



RUTH H. UTIDA, GRACIELLE T. COSTA, ROSÂNGELA L. BRANDÃO, MARIANA
C. A. GONÇALVES, NEWTON P. CARNEIRO e ANDRÉA A. CARNEIRO

Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG – Caixa Postal 151 –
andreac@cnpmis.embrapa.br

INTRODUÇÃO

A transformação genética constitui um método de reconhecida importância no melhoramento de plantas, onde genes de diferentes organismos que apresentam interesse agrônomico podem ser introduzidos em outras espécies. Entretanto, todos os plasmídeos recombinantes utilizados na transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* ou transferência direta de DNA, possuem além do gene de interesse outras seqüências estruturais do vetor que se integram no genoma juntamente com o transgene (Ramanathan e Veluthambi, 1996; Cluster *et al.*, 1994; Kononov *et al.*, 1997; Tingay *et al.*, 1997, Kohli *et al.*, 1999). A integração de seqüências estruturais do vetor no genoma de plantas transgênicas é indesejável pois além de ocasionar efeitos negativos em *cis* (Artelt *et al.*, 1991) podem causar um aumento na tendência de rearranjos dos transgenes (Muller *et al.*, 1999). Os rearranjos podem ser ocasionados pela presença de seqüências de DNA identificadas como "hotspots" que estimulam recombinação ilegítima pela formação de estruturas secundárias. Algumas seqüências como as origens de replicação plasmidial podem estar envolvidas em rearranjos porque são alvos de nucleases e topoisomerasas (Linden *et al.*, 1996); regiões estruturais dos vetores são ricas em AT, seqüências reconhecidas recombino-gênicas (Muller *et al.*, 1999). Adicionalmente os rearranjos de transgenes podem causar silenciamento gênico e instabilidade da construção no genoma da planta transgênica (Fu *et al.*, 2000).

Embora seja comum em transformação animal a remoção das seqüências estruturais dos vetores, em plantas utiliza-se todo o plasmídeo. Ainda que rotineiramente todo o vetor seja utilizado em transferências direta de DNA, como a biobalística, as seqüências estruturais do vetor não tem nenhuma utilidade para a planta. Recentemente Fu et al. (2000) utilizando construções lineares ou cassetes gênicos mínimos ("Clean" DNA) compostos da região promotora CaMV35S, da codante dos genes *uidA* (β -glucuronidase GUS) ou *hpt* (resistência ao antibiótico higromicina) ou *bar* (resistência ao herbicida fosfinotricin) e da terminadora, transformaram arroz, através do bombardeamento de partículas. As plantas transgênicas produzidas mostraram um padrão de integração do transgene simples, com um baixo número de cópias e baixa freqüência de rearranjos. Com resultados semelhantes, Loc et al. (2002) bombardearam arroz com construções lineares mínimas contendo o promotor da Ubiquitina, as regiões codantes do gene GNA (*Galanthus nivalis* agglutinina), *cry1Ac* (toxina do *Bacillus thuringiensis*) e o terminador NOS, juntamente com a construção linear formada pelo promotor CaMV35S, pela região codante *hpt* e o terminador NOS. Análises moleculares constataram que as plantas produzidas possuíam tanto os genes não selecionáveis (*cry1Ac* e GNA) quanto o gene de seleção *hpt*. Altos níveis de acumulo de proteína inseticida, *cry1Ac* e de GNA, foram observadas em plantas transgênicas produzidas utilizando o cassete mínimo. Segundo Zhao et al. (2003), os sistemas de transformação direta de DNA utilizando apenas cassetes mínimos (promotor, região codante do gene e terminador) geram plantas transgênicas mais seguras e, podem ser utilizados para introduzir diferentes genes de importância agrônômica, simultaneamente, em plantas.

Apesar da potencialidade da técnica de transformação de plantas utilizando cassetes mínimos para a segurança dos OGMs, existem raros trabalhos feitos com este tema. Neste artigo serão descritos os estudos preliminares, realizados na Embrapa Milho e Sorgo, propondo verificar a utilidade desta técnica para transformação de milho tropical via biobalística.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados com cassetes mínimos contendo (i) o promotor CaMV35S, a região codante do gene *uidA* (GUS) e o terminador NOS (CaMV35S+*uidA*+NOS) e, (ii) o promotor CaMV35S, a região codante do gene *bar* e o terminador CaMV35S (CaMV35S+*bar*+CaMV35S). Estes fragmentos foram amplificados por PCR a partir do vetor binário pCAMBIA 3301 (CAMBIA Institute Austrália). Os primers AAC3 (TGA GCA AAG TCT GCC GCC TTA C) e AAC4 (CAT ACG AGC CGG AAG CAT AAA G) foram utilizados para amplificar uma região de 1909 pb do vetor pCAMBIA 3301 contendo a construção linear CaMV35S+*bar*+CaMV35S, acrescidas de 193 pb e 159 pb provenientes do vetor flanqueando as extremidades 5' e 3', respectivamente. Os primers AAC5 (CCA ACT TAA TCG CCT TGC AG) e AAC6 (TGT GGT TGG CAT GCA CAT AC), foram utilizados para amplificar uma região de 3150 pb, contendo a construção linear CaMV35S+*uidA*+NOS e, mais 161 pb e 120 pb provenientes do vetor flanqueando as extremidades 5' e 3', respectivamente (Figura 1). Cada 25 μ l de reação continha tampão de PCR 1X, 2 mM de MgCl₂, 100 μ M de cada dNTP, 0,2 μ M de cada um dos primers, 25 ng de DNA e 1 unidade de *Taq* Platinum DNA Polimerase (Invitrogen). As reações foram feitas utilizando um termociclador modelo 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) programado para uma desnaturação inicial de 15 segundos a 94°C, seguido de 30 ciclos de amplificação (15"/ 95°C, 15"/ 60°C, 5"/ 72°C), e uma extensão final a 72°C por 7 min. Os fragmentos

amplificados foram purificados utilizando o kit DNA and Gel Band Purification (Amershan Biosciences – Piscataway NJ) e utilizados para o bombardeamento de partículas.

Na produção de milho tropical transgênico via biobalística, utilizando os cassetes mínimos, embriões imaturos, de 1,0 a 1,5 mm foram isolados em condições estéreis e cultivados durante 30 dias em meio básico N6 (Chu *et al.*, 1975) suplementado com Dicamba. Durante o bombardeamento foram utilizadas micropartículas de tungstênio aceleradas através de um aparelho movido à hélio. Um estoque de micropartículas de tungstênio foi preparado ressuspensando 60 mg tungstênio M10 (Sylvania, GTE Chemicals/ Towanda – USA) em 1 ml de uma solução 50% glicerol estéril. DNA das duas construções lineares na concentração de 500 ng do cassete CaMV35S+*uidA*+NOS e 150 ng do cassete CaMV35S+*bar*+CaMV35S foram juntamente precipitados sobre 50 µl da solução estoque de tungstênio. As partículas de tungstênio cobertas com DNA foram cuidadosamente lavadas e ressuspensadas em 60 µl de etanol 100%. Sete microlitros, desta solução, foram depositados no centro dos macrocarreadores, discos (24 mm) de membranas Kapton (Du Pont). Tais membranas foram usadas no bombardeamento dos tecidos de interesse utilizando 900 psi de pressão de gás hélio e os explantes foram posicionadas à 6 cm da plataforma de lançamento das micropartículas. Foram mantidas constante a distância entre a câmara de gás de alta pressão e a membrana carreadora contendo as micropartículas cobertas com DNA (8 mm), distância entre a membrana carreadora e a tela de retenção (12 mm) e a pressão de vácuo (27 mm Hg).

A seleção de plantas transgênicas foi iniciada sete dias após bombardeamento quando os calos de milho foram transferidos para meio básico N6 suplementados com glufosinato de amônia, o composto ativo do herbicida Finale. Calos foram subcultivados a cada 10 dias em dosagens crescentes de glufosinato de amônia (3 a 9 mg/L). Para a regeneração, calos embriogênicos foram transferidos para meio MS suplementado com glufosinato de amônia e cultivados à 26°C em luz (16 horas). Plantas com aproximadamente 5 cm de altura foram transferidas para solo em casa de vegetação.

Para avaliar a expressão da enzima β-glucuronidase (gene repórter GUS), controlada pelo promotor CaMV35S, foi realizado o teste histoquímicos de acordo com a metodologia descrita por Jefferson *et al.* (1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos seis calos crescendo em meio de cultivo suplementado com 9 mg/L de glufosinato de amônio, portanto no caso do cassete CaMV35S+*bar*+CaMV35S houve uma seleção contra rearranjos destrutivos que implicassem na não expressão desta construção linear (Figura 2B). Parte destes calos foram utilizados em análises histoquímicas para detecção de GUS e, o restante foi colocado em meio para regeneração de plantas. Dentre os seis calos que estavam se desenvolvendo em meio de cultura contendo o agente seletivo, a mais de oito semanas, dois expressaram a enzima β-glucuronidase (Figura 2A).

Embora o tamanho da amostragem utilizada nestes experimentos fosse pequena, os resultados mostraram que a co-integração não foi afetada pelo uso de construções gênicas mínimas. Co-integração dos cassetes gênicos CaMV35S+*bar*+CaMV35S e CaMV35S+*uidA*+ NOS ocorreu em 33,33% dos calos transgênicos produzidas. Fu *et al.* (2000) encontrou uma taxa de 100% de co-transformação com cassetes mínimos para os genes *hpt* e *gusA*, e 88% de co-expressão dos dois genes (em 12% não houve a expressão de *gusA*). Loc *et al.* (2002) trabalhando com *cry1Ac*, *gna* e *hpt*, produziram 71,43% de plantas contendo as três construções mínimas, concluindo que a transformação com cassetes mínimos produz resultados que são tão eficientes quanto com o plasmídeo inteiro.

Na tentativa de minimizar a quantidade de DNA heterólogo, em plantas transgênicas, e assim criar plantas geneticamente modificadas mais estáveis em relação ao transgene e mais seguras para os consumidores e para o meio ambiente, futuros experimentos estão direcionados para a otimização do processo de transformação de milho com construções gênicas mínimas contendo promotor, região codante do gene e terminador. Adicionalmente, estudos comparando os padrões de integração e os níveis de expressão dos transgenes em plantas produzidas tanto com os fragmentos lineares como com o plasmídeo total estão planejados.

LITERATURA CITADA

- ARTELT P., GRANNEMANN R., STOCKING C., FRIEL J., BARTSCH J., HAUSER H. (1991) the prokaryotic neomycin-resistance encoding gene acts as a transcriptional silencer in eukaryotic cells. *Gene*. 99:249-254.
- CLUSTER P., FORD T., KOFRON M. (1991) Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio?technology* 9: 957-962.
- 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 Sinica* 18; 659 – 668.
- FU X.D., DUC L.T., FONTANA S., BONG B.B., TINJUANGJUN P., SUDHAKAR D. TWYMAN R.M., CHRISTOU P., KOHLI A. 2000. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generates low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Res.* 9:11-19.
- JEFFERSON R.A., KAVANAGH T.A., BEVAN M.W. (1987) GUS fusions: b-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- KOHLI A., GRIFFITHS S., PALACIOS N., TWYMAN R.M., VAIN P., LAURIE D.A. CHRISTOU P. (1999). Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV5S promoter and confirms the predominance of microhomology-mediated recombination. *Plant J.* 17: 591-601.
- KONONOV M.E., BASSUMER B., GELVIN S.B. (1997) Integration of T-DNA binary vector "backbone" sequences into the tobacco genome: Evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J.* 11: 945-957.
- LINDEN R.M., WINOCOUR E., BERNS K.I. (1996) the recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 7966-7972.

LOC N.T., TINJUANGJUN P., GATEHOUSE A.M.R., CHRISTOU P., GATEHOUSE J.A. 2002. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate transgenic rice plants which accumulate higher levels of proteins conferring insect resistance. *Mol. Breeding* 9(4):231-244.

MULLER A.E., KAMISUGI Y., GRUNEBERG R., NIEDENHOF I., HOROLD R.J., MEYER P. (1999) Palindromic sequences and A+T-rich DNA elements promote illegitimate recombination in *Nicotiana tabacum*. *J. Mol. Biol.* 291: 29-46.

RAMANATHAN V., VELUTHAMBI K. (1996) transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTIA6 from the left terminus T-L-DNA. *Plant Mol. Biol.* 28: 1149-1154.

TINGAY S., MCELROY D., KALLA R., FIEG S., WANG M., THOMAS S., BRETTELL R. (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.* 11: 1369-1376.

ZHAO Y., YU Y.C., QIAN Q., YAN M.X., HUANG D.N. 2003. Cotransformation of rice by bar and cecropin B gene expression cassettes lacking vector backbone sequences. *Yi Chuan Xue Bao.* 30(2):135-41.

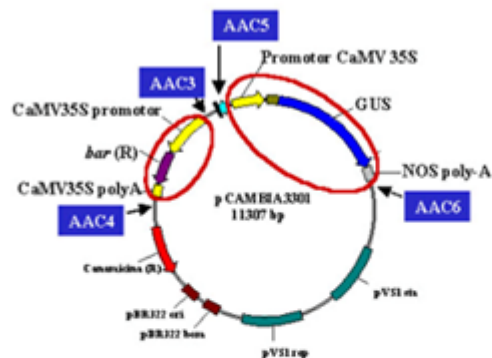


Figura 1: Vetor Completo para Transformação Genética de Plantas. AAC3, 4, 5 e 6: localização dos primers para amplificação das construções lineares. Circulos vermelhos: cassetes mínimos que foram utilizados nas transformações de milho. Canamicina (R): gene para *E. coli* necessário durante os processos de clonagem do gene de interesse; pBR322 ori: origem de replicação bacteriana; pVSI1rep: responsável pelo aumento do número de cópias do vetor em *Agrobacterium*; pVSI1sta: responsável pela estabilidade do vetor em *Agrobacterium*.

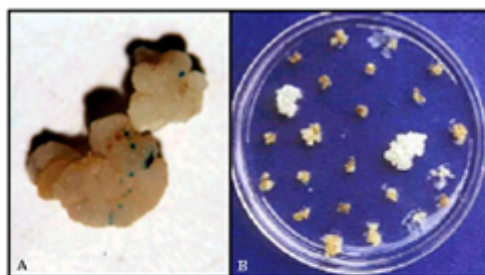


Figura 2: Expressão dos Cassetes Mínimos. (A) CaMV35S+uidA+NOS; (B) CaMV35S+bar+CaMV35S.



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C
