text{m}$  de  $\emptyset$  (Figura 6-D). Como deveria ser esperado, quanto menor a distância entre o alvo e o disco de ruptura, maior o número de células transformadas em camadas mais profundas do tecido. Deste modo quando o tecido alvo estava localizado a 6 cm de distância do disco de ruptura, observou-se maior taxa de transformação de células localizadas em camadas mais profundas, do que quando ele estava localizado a 9 cm (Figura 6-E). Ao contrário da expressão transiente, a profundidade é influenciada pela pressão utilizada. Quanto maior a pressão, maior a penetração. Assim com a utilização de 1800 psi de pressão obteve-se maior penetração do tecido pelas micropartículas do que com a utilização de 1200 psi de pressão (Figura 6-F). O conjunto dos resultados deste experimento fatorial indica que, para a obtenção de maior penetração do tecido escutelar, devem ser utilizadas micropartículas de 1,6  $\mu\text{m}$  de  $\emptyset$ , o tecido deve estar localizado a 6 cm do disco de ruptura e a pressão deve ser de 1800 psi.

A distribuição percentual de células expressando GUS por camada celular em 3 tratamentos distintos pode ser observada na Figura 7. No tratamento de menor índice de penetração, apenas 3.8% das células transformadas estão localizadas a partir da terceira camada celular. Já no tratamento de maior índice de penetração este percentual sobe para 62.0%. No tratamento de índice de penetração intermediário foram observados 17.2% de células expressando GUS a partir da terceira camada celular. A análise histológica de amostras de embriões bombardeados nas diferentes condições físicas demonstra que a expressão de GUS no tratamento de menor penetração, está concentrada nas primeiras camadas de células, sem atingir os aglomerados celulares embriogênicos (Figuras 8-A e B). Já no tratamento de maior penetração (Figuras 8-C e D) as células expressando GUS estão localizadas em camadas mais profundas do tecido escutelar.



**Figura 07** - Distribuição percentual de células transformadas por camada celular nos tratamentos de maior (●; micropartículas de 1,6  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$ , 1800 psi e 6 cm entre o alvo o disco de ruptura), mediano (▽; micropartículas de 1,0  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$ , 1800 psi e 6 cm entre o alvo o disco de ruptura) e pior (○; micropartículas de 1,0  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$ , 1200 psi e 9 cm entre o alvo o disco de ruptura) índice de penetração.

A análise histológica ilustrada na Figura 8 mostra que os tecidos bombardeados (notar coloração avermelhada da parede celular) foram bastante danificados. Tem sido observado que o processo de bombardeamento causa danos severos ao tecido (Vain *et al.*, 1993; Russel *et al.*, 1992b), porém não há informações conclusivas na bibliografia sobre a proporção destes danos e nem



**Figura 8** - Cortes histológicas mostrando a transformação e os danos causados ao tecido escutelar pelos tratamentos de menor e maior índice de penetração.

(A) e (B) Corte histológico mostrando a penetração, transformação e os danos causados pelo bombardeamento nas condições do tratamento com menor índice de penetração (micropartículas de 1,0  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$ , 1200 psi e 9 cm entre o alvo e o disco de ruptura). A seta em (B) indica uma célula expressando GUS na primeira camada celular.

(C) e (D) Corte histológico mostrando a penetração, transformação e os danos causados pelo bombardeamento nas condições do tratamento com maior índice de penetração (micropartículas de 1,6  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$ , 1800 psi e 6 cm entre o alvo e o disco de ruptura). A seta em (D) indica uma célula expressando GUS na quinta camada de células a partir da superfície do escutelo.

a correlação destes com as condições físicas empregadas no bombardeamento. A coloração proporcionada pelos corantes safranina/fast green, permitiu a identificação dos tecidos danificados no processo de bombardeamento. A composição normal da parede celular de tecidos embriogênicos, como o embrião imaturo mostrado na Figura 3-A, é de origem celulósica. Este tipo de parede celular adquire tom verde-claro, quando colorida com safranina e fast

green. Já paredes celulares lignificadas e cutinizadas colorem-se de vermelho em tecidos como o xilema, quando tratados com esses corantes (Schneider, 1981). Já tecidos de parede celulósica, como no caso do embrião imaturo ou culturas celulares derivadas deste, quando danificados, tendem a acumular lignina e cutina em níveis significativos no fermento, adquirindo matiz vermelha quando colorido com safranina. Através desta metodologia pode-se identificar a localização e extensão dos danos provocados pelo bombardeamento no escutelo de embriões imaturos bombardeados sob diferentes condições.

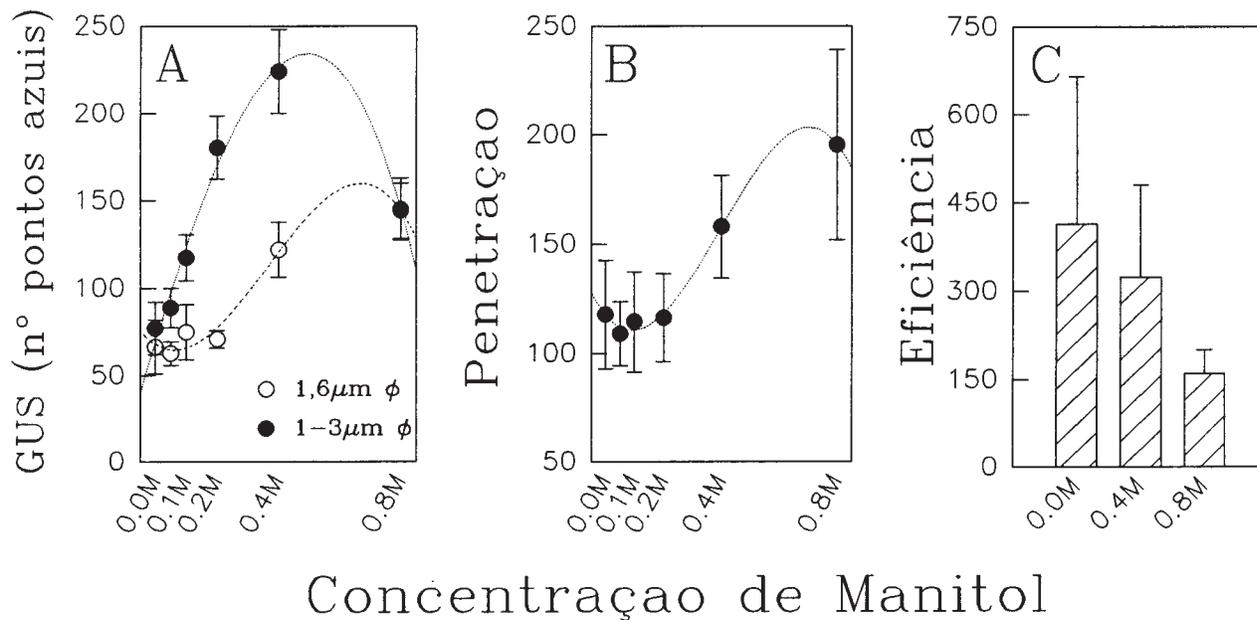
Como pode ser visto na Figura 8 existe uma correlação positiva entre o índice de penetração e o dano causado pelo bombardeamento. No tratamento de menor índice de penetração do tecido, houve pouca degradação do tecido, localizada principalmente nas camadas superficiais de células do escutelo (Figuras 8-A e B). Já no tratamento de maior índice de penetração, a degradação foi pronunciada em todo o tecido escutelar (Figuras 8-C e D). Neste caso foi observada também a formação de crateras na superfície do escutelo (ver seta na Figura 8-C), provavelmente devido ao impacto de aglomerados de micropartículas.

#### 6.5. Efeito do manitol nos tecidos bombardeados

O aumento da osmolaridade do meio de cultura influencia significativamente a eficiência de transformação transiente e estável, devido principalmente a não extrusão do citoplasma das células quando da entrada da micropartícula, permitindo maior sobrevivência e viabilidade dos tecidos bombardeados (Russel *et al.*, 1992b; Vain *et al.*, 1993). Neste trabalho, o manitol foi estudado como agente osmótico para incrementar a viabilidade dos tecidos bombardeados. Adicionalmente, foram empregadas as micropartículas de 1,6 e de 1-3  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$ , com o objetivo de verificar possíveis interações entre as micropartículas e a concentração de manitol.

O aumento da concentração de manitol provocou aumento significativo no número de células transformadas transientemente (Figura 9-A). O aumento no número de células transformadas foi 2 a 3 vezes superior quando utilizou-se micropartícula de 1,6 e de 1-3  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$ , respectivamente. É interessante notar que há interação entre o tamanho da micropartícula utilizada e o número de células transformadas, e que concentrações muito elevadas do agente osmótico causam redução no número de células transformadas, principalmente quando utilizou-se micropartícula de 1-3  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$ . Pela primeira vez demonstrou-se a correlação positiva entre a penetração e a concentração do agente osmótico, mostrando que a osmolaridade do meio de bombardeamento favorece diretamente a penetração. Apesar da variabilidade, o aumento da penetração observado foi significativo a nível de 5% para os embriões bombardeados em meio contendo 0.4 e 0.8 M de manitol em relação aos demais tratamentos (Figura 9-B). A contagem do número de micropartículas e do número de células transformadas, em cortes histológicos de embriões bombardeados com micropartículas de 1,6  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$ , revelou que o número de micropartículas necessárias para originar uma célula transformada diminui com o aumento da concentração de manitol (Figura 9-C).

Os danos causados pelo bombardeamento foram significativamente reduzidos com o aumento da concentração de manitol do meio de cultura (Figura 10). Na ausência de manitol, houve degradação extensiva tanto das células localizadas na superfície como nas células das camadas mais profundas do escutelo (Figura 10-A). Já na presença de 0.4 M de manitol pode ser verificada degradação em uma camada sub-superficial e, apesar de não ocorrer degradação física nas células das camadas superficiais, seus núcleos possuem coloração avermelhada, completamente diferente daquela verificada para as células localizadas no interior do escutelo (Figura 10-B). Nenhum sinal de degradação em qualquer nível e região do tecido escutelar foi observado no tratamento com 0.8 M de manitol (Figura 10-C).

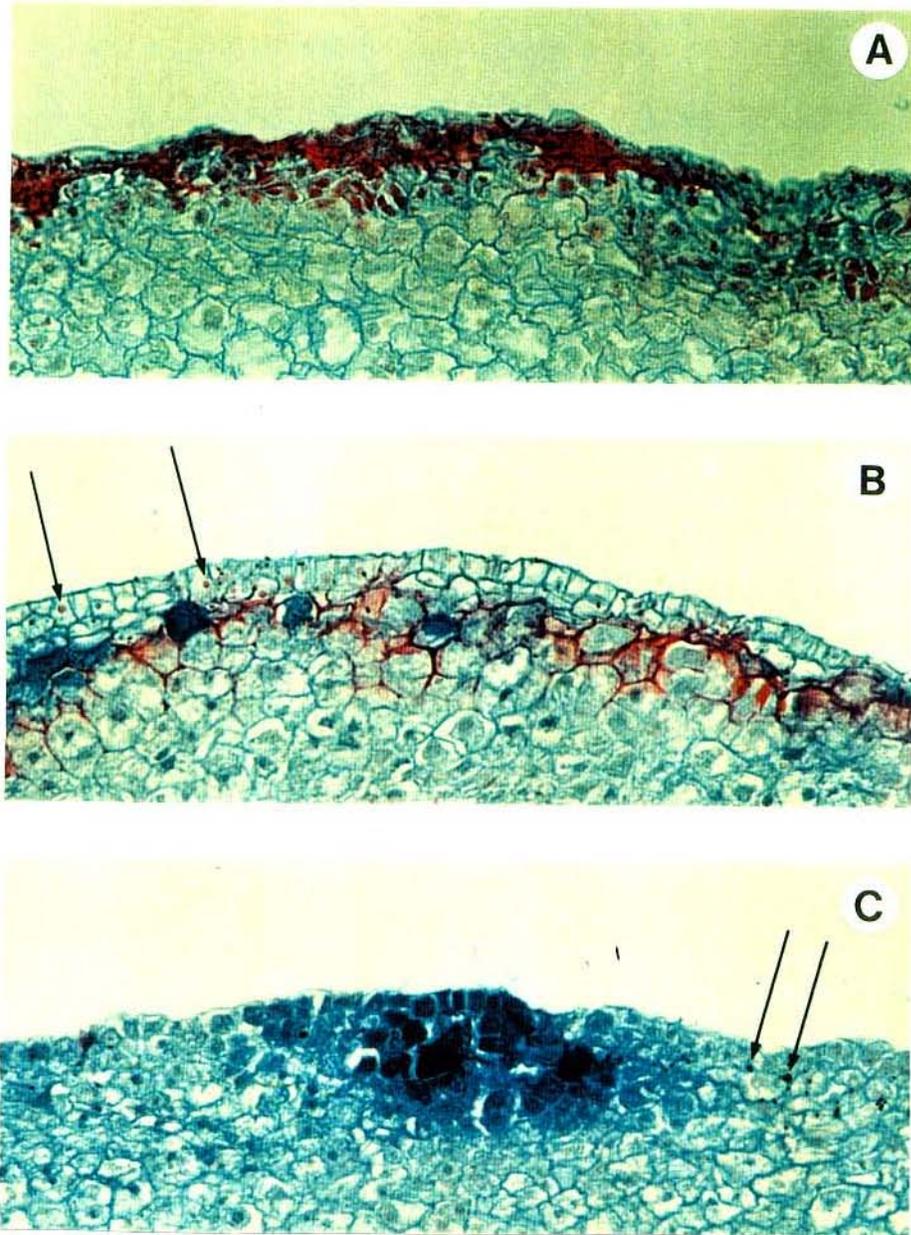


**Figura 9** - Influência da concentração de manitol na transformação transiente, na penetração e na eficiência da transformação da superfície escutelar.

**(A)** Influência de concentrações crescentes de manitol no número de células transformadas utilizando micropartículas de 1,6 e de 1 - 3  $\mu\text{m}$  de  $\phi$ .

**(B)** Influência de concentrações crescentes de manitol na profundidade de penetração de micropartículas no tecido escutelar, medido através do índice de penetração.

**(C)** Efeito do aumento da concentração de manitol na eficiência de transformação (número de micropartículas necessárias para transformar uma célula).



**Figura 10** - Efeito da concentração de manitol nos danos causados ao tecido escutelar pelo bombardeamento.

(A) Embrião bombardeado em meio sem manitol.

(B) Embrião bombardeado após pré-tratamento de 4 horas em meio com 0.4 M de manitol. As setas indicam núcleos de células da camada epidérmica.

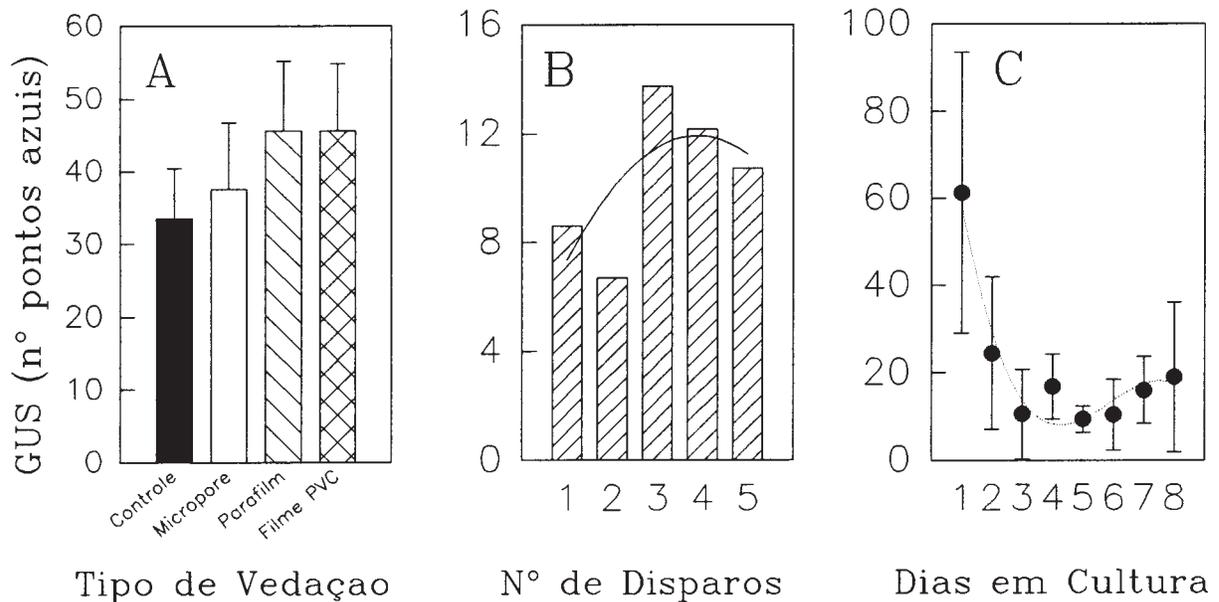
(C) Embrião bombardeado após pré-tratamento de 4 horas em meio com 0.8 M de manitol. As setas indicam micropartículas presentes no tecido.

## 6.6. Variáveis biológicas envolvidas no bombardeamento

Foram estudados alguns fatores biológicos, quanto a eficiência de transformação transiente. Um desses fatores é o acúmulo de etileno verificado após o bombardeamento, devido aos danos causados ao tecido. O acúmulo de etileno inibe a expressão de GUS (Morrish *et al.*, 1992). Para reduzir este acúmulo foram testados quatro tipos de vedação: placas não vedadas, vedadas com esparadrapo antialérgico poroso (Micropore), vedadas com parafilme e vedadas com filme de PVC. Como pode ser visto na Figura 11-A, os tratamentos não diferiram significativamente quanto ao número de células transformadas. Foi observada uma tendência de correlação negativa entre o número de células transformadas e a aeração da placa (Figura 11-A).

Uma das maneiras para se incrementar o número de células transformadas é aumentar o número de disparos no mesmo tecido. Entretanto deve-se esperar que quanto maior o número de disparos efetuados em um mesmo tecido, maiores serão os danos causados no mesmo. A Figura 11-B mostra o resultado de um ensaio onde pode ser observado o efeito do número de disparos em um mesmo tecido. O número de células transformadas aumenta com o número de disparos, até um certo limite, caindo em seguida com um número maior de disparos.

O número de dias após o inóculo ou após um repique tem influência no número de células transformadas (Sanford *et al.*, 1993). A variação no tempo entre o inóculo dos embriões imaturos e o bombardeamento, em dias, influencia no número de células transformadas (Figura 11-C). Este, cai em tecidos bombardeados 1 dia após o inóculo até o terceiro dia. Em seguida observa-se estabilização do número de células transformadas até 8 dias após o inóculo.



**Figura 11** - Influência do tipo de vedação, número de disparos e dias em cultura na transformação transiente de embriões imaturos de milho.

**(A)** Efeito do tipo de vedação após o bombardeio na transformação transiente.

**(B)** Efeito do número de disparos consecutivos no mesmo tecido na transformação transiente. A curva de regressão quadrática dos dados obtidos também é mostrada.

**(C)** Influência do intervalo, em dias, entre o inóculo e o bombardeio na transformação transiente.

## 6.7. Otimização das condições de seleção

### 6.7.1. Efeito da concentração de PPT no crescimento de calos tipo I derivado da linhagem Cat-100-6

A concentração de um agente seletivo para a seleção de células transformadas deve ser bem determinada, pois em baixas concentrações pode favorecer o surgimento de um grande número de escapes e em altas

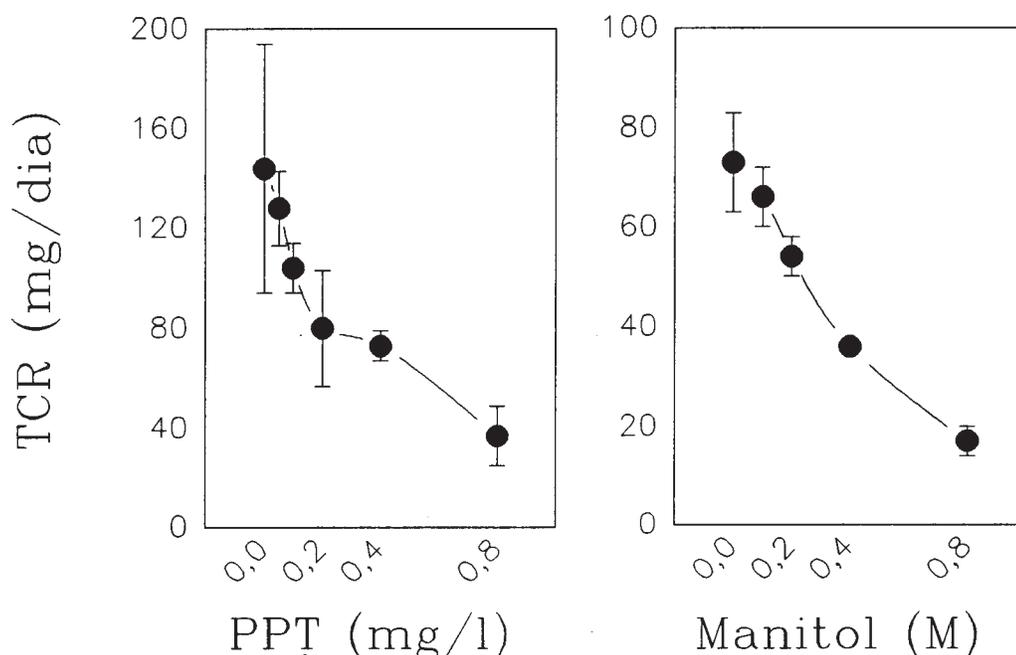
concentrações mata todas as células, inclusive as transformadas. A concentração do agente seletivo deve ser em nível que permita, através de crescimento diferencial, a identificação de setores transformados entre a população total das células.

Os trabalhos de transformação de milho reportados na literatura sugerem que a concentração de Bialaphos para a seleção de células transformadas deve ser em torno de 1 a 3 mg/l (Gordom-Kamm *et al.*, 1990) e de PPT de 5 mg/l (Fromm *et al.*, 1990). Neste trabalho foi estudado o efeito inibitório de concentrações crescentes de PPT sobre o crescimento de calos derivados da linhagem CAT-100-6. Como pode ser visto na Figura 12-A, houve uma redução acentuada do crescimento dos calos em função do aumento da concentração de PPT. Estes resultados sugeriram que a seleção de células transformadas de calos derivados da linhagem Cat-100-6 deve ser realizada entre 1 e 3 mg/l de PPT. A análise visual dos calos mostrou que em concentrações de 4 e 8 mg/l de PPT houve escurecimento gradativo dos calos em contato com o meio de cultura, indicando um efeito inibitório mais drástico do PPT quando em concentrações mais elevadas.

#### *6.7.2. Efeito da concentração do manitol no crescimento dos calos*

Um dos efeitos benéficos da adição de manitol no meio de cultura é a redução do crescimento de células não transformadas (Russell *et al.*, 1992b; Sanford *et al.*, 1993). A alta osmolaridade (0.8 M) do meio inibe o crescimento de todas as células, porém quando a concentração de manitol é mantida entre 0.1 e 0.2 M após o bombardeamento, existe a tendência das células transformadas crescerem mais rapidamente (em relação a um meio sem manitol), acentuando o crescimento diferencial destas células em relação aquelas não transformadas (Russell *et al.*, 1992b; Sanford *et al.*, 1993).

O manitol inibiu o crescimento dos calos de milho, de modo exponencial em relação a concentração adicionada ao meio (Figura 12-B). A análise visual dos calos mantidos em 0,1 M de manitol mostrou que estes, possuem melhores características embriogênicas que os calos mantidos nos demais tratamentos. Em 0,2 M de manitol alguns calos apresentaram aspecto de calóides, porém este fator foi muito mais pronunciado nos tratamentos de 0,4 e 0,8 M de manitol. Nos tratamentos subseqüentes utilizou-se manitol a 0.1 M no meio de cultura durante o processo de seleção.



**Figura 12** - Inibição do crescimento de calo da linhagem Cat-100-6 pelo PPT e manitol.

**(A)** Inibição do crescimento de calo pela adição de concentrações crescentes de PPT ao meio de cultura. A TCR (Taxa de crescimento relativo) foi estimada conforme especificado em *Materiais e Métodos*, pg 47.

**(B)** Inibição do crescimento de calo pela adição de concentrações crescentes de manitol ao meio de cultura. A TCR (Taxa de crescimento relativo) foi estimada conforme especificado em *Materiais e Métodos*, pg 47.

### 6.8. *Transformação estável*

Com o estabelecimento de condições otimizadas de cultura de tecidos, bombardeamento, estabilização osmótica e seleção, foram realizados experimentos visando a obtenção de células e/ou plantas transformadas estavelmente. Embriões imaturos ou calos tipo I recém induzidos de embriões imaturos da linhagem CAT-100-6 foram utilizados nestes experimentos.

Foram bombardeadas 17 placas contendo 25 embriões imaturos inoculados em meio ML1. Seis horas antes do bombardeamento os embriões foram transferidos para meio ML1 contendo 0,5 M de manitol. Nove placas foram bombardeadas com uma mistura 1:2 dos plasmídeos pACTBARGUS e p $\gamma$ KAF e 8 com uma mistura 1:2 dos plasmídeos pACTBARGUS e pPKDHDP5. Todas as placas foram bombardeadas uma única vez com micropartículas de 1,6  $\mu$ m de  $\varnothing$ , 2000 psi de pressão e 6 cm de distância entre o alvo e o disco de ruptura. Dois dias após o bombardeamento, os embriões foram transferidos para meio seletivo contendo 3 mg/l de PPT e 0,1 M de manitol. Uma amostra de 3 embriões foi retirada de cada placa para monitorar a eficiência de transformação transiente através da análise histoquímica do número de células com atividade de GUS. Em média, foram observadas  $110 \pm 62$  células transformadas por embrião.

Os embriões, transferidos para meio novo a cada 7 dias, originaram calos tipo I, sendo que em alguns calos surgiram massas celulares mucilaginosas. Em geral notou-se o escurecimento da superfície dos calos em contato com o meio de cultura. Somente os calos embriogênicos que apresentaram crescimento vigoroso e sem escurecimento foram repicados a cada sub-cultura e fracionados com auxílio de uma pinça de ponta fina. Os calos descartados foram revelados para a atividade de GUS. Nos dois primeiros ciclos seletivos observou-se um elevado número de células transformadas nesse material. No terceiro e quarto ciclos foram observados alguns setores azuis claro, inclusive no controle

negativo, indicando não a transgênese, mas a degradação inespecífica de X-gluc.

Após 4 ciclos seletivos, os calos foram transferidos para meio de regeneração com e sem PPT na concentração de 1 mg/l. Nos sub-cultivos posteriores o PPT não foi adicionado ao meio de cultura. Foram obtidos um total de 537 plantas regeneradas. A análise da atividade de GUS de amostras de folhas e pontas de raízes revelou que nenhuma das plantas regeneradas estavam transformadas. Mesmo assim as plantas foram crescidas até a maturidade e autofecundadas. Foram obtidas sementes de 342 plantas. Sempre que possível, cinco plântulas de cada progênie foram testadas para a resistência ao herbicida Basta<sup>TM</sup>. Nenhuma plântula mostrou resistência ao herbicida.

Em um segundo experimento foram bombardeadas 22 placas contendo 36 embriões imaturos por placa 10 dias após o inóculo em meio ML1. Doze placas foram bombardeadas com uma mistura 1:2 dos plasmídeos pACTBARGUS e p $\gamma$ KAF e 10 placas com uma mistura 1:2 dos plasmídeos pACTBARGUS e pPKDHDP5. Antes do bombardeamento os embriões foram tratados por 6 horas em meio ML1 contendo 0,5 M de manitol. As placas foram bombardeadas 1 vez com micropartículas de 1,6  $\mu$ m de  $\varnothing$  e 1800 psi de pressão a uma distância de 6 cm entre o alvo e o disco de ruptura. Vinte e quatro horas após o bombardeamento os embriões foram transferidos para meio seletivo contendo 3 mg/l de PPT e 0,1 M de manitol. Três 3 embriões foram amostrados de cada placa para monitorar a eficiência de transformação transiente através da análise histoquímica da atividade de GUS. A eficiência de transformação foi em média acima de 100 células transformadas por embrião.

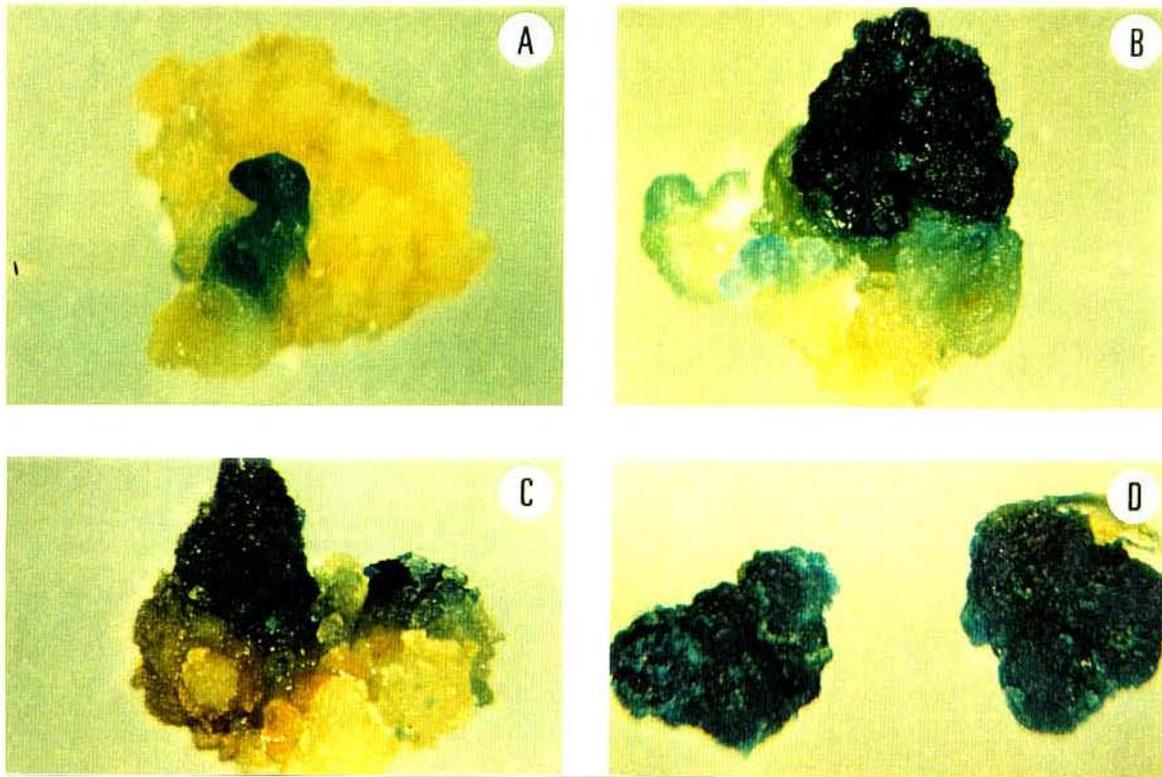
Os calos tipo I, formados a partir dos embriões imaturos, foram repicados a cada 18 dias, para meio contendo concentrações crescentes de PPT. Foram efetuados um total de 11 repiques, sendo que a concentração de PPT do último repique foi de 18 mg/l. Como observado no experimento anterior, massas de

células mucilaginosas surgiram em alguns calos. O escurecimento da superfície em contato com o meio de cultura nos calos embriogênicos foi pronunciado. Apenas as porções dos calos embriogênicos, sem escurecimento, foram repicadas a cada ciclo seletivo. Os calos mucilaginosos e os calos embriogênicos escuros descartados a cada repique, foram monitorados para a atividade de GUS. Algumas amostras também foram retiradas dos calos que apresentavam crescimento pronunciado em cultura. Foram observados células com atividade de GUS no material descartado até o sexto e sétimo ciclo seletivo. Foi interessante notar que a atividade de GUS estava negativamente correlacionada com o crescimento do tecido embriogênico (Figura 13). Alguns setores de alguns calos apresentaram coloração azul quando incubados em meio de reação para a atividade de GUS por apenas 1 a 2 horas (Figura 14). A relação entre o setor azul e o não azul aumentou com o número de ciclos seletivos (Figura 14-A para D).



**Figura 13** - Coloração histoquímica para a atividade de GUS em amostras de calo retiradas após o segundo ciclo seletivo.

Observar que a ocorrência de células expressando GUS, correlaciona-se negativamente com as regiões de crescimento ativo.



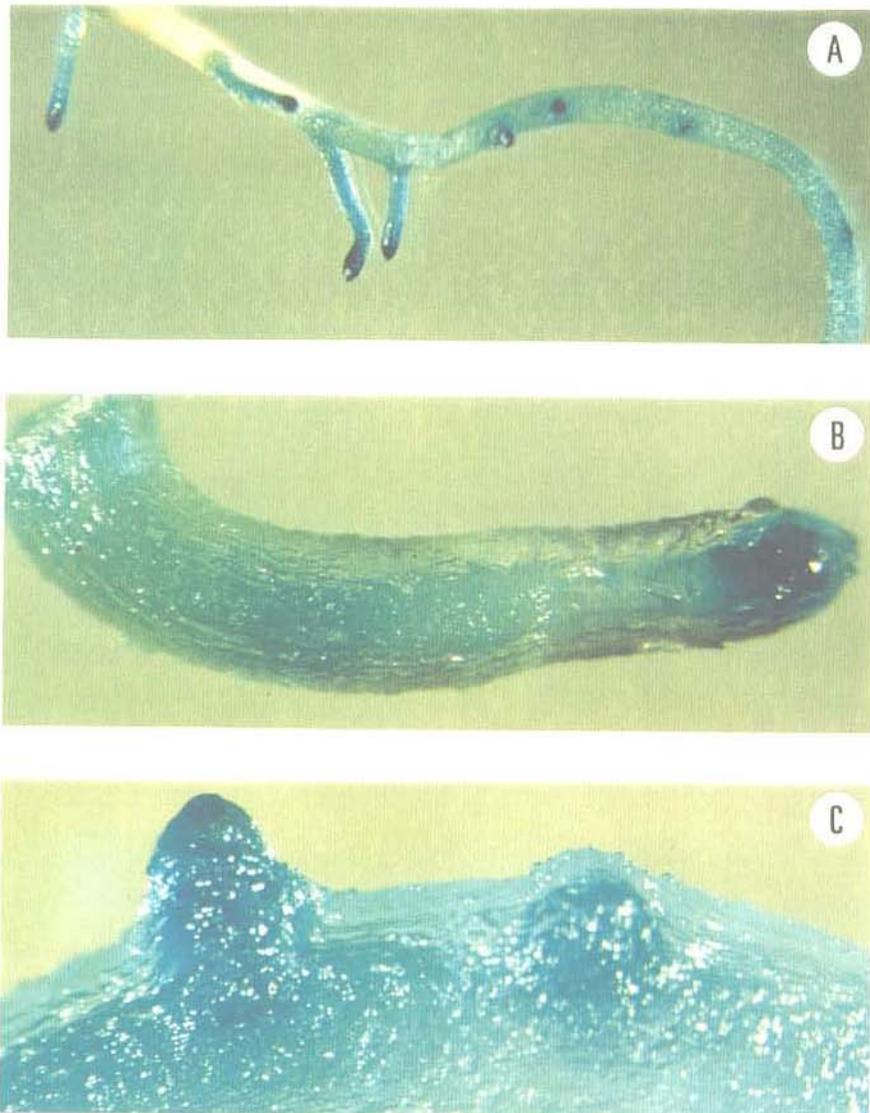
**Figura 14** - Coloração histoquímica para a atividade de GUS em calo após diferentes ciclos de seleção.

O número de ciclos seletivos aumenta de (A) para (D). Notar o aumento da relação entre tecido transformado/não transformado com o número de ciclos seletivos.

Após 11 ciclos seletivos, os calos foram transferidos para meio de regeneração contendo 3 mg/l de PPT. Essa concentração do herbicida inibiu bastante a regeneração dos calos. Trinta dias após o início da fase de regeneração o PPT foi retirado do meio de regeneração, resultando no aumento de plantas regeneradas. Os calos que permaneceram em meio contendo PPT apresentaram setores verdes e emitiram um elevado número de raízes finas, mas não regeneraram parte aérea.

Apenas um setor apresentou crescimento de raízes em taxas maiores que o normal. Amostras de raízes deste setor mostraram reação intensa para a atividade de GUS em apenas 1 hora de incubação (Figura 15). Algumas raízes advindas deste setor, entretanto, não apresentaram atividade de GUS, indicando que o calo em questão deveria ser quimérico. As raízes transformadas apresentaram a atividade típica do promotor do gene *Act1* de arroz em raízes de milho (McElroy *et al.*, 1990), e com expressão pronunciada em regiões de alta atividade meristemática, como na ponta das raízes (Figura 15-A). A Figura 15-B mostra uma raiz secundária jovem. Como notado na Figura 15-A, a ponta da raiz demonstra forte atividade de GUS, sendo que logo abaixo, pode ser identificada atividade de GUS no cilindro vascular e nenhuma atividade de GUS nas células parenquimáticas do córtex, exoderma e epiderme como observado por Esau (1974). Logo abaixo desta região, pode ser notado um aumento da expressão de GUS, localizado no cilindro vascular. A Figura 15-C demonstra que a expressão de GUS é acentuada nos primórdios de novas raízes. Infelizmente o setor que deu origem às raízes transformadas não regenerou parte aérea.

Neste experimento foram regeneradas 160 plantas, porém nenhuma apresentou reação positiva para a atividade de GUS, em amostras de folhas e pontas de raízes. Foi realizada análise por PCR utilizando-se DNA extraído das plantas regeneradas. O DNA foi extraído conforme a metodologia de Edwards *et al.*, (1991). Para a reação de PCR foram adicionados ao meio de reação 3  $\mu$ l do DNA, 1.5 mM de cloreto de magnésio, 1.2  $\mu$ l de cada oligonucleotídeo, 0.25 mM de dNTPs e 1 unidade de Taq DNA polimerase. Após a etapa de otimização com os oligonucleotídeos KAF1234 e KAF1539, os DNAs de todas as plantas foram testados para a presença do gene *bar* através dos oligonucleotídeos BARP e BARN, utilizando-se os oligonucleotídeos KAF1234 e KAF1539 como controle positivo em reações separadas. Não foi observada a amplificação de nenhum fragmento correspondendo ao tamanho de 400 pares de base, como



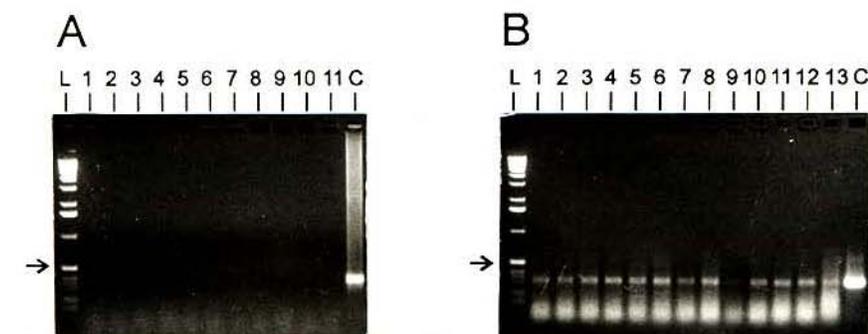
**Figura 15** - Coloração histoquímica para a atividade de GUS em raízes transgênicas.

(A) Aspecto geral da atividade de GUS em raízes secundárias e terciárias em diferentes fases do desenvolvimento.

(B) Raiz secundária mostrando alta atividade de GUS na ponta da raiz.

(C) Detalhe de raízes secundárias originando raízes terciárias com alta atividade de GUS.

seria esperado para uma planta transgênica (Figura 16). Este resultado indicou que nenhuma das plantas regeneradas era transgênica.



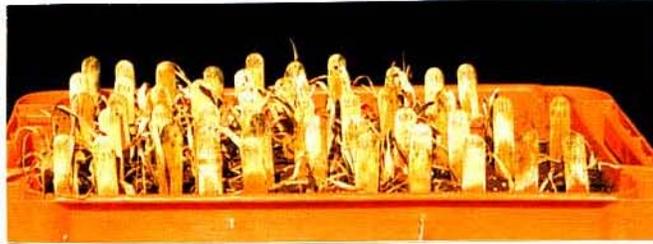
**Figura 16** - Resultados obtidos através de PCR para os genes *bar* a da  $\gamma$ -zeína de 27 kDa.

(A) Amplificação do DNA de 11 plantas regeneradas e do DNA do plasmídeo pACTBARGUS com os oligonucleotídeos BARP e BARN. Nenhum fragmento foi amplificado correspondente ao gene *bar* com o DNA das plantas regeneradas, indicando que não houve ocorrência de transformantes. No canaleta C pode-se observar o fragmento amplificado do gene *bar* a partir do plasmídeo pACTBARGUS. O canaleta L é o controle de peso e a seta equivale a banda de 500 pb.

(B) Amplificação do DNA de 13 plantas regeneradas a do DNA do plasmídeo p $\gamma$ KAF correspondente ao gene codificador da  $\gamma$ -zeína de 27 kDa com os oligonucleotídeos KAF1234 e KAF1539. Todas as reações apresentaram o fragmento esperado de 330 pb correspondente ao gene codificador da  $\gamma$ -zeína de 27 kDa. No canaleta C pode-se observar o fragmento amplificado do gene codificador da  $\gamma$ -kafirina de 28 kDa a partir do plasmídeo p $\gamma$ KAF. O canaleta L é o controle de peso e a seta equivale a banda de 500 pb.

Apenas 93 plantas regeneradas produziram sementes. Pelo menos 5 sementes, quando possível, de cada progênie, foram semeadas em bandejas

contendo uma mistura de vermiculita e terra peneirada 1:1. As plântulas obtidas foram testadas para a resistência ao herbicida Basta™. Nenhuma plântula sobreviveu ao teste com o herbicida, indicando que nenhuma planta era transgênica (Figura 17).



**Figura 17** - Progênies das plantas regeneradas, 10 dias após a aplicação de Basta™.

Observar que nenhuma planta resistiu ao teste indicando que não houve ocorrência de transformantes nas progênies.

## 7. DISCUSSÃO

Em cereais, a estratégia geralmente utilizada para a obtenção de plantas transgênicas envolve o bombardeamento de calos ou suspensões celulares, e posterior seleção bioquímica e/ou visual de setores transgênicos. Deste modo, a manipulação correta dos tecidos em cultura é fundamental para o sucesso da transformação. Neste trabalho foram estudados alguns dos aspectos mais importantes relacionados diretamente com a eficiência de transformação, seleção e regeneração de plantas de milho a partir de calos recém induzidos de embriões imaturos.

As linhagens CAT-100-6 e CAT-100-1, utilizadas inicialmente por Prioli, (1987) são bastante embriogênicas e produzem calos friáveis e não friáveis. Estas linhagens diferiram bastante quanto a indução de calos embriogênicos. Nas condições utilizadas neste trabalho, a linhagem CAT-100-6 apresentou melhor resposta para a formação de calos embriogênico tipo I do que a linhagem CAT-100-1, contrariamente ao observado por Prioli (1987). É difícil encontrar uma explicação plausível para este fato, mas é possível que possam estar envolvidas a penetrância e expressividade dos genes envolvidos na resposta à obtenção de calo embriogênico. Apesar da maior frequência e qualidade dos calos obtidos com embriões imaturos da linhagem CAT-100-6 em relação a linhagem CAT-100-1, estes apresentavam alta taxa de formação de calóides. Este aspecto foi contornado com a suplementação de L-prolina, caseína hidrolisada, nitrato de prata, cloreto de magnésio e vitaminas de Horn *et al.*, (1983). A adição de nitrogênio reduzido na forma de aminoácidos e a inibição da produção de etileno pelo nitrato de prata, promovem o aumento da obtenção e crescimento de calos embriogênico em milho (Duncan *et al.*, 1985; Armstrong & Green, 1985; Vain *et al.*, 1989a, 1989b). O meio ML1, formulado para verificar o efeito conjunto desses fatores na obtenção de culturas

embriogênicas, demonstrou aumento significativo da resposta à embriogênese somática em termos qualitativos e quantitativos (Tabela 2). Esta superioridade de resposta levou a substituição do meio CM1 pelo meio ML1, nos experimentos de transformação.

A adição de 0.1 M de manitol no meio, com o objetivo inicial de facilitar o processo seletivo (Sanford *et al.*, 1993), resultou em incremento significativo da qualidade na cultura obtida no meio ML1. A fonte de carbono é importante, tanto para o metabolismo como pela osmolaridade dada ao meio de cultura (Ozias-Akins & Vasil, 1985). Embora a sacarose seja a fonte de carbono onde tem sido observadas as mais altas taxas de crescimento dos calos, outras fontes de carbono, como o sorbitol e a glicose, originam culturas de melhor qualidade (Swedlund & Locy, 1993, Duncan *et al.*, 1985). O manitol pode aumentar a qualidade da cultura devido ao aumento da osmolaridade do meio (Litz, 1986; Nomura & Komamine, 1985) e/ou através de produtos do seu metabolismo que promovem o crescimento apenas de calos embriogênicos, como verificado para o enantiomero sorbitol (Thompson *et al.*, 1986; Swedlund & Locy, 1993).

Os resultados obtidos com embriões imaturos do material Hi-II F1 e do cruzamento de Hi-II F1 com a linhagem CAT-100-6 em meio ML1 e meio N6 1-100-25-Ag são interessantes porque indicam claramente que o genótipo é importante na obtenção de calos tipo I ou tipo II e, que o meio de cultura afeta de maneira importante o processo. Estes resultados indicam a importância da utilização de meios de cultura adequados à cada genótipo para a obtenção de culturas de melhor qualidade, com o objetivo de facilitar o processo de transformação e seleção. Os calos tipo II são preferidos para a obtenção de suspensões celulares, protoplastos, e são os mais utilizados na transformação de milho e de outros cereais (Tabela 3). A maior friabilidade desses calos favorece o processo de seleção, porém sua produção é genótipo dependente e restrito a poucas linhagens. Os calos tipo I, produzidos com certa facilidade em muitos genótipos, podem ser utilizados na transformação de linhagens elite,

**Tabela 3 - Resumo dos procedimentos de seleção utilizados para a transformação de gramíneas utilizando o gene *bar*.**

Cultura	Método <sup>a</sup>	Tecido <sup>b</sup>	Agente <sup>c</sup>	Concentração <sup>d</sup>	Fonte de N <sup>e</sup>	Referência
<b>Milho</b>	Bombard.	Susp.	Bialaphos	1 ou 3 mg/l	Sim	Gordon-Kamm et al. (1990, 1991)
<b>Milho</b>	Bombard.	Susp.	PPT	5 mg/l	Não	Fromm et al. (1990)
Arroz	Bombard.	Tipo II	Bialaphos	10 mg/l	Não	Christou et al. (1991)
Trigo	Bombard.	Tipo I	PPT	1 a 40 mg/l	Não	Vasil et al. (1992)
Aveia	Bombard.	Susp.	PPT	3 mg/l	Não	Somers et al. (1992)
Festuca	Protoplasts.	Protop.	PPT	100 a 200 mg/l	Sim	Wang et al. (1992)
Arroz	Bombard.	Susp.	PPT	4 mg/l	Não	Cao et al. (1992)
<b>Milho</b>	Bombard.	----	PPT	3 mg/l	----	Koziel et al. (1993)
<b>Milho</b>	Bombard.	Susp.	Ambos	3 a 5 mg/l	Não	Vain et al. (1993)
Arroz	Protoplasts.	Protop.	PPT	2,5 a 5 mg/l	Não	Rathore et al. (1993)
Arroz	Protoplasts.	Protop.	Bialaphos	1 mg/l	----	Yu et al. (1993)
Trigo	Bombard.	Tipo I	Bialaphos	1 mg/l	Não	Weeks et al. (1993)
<b>Milho</b>	Bombard.	Tipo II	Bialaphos	----	----	Wang et al. (1994)
<b>Milho</b>	Eletropor.	Susp.	Bialaphos	1 a 3 mg/l	Sim	Laursen et al. (1994)
<b>Milho</b>	Fibra Sílica	Susp.	Bialaphos	1 mg/l	Não	Frame et al. (1994)
<b>Milho</b>	Bombard.	Susp.	Bialaphos	1 mg/l	Não	Register III et al. (1994)
Trigo	Bombard.	----	PPT	5 mg/l	Não	Nehra et al. (1994)
Trigo	Bombard.	----	PPT	0.5 ou 5 mg/l	----	Becker et al. (1994)
Cevada	Bombard.	Tipo I	Bialaphos	5 mg/l	Sim	Wan & Lemaux, (1994)
<i>Agrostis</i>	Bombard.	Susp.	Bialaphos	2 a 4 mg/l	Sim	Hartman et al. (1994)
Centeio	Bombard.	Tipo I	PPT	5 a 30 mg/l	Não	Castillo et al. (1994)
<b>Milho</b>	Bombard.	Tipo I	Bialaphos	1 a 3 mg/l	----	Wan et al. (1995)
Cevada	Bombard.	Susp.	PPT	100 a 200 mg/l	Não	Stiff et al. (1995)

<sup>a</sup>Método de transformação utilizado: Bombard. - Bombardeamento de micropartículas; Protoplast. - Eletro ou quimioporação de protoplastos; Eletropor. - Eletroporação de tecidos intactos; Fibra Sílica - Agitação com fibras de sílica. <sup>b</sup>Tecido utilizado na seleção: Tipo I - Calli organizado tipo I; Tipo II - Calli friável tipo II; Susp. - Uso de calli tipo II para formação de suspensão celular em algum passo do processo seletivo; Protop. - Utilização de protoplastos ou culturas derivadas no processo seletivo. <sup>c</sup>Herbicida utilizado com o gene *bar* para a seleção: PPT - fosfinitricina; Bialaphos. <sup>d</sup>Concentração utilizada do herbicida no meio de cultura. <sup>e</sup>Fonte de Nitrogênio na forma de amino-ácidos disponível (Sim) ou não disponível (Não) no meio de cultura durante a seleção.

porém muitas dificuldades são encontradas principalmente no processo seletivo (Wan *et al.*, 1995) (Tabela 3).

A localização dos agrupamentos de células no embrião zigótico imaturo que dão origem aos embriões somáticos é de importância fundamental, para a posterior otimização das condições físicas para a transformação destes agrupamentos celulares. As informações existentes sobre a localização destes agrupamentos em embriões zigóticos imaturos são contraditórias. Em arroz, por exemplo, foi demonstrado que a embriogênese somática origina-se a partir das células da epiderme do escutelo (Jones & Rost, 1989). Em milho, por sua vez, alguns autores apontam a origem de embriões somáticos a partir de células da epiderme e subepiderme (Franz & Schel, 1987), enquanto outros demonstram que a embriogênese inicia-se a partir de camadas de células sub-epidérmicas do escutelo (Vasil *et al.*, 1985; Franz & Schel, 1990a, 1990b). O estudo da origem das células embriogênicas não é rotineiramente realizada em trabalhos de transformação que utilizam calos tipo I ou escutelo no bombardeamento. D'Halluin *et al.*, (1992) obtiveram sucesso na transformação de milho por eletroporação de tecido intacto somente após a digestão enzimática dos calos tipo I ou embriões imaturos. Os autores sugeriram que a digestão induziu a competência às células e/ou deixou as células competentes acessíveis ao DNA.

Os estudos histológicos realizados neste trabalho levam a conclusão de que a embriogênese somática em embriões imaturos da linhagem CAT-100-6 origina-se de células localizadas em camadas sub-epidérmicas do escutelo (Figura 3). Entretanto não foi possível concluir se a embriogênese somática é de origem uni ou pluricelular.

O bombardeamento com micropartículas pode ser efetuado através do método GE ou do método Kapton<sup>®</sup> (Figura 2; Ye *et al.*, 1990). Os resultados obtidos neste trabalho mostram claramente que o método GE é claramente superior ao Kapton<sup>®</sup>, tanto no aumento do número de células transformadas

quanto na variação sensivelmente menor entre disparos consecutivos (Figura 5). Este fator é importante, principalmente em experimentos de transformação transiente, pois permite verificar maiores diferenças entre os tratamentos aplicados. A maior variabilidade observada no método Kapton<sup>®</sup>, deve estar correlacionada com a distribuição irregular das micropartículas/DNA na membrana e aos possíveis desvios da trajetória durante o disparo sofrido pela membrana Kapton<sup>®</sup> (Figura 2-B).

Ye *et al.*, (1990) e Sanford *et al.*, (1991) já haviam testado um aparelho com desenho similar ao GE e obtiveram resultados semelhantes, porém utilizaram tela de nylon para depositar as micropartículas. Apesar dos resultados destes trabalhos, este método não foi utilizado em trabalhos rotineiros de transformação. Além da vantagem da maior eficiência de transformação e menor variação entre disparos consecutivos, o método GE permite maior velocidade de trabalho, aumentando o número de disparos que uma pessoa pode efetuar em um dia.

O estudo das condições físicas de bombardeamento é de importância fundamental para o sucesso da transformação das células competentes à embriogênese somática e, com o mínimo de danos causados ao tecido alvo. Os estudos das condições físicas para a transformação de camadas celulares relativamente profundas demonstrou que quase todos os fatores físicos estudados influenciam significativamente na expressão transiente e na penetração da micropartícula.

A eficiência de transformação transiente foi influenciada significativamente pelo tamanho das micropartículas e distâncias entre o alvo e o disco de ruptura a nível de 1%, porém não foi influenciada pelas diferentes pressões utilizadas (Figura 6). A maior eficiência de transformação transiente observada com a micropartícula de 1,0  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$  pode ser explicada pelo maior número de micropartículas no mesmo volume em comparação com as demais micropartículas. Esta hipótese foi testada, correlacionando-se o número de

quanto na variação sensivelmente menor entre disparos consecutivos (Figura 5). Este fator é importante, principalmente em experimentos de transformação transiente, pois permite verificar maiores diferenças entre os tratamentos aplicados. A maior variabilidade observada no método Kapton<sup>®</sup>, deve estar correlacionada com a distribuição irregular das micropartículas/DNA na membrana e aos possíveis desvios da trajetória durante o disparo sofrido pela membrana Kapton<sup>®</sup> (Figura 2-B).

Ye *et al.*, (1990) e Sanford *et al.*, (1991) já haviam testado um aparelho com desenho similar ao GE e obtiveram resultados semelhantes, porém utilizaram tela de nylon para depositar as micropartículas. Apesar dos resultados destes trabalhos, este método não foi utilizado em trabalhos rotineiros de transformação. Além da vantagem da maior eficiência de transformação e menor variação entre disparos consecutivos, o método GE permite maior velocidade de trabalho, aumentando o número de disparos que uma pessoa pode efetuar em um dia.

O estudo das condições físicas de bombardeamento é de importância fundamental para o sucesso da transformação das células competentes à embriogênese somática e, com o mínimo de danos causados ao tecido alvo. Os estudos das condições físicas para a transformação de camadas celulares relativamente profundas demonstrou que quase todos os fatores físicos estudados influenciam significativamente na expressão transiente e na penetração da micropartícula.

A eficiência de transformação transiente foi influenciada significativamente pelo tamanho das micropartículas e distâncias entre o alvo e o disco de ruptura a nível de 1%, porém não foi influenciada pelas diferentes pressões utilizadas (Figura 6). A maior eficiência de transformação transiente observada com a micropartícula de 1,0  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$  pode ser explicada pelo maior número de micropartículas no mesmo volume em comparação com as demais micropartículas. Esta hipótese foi testada, correlacionando-se o número de

células com atividade de GUS com o número de micropartículas contadas em hemocítômetro. O coeficiente de correlação obtido (considerando-se micropartículas de 1-3  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$  como 1.5  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$ ) foi de 88.8 %, indicando que, dentro dos limites estudados, a variação do número de células transformadas é devido a variação do número de micropartículas.

O maior nível de expressão transiente de GUS quando o alvo encontra-se a 9 cm do disco de ruptura em relação a distância de 6 cm pode ser devido a maior destruição do tecido escutelar verificada em menores distâncias entre o alvo e o disco de ruptura (Figura 8). Devido a significância das interações entre distância e micropartícula e entre distância, micropartícula e pressão, o bombardeamento deve ser otimizado para cada espécie e tecido através de um experimento multifatorial.

Todos os fatores estudados influenciam significativamente a penetração das micropartículas no tecido escutelar a nível de 1 % (Figura 6). A primeira questão levantada foi confirmar que a variação observada no índice de penetração era influenciada pela sua massa. A correlação entre a massa das micropartículas e o índice de penetração foi de 76.1 %, indicando que pelo menos em parte, e dentro dos limites estudados, a variação da penetração nos tecidos pelo fator micropartícula, é devido a sua massa.

Como podia-se esperar, a distância entre o alvo e o disco de ruptura influenciou significativamente na penetração das micropartículas, indicando que quanto menor a distância maior é a penetração. Isto pode ser explicado devido a perda de energia cinética da micropartícula com o ar residual da câmara de disparo. Dentro dos limites estudados, quanto maior a pressão maior é a penetração, indicando que a energia aplicada no bombardeamento está diretamente correlacionada com a velocidade de impacto das micropartículas no tecido-alvo e deste modo com a profundidade de penetração.

As interações da distância (entre o alvo e o disco de ruptura) e pressão e a distância e micropartícula foram significativas, reforçando a hipótese de que os estudos de otimização devem ser realizados em experimentos multifatoriais, como o conduzido neste trabalho. Aspecto interessante, é que aparentemente o fator distância foi o que mais influenciou na penetração das micropartículas. Esta observação é baseada no fato de que as interações onde o fator distância estava presente foram significativas sendo o fator que produziu quadrado médio duas vezes superior ao quadrado médio dos fatores micropartícula e pressão. Indiretamente, esta observação indica que o ar residual na câmara de disparo é o fator mais importante a ser considerado para a penetração de determinada superfície de interesse.

As análises acima descritas permitem concluir que o índice de penetração, criado para agrupar em um único valor a dispersão percentual das células transgênicas por camada celular (Figura 7), foi coerente e acertado, pois permitiu a realização de análises estatísticas de modo rápido e simples. A associação entre o índice de penetração e o número de células transformadas transientemente, permite por sua vez a conclusão de que no tratamento com micropartículas de 1,6  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$ , 6 cm de distância entre o alvo e o disco de ruptura e pressão de 1800 psi, a eficiência de transformação de células localizadas a partir da terceira camada celular do escutelo é de cerca de 65 %, maior que em qualquer outro tratamento (Figuras 7 e 8). Já no tratamento onde ocorreu o menor índice de penetração (micropartículas de 1,0  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$ , 9 cm de distância entre o alvo e o disco de ruptura e pressão de 1200 psi), menos de 5 % das células expressando GUS estão localizadas a partir da terceira camada de células (Figuras 7 e 8).

Um dos problemas sérios encontrados decorrentes da utilização das condições ótimas para atingir as camadas de células mais profundas do escutelo foi o dano excessivo causado pelo bombardeamento a alta pressão e pequena distância entre o alvo e o disco de ruptura (Figura 8). Os resultados

foram surpreendentes. No início deste experimento não era esperado que a coloração com safranina e fast green pudesse dar resultados tão indicativos dos danos causados pelo bombardeamento. Normalmente os tecidos meristemáticos, como o embrião imaturo, ficam com a parede celular esverdeada, o núcleo vermelho e o citoplasma variando da coloração esverdeado a rosa, quando coloridos com safranina e fast green (Schneider, 1981). A coloração vermelha da parede celular verificada apenas nas células superficiais e/ou por todo o escutelo dos embriões bombardeados, funcionou como eficiente marcador *in situ* para os danos causados pelo bombardeamento (Figura 8). A coloração vermelha, originada pela safranina, é observada normalmente, inclusive no controle não bombardeado, apenas nos núcleos e na parede de tecidos de condução (ver porção mediana direita do embrião bombardeado na Figura 8-A).

A questão era como contornar a necessidade de atingir camadas celulares profundas, não verificado em bombardeamentos “leves”, sem provocar danos generalizados através do bombardeamento em condições “pesadas” (Figura 8). Este problema foi contornado aumentando-se a osmolaridade do meio de cultura com o manitol, açúcar pouco metabolizado em células de plantas (Thompson *et al.*, 1986; Richter & Kirst, 1987). A utilização desse açúcar foi baseada no fato de que a adição de agentes osmóticos no meio de bombardeamento aumentam a eficiência de transformação transiente e estável em bactérias e plantas (Sanford *et al.*, 1993; Vain *et al.*, 1993).

Concentrações crescentes de manitol proporcionaram um aumento significativo na eficiência de transformação transiente e no índice de penetração e, reduziu quase que totalmente os danos causados ao tecido bombardeado. O aumento da eficiência de transformação transiente foi significativamente diferente para os dois tipos de micropartículas testadas (Figura 9-A). O aumento do número de células transformadas pode ser explicado pelo aumento da eficiência de transformação. A eficiência de transformação foi demonstrada pela

queda do número de micropartículas necessárias para gerar uma célula transformada (Figura 9-C). Este aumento de eficiência pode ser devido a dois fatores: O primeiro em função da proteção contra o estouro das células durante a penetração das micropartículas. Isto ocorre devido a redução da turgescência das células. O segundo é em função da maior penetração em tratamentos com o agente osmótico, que aumenta o número de células passíveis à transformação. As Figuras 9-C e 10 comprovam que ambas as hipóteses são plausíveis. Quanto maior a concentração de manitol maior é a proteção contra os danos causados pelo bombardeamento (Figura 10) e maior é a penetração das micropartículas (Figura 9-B). Dos dois fatores propostos para explicar a correlação, entre número de células transformadas e concentração de manitol, o da proteção contra o estouro das células deve ser creditado como principal. Isto pode ser concluído em função da expressiva proteção do manitol em concentração elevada contra as injúrias causadas pelo bombardeamento, e também, devido a curva de aumento da penetração do tecido pelas micropartículas ser muito variável em função do aumento da concentração de manitol.

Combinando-se os resultados do experimento de otimização das condições físicas com aqueles do experimento do efeito do manitol, pode-se concluir que é possível atingir as células localizadas a partir da terceira camada celular com alta eficiência, sem causar danos significativos ao tecido alvo.

É interessante notar que no tratamento com 0.8 M de manitol os embriões que mostraram poucos danos causados pelo bombardeamento, apresentaram eficiência de aproximadamente 150 micropartículas para a obtenção de uma célula transformada e taxa de transformação de 0.83%. Cada célula, transformada ou não, apresentou em média 1.25 micropartícula, até a quinta camada celular. As observações supracitadas corroboram com a conclusão de Yamashita *et al.*, (1991). Estes autores afirmam que a micropartícula deve penetrar o núcleo para que ocorra a transformação. A

argumentação de que nem todas as micropartículas contenham DNA, foi descartada por Armaleo *et al.*, (1990), que determinaram através da transformação de leveduras duplmutantes, que cada micropartícula possui entre 10 e 30 moléculas de DNA ativas. Klein *et al.*, (1987), encontraram eficiência de até 40 % de transformação de células de epiderme de cebola com o uso de mRNA. O conjunto das informações supracitadas indicam que a eficiência de transformação poderia ser incrementada se o DNA fosse translocado do citoplasma para o núcleo. Assim, a incorporação no bombardeamento de proteínas, ou mRNAs que dirijam a síntese de proteínas, que transloquem e/ou insiram o DNA no núcleo, poderão aumentar significativamente a eficiência da transformação através do bombardeamento com micropartículas.

Vários outros fatores influenciam a transformação de células competentes através de bombardeamento com micropartículas. Um destes fatores, por exemplo, é a produção de etileno por tecidos danificados. As células bombardeadas aumentam rapidamente a produção de etileno, o qual está inversamente correlacionado com a eficiência de transformação (Morrish *et al.*, 1992). Porém este efeito não foi notado neste trabalho. Pelo contrário observou-se apenas uma tendência de maior eficiência de transformação com o aumento da vedação das placas contendo os tecidos bombardeados (Figura 11-A). Este resultado sugere que os embriões recém-bombardeados devem sofrer mais injúrias com a perda de água após o bombardeamento que com a produção de gases inibidores como o etileno.

Embriões bombardeados 1 dia após o inóculo apresentam geralmente maior eficiência de transformação, que embriões bombardeados entre 2 e 8 dias após o inóculo (Figura 11-C). Isto pode ser devido a maior taxa de divisão celular e/ou o estado fisiológico do embrião ser mais adequado para a transformação. Tem sido observado que a integração do DNA ocorre em células com replicação ativa de DNA (Morrish *et al.*, 1993), apesar de que Lida *et al.*,

(1991) observaram taxas 4 a 6 vezes maiores de transformação em culturas celulares bombardeadas nas fases M e G2 do ciclo celular. Apesar da fase do ciclo celular, alguns autores demonstraram que o bombardeamento de culturas celulares em crescimento ativo resulta em maior taxa de transformação (Sanford *et al.*, 1993).

Para a seleção das células transgênicas com o gene *bar* é necessária a expressão da enzima PAT em níveis elevados, devido a constante de inibição da enzima glutamina sintetase (GS) pelo PPT ser 4  $\mu\text{M}$  para a isoforma GSI e 1.5  $\mu\text{M}$  para a isoforma GSII e o  $K_m$  da enzima pelo glutamato ser de 3 mM (Stewart *et al.*, 1980; Kollner, 1993). Para a obtenção de expressão de PAT em níveis adequados é necessário que o gene *bar* esteja sob o controle de um promotor constitutivo forte. Neste trabalho demonstrou-se que o plasmídeo pACTBARGUS dirige a expressão da enzima PAT em níveis comparáveis ao observado para o plasmídeo pBARGUS (Figura 4-B). Estes resultados indicam que o promotor do gene *act1* e íntron 1 de arroz e, o promotor 35S e íntron 1 do gene *adh1* de milho, são semelhantes quanto a sua atividade. Tendo em vista que o promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve-flor sozinho é ineficiente em cereais (Lazzeri & Shewry, 1993; Vasil, 1994), pode-se afirmar que os íntrons realmente proporcionam aumento significativo da expressão e devem ser utilizados para atingir expressão constitutiva adequada do gene de interesse, no caso o gene seletivo *bar*. A expressão do gene *uidA* pelos dois plasmídeos foi cerca de três vezes maior com o promotor do gene *Act1* e íntron 1 de arroz e o promotor do gene *Adh1* e íntron 1 do gene *Adh1* de milho, indicando maior eficiência do promotor do gene *Act1* em relação ao promotor do gene *Adh1* (Figura 4-A).

Como discutido nas páginas anteriores, a taxa de transformação pelo bombardeamento com micropartículas é baixa, mesmo com um protocolo de bombardeamento bem estabelecido. Para contornar este problema, as células transformadas devem ser selecionadas com marcadores bioquímicos e/ou

visuais. Neste trabalho foi utilizado o gene *bar* que confere resistência aos herbicidas PPT e bialaphos<sup>®</sup>. O nível de inibição do PPT no crescimento dos calos da linhagem Cat-100-6 indicou que a seleção deveria ser realizada em concentrações entre 1 e 3 mg/l de PPT (Figura 12). Esta concentração é equivalente a proposta por Fromm *et al.*, (1990), e foi utilizada nos experimentos iniciais de transformação. O manitol, além de melhorar a qualidade dos calos e proteger os tecidos contra os danos gerados pelo bombardeamento, favorece de algum modo a seleção dos tecidos transgênicos (Sanford *et al.*, 1993; Vain *et al.*, 1993). O teste realizado mostrou que concentrações crescentes de manitol inibem o crescimento dos calos (Figura 12) e que em baixas concentrações favorece a qualidade da cultura obtida.

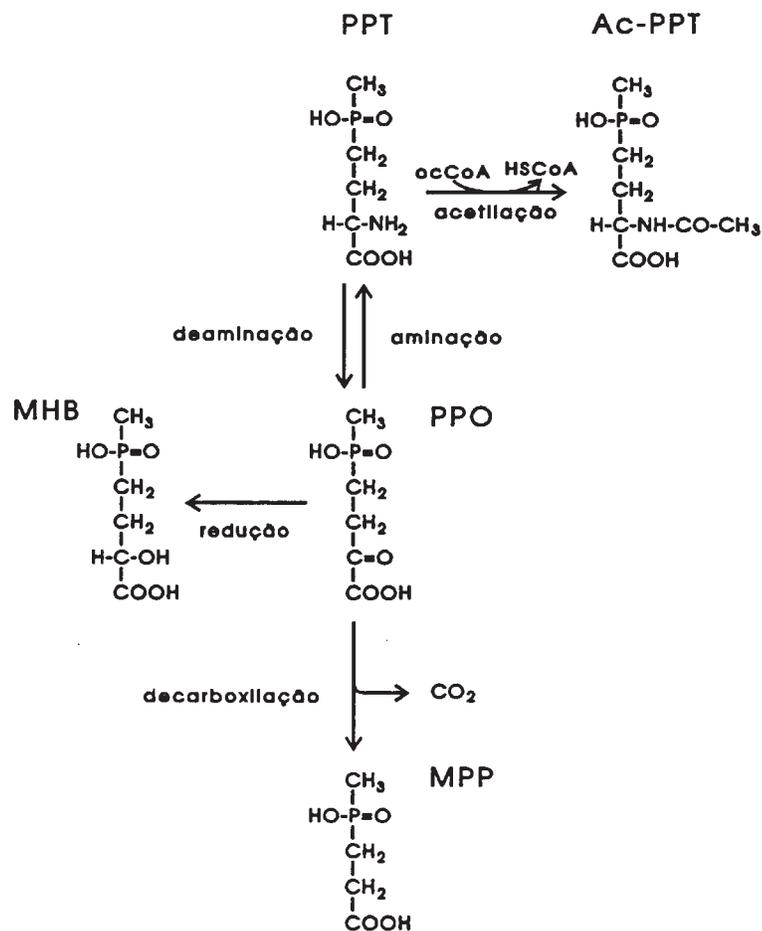
Todas as condições estudadas neste trabalho foram utilizadas na tentativa de se obter plantas transgênicas. Nos experimentos de obtenção de transformantes estáveis, muitos dos tecidos descartados apresentaram inúmeros pontos azuis e; muitos setores que apresentaram crescimento vigoroso ficaram oxidados em repiques subsequentes. Este resultado foi interpretado como proteção cruzada (Wilmink & Dons, 1993), ou seja, a proteção de tecidos não transformados por células transgênicas. A hipótese está claramente demonstrada na Figura 13, onde pode ser notado a forte correlação negativa entre os *foci* expressando GUS e o crescimento de calos não transgênicos.

Os setores azuis claro obtidos, inclusive no controle sem bombardeio, são devido a degradação inespecífica do substrato da enzima  $\beta$ -glucuronidase. Esta degradação pode ser causada por bactérias endófitas associadas ao tecido vegetal (Wilson *et al.*, 1992), ou pela atividade intrínseca de GUS dos tecidos vegetais (Kosugi *et al.*, 1990). A degradação de glucoronídeos foi eficientemente contornada através da adição de metanol. A enzima  $\beta$ -glucuronidase demonstrou ser resistente a este solvente orgânico e inibiu a atividade de

enzimas que degradam o X-gluc inespecificamente como glicosidases (Jefferson *et al.*, 1987; Kosugi *et al.*, 1990).

O fato da superfície do tecido em contato com o meio de cultura ficar oxidada mais rapidamente, indica que o PPT possui baixa translocação no tecido. O ácido glutâmico, análogo do PPT, possui baixa translocação nos tecidos, devido a baixa afinidade relativa a outros aminoácidos de entrada em células vegetais (Tabela 4).

No primeiro experimento, durante o processo de seleção foram mantidos os aminoácidos do meio de cultura. Este procedimento foi contrário ao proposto por Dekeyser *et al.*, (1989), que indicam a interferência dos aminoácidos no processo de seleção. Neste experimento algumas placas em seleção tinham aparência embriogênica e crescimento similar aos controles não bombardeados mantido em meio com e sem PPT. Este resultado é contrário a determinação da curva de sensibilidade ao PPT e se deve ao fato da curva de inibição ter sido realizada em meio CM1, sem aminoácidos no meio de cultura, e este experimento ter sido conduzido em meio ML1, com aminoácidos. O crescimento observado pode ser devido a degradação do PPT nos tecidos não transgênicos e/ou a interferência dos aminoácidos do meio de cultura na absorção do PPT. A Figura 18 mostra o metabolismo do L-PPT em plantas transgênicas e não transformadas. A degradação de PPT em plantas não transformadas leva a formação de MHB e MPP, que são acumulados nos tecidos da planta. Esta hipótese, de degradação do PPT em tecidos não transformados, possui reduzida relevância, devido a três fatores. O primeiro é que a degradação do PPT não ser elevada (Dröge-Laser *et al.*, 1994) e de que, com o número de ciclos seletivos é plausível que ocorra um equilíbrio entre a formação de MHB e MPP e a degradação de PPT. É importante ressaltar que no meio CM1, sem aminoácidos, o efeito do PPT foi claro, ao contrário do observado no meio ML1, que possui aminoácidos em sua formulação. Deste modo a interferência de amino-ácidos do meio de cultura ML1 na absorção de PPT ganha importância. A



**Figura 18** - Esquema das reações metabólicas do herbicida L-PPT em plantas.

Em plantas transgênicas expressando o gene *bar/pat*, o L-PPT é acetilado para *N*-acetil-PPT. A taxa de acetilação depende da atividade da PAT com a degradação que ocorre normalmente em tecidos não transformados. Duas vias de degradação ocorrem a partir da deaminação do L-PPT. Na primeira ocorre redução do PPO (Ácido 4-metil-fosfinico-2-oxi-butanóico) para a formação do MHB (Ácido 4-metilfosfinico-2-hidroxi-butanóico) e na segunda a decarboxilação do PPO para a formação do MPP (Ácido 3-metilfosfinico-propanóico). Modificado a partir de Dröge-Laser et al. (1994).

**Tabela 4 - Afinidade relativa pelo sítio I<sup>a</sup> de entrada de amino-ácidos em células vegetais<sup>b</sup>.**

<b>Amino-ácido</b>	<b>Afinidade relativa</b>	<b>Classe</b>
<b>Alanina</b>	<b>75</b>	<b>Neutro</b>
Metionina	75	Neutro
Fenil alanina	64	Neutro
Tirosina	64	Neutro
Leucina	63	Neutro
Cisteína	58	Neutro
Serina	57	Neutro
Glicina	56	Neutro
Triptofano	54	Neutro
Glutamina	51	Neutro
Treonina	49	Neutro
Valina	44	Neutro
Isoleucina	44	Neutro
<b>Ácido glutâmico</b>	<b>44</b>	<b>Ácido</b>
<b>Prolina</b>	<b>43</b>	<b>Neutro</b>
Histidina	33	Básico
Lisina	32	Básico
Asparagina	22	Neutro
Arginina	22	Básico
Ácido aspártico	18	Ácido

<sup>a</sup>Kinraide (1981), demonstra que existem apenas dois sítios de entrada de amino-ácidos em células vegetais. O sítio II tem alta afinidade por amino-ácidos básicos e desprezível para os demais amino-ácidos. <sup>b</sup>Obtido a partir de Kinraide (1981).

Tabela 3 mostra um resumo de trabalhos de transformação de gramíneas com o gene *bar*. Para a seleção de transformantes com esse gene podem ser utilizados os herbicidas PPT e bialaphos<sup>®</sup>. Como pode ser visto, geralmente os autores que utilizaram PPT não utilizaram fonte de nitrogênio na forma de aminoácidos no meio seletivo. Já um número significativo dos autores que utilizaram bialaphos<sup>®</sup>, mantiveram aminoácidos no meio seletivo. Outro ponto importante a ressaltar é que os trabalhos com seleção de PPT aplicam, em média, maior concentração no meio seletivo que os trabalhos que utilizam bialaphos<sup>®</sup>.

Esta diferenciação é devido a maior translocação do bialaphos<sup>®</sup> em relação ao PPT. A alanina, presente no tripeptídeo bialaphos<sup>®</sup>, é o aminoácido de maior afinidade relativa pelo sítio principal de entrada de aminoácidos em células vegetais (Tabela 4). Já o ácido glutâmico, análogo do PPT, possui afinidade relativamente baixa por este sítio e, praticamente a mesma do aminoácido prolina que é geralmente utilizado em concentrações muito superiores ao do PPT no meio de cultura. Estas considerações fazem da interferência na absorção de PPT por aminoácidos, e da sua baixa translocação, as razões possíveis da ineficiência verificada durante o processo seletivo e do fato de que nenhuma planta regenerada, ter demonstrado atividade das enzimas GUS ou PAT.

Devido a indisponibilidade de bialaphos<sup>®</sup>, em nosso laboratório, os experimentos continuaram a ser conduzidos utilizando-se PPT como agente seletivo. Experimentos foram conduzidos na ausência de aminoácidos no meio seletivo e em condições mais severas de seleção em PPT, através do aumento gradativo da concentração do herbicida no meio seletivo e maior número de ciclos seletivos. Apesar da baixa frequência, foram observados setores com alta expressão de GUS, evidenciando algum sucesso no processo de seleção aplicado (Figura 14). Com a retirada dos aminoácidos do meio de cultura, não foi verificada queda acentuada da qualidade da cultura em termos

embriogênicos Isto indica que os aminoácidos, apesar de favorecerem a taxa de crescimento da cultura, possuem importância maior na indução da embriogênese somática, como descrito por Armstrong & Green (1985), Songstad *et al.*, (1992) e Dennehey *et al.*, (1994).

O problema mais sério verificado foi a inibição da regeneração pelo PPT. Este problema já havia sido identificado em outros experimentos, porém como houve problemas de regeneração devido a baixa luminosidade, acreditou-se na época, que este último era o fator principal para a falta de regeneração de plantas. Nos experimentos subsequentes, enquanto havia PPT no meio de cultura, os calos apenas ficavam verdes e emitiram poucas e finas raízes. Apenas um setor do terceiro experimento apresentou o crescimento de raízes vigorosas em meio com PPT, porém sem a regeneração de planta inteira. Estas raízes apresentaram reação positiva para a atividade de GUS (Figura 15), denotando a transgênese do setor. Este setor entretanto era provavelmente quimérico, reforçando a hipótese de que o sistema seletivo foi ineficiente. Estes resultados indicam que em experimentos futuros deve-se retirar o PPT do meio de regeneração. A inibição da regeneração pelo PPT, mesmo em uma população de calos onde uma fração é transgênica, pode ser devido a inibição da fotossíntese pelo PPT (Sauer *et al.*, 1987) ou devido a maior sensibilidade ao PPT da GS do cloroplasto em relação a GS do citoplasma. A primeira isoforma é inibida pelo PPT em níveis mais baixos ( $K_i$  1.5  $\mu$ M) que a segunda ( $K_i$  4.0  $\mu$ M) é inibida somente em concentração mais elevada (Zollner, 1993). A GS do cloroplasto é expressa somente em tecidos verdes, como o calo em processo de regeneração, ao passo que a GS do citoplasma é expressa em tecidos não fotossintéticos, como em calo em seleção (Edwards *et al.*, 1990). GS do citoplasma ( $K_i$  1.5  $\mu$ M), que é expressa em tecidos não fotossintéticos, como calos em cultura (Edwards *et al.*, 1990) ou devido a inibição da fotossíntese pelo PPT (Sauer *et al.*, 1987).

Apesar deste experimento ter gerado calo transgênico, a frequência na população foi baixa, entre 0.5 e 1 %, indicando que mesmo após vários ciclos seletivos em concentrações altas de PPT, o crescimento de muitos calos deve ter sido devido a proteção cruzada. Esta hipótese é salientada pela observação de que, mesmo após vários ciclos seletivos, podem ser observados células expressando GUS. Outro fato a considerar é que os calos possam crescer em meio com PPT devido a baixa translocabilidade e relativa resistência a amônia devido a algum tipo de resistência epigenética. O fato de nenhuma planta transgênica ter sido identificada através da análise das atividades das enzimas GUS e PAT e análise molecular por PCR, reflete a ineficiência do sistema seletivo e/ou a inibição da regeneração pelo PPT.

O bialaphos<sup>®</sup> tem sido demonstrado ser mais eficiente que o PPT durante a seleção dos calos em cultura, devido a sua maior translocação. Register III *et al.*, (1994) relatam a ineficiência de transformação de milho com o pBARGUS utilizando o PPT como agente seletivo, mesmo em altas concentrações. Estes autores afirmam que o bialaphos, análogo do PPT, é eficiente para a seleção mesmo em concentrações relativamente pequenas. Wang *et al.*, (1992) demonstrou que a seleção com PPT é ineficiente devido a interferência de glutamina e asparagina na atividade do herbicida.

Neste trabalho, a localização histoquímica da atividade de GUS dirigida pelo promotor do gene *act1* de arroz, em raízes de milho, revelou alta similaridade com a expressão verificada em raízes de arroz (Zhang *et al.*, 1991). Estes resultados de expressão de GUS em raízes transgênicas não são importantes *per se*, mas servem para demonstrar como a técnica de transformação pode ser uma ferramenta poderosa para diversos estudos de biologia básica e aplicada.

## 8. CONCLUSÕES

Este trabalho identificou vários aspectos necessários para a obtenção de plantas transgênicas de milho, através do bombardeamento com micropartículas. Os pontos estudados, de maior relevância foram:

- Obtenção de culturas de calo tipo I de excelente qualidade em termos de embriogênese, a partir de embriões imaturos da linhagem CAT-100-6 inoculados em meio ML1.

- Estabelecimento das linhagens Hi-II, que poderão ser utilizadas para experimentos de transformação, devido a maior facilidade de seleção em calos tipo II.

- Identificação da origem da embriogênese somática na linhagem CAT-100-6.

- Estabelecimento do método GE para a utilização em experimentos de transformação transiente e estável, em detrimento ao método Kapton de aceleração das micropartículas.

- Estudo de vários fatores físicos e biológicos para a transformação transiente e estável.

- Todos os fatores físicos estudados influenciam na transformação transiente, penetração e/ou danos ao tecido alvo.

- As células que dão origem à embriogênese somática são eficientemente transformadas com o uso de micropartículas de 1.6  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$ , 6 cm entre o alvo e o disco de ruptura e 1800 psi de gás Hélio.

- Os danos causados pelo bombardeamento ao tecido alvo, são facilmente contornados pela adição de 0.8 M de manitol por 5 horas antes do bombardeamento e 16 horas após o bombardeamento.

- O aumento da concentração de manitol no meio de cultura aumenta a expressão transiente, e influencia diretamente na penetração.

- A coloração de safranina/fast green foi eficiente na identificação dos danos causados pelo bombardeamento.

- O índice de penetração foi acertado e seu uso identificou eficientemente os tratamentos de maior penetração.

- O plasmídeo pACTBARGUS expressa GUS e PAT em níveis adequados para identificação e seleção eficiente dos calos bombardeados.

- O PPT demonstrou-se ser ineficiente na seleção de calli transformados.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, G.C.; Hall Jr., G.E.; Childs, L.C. Weissinger, A.K.; Spiker, S.; Thompson, W.F. (1993). Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells. *Plant Cell* **5**:603-13.
- 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. (1994). Regeneration of plants from somatic cell cultures: Applications for in vitro genetic manipulation. In: Freeling, M.; Walbot, V. (eds). **The Maize Handbook**, pp 663-71. Springer-Verlag, New York.
- Armstrong, C.L. & Green, C.E. (1985). Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* **164**:207-14.
- 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.* **65**:92-3.
- Aves, K.; Genovesi, D.; Willetts, N.; Zachwieja, S.; Mann, M.; Spencer, T.; Flick, C.; Gordon-Kamm, W. (1992). Transformation of an elite maize inbred through microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **28**:124A.
- Bayer, E.; Gugel, K.H.; Hagele, K.; Hagenmaier, H. Jessipow, S.; Koning, W.A.; Zahner, H. (1972). Stoffwechselprodukte von mikroorganismen: Phosphinothricin und phosphinothricyl-alanyl-alanin. *Helv. Chim. Acta* **55**:224-239.
- Becker, D.; Brettschneider, R.; Lorz, H. (1994). Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J.* **5**:299-307.
- Birch, R.G. & Franks, T. (1991). Development and optimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. *Aust. J. Plant Physiol.* **18**:453-69.

- Blowers, A.D.; Bogorad, L.; Shark, K.B.; Sanford, J.C. (1989). Studies on *Chlamydomonas* chloroplast transformation: Foreign DNA can be stable maintained in the chromosome. *Plant Cell* **1**:123-32.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **76**: 248-54.
- Cao, J.; Duan, X.; McElroy, D.; Wu, R. (1992). Regeneration of herbicide resistant transgenic plants following microprojectile bombardment-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Rep.* **11**:586-591.
- Cassas, A.M.; Kononowicz, A.K.; Kehr, U.B.; Tomes, D.T.; Axtell, J.D.; Butler, L.G.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M. (1993). Transgenic *Sorghum* plants via microprojectile bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:11212-6.
- Castillo, A.M.; Vasil, V.; Vasil, I.K. (1994). rapid production of fertile transgenic plants of rye (*Secale cereale* L.). *Biotechnology* **12**:1366-71.
- Chan, M.T.; Chang, H.H.; Ho, S.L.; Tong, W.F.; Yu, S.M. (1993). *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimaeric  $\alpha$ -amilase promoter/ $\beta$ -glucuronidase gene. *Plant Mol. Biol.* **22**:491-506.
- Chasan, R. (1994). A Meeting on the minds of maize. *Plant Cell* **6**:920-5.
- Chee, P.P.; Drong, R.F.; Slightom, J.L. (1991). Using olymerase chain reaction to identify transgenic plants. In: Gelvin, S.B.; Schilperoort, R.A.; Verma, D.P.S. (eds). **Plant Molecular Biology Manual**. pp C3.1-C3.28. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Christou, P. (1992). Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *Plant J.* **2**:275-81.
- 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.; Swain, W.F.; Yang, N.-S.; McCabe, D.E. (1989). Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA* **86**:9692-6.
- 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. *BioTechnology* **9**:957-62.
- 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.
- Claparols, I.; Santos, M.A.; Torné, J.M. (1993). Influence of some exogenous amino acids on the production of maize embryogenic callus and on endogenous amino acid content. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **34**:1-11.
- Clayton, W.D. (1973). The awnless species of Andropogoneae. *Kew. Bull.* **28**:49-58.
- Clayton, W.D. (1983). Notes on tribe Andropogoneae (Gramineae). *Kew. Bull.* **35**:813-8.
- Close, K.R.; Ludeman, L.A. (1987). The effect of auxin-like plant growth regulators and osmotic regulation on induction of somatic embryogenesis from elite maize imbreeds. *Plant Science* **52**:81-9.
- Coruzzi, G.M. (1991). Molecular approaches to the study os amino acid biosynthesis in plants. *Plant Sci.* **74**:145-155.
- D'Halluin, K.; Bonne, E.; Bossut, M.; De Beuckeleer, M. and Leemansl,J. (1992). Transgenic maize plants by tissue electroporation. *The Plant Cell* **4**:1495-505.
- De Block, M.; Botterman, J.; Vandewiele, M.; Dockx, J.; Thoen, C.; Gosselé, V.; Movva, N. R.; Thompson, C.J.; Van Montagu, M.; Leemans, J. (1987). Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* **6**:2513-18.
- Dekeyser, R.; Claes, B.; Marichal, M.; Van Montagu, M.; Caplan, A. (1989). Evaluation of selectable markers for rice transformation. *Plant Physiol.* **90**:217-223.

- Dennehey, B.K.; Petersen, W.L.; Ford-Santino, C. Pajeau, M.; Armstrong, C.L. (1994). Comparison of selective agents for use with the selectable marker gene bar in maize transformation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **36**:1-7.
- Donn, G.; Nilges, M.; Morocz, S. (1990). Stable transformation of maize with a chimaeric, modified phosphinotricin-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes*. In: **Progress in plant cellular and molecular biology**, ed. Nijkamp, H.J.J.; Van der Plas, L.H.W.; Aartrijk, J.. Abstr. A2-38, p. 53 Dordrecht: Kluwer.
- Dröge-Laser, W.; Siemeling, V.; Pühler, A.; Broer, I. (1994). The metabolites of the herbicide L-Phosphinothricin (glufosinate): Identification, stability and mobility in transgenic, herbicide-resistant, and untransformed plants. *Plant Physiol.* **105**:159-66.
- Duncan, D.R.; Williams, M.E.; Zehr, B.E. e Widholm, J.M. (1985). The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta* **165**:322-32.
- Edwards, J.W.; Walker, E.L.; Coruzzi, G.M. (1990). Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:3459-63.
- Edwards, K.; Jonhstone, C.; Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* **19**:1349.
- Esau, K. (1974). **Anatomia das plantas com sementes**. (Morretes, B.L.; trad) 293 p. Edgard Blücher, São Paulo.
- Finer, J.J.; McMullen, M.D. (1990). Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. *Plant Cell Rep.* **8**:586-9.
- Food and Agriculture Organization (1988). **Production**, vol 42. FAO, Rome.
- 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.

- Fransz, P.F.; Schel, J.H.N. (1987). An ultrastructural study on early callus development from immature embryos of the maize strains A188 and A632. *Acta Bot. Neerl.* **36**:247-60.
- Fransz, P.F.; Schel, J.H.N. (1990a). An ultrastructural study on the early developmental of *Zea mays* somatic embryos. *Can. J. Bot.* **69**:858-65.
- Fransz, P.F.; Schel, J.H.N. (1990b). Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*). *Can. J. Bot.* **69**:26-33.
- Freitas, F.A. (1993). Clonagem e caracterização dos genes que codificam as  $\gamma$ -prolaminas de *Coix* e sorgo. Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.
- Freitas, F.A. de; Yunes, J.A.; Silva, M.J. da; Arruda, P e Leite, A. (1994). Structural characterization and promoter activity analysis of the  $\gamma$ -kafirin gene from *Sorghum*. *Mol. Gen. Genet.* **245**:177-186.
- Fromm, M.E.; Morrish, F.; Armstrong, C.; Willians, R.; Thomas, J.; Klein, T.M. (1990). Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *BioTechnology* **8**:883-9.
- Gallie, D.R.; Lucas, W.J.; Walbot, V. (1989). Visualizing mRNA expression in plant protoplasts: Factors influencing efficient mRNA uptake and translation. *Plant Cell* **1**:301-11.
- Godwin, I.D.; Ford-Lloyd, B.V.; Newbury, H.J. (1992). In vitro approaches to extending the host-range of *Agrobacterium* for plant transformation. *Aust. J. Bot.* **40**:751-63.
- Golovkin, M.V.; Abrahám, M.; Mórocz, S.; Bottka, S.; Fehér, A.; Dudits, D. (1993). Production of transgenic maize plants by direct DNA uptake into embryogenesis protoplasts. *Plant Sci.* **90**:41-52.
- Gordom-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.; Willetts, 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. *The Plant Cell* **2**:603-19.
- Gould, J.; Devey, M.; Hasegawa, O.; Ulian, E.C.; Peterson, G.; Smith, H. (1991). Transformation of *Zea mays* using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiol.* **95**:426-34.
- Grosveld, F.; van Assendelft, G.B.; Greaves, D.R. Kollias, G. (1987). Position-independent, high-level expression of the human  $\beta$ -globin gene in transgenic mice. *Cell* **51**:975-85.
- Guilley, H.; Dudley, R.K.; Jonard, G.; Balazs, E.; Richards, K.E. (1982). Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: Detection of promoter sequences, and characterization of transcription. *Cell* **30**:763-73.
- Hauptmann, R.M.; Vasil, V.; Ozias-Akins, P.; Tabaeizadeh, Z.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T.; Horsch, R.B.; Vasil, I.K. (1988). Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformants in the Gramineae. *Plant Physiol.* **86**:602-6.
- Hess, D.; Dressler, K.; Nimmrichter, R. (1990). Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci.* **72**:233-44.
- Hiei, Y.; Ohta, S.; Komari, T. Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* **6**:271-82.
- Horn, M.E.; Sherrard, J.H.; Widholm, J.M. (1983). Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture: I. Establishment of photoautotrophic cultures. *Plant Physiol.* **72**:426-9.
- Iida, A.; Yamashita, T.; Yamada, Y.; Morikawa, H. (1991). Efficiency of particle-bombardment-mediated transformation is influenced by cell cycle stage in synchronized cultured cells of tobacco. *Plant Physiol.* **97**:1585-7.
- Jefferson, R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**:387-405.

- Jefferson, R.A. (1993). Beyond model systems: New strategies, methods, and mechanisms for agricultural research. *Ann. New York Acad. Sci.* **700**:53-73.
- Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A.; Bevan, M.W. (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**:3901-7.
- Jefferson, R.A.; Wilson, K.J. (1991). The GUS gene fusion system. In: Gelvin, S.B.; Schilperoort, R.A.; Verma, D.P.S. (eds). **Plant Molecular Biology Manual**, pp B14/1-B14/33. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Jones, T.J.; Rost, T. (1989). The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epithelial cells. *Bot. Gaz.* **150**:41-9.
- Kahl, G. (1982). Molecular biology of wound healing: The conditioning phenomenon. In: Kahl, G.; Schell, J. (eds). **Molecular Biology of Plant Tumors**, pp 211-67. Academic Press, New York.
- Kikkert, J.R. (1993) The Biolistic<sup>®</sup> PDS-1000/He device. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **33**:221-6.
- Kinraide, T.B. (1981). Interamino acid inhibition of transport in higher plants: Evidence for two transport channels with ascertainable affinities for amino acids. *Plant Physiol.* **68**:1327-33.
- Klein, T.M.; Wolf, E.D.; Wu, R.; Sanford, J.C. (1987). High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**:70-3.
- Klein, T.M.; Gradziel, T.; Fromm, M.E. and Sanford, J.C. (1988). Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *BioTechnology* **6**:559-63.
- 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* **85**:6681-5.
- Kosugi, S.; Ohashi, Y.; Nakajima, K.; Arai, Y. (1990). An improved assay for  $\beta$ -glucuronidase in transformed cells: Methanol almost completely suppresses a putative endogenous  $\beta$ -glucuronidase activity. *Plant Sci.* **70**:133-40.

- Koziel, M.G.; Beland, G.L.; Bowman, C.; Carozzi, N.B.; Crenshaw, R.; Crossland, 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. and Evola, S.V. (1993). Field performance of elite transgenic plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *BioTechnology* **11**:194-200.
- Kramer, C.; DiMaio, J.; Carswell, G.K.; Shillito, R.D. (1993). Selection of transformed protoplast-derived *Zea mays* colonies with phosphinothricin and a novel assay using the pH indicator chlorophenol red. *Planta* **190**:454-8.
- Lazzeri, P.A.; Shewry, P.R. (1993). Biotechnology of cereals. *Biotech. Gen Eng. Rev.* **11**:79-146.
- Li, L.; Qu, R.; Kochko, A.de; Fauquet, C. e Beachy, R.N. (1993). An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep.* **12**: 250-5.
- Lindley, K. (1992). Genetic manipulation of crop plants. *J. Biotechnol.* **26**:1-28.
- Litz, R.E. (1986). Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspension cultures. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **111**:969-72.
- Lu, C.; Vasil, I.K.; Ozias-Akins, P. (1982). Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theor. Appl. Genet.* **62**:109-12.
- Luehersen, K.R. (1994). Introns. In: Freeling, M.; Walbot, V. (eds). **The Maize Handbook**. pp 636-9. Springer-Verlag, New York.
- McCabe, D.E.; Swain, W.F.; Martinell, B.J.; Christou, P. (1988). Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Biotechnology* **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.
- McElroy, D.; Chamberlain, D.A.; Moon, E.; Wilson, K.J. (1995). Development of *gusA* reporter gene constructs for cereal transformation: Availability of plant transformation vectors from the CAMBIA Molecular Genetic Resource Service. *Mol. Breed.* **1**:27-37.

- Miflin, B.J.; Lea, P.J. (1976). The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry* **15**:873-85.
- Morocz, S.; Donn, G.; Nemeth, J.; Dudits, D. (1990). An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. *Theor. App. Gen.* **80**:721-6.
- Morrish, F.; Songstad, D.D.; Armstrong, C.L.; Fromm, M.E. (1992). Microprojectile bombardment: A method for the production of transgenic cereal crop plants and the functional analysis of genes. In: Hiatt, A. (ed). **Transgenic Plants: Fundamentals and Applications**, pp133-71. Marcel Dekker, New York.
- Morrish, F.M.; Fromm, M.E. (1992). Cereal transformation methods. *Curr. Opin. Biotech.* **3**:141-146.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**:473-97.
- Murry, L.E.; Elliott, L.G.; Capitant, S.A.; West, J.A.; Hanson, K.K.; Scarafia, L.; Johnston, S.; DeLuca-Flaherty, C.; Nichols, S.; Cunanan, D.; Dietrich, P.S.; Mettler, I.J.; Dewald, S.; Warnick, D.A.; Rhodes, C.; Sinibaldi, R.M.; Brunke, K.J. (1993). Transgenic corn plants expressing MDMV strain B coat protein are resistant to mixed infections of maize dwarf mosaic virus and maize chlorotic mottle virus. *Biotechnology* **11**:1559-64.
- Nehra, N.S.; Chibbar, R.N.; Leung, N.; Caswell, K.; Mallard, C.; Steinhauer, L.; Baga, M.; Kartha, K.K. (1994). Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs. *Plant J.* **5**: 285-97.
- Nomura, K.; Komamine, A. (1985). Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.* **79**:988-91.
- Omirulleh, S.; Abraham, M.; Golovkin, M.; Stefanov, I.; Karabaev, M.K.; Mustardy, L.; Morocz, S.; Dudits, D. (1993). Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize. *Plant Mol. Biol.* **21**:415-28.

- Ozias-Akins, P.; Vasil, I.K. (1985). Nutrition of plant tissue cultures. In: Vasil, I.K. (ed). **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants**. Vol 2, pp 129-48. Academic Press, Orlando.
- Paskowski, J.; Shillito, R.D.; Saul, M.; Mandak, V.; Hohn, T.; Hohn, B.; Potrykus, I. (1984). Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* **3**:2717-22.
- Pinazza, L.A. (1993). Perspectivas da cultura do milho e do sorgo no Brasil. In: Büll, L.T.; Cantarella, H. (eds). **Cultura do milho: Fatores que afetam a produtividade**. pp 1-10. Potafos, Piracicaba.
- Potrykus, I. (1991). Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **42**:205-25.
- Prioli, L.M. (1987). Cultura de tecidos e células, controle genético da embriogênese somática e variação somaclonal em milho (*Zea mays* L.). IB - UNICAMP (tese de doutorado).
- 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.; Wilson, H.M. (1994). Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment. *Plant Mol. Biol.* **25**:951-61.
- Richaud, F.; Richaud, C.; Rafet, P.; Patte, J.C. (1986). Chromosomal location and nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *dapA* gene. *J. Bact.* **166**: 297-300.
- Richter, D.F.E.; Kirst, G.O. (1987). D-mannitol dehydrogenase and d-mannitol-1-phosphate in *Platymonas subcurdiformis*: Some characteristics and their role in osmotic adaptation. *Planta* **170**: 528-34.
- Ritala, A.; Aspregen, K.; Kurtén, U.; Salmenkallio-Marttila, M.; Mannonen, L.; Hannus, R.; Kauppinen, V.; Teeri, T.H.; Enari, T.-M. (1994). Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. *Plant Mol. Biol.* **24**:317-25.
- Roth, B.A.; Goff, S.A.; Klein, T.M.; Fromm, M.E. (1991). C1- and R-dependent expression of the maize Bz1 gene require sequences with homology to mammalian *myb* and *myc* binding sites. *Plant Cell* **3**:317-25.

- Russell, J.A.; Roy, M.K.; Sanford, J.C. (1992a). Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiol.* **98**:1050-6.
- Russell, J.A.; Roy, M.K.; Sanford, J.C. (1992b). Major improvements in biolistic transformation of suspension-cultured tobacco cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **28P**: 97-105.
- Sahi, S.V.; Chilton, M.D.; Ghilton, W.S. (1990). Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:3879-83.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3 vol. 2 ed Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sanford, J.C. (1990). Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant.* **79**:206-9.
- Sanford, J.C.; Klein, T.M.; Wolf, E.D.; Allen, N. (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science technology* **5**:27-37.
- Sanford, J.C.; DeVit, M.J.; Russell, J.A.; Smith, F.D.; Harpending, P.R.; Roy, M.K.; Johnston, S.A. (1991). An improved, helium-driven biolistic device. *Technique* **3**:3-16.
- Sanford, J.C.; Smith, F.D. e Russell, J.A. (1993). Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzym.* **217**:483-509.
- Sauer, H.; Wild, A.; Rühle, W. (1987). The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis. II. The causes of inhibition of photosynthesis. *Z. Naturforsch* **42c**:270-87.
- Schneider, H. (1981). Plant anatomy and general botany. In: Clark, G. (ed). **Staining procedures**. pp 315-33. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Shaul, D. e Galili, G. (1992). Increased lysine synthesis in tobacco plants that express high levels of bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. *Plant J.* **2**:203-9.
- Shillito, R.D.; Carswell, G.K.; Johnson, C.M.; Di Maio, J.J.; Harms, C.T. (1989). Regeneration of fertile plants from protoplasts of elite inbred maize. *Biotechnology* **7**:581-7.

- Skokut, T.A.; Wolk, C.P.; Thomas, J.; Meeks, J.C.; Shaffer, P.W. (1978). Initial organic products of assimilation of [13N]-ammonium and [13N]-nitrate by tobacco cells cultured on different sources of nitrogen. *Plant Physiol.* **62**:299.
- Somers, D.A.; Rines, H.W.; Gu, W.; Kaeppler, H.F. Bushnell. W.R. (1992). Fertile transgenic oat plants. *Biotechnology* **10**: 1589-94.
- 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.
- Songstad, D.D.; Somers, D.A.; Griesbach, R.J. (1995). Advances in alternative DNA delivery techniques. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **40**:1-15.
- Spencer, T.M.; Gordom-Kamm, W.J.; Daines, R.J.; Start, W.G.; Lemaux, P.G. (1990). Bialaphos selection of stable transformants from maize cell cultures. *Theor. Appl. Genet.* **79**:625-31.
- Spencer, T.M.; O'Brien, J.V.; Start, W.G.; Adams, T.R.; Gordon-Kamm, W.J.; Lemaux, P.G. (1992). Segregation of transgenes in maize. *Plant Mol. Biol.* **18**:201-10.
- Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. (1980). **Principles and procedures of statistics**. 2 ed. 633p. McGraw Hill, New York.
- Stewart, G.R.; Mann, A.F.; Fentem, P.A. (1980). Enzymes of glutamate formation: Glutamate dehydrogenase, glutamine syhthetase, and glutamate synthase. In: Mifflin, B.J. (ed). *Amino acids and derivatives*, Vol 5. In: Stumpf, P.K.; Conn, E.E. (eds). **The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise**. pp 271-327. Academic Press, New York.
- Stiff, C.M.; Kilian, A.; Zhou, H.; Kudrna, D.A.; Kleinhofs, A. (1995). Stable transformation of barley callus using biolistic® particle bombardment and the phosphinothricin acetyltransferase (*bar*) gene. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **40**:243-8.
- Swedlund, B. e Locy, R.D. (1993). Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize. *Plant Physiol.* **103**:1339-46.

- Tachibana, K.; Watanabe, T.; Sekizawa, Y.; Takematsu, R. (1986a). Inhibition of glutamine synthetase and quantitative changes of free amino acids in shoots of bialaphos-treated Japanese barnyard millet. *J. Pesticider Sci.* **11**:27-31.
- Tachibana, K.; Watanabe, T.; Sekizawa, Y.; Takematsu, R. (1986b). Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *J. Pesticide Sci.* **11**:33-37.
- Thompson, C.J.; Movva, N. R.; Tizard, R.; Cramer, R.; Davies, J.E.; Lauwereys, M.; Botterman, J. (1987). Characterization of the herbicide-resistant *bar* gene from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* **6**:2519-23.
- Thompson, M.R.; Douglas, T.J.; Obata-Sasamoto, H. Thorpe, T. (1986). Mannitol metabolism in cultured plant cells. *Physiol. Plant.* **67**:365-9.
- Trigiano, R.N.; May, R.A.; Conger, B.V. (1992). Reduced nitrogen influences somatic embryo quality and plant regeneration from suspension cultures of orchardgrass. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **28P**:187-91.
- Vain, P.; Yean, H. e Flament, P. (1989). Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. by AgNO<sub>3</sub>. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **18**:143-151.
- Vain, P.; Flament, P e Soundain, P. (1989). Role of ethylene in embryogenic callus initiation and regeneration in *Zea mays* L. *J. Plant Physiol.* **135**:537-540.
- Vain, P.; McMullen, M.D. e Finer, J.J. (1993). Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. (1993). *Plant Cell Rep.* **12**:84-8.
- Vasil, I.K. (1985). Biotechnology in the improvement of forage crops. In: **Proc. of the XV Intern. Grassl. Congr.**, p 45-8, Kyoto.
- Vasil, I.K. (1994). Molecular improvement of cereals. *Plant Mol. Biol.* **25**:925-37.
- Vasil, V.; Lu, C.; Vasil, I.K. (1985). Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Protoplasma* **127**:1-8.

- 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. *Biotechnology* **10**: 667-75.
- Vasil, V.; Srivastava, V.; Castillo, A.M.; Fromm, M.E., Vasil, I.K. (1993). Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Biotechnology* **11**:1553-8.
- Walters, D.A.; Vetsch, C.S.; Potts, 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.; Lemaux, P.G. (1994). Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.* **104**:37-48.
- 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.; Brambila, E.; Evans, R.A. (1994). Rapid production of transgenic corn by microprojectile bombardment of high type II immature embryos. *In vitro Cel. Dev. Biol.* **30A**:67.
- Wang, Z.; Takamizo, T.; Iglesias, V.A.; Asusky, M.; Nagel, J.; Potrykus, I.; Spangenberg, G. (1992). Transgenic plants of tall fescue (*Festuca arundinaceae* Scrib.) obtained by direct gene transfer to protoplasts. *Biotechnology* **10**:691-6.
- Weeks, J.T.; Anderson, O.D.; Blechl, A.E. (1993). Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat. *Plant Physiol.* **102**:1077-74.
- Wilmink, A.; Dons, J.J.M. (1993). Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11**:165-85.
- Wilson, K.J.; Jefferson, R.A.; Hughes, S.G. (1992). The *Escherichia coli gus* operon: Induction and expression of the *gus* operon in *E. coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria. In: Gallagher, S.R. (ed). **GUS protocols: Using the GUS gene as a reporter of gene expression.** pp 7-22. Academic Press, San Diego.

- Wohlleben, W.; Arnold, W.; Broer, I.; Hillemann, D.; Struch, E.; Pühler, A. (1988). Nucleotide sequence of the phosphinothricin-*N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü 494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* **70**:25-37.
- Wright, M.S.; Shillito, R.D.; Launis, K.; Bowman, C.; Hill, M.; DiMaio, J. (1994). Screening of *Zea mays* plants for phosphinothricin resistance using the chlorophenol red test. *In vitro Cel. Dev. Biol.* **30A**:59.
- Yamashita, T.; Iida, A.; Morikawa, H. (1991). Evidence that more than 90% of  $\beta$ -glucuronidase-expressing cells after particle bombardment directly receive the foreign gene in their nucleus. *Plant Physiol.* **97**:829-31.
- 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.
- Zhang, W.; McElroy, D.; Wu, R. (1991). Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants. *Plant Cell* **3**:1155-65.
- Kollner, H. (1993). **Handbook of enzyme inhibitors**. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Zupan, J.R.; Zambrysky, P. (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* **107**:1041-7.