



XXX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global"

Transformação genética de milho utilizando o gene *AtDREB2A* visando tolerância à seca

Paloma Alessandra Alves⁽¹⁾; Raquel Oliveira Moreira⁽²⁾; Beatriz de Almeida Barros⁽³⁾; Meire de Cássia Alves⁽³⁾; Paulo Cesar Magalhaes⁽⁴⁾; Andrea Almeida Carneiro⁽⁴⁾; Newton Portilho Carneiro⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Estudante de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas, MG; palomaalexandraalves@hotmail.com; ⁽²⁾ Estudante de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas; ⁽³⁾ Analista de pesquisa e desenvolvimento, Embrapa Milho e Sorgo; ⁽⁴⁾ Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO: Milho (*Zea mays* ssp. *Mays* L) é um produto de grande importância econômica e social. Esta cultura é afetada por vários fatores bióticos e abióticos. Mudanças climáticas podem levar à baixa produção de grãos e estima-se que pelo menos 20% dos campos de milho no Brasil sejam afetados pela seca, o que pode levar a perdas de, aproximadamente, 4 milhões de toneladas de grãos. A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) em parceria com o laboratório de estresses abióticos do Jircas (*Japan International Research Center for Agriculture Science*), empresa de pesquisa vinculada ao governo japonês, vem desenvolvendo um projeto para o desenvolvimento de cultivares contendo construções gênicas com o gene *AtDREB2A* visando tolerância à seca. Esse gene codifica uma proteína em resposta à desidratação celular, uma defesa da planta contra danos causados pela perda de água. Para determinar o efeito de sua expressão em milho, o gene *AtDREB2A* foi clonado em um vetor binário sob o controle do promotor da ubiquitina e utilizado para transformar o genótipo de milho Hill via *Agrobacterium tumefaciens*. As plantas transgênicas geradas foram transferidas para casa de vegetação e a expressão do gene *AtDREB2A* foi verificada por meio de PCR em tempo real e análises fisiológicas. As plantas de milho transgênicas apresentaram uma maior estabilidade e produção de grãos sob estresse de seca em casa de vegetação.

Termos de indexação: *Zea mays*, déficit hídrico, transgênico.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o milho é considerado a terceira maior cultura do mundo, tanto pelo seu valor nutricional quanto por seu valor econômico. Alterações climáticas como a seca acarretam danos na produção desse cereal, uma vez que o déficit hídrico faz com que o intervalo de emergência do

pendão até o aparecimento dos estigmas aumente de três a quatro dias e desenvolvam-se espigas estéreis ou com poucos grãos. Por meio da seleção e transferência de genes expressos sob condição de estresse hídrico em linhagens de milho tolerantes, pode-se obter respostas favoráveis que minimizam os efeitos da seca. A busca por mecanismos que tornem cultivares mais tolerantes à seca e, conseqüentemente, aumente a produção de grãos em áreas com restrição hídrica, é uma alternativa que vem sendo adotada via biotecnologia com organismos geneticamente modificados. Recentemente, 12 eventos expressando o gene *AtDREB2A* foram gerados na EMBRAPA Milho e Sorgo. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão do gene *AtDREB2A*, as respostas fisiológicas dessas plantas ao déficit hídrico.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em duas casas de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo (19°28' S, 44°15'08" W, 732 m de altitude), e o material vegetal consistiu de eventos de milho transformados com o gene *AtDREB2A* para tolerância à seca. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos com capacidade de 20 litros, contendo Latossolo Vermelho Distrófico Típico. O teor de água no solo foi monitorado diariamente entre 09:00 e 15:00 h, com auxílio de sensores de umidade modelo GB Reader N1535 (Measurement Engineering, Austrália) instalados no centro de cada parcela, com auxílio de um trado de rosca, a uma profundidade de 20 cm. Esses sensores detectam a tensão de água no solo com base na resistência elétrica acoplados a medidores digitais. A reposição hídrica através de irrigação foi realizada com base nas leituras obtidas com o sensor e a água repostada até a capacidade de campo, durante o período que antecedeu a imposição dos tratamentos. Os

cálculos de reposição de água foram realizados com o auxílio de uma planilha eletrônica, feita em função da curva de retenção de água do solo. Ao atingir o estágio de pré-florescimento, três vasos de cada tratamento foram submetidos ao déficit hídrico (DH); e dois vasos foram continuamente recebendo irrigação diariamente, a fim de manter a umidade do solo próxima à capacidade de campo (tensão de água no solo de -18 kPa). A exposição ao DH foi realizada pelo fornecimento diário de 50% da água total disponível até a tensão de água no solo atingir, no mínimo, -138 kPa. O estresse foi mantido até a colheita do material. Os parâmetros avaliados foram níveis de clorofila utilizando o equipamento modelo SPAD (SPAD-502-PLUS) (**Figura 1**), fluorescência da clorofila utilizando o equipamento PEA (Hansatech Instruments, King's Lynn) (**Figura 2**), condutância estomática utilizando o aparelho Porometro (modelo LI-1600) (**Figura 3**), número de grãos, peso de grãos (**Figura 4**) e peso de espigas sem os grãos (**Figura 5**). Durante a exposição ao estresse hídrico a expressão do gene *AtDREB2A* foi monitorada por PCR em tempo real. O RNA foi extraído de uma fração da folha mais distal à planta, utilizando o kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) e o cDNA foi sintetizado a partir de 1,0 μ g de RNA total com o auxílio High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) seguindo as recomendações do fabricante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estresse hídrico influencia diretamente na fotossíntese. Segundo Liu et al. (2012), uma das primeiras respostas à seca é o fechamento dos estômatos e a diminuição da taxa fotossintética, devido à diminuição da captura de CO_2 . Dessa forma ocorre uma queda na concentração de clorofila nas folhas. Observando a Figura 1, pode-se observar que os eventos transgênicos estressados apresentaram queda menor na concentração de clorofila em relação ao evento Hill estressado, apresentando leituras SPAD em torno de 35-42.

Uma maneira de se avaliar a atividade do processo fotossintético é por meio da medição da fluorescência da clorofila. Esta técnica avalia a eficiência fotoquímica do fotossistema II (Martins, 2012). Não houve diferença significativa entre a avaliação da fluorescência da clorofila entre os eventos transgênicos estressados e o evento Hill (**Figura 2**).

A avaliação da condutância estomática (**Figura 3**) mostrou quedas significativas nos eventos estressados em relação aos não estressados. Sendo a condutância estomática o mecanismo de regulação de entrada e saída de CO_2 e água nas folhas (Martins, 2010), observa-se que quanto menor a quantidade de água nas folhas, menor será a condutância. Os eventos T5 e T36 apresentaram queda abrupta na condutância. O evento Hill

também apresentou queda abrupta, em relação aos eventos transgênicos, mostrando-se mais sensível ao estresse hídrico.

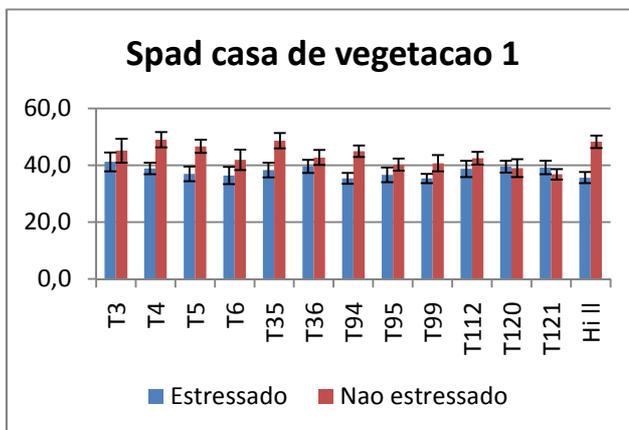


Figura 1. Concentração de clorofila de 12 eventos transgênicos comparados com a planta não transgênica (Hi-II); média de 16 medidas; barras indicam desvio padrão.

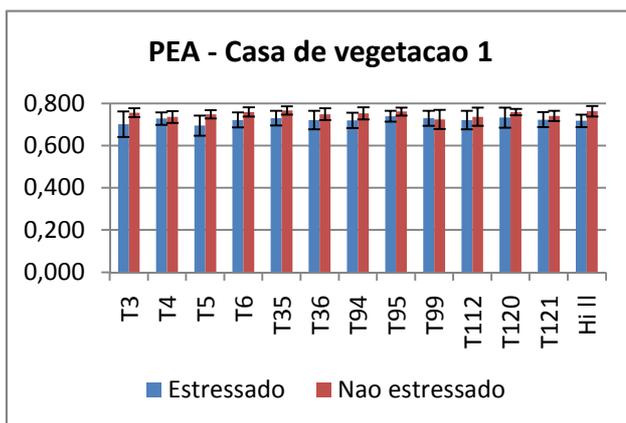


Figura 2. Fluorescência da clorofila utilizando o equipamento PEA de 12 eventos transgênicos comparados com a planta não transgênica (Hi-II); média de 16 medidas; barras indicam desvio padrão.

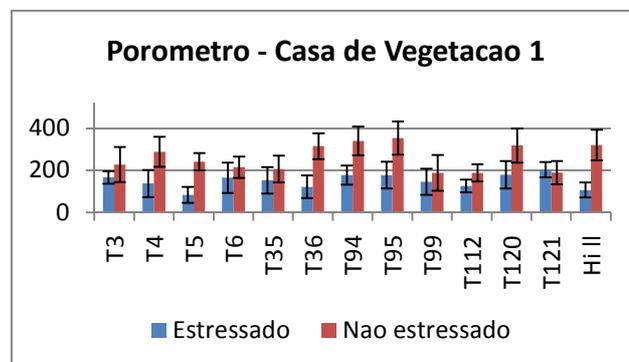


Figura 3. Condutância estomática utilizando o Porometro de 12 eventos transgênicos comparados com a planta não transgênica (Hi-II); média de 16 medidas; barras indicam desvio padrão.

O comprometimento da chegada de CO₂ aos sítios de catalisação da Rubisco via fechamento estomático, e também do processo fotoquímico e bioquímico leva a diminuição da atividade fotossintética, e conseqüentemente à diminuição da produção de fotoassimilados e grãos (Martins, 2012). Isto leva a diminuição de mais de 50% da produção de grãos de milho, o que pode ser observado na Figura 4, na qual todos os eventos estressados apresentaram menos de 50 grãos, alguns com a produção próxima a zero. Embora os eventos transgênicos tenham apresentado baixa produção, tanto com e sem estresse hídrico, o evento que se mostrou mais sensível ao estresse foi o Hill, passando de ≈ 350 grãos para quase 0.

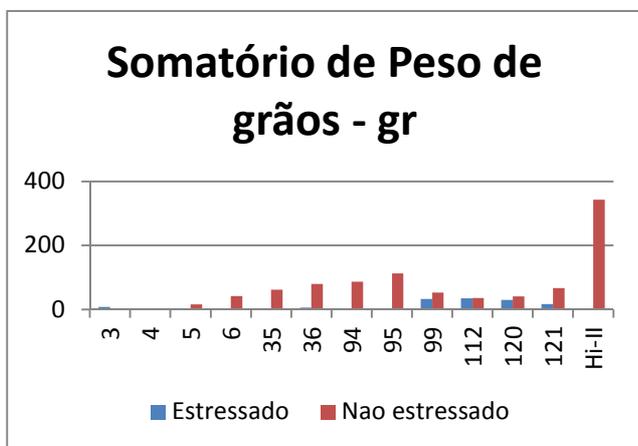


Figura 4. Somatório de peso de grãos em gramas de 12 eventos transgênicos comparados com a planta não transgênica; média de 12 medidas; barras indicam desvio padrão.

Os eventos transgênicos estressados 6, 35, 36, 94 e 95 foram os que tiveram maior queda no peso das espigas em relação às plantas não estressadas (Figura 5). O evento Hill estressado novamente se mostrou mais sensível ao estresse hídrico, apresentando peso de espiga próximo a zero.



Figura 5. Somatório de peso de espiga em gramas (sem grãos) de 12 eventos transgênicos comparados com a planta não transgênica; média de 12 medidas; local do experimento casa de vegetação 1; barras indicam desvio padrão.

Análise de expressão do gene *AtDREB2A* em plantas transgênicas de milho

A expressão do gene DREB só foi verificada nas plantas transgênicas. Não houve diferenças na expressão do gene na planta 36 que apresenta o promotor Zm, induzido pelo estresse.

A análise foi feita com plantas transformadas com o plasmídeo p7U (eventos 3, 4, 5, 6, 35 e 36) e pBRACT (eventos 94, 95, 99, 112, 120, 121) (Figura 6) com dois dias de estresse.

A expressão do gene se mostrou mais alta nos eventos transformados com o plasmídeo pBRACT.

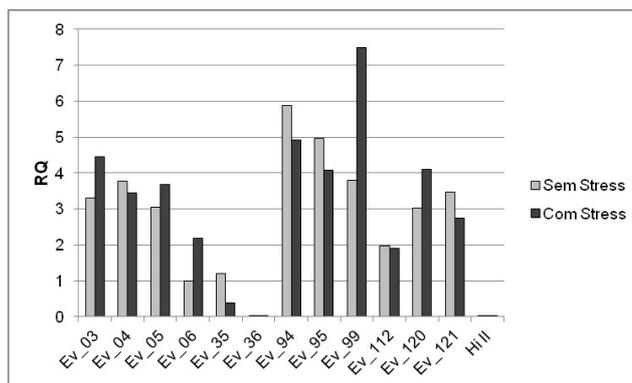


Figura 6. Expressão do gene *AtDREB2A* em diferentes eventos transgênicos comparados com o controle Hill.

Análise de expressão do gene *AtDREB2A* em eventos *ZmRAB17:DREB2A* em plantas de milho – todos os tempos

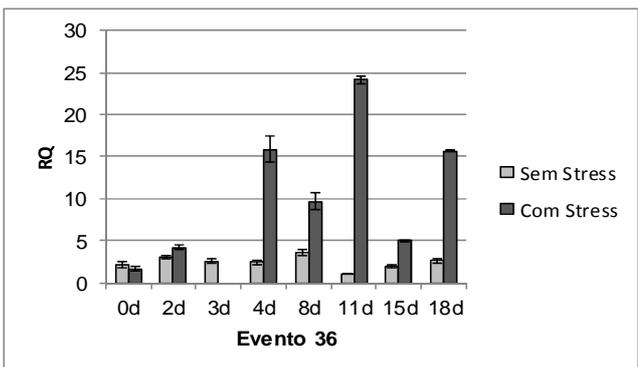


Figura 8. Níveis de expressão do evento 36 nos tempos de 0, 2, 3, 4, 8, 11, 15 e 18 dias de estresse. O evento 36 tem a construção p7U Zm:DREB.

CONCLUSÕES

A partir de janeiro de 2012 foi dada uma grande ênfase à transformação por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando o plasmídeo p7U contendo tanto o promotor Ubiquitina como o promotor Zm

(demonstrado em trabalhos publicados ser induzido pelo estresse de seca). Foram realizados 62 transformações com a construção contendo o promotor Ubiquitina e o promotor Zm. A troca pelo plasmídeo p7U foi feita devido a dificuldade de obtenção de eventos utilizando o plasmídeo pBRAC1. Esse plasmídeo tem um defeito no gene de seleção bar. Apesar de um grande número de experimentos terem sido feitos com o p7U tanto contendo o promotor Ubiquitina como o promotor Zm, foram muito poucos com a Ubiquitina que chegaram na fase de plantas. Não temos formulado uma explicação do porque que eventos contendo o promotor Ubiquitina tiveram tão poucos eventos utilizando o plasmídeo p7U.

O estresse aplicado nas plantas em casa de vegetação corresponde a uma queda em média de 50% da produção de linhagens elites tolerantes ao estresse. Assumiu-se que seria possível verificar resultados satisfatórios aplicando um estresse de mesma intensidade nas plantas contendo o gene *AtDREB2A*. Os resultados apresentados na casa de vegetação tiveram uma demonstração evidente que as plantas submetidas ao estresse tiveram uma queda de produção, tanto à nível de produção como matéria seca foliar, contudo fica inconclusivo se a intensidade de estresse seria a mais adequada para esse caso. Espera-se que com esse primeiro levantamento seja possíveis de escolher eventos com expressão do gene *AtDREB2A* de moderada para alta dos eventos transgênicos para a uma nova fase de multiplicação de sementes e mais um experimento em casa de vegetação. No primeiro experimento em casa de vegetação parece que houve um pequeno efeito de posição de vasos. Vasos que estavam localizados na região esquerda da casa de vegetação sentiram mais o estresse hídrico dos que os localizados na região direita, apesar de uso de sensores de umidade no solo.

Pela análise de expressão, eventos tanto de pBRAC1:DREB como p7U:DREB com o promotor da Ubiquitina mostraram alta expressão do gene *AtDREB2A*. O segundo experimento foi feito em outra casa de vegetação e foi tentado evitar os erros cometidos na primeira casa, trazendo resultados mais confiáveis. Algumas plantas com expressão do gene DREB mostraram resultados de clorofila, condutância estomática, produção e peso seca superior ao apresentado pelo controle negativo, indicando que realmente o gene *AtDREB2A* pode estar trazendo algum benefício quando a planta é exposta ao estresse hídrico sob as condições impostas. Ficou bastante evidente também, principalmente no segundo experimento em casa de vegetação, que o promotor Zm aumenta a expressão do gene quando a planta é submetida à seca. Nos experimentos com tambores, foi feita uma terceira tentativa de validar comparativamente melhor os eventos transgênicos em relação ao controle. Hoje se tem bons candidatos de milho

expressando o gene *AtDREB2A* com esse comportamento, com a possibilidade da multiplicação de sementes e sua demonstração no campo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG, JIRCAS, Embrapa e CNPq que promovem atividades de fomento, apoio e incentivo a pesquisas científicas e tecnológicas em Minas Gerais, possibilitando a realização do estudo por meio do fornecimento de auxílio financeiro, e à Embrapa Milho e Sorgo pela concessão de bolsa de estudo durante o período de realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

LIU, M.; QI, H.; ZHANG, Z. P.; SONG, Z. W.; KOU, T. J.; ZHANG, W. J.; YU, J. L. Response of photosynthesis and chlorophyll fluorescence to drought stress in two maize cultivars. **African Journal of Agricultural Research**, v.7, n. 34, p. 4751-4760, 2012.

MARTINS, A. O. **Interferências genético-fisiológicas da tolerância à seca em milho**. 2012. 140f. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Gotacazes.

MARTINS, J. D. **Modificações morfofisiológicas em plantas de milho submetidas a déficit hídrico**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.



XXX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global"