



**Universidade de Brasília
Instituto de ciências Biológicas
Programa de Pós- graduação em Botânica**

**Silenciamento mediado por RNA interferente do gene *sbe1* que
codifica para a Enzima de Ramificação do Amido I (SBE I) em
Milho (*Zea mays* L.)**

Thaís de Moura Cipriano

**Brasília-DF
2008**

SILENCIAMENTO MEDIADO POR RNA INTERFERENTE DO GENE
SBE1 QUE CODIFICA PARA A ENZIMA DE RAMIFICAÇÃO DO
AMIDO I (SBE I) EM MILHO (*Zea mays* L.)

Dissertação apresentada ao
Departamento de Botânica, do
Programa de Pós-graduação em
Botânica, da Universidade de
Brasília, como parte dos
requisitos necessários à
obtenção do título de MESTRE
EM BOTÂNICA.

Thaís de Moura Cipriano

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão

**Brasília-DF
2008**

SILENCIAMENTO MEDIADO POR RNA INTERFERENTE DO GENE
SBE1 QUE CODIFICA PARA A ENZIMA DE RAMIFICAÇÃO DO
AMIDO I (SBE I) EM MILHO (*Zea mays* L.)

THAÍS DE MOURA CIPRIANO

Banca Examinadora

Dr. Francisco José Lima Aragão
Presidente da Banca Examinadora - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Dalva Graciano Ribeiro
Membro Interno - Universidade de Brasília (UnB)

Dra. Kenny Bonfim
Membro Externo - Ministério da Saúde

Ao meu filho Luís Eduardo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha querida mãe, que sempre me incentivou em todas as escolhas, por estar sempre ao meu lado e por ser meu grande exemplo de luta, carinho, vitória e esperança.

Ao meu marido Helvécio pelo amor, dedicação e companheirismo. A ele também por ter me proporcionado o maior presente da minha vida: o meu “pequeno príncipe” Luís Eduardo.

Agradeço ao meu filho por me trazer uma felicidade indescritível e por se ele a razão de todos os meus esforços.

Aos meus amados irmãos Thiago e Patrícia pelo amor incondicional, apoio e amizade.

A minha avó, meu avô e tios que estiveram sempre presentes no meu dia-a-dia.

Ao meu orientador Dr. Francisco Aragão pelos grandes ensinamentos, paciência, disponibilidade, dedicação e incentivo.

Ao meu primeiro orientador, Dr. Elíbio Leopoldo Rech, por me colocar em contato com a Engenharia Genética e por me incentivar na busca pelo conhecimento.

Aos pesquisadores da Embrapa milho e sorgo (CNPMS), Dra. Andréa Carneiro e Dr. Newton Carneiro, e também ao pesquisador do Cenargen Dr. Luís Joaquim Castelo Branco de Carvalho pelas valiosas colaborações para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Giovanni e ao Nicolau pela amizade, ensinamentos e sugestões ao longo da realização deste trabalho.

A minha amiga Angélica pela amizade e companheirismo.

A Elsa pela amizade e por estar sempre me incentivando.

Aos meus amigos do Laboratório: Luís, Warley, Maria Laine, Cris, Alexandre, Sharon, Aline, Bárbara, Luisa, Andréia, Betúlia, Aisy, Gustavo, Emanuel, Sérgio, Gabriela, Fernanda, Érica, Dani, Cristiano, Nayche, Cristina, Paula, Kenny e Wel pelas conversas e momentos de descontração.

A querida D. Isabel pelo apoio com as vidrarias.

Aos meus colegas de mestrado Davi, Zanderluce e Giselle pelo companheirismo.

As Dra. Dalva e Dra Natália pelas sugestões que enriqueceram meu trabalho.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos.

A todos do Departamento de Botânica que estiveram dispostos a me ajudar.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela disponibilização das instalações físicas e equipamentos.

ÍNDICE DE ASSUNTOS

BANCA EXAMINADORA	i
DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS	iii
ÍNDICE DE ASSUNTOS	v
ÍNDICE DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A cultura do milho	1
1.2. Importância econômica	4
1.3. Metabolismo do amido	6
1.4. Transformação genética de plantas	11
1.5. Transformação genética do milho	16
1.6. Regeneração de calos de milho	18
1.7. Silenciamento de genes mediado por RNA interferente (RNAi)	19
1.8. Direcionamento da expressão do gene para o endosperma	22
2. OBJETIVOS	24

3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Esterilização de sementes e preparo do material vegetal	26
3.2. Estabelecimento das culturas embriogênicas	27
3.3. Precipitação de DNA sobre as micropartículas	30
3.4. Bombardeamento	30
3.5. Construção do vetor para silenciamento	32
3.6. Teste da proteína PAT	36
3.7. Reação da Polimerase em cadeia (PCR)	36
3.8. Análise por <i>Western blot</i>	37
3.9. Extração de açúcar livre (Glicose)	38
3.10. Quantificação da Glicose	38
3.11. Análise de progênie	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Construção do vetor para transformação e silenciamento do gene <i>sbe1</i>	40
4.2. Obtenção de plantas de milho geneticamente modificadas	43
4.3. Avaliação de fenótipo de linhagens geneticamente modificadas	47
4.4. Análise fenotípica das sementes	49
4.5. Reação de polimerase em cadeia - PCR	51
4.6. Análise por <i>Western blot</i>	52
4.7. Quantificação da Glicose	54
4.8. Linhagem 3 X Não-transgênica	55
4.9. Análise de segregação do transgene na progênie	57

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
7. ANEXO I	74
Soluções e Reagentes	74
8. ANEXO II	78
Detalhamento do cassete de interferência do gene pPKZmBE	78
9. ANEXO III	79
Trabalho apresentado em congresso	80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Composição dos meios de cultivo para transformação de milho Hi-II	29
Tabela 2	Seqüência de oligonucleotídeos utilizados para análise de PCR	37
Tabela 3	Análise da segregação da progênie	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema representativo da biossíntese de amido de milho	8
Figura 2	Mecanismo de silenciamento gênico mediado por RNAi	22
Figura 3	Estratégia para a construção do vetor pPKZmBE	35
Figura 4	Região codificante do gene <i>sbe1</i>	41
Figura 5	Vetor pPKZmBE para silenciamento do gene <i>sbe1</i>	42
Figura 6	Calos de milho em meio de seleção	43
Figura 7	Diferenciação de calos de milho <i>in vitro</i> até a formação da planta	46
Figura 8	Teste para detecção da proteína PAT	47
Figura 9	Plantas transgênicas de milho apresentando crescimento anormal	49
Figura 10	Comparação fenotípica entre sementes de milho	50
Figura 11	PCR de plantas de milho	51
Figura 12	<i>Western blot</i> realizado de folhas, endospermas e embriões	53
Figura 13	Quantificação de glicose em sementes de milho	54
Figura 14	Quantificação de glicose entre sementes da linhagem 3	55
Figura 15	Quantificação de amido entre sementes de milho	56
Figura 16	Quantificação de glicogênio entre sementes de milho	57

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

cDNA	- DNA complementar
°C	- graus Celsius
DNA	- ácido desoxirribonucléico
dNTP	- desoxinucleotídeos trifosfatos
T-DNA	- DNA de transferência
DTT	- ditioneitol
dsRNA	- RNA de dupla fita
NaCl	- cloreto de sódio
NaOH	- hidróxido de sódio
USA.	- Estados Unidos da América
M	- molar
pb	- pares de bases
p/v	- peso por volume
kb	- quilo base (1.000 bases)
RNA	- ácido ribonucléico
x g	- força gravitacional
rpm	- rotação por minuto
μ	- micro (10^{-6})
n	- nano (10^{-9})
U	- unidades de enzima

Ω	- ohms (unidade de resistência elétrica)
μF	- micro Faraday
kV	- quilo Volts
~	- aproximadamente
mL	- mililitros

RESUMO

O milho é uma cultura de grande importância econômica mundial. O amido contido em seus grãos é altamente utilizado na nutrição humana, animal e na indústria. O amido é composto de dois tipos de polímeros de glicose estruturalmente diferentes, a amilose constituída por cadeia linear, conectadas por ligações glicosílicas α -1,4 e a amilopectina com cadeia ramificada conectadas por ligações glicosílicas α -1,4 e por pontos de ramificação α -1,6. A enzima de ramificação do amido (*Starch-Branching Enzyme* - SBE) catalisa a formação de ligações glicosílicas α -1,6, formando a estrutura da amilopectina. Em milho foram identificadas três isoformas da enzima de ramificação, a SBE I, SBE IIa e SBE IIb. O objetivo principal deste trabalho foi estudar o efeito do silenciamento do gene *sbe1* que codifica para a enzima de ramificação do amido I (SBE I) em milho e monitorar as possíveis alterações na ausência da expressão do gene no amido da semente. Para o silenciamento do gene *sbe1* foi construído um vetor de RNA interferente, que contém o gene *bar* como marcador de seleção. O plasmídeo foi utilizado na transformação genética de calos embriogênicos de milho via biobalística. Trinta plantas de milho geneticamente modificadas (R₀) foram geradas e caracterizadas. A ausência do gene *sbe1* alterou o fenótipo dos grãos de milho produzidos pelas plantas transgênicas deixando-os enrugados. A análise protéica demonstrou que houve o silenciamento parcial do gene *sbe1* no endosperma transgênico. As sementes de milho geneticamente modificadas demonstraram aumento da quantidade de glicose.

ABSTRACT

Maize is a very important world-wide economic crop. The starch contained in its grains is highly used in human nutrition, animal feeding and fuel industry. Starch is composed of two types of structurally different glucose polymers: amylose, constituted by linear chain, hardwired for glucosidic linkage α -1,4; and amylopectin with glucosidic linkage α -1,4 and branchpoints α -1,6 ramified chains. The starch branching enzyme (SBE) catalyzes the formation of glucosidic linkage α -1,6, conferring the amylopectin final structure. Three isoforms of the starch branching enzyme have been identified in maize: SBE I, SBE IIa and SBE IIb. The main objective of this work was to study the effect of starch branching enzyme I gene (*sbe1*) silencing and to monitor the possible alterations in the absence of the expression of the gene in the seeds. For inactivation of *sbe1* gene a RNA interfering vector containing the selection marker *bar* gene was constructed. The vector was used to transform embryonic *calli* of maize via biobalistic method. Thirty maize transgenic lines (R0) were generated and characterized. The *sbe1* silencing contributed to modify grains phenotype, resulting in wrinkled seeds in transgenic plants. The analysis of protein accumulation levels in different transgenic tissues demonstrated that SBE I was found in lower levels in transgenic endosperm when compared to the same tissue in non-transgenic plants, suggesting that target gene inactivation was carried out partial and efficiently in endosperm cells. In an analogous way seed glucose content was increased in most of transgenic maize lines.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta herbácea e de acordo com a classificação botânica e pertencente à ordem *Gramineae*, família *Poaceae*, sub-família *panicoideae*, tribo *maydeae*, gênero *Zea* e espécie *mays*. Agronomicamente o milho é caracterizado como cereal. Devido à sua característica de alta adaptabilidade a diversos ambientes, o milho é o cereal mais cultivado em termos de número de países, cerca de setenta, o que totaliza mais de 100 milhões de hectares de área plantada em todo o mundo.

O centro de origem do milho cultivado ainda é bastante discutido por pesquisadores e historiadores. Alguns pesquisadores acreditam que o milho originou-se na América Central, possivelmente no México, uma vez que os registros mais antigos de amostras de milho foram encontrados na Cidade do México (Laborda, 2003). É uma das culturas mais antigas do mundo, havendo provas, através de escavações arqueológicas e geológicas, e através de medições por desintegração radioativa, de que é cultivado há pelo menos 5.000 anos. Logo depois do descobrimento da América, o milho foi levado para a Europa, onde era cultivado em jardins, até que seu valor alimentício tornou-se conhecido. Passou então, a ser plantado em escala comercial e espalhou-se desde a União Soviética até a Argentina (Godoy, 2002).

Recentemente, análises de grânulos de amido têm sido utilizadas pela arqueobotânica como um meio significativo para distinguir sementes de teosinte e de milho. Essa metodologia poderá contribuir para a definição da área geográfica de origem. O critério utilizado é a diferença de tamanho e morfologia, servindo assim para investigar o estágio de desenvolvimento e a dispersão dos fósseis encontrados na América Central e na América do Sul. (Holst *et al.*, 2007).

A duração do ciclo fenológico do milho para a produção de grãos varia de 120 a 180 dias (CNPMS, 2006). É uma planta monocotiledônea, com raiz do tipo fasciculada e caule do tipo colmo. O fruto é do tipo cariopse, onde a parede da semente (testa) encontra-se fundida com a parede do fruto, o pericarpo. A semente é composta por dois órgãos: o endosperma e o embrião (Lazzerri & Shewry, 1993). Esses órgãos são produzidos por meio de um processo de dupla fertilização, mecanismo exclusivo de plantas superiores (Russell, 1992). A fusão de um núcleo espermático com a célula-ovo origina o zigoto que resulta no embrião. Ao mesmo tempo, uma segunda célula espermática funde-se com uma célula binucleada central que resulta na origem do endosperma de natureza triploide. Em seguida, esse núcleo sofre múltiplas divisões, resultando na formação de um sincício contendo centenas de núcleos (Olsen, 2004).

O início do surgimento das paredes celulares do endosperma dá-se no terceiro dia após a polinização (DAP), completando-se no quinto DAP, quando o tecido torna-se completamente celularizado e uninucleado. O período de crescimento mais intenso do endosperma ocorre de 8 a 13 DAP, com a

ocorrência simultânea de divisões celulares e aumento do volume das células. Com aproximadamente 12 DAP, o endosperma preenche a região central da semente, e neste estágio a camada externa das células, a aleurona, encontra-se completamente diferenciada. As divisões celulares cessam na região central do endosperma, e os núcleos iniciam um processo de duplicação cromossômica sem mitose, que eleva substancialmente o conteúdo de DNA, processo conhecido como endoreduplicação (De Lucca, 2003).

O endosperma de milho constitui a principal fonte de nutrientes para a germinação do embrião. A maioria do carbono utilizado nos estágios iniciais do desenvolvimento deriva-se do amido e de proteínas de reserva. O conjunto destes produtos de reserva compõe aproximadamente 90% do peso seco do endosperma maduro. Na semente madura, o endosperma é diferenciado em dois tecidos: o endosperma amiláceo e a camada de aleurona. As células da região central do endosperma acumulam amido de forma abundante, e as regiões periféricas são mais ricas em proteínas de reserva. No final da maturação da semente, o endosperma amiláceo transforma-se num tecido mole e quebradiço, enquanto que a região protéica torna-se dura e translúcida (Shewry & Casey, 1999).

O cruzamento controlado em plantas de milho facilita a obtenção de inúmeros tipos de híbridos. Tendo isso em vista, existem materiais genéticos que apresentam modelo de desenvolvimento que difere temporal e espacialmente do padrão apresentado acima.

1.2. Importância econômica

Por ser uma das culturas cereais de maior importância econômica no mundo, o milho é uma das espécies vegetais mais estudadas. Programas de melhoramento estão constantemente buscando novos procedimentos para a obtenção de variedades mais produtivas e economicamente rentáveis e, para tanto, muito esforço é feito para o entendimento mais amplo sobre a sua origem e evolução. Informações provindas de diversas áreas, como a arqueologia, a citologia, a história e a biosistemática corroboraram e ainda corroboram para o esclarecimento da longa trajetória evolutiva que levou à constituição do fenótipo da planta de milho como atualmente a conhecemos. Algumas controvérsias que acompanharam o início dos estudos sobre o milho persistem ainda hoje, o que se percebe facilmente se nos reportarmos à questão do parentesco entre milho (*Zea mays* spp. *mays*), teosinte (*Zea mays* spp. *mexicana* ou *Zea mays* ssp. *parviglumis*) e *Tripsacum* (Laborda, 2003).

O seu uso é muito variável e passa (1) pela dieta humana com o consumo direto do grão, ou por meio de vários alimentos industrializados a partir do processamento somente do grão ou de toda a espiga, (2) pela alimentação de animais com os grãos (suínos e aves) e com o caule e as folhas (ruminantes), (3) pela produção de bebidas por meio da fermentação e da destilação; (4) pela obtenção de produtos secundários, como adoçantes, óleos de cozinha e farinha e (5) produção de etanol (combustível). Além da vantagem de utilização de várias partes da planta, seu valor é altamente nutritivo, já que além das fibras, o grão de milho é constituído de carboidratos, proteínas,

vitaminas (complexo B), sais minerais (ferro, fósforo, potássio e cálcio), óleo e grandes quantidades de açúcares, gorduras, celulose e, portanto, calorias.

De acordo com dados da Embrapa Milho e Sorgo (2006), o Brasil é o terceiro maior produtor mundial, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China. A produtividade brasileira tem crescido sistematicamente, passando de 1.874 kg/ha, em 1990, para 3.500 kg/ha no ano de 2006 (IBGE, 2007).

A produção de milho no Brasil, juntamente com a soja, contribui com cerca de 80% da produção de grãos no Brasil. A diferença entre as duas culturas está no fato de que a soja tem liquidez imediata, dada a sua característica de "commodity" no mercado internacional, enquanto que o milho tem sua produção voltada principalmente para o abastecimento interno. Apesar disto, o milho tem evoluído como cultura comercial e a estimativa para a produção nacional de milho em grão em 2007 era de 34.502.677 toneladas, contra 31.465.468 toneladas produzidas no ano de 2006. No entanto, foi observada uma produção de 51.529.365 toneladas, onde houve uma variação de aproximadamente 20,9% de crescimento em relação a 2006 (IBGE, 2008). Um dos fatores relevantes para o aumento da produção e também nos preços do milho no Brasil é o aumento da exportação do cereal para a obtenção de etanol nos Estados Unidos (Tsunechiro & Perez, 2007).

A importância do milho é verificada não apenas na produção de uma cultura anual, mas em todo o relacionamento que essa cultura tem na produção agropecuária brasileira, tanto no que diz respeito a fatores econômicos quanto a fatores sociais. De acordo com a sua versatilidade de uso, pela utilização na produção animal, pelo aspecto social e sua

adaptabilidade de cultivo em diversos ambientes o milho é um dos mais importantes produtos do setor agropecuário no Brasil.

1.3. Metabolismo do amido

O amido é um dos polissacarídeos de armazenamento mais importantes na natureza. A maioria das células vegetais tem a habilidade de sintetizar o amido, porém ele é especialmente abundante em tubérculos, como na batata (*Solanum tuberosum*) e nas sementes, como o milho. A biossíntese de amido em plantas envolve quatro grupos de enzimas, ADPG-pirofosforilase, amido sintase, enzimas de ramificação do amido e enzima de desramificação do amido (Preiss & Sivak, 1996, Smith *et al.* 1997).

O amido é composto de dois tipos de polímeros da glicose estruturalmente diferentes, a amilose e a amilopectina. A amilose é essencialmente um polímero linear de cadeias longas e conectadas por ligações glicosílicas α -1,4, enquanto a amilopectina é um polímero que possui ligações glicosílicas α -1,4, mas possui pontos de ramificação que ocorrem a cada 24 e 30 resíduos, através de ligações α -1,6 (Gao *et al.*, 1996).

As enzimas de ramificação do amido [*Starch Branching Enzymes* (SBE)] são essenciais para sua síntese em células de reserva em sementes (Repellin *et al.*, 1997). Estas enzimas catalisam a formação de ligações α -1,6, o que afeta a estrutura da amilopectina e dos grânulos do amido (Seo *et al.*, 2002). Algumas espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas possuem duas

classes de enzimas de ramificação do amido, a SBE I e a SBE II, que diferem entre si de acordo com a especificidade de seus substratos, modo de ação, distribuição temporal e papel fisiológico (Takeda *et al.*, 1993; Guan & Preiss, 1993; Burton *et al.*, 1995; Nair *et al.*, 1997; Morell *et al.*, 1997).

No milho está presente a SBE I e são observadas duas isoformas da SBE II, a SBE IIa e a SBE IIb, que são similares em muitas propriedades bioquímicas, mas não idênticas e diferem da SBE I cromatograficamente, pela reatividade imunológica e por propriedades cinéticas da enzima (Preiss, 1991). Os genes dessas enzimas também diferem consideravelmente em seus padrões temporais de expressão (Gao *et al.*, 1996). A SBE IIa e a SBE IIb têm similaridade em suas propriedades *in vitro* e alta homologia de suas seqüências de cDNA (Guan & Preiss, 1993; Takeda *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 1996).

Para espécies com múltiplos genes *sbe*, a máxima expressão de genes que codificam para a isoforma SBE I ocorre mais tarde no desenvolvimento do armazenamento e dos tecidos do embrião do que os que codificam para a SBE II. Os genes que codificam para a isoforma SBE I são constitutivamente expressos em baixos níveis em tecidos vegetativos e fortemente expressos durante o desenvolvimento de tecidos de armazenamento e embriões (Gao *et al.*, 1996; Kim & Guiltinam, 1999). A SBE I de folha e a SBE I do endosperma são relacionadas, porém não são idênticas (Dang & Boyer, 1988). A enzima de ramificação do amido encontrada em maiores níveis em folhas é a SBE IIa. Não foi detectada a expressão da SBE IIb em folhas, sugere-se que é específica de endosperma (Gao *et al.*, 1996).

A biossíntese do amido ocorre no interior dos cloroplastos e amiloplastos, onde estão localizadas as enzimas que catalisam a síntese de polímeros, utilizando como material básico a glicose produzida durante o processo de fotossíntese. O esquema representativo simplificado da biossíntese do grânulo de amido de milho, com destaque para as enzimas de ramificação do amido (SBE I, SBE IIa e SBE IIb), pode ser visualizado na figura 1.

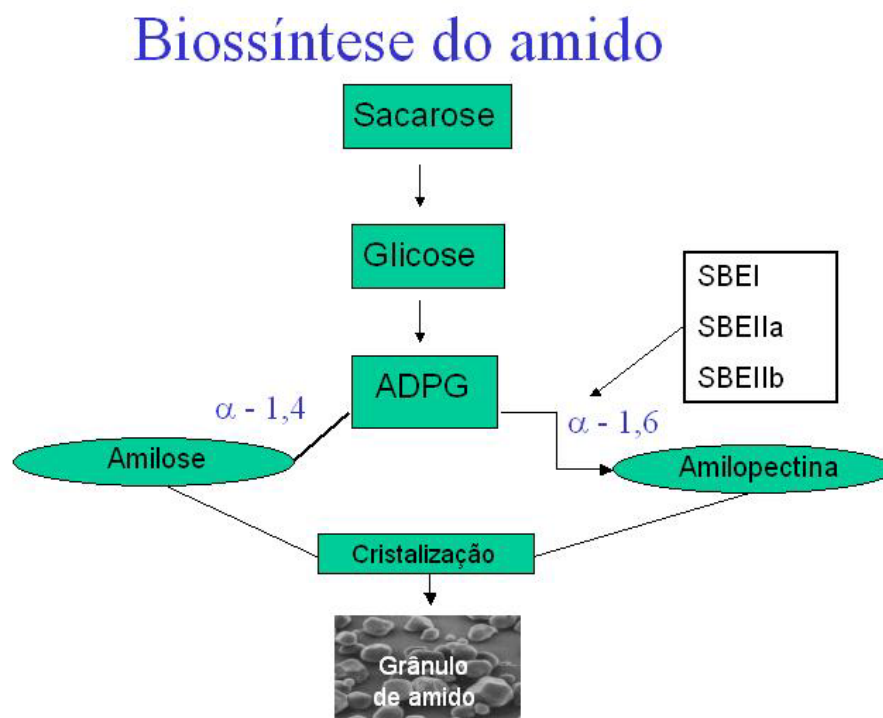


Figura 1- Esquema representativo da biossíntese de amido de milho. A enzima invertase catalisa a reação que converte a sacarose em glicose. A glicose é convertida a adenosina difosfato glicose (ADPG) numa reação catalisada pela adenosina difosfato glicose pirofosforilase (ADPGppase). Reações enzimáticas convertem ADPG em polímeros de glicose (amilose e amilopectina). A amilopectina possui pontos de ramificação (ligações α 1,6) catalisados pelas enzimas SBE I, SBE IIa e SBE IIb. Os polímeros de glicose são cristalizados e formam os grânulos de amido.

Regina *et al* (2006) geraram em trigo um amido com cerca de 70% de amilose, utilizando o método de RNA interferente para silenciar as duas

isoformas da SBE II (SBEIIa e SBEIIb). Eles avaliaram esse novo amido na alimentação de ratos e observaram uma melhoria na função do intestino grosso destes animais. Os resultados indicaram que esse novo trigo contendo amido com maior quantidade de amilose pode ajudar na saúde humana, principalmente no que se refere à diminuição da incidência do câncer do colo-retal, proporcionado pelo maior consumo de fibras. Com a redução da amilopectina e aumento de amilose na estrutura do amido faz com que haja redução da digestão no intestino delgado. A redução da digestão do amido no intestino delgado tem uma potencial diminuição da entrada de glicose na circulação sanguínea e isso reduz a demanda de insulina.

O monge Gregor Mendel, em 1865, realizou cruzamentos entre ervilhas de fenótipo liso com ervilhas de fenótipo rugoso. Nesse estudo chamado de herança monogênica, Mendel descobriu que ervilhas de fenótipo liso eram dominantes em relação a ervilhas de fenótipo rugoso, que eram recessivas, numa proporção de três ervilhas lisas para cada ervilha rugosa. Essa proporção ficou conhecida como segregação Mendeliana 3:1. Já em 1990, mais de um século depois dos estudos de Mendel, foi descoberto que a rugosidade das ervilhas recessivas aconteciam devido a uma mutação gênica que inibiu a expressão da SBEI (Bhattacharyya *et al.*, 1990). Essas sementes além de possuir fenótipo rugoso, tiveram uma alteração na estrutura do amido que consiste em mais amilose e maior teor de glicose.

Um mutante da SBE IIa em milho, o *sbe2a::Mu* tem visível fenótipo de aceleração da senescência foliar quando comparado à uma planta de milho controle. Caracterização do amido foliar demonstra a redução da ramificação

(Blauth *et al.*, 2001). Esse trabalho é importante porque afirma que a SBEIIa não exerce relevante papel na determinação da estrutura do amido do endosperma. Portanto, a SBE IIa foi encontrada em níveis significativos em folha, ao contrário da SBE I, que foi indetectável. Em 2002, Blauth *et al* estudaram um mutante da SBEI em milho, o *sbe1::Mu*, e perceberam que o nível de SBEI foi indetectável no endosperma do mutante. Porém eles não visualizaram diferenças entre o amido de um milho controle e o amido do mutante. Eles atribuem esse fato ao método utilizado, a cromatografia da exclusão segundo o tamanho (SEC) e sugerem novos estudos com o mutante em questão.

Em batata (*Solanum tuberosum*) foi observado que a inibição simultânea da SBEI e da SBEII, por meio de modificação genética, produz um amido com elevada quantidade de amilose e baixo nível de amilopectina. Esse amido tornou-se também mais estável quando submetido ao congelamento e descongelamento o que garante maior qualidade do amido (Schwall *et al.*, 2000).

No Brasil, Carvalho *et al* (2004) descobriram um tipo diferente de mandioca da Amazônia com um novo amido e açúcarada. Análises na composição do monossacarídeo revelaram a existência de um açúcar solúvel em água não presente em cultivares comerciais. Essa mandioca possui um rompimento na via de síntese de amido por enzimas ativas. As análises da estrutura do amido indicaram a falta de transcrição do gene que codifica para as enzimas de ramificação do amido (SBEs).

1.4. Transformação genética de plantas

A transformação genética de plantas pode ser compreendida como a introdução controlada de genes oriundos de diferentes espécies animais, vegetais ou microorganismos, em um genoma vegetal receptor, independentemente da fecundação (Brasileiro, 1998).

Pode-se afirmar que a obtenção de plantas transgênicas apóia-se em três conjuntos amplos de técnicas celulares e moleculares: a tecnologia do DNA recombinante, comumente conhecida como engenharia genética; a morfogênese *in vitro* associada a técnicas de cultura de tecidos vegetais e, por fim, técnicas de introdução de genes.

Segundo Alberts e colaboradores (1994), a tecnologia do DNA recombinante desenvolveu-se pela reunião progressiva de informações decisivas para o entendimento da estrutura e função de ácidos nucléicos e que permitiram a sua manipulação. Essas etapas podem ser enumeradas a partir de 1869, quando Miescher realizou com sucesso o primeiro isolamento de ácidos nucléicos, que ele chamou de nucleína (depois chamado de DNA).

A ação combinada do descobrimento da DNA polimerase por Kornberg em 1957, da renaturação das duas fitas do DNA por Marmur e Doty em 1961, da primeira evidência da existência das endonucleases de restrição do DNA (e sua posterior purificação) proposta por Arder em 1962, da caracterização de seqüências de DNA por Nathans e Smith também em 1962, e, finalmente, do descobrimento da DNA ligase em 1967 por Gellert, permitiu a obtenção dos conceitos e fundamentos que levariam ao desenvolvimento de técnicas de

clonagem de DNA propostas por Berg em 1973, resultando na manipulação controlada da molécula. A detecção de seqüências específicas de DNA através da hibridização de ácidos nucléicos após transferência de gel, técnica desenvolvida por Southern em 1975 e a hibridização de RNA proposta por Alwine em 1977, foram realizações importantes na evolução das técnicas de caracterização de seqüências até então desconhecidas, permitindo inclusive estudos sobre a expressão gênica. Como resultados de todos esses esforços e atrelados à elucidação do código genético em 1966 por Nirenberg, Ochoa e Khorana e pelos métodos rápidos de seqüenciamento de DNA desenvolvidos por Sanger, Barrell, Maxam e Gilbert em 1975-1977, foram atingidos três marcos das conquistas da engenharia genética: a produção de camundongos transgênicos por Palmiter e Brinster em 1981, de moscas-da-fruta transgênicas em 1982 por Spradling e Rubin e o desenvolvimento da técnica de amplificação de fragmentos de DNA pela reação em cadeia da polimerase, em 1984, por Mullins e colaboradores (Alberts *et al.*, 1994).

Em 1983 criou-se a primeira planta geneticamente modificada, quando um gene codificante para a resistência contra o antibiótico canamicina foi introduzido em plantas de tabaco (Hammond *et al.*, 1999). Desde então, muitas proteínas recombinantes têm sido expressas em espécies agronomicamente importantes como milho (Fromm *et al.*, 1990; D'Halluin *et al.*, 1992), tomate (Hamilton *et al.*, 1990), batata (Lawson *et al.*, 1990), canola (Mariani *et al.*, 1992), feijão (Aragão *et al.*, 1996), soja (Aragão *et al.*, 2000) entre outros.

A segunda base de sustentação da transformação genética de plantas é constituída pelo conjunto de técnicas de cultura de tecidos e regeneração de plantas *in vitro*. A morfogênese *in vitro* baseia-se na totipotência das células vegetais e na capacidade de cultivo dessas células em laboratório, mediante a utilização de meios de cultura nutritivos e reguladores de crescimento apropriados para modular a regeneração das plantas. Dois modelos de morfogênese *in vitro* e suas variações são utilizados para a regeneração de plantas visando sua transformação genética: a organogênese e a embriogênese somática.

A organogênese estimula a formação de gemas apicais e posterior indução de enraizamento em estruturas já estabelecidas, sendo que os órgãos regenerados têm origem multicelular e sub-epidérmica. Nesse modelo a regeneração ocorre a partir de grupos celulares meristemáticos do tecido original respondendo positivamente ao estímulo gerado por citocininas (Guerra *et al.*, 1999). O cultivo de embriões com sua região meristemática apical preservada ou simplesmente dos próprios meristemas apicais ou axilares, na presença de citocininas em meio de cultura, foi descrita por Malik & Saxena (1992) como um eficiente indutor de organogênese direta de parte aérea, capaz de regenerar plantas transgênicas sem a necessidade de passagem do tecido por fases intermediárias de desdiferenciação, como por exemplo o estágio de calo.

Já a embriogênese somática rege a formação multiembrionária adventícia de explantes, sendo que os embriões originados possuem eixos vasculares próprios (Sharp *et al.*, 1980), origem histológica unicelular ou de

poucas células e localização superficial, além da indução de regeneração ser eficiente quando da utilização de auxinas (Guerra *et al.*, 1999).

Ambas as formas de regeneração de plantas *in vitro* permitem, a partir dos explantes iniciais, a obtenção contínua de tecidos e material experimental através de culturas cíclicas e, associadas às demais técnicas de cultura de tecidos, possuem aplicações e importância fundamentais em diversas áreas científicas como no melhoramento genético de plantas (Ferreira, 1998), na fitopatologia e na própria transformação genética de plantas.

A terceira premissa para a transformação genética de plantas é a transferência de genes de interesse oriundos de outros organismos para células vegetais potencialmente precursoras de um órgão ou um embrião.

Convencionalmente para a produção de plantas transgênicas essa introdução tem sido feita de três formas: através da infecção dos tecidos-alvo por *Agrobacterium tumefaciens*; pelo bombardeamento dos explantes com micropartículas recobertas com DNA contendo seqüências de genes de interesse e por eletroporação de protoplastos.

A transformação genética por agrobactéria baseia-se na capacidade que a espécie *Agrobacterium tumefaciens* (família Rhizobiaceae) possui em transferir parte de seu DNA do plasmídio Ti (Tumor inducing) para o genoma de células de plantas hospedeiras (Hoekema *et al.*, 1983; Rogers *et al.*, 1986).

O processo de biobalística (Sanford *et al.*, 1987) preconiza a aceleração de microprojéteis (de 0,2 a 4µm de diâmetro) recobertos com seqüências de ácidos nucléicos, a uma velocidade final de 1500km/h, sobre os explantes. Os microprojéteis, de ouro ou tungstênio, penetram de maneira

não-letal a parede celular e a membrana citoplasmática, alojando-se aleatoriamente nas organelas celulares, quando então o DNA é dissociado dos microprojéteis pela ação do líquido celular e segue-se a integração da seqüência contendo os genes de interesse ao genoma vegetal (Aragão & Rech,1998).

Já a eletroporação de protoplastos é um método de transformação genética que consiste no emprego de pulsos elétricos que modificam temporariamente a estrutura da membrana plasmática, induzindo a formação de aberturas semelhantes a poros ao longo de sua superfície aumentando a sua permeabilidade. O uso de campos elétricos pode influenciar sistemas biológicos, aumentando o tamanho de protoplastos o que permite elevar a absorção de íons pelos mesmos e macromoléculas do meio, sendo esse o efeito de mudanças termodinâmicas na membrana.

Tanto a biobalística quanto a eletroporação, são métodos físicos que permitem a extensão de sua aplicação a qualquer tipo de célula, tais como fungo, bactéria, planta ou animal.

Dessa maneira, como resultado da ação integrada entre os três conjuntos de técnicas principais que constituem o processo de transformação genética de plantas, é possível construir vetores plasmidiais contendo genes de interesse, realizar a introdução desses genes em uma célula vegetal, verificar a integração das seqüências exógenas ao genoma da espécie vegetal em questão e expressá-las de maneira estável. Entretanto, para o sucesso do sistema de transformação, é necessário eficiência não só na introdução do

gene de interesse, mas também na seleção e regeneração das células transformadas.

1.5. Transformação genética de milho

As primeiras plantas transgênicas de milho foram obtidas a partir do bombardeamento de células em cultura e por eletroporação de protoplastos (Fromm *et al.*, 1990; D'Halluin *et al.*, 1992) e de embriões zigóticos imaturos (Kozziel *et al.*, 1993). Atualmente, os tecidos mais utilizados na transformação de milho são as culturas de calos embriogênicos geradas de embriões zigóticos imaturos. No entanto, a partir das transformações obtidas em arroz via agrobactéria com o emprego de cepas de bactérias mais virulentas com os plasmídeos super-binários, essa estratégia voltou a ser estudada em cereais (Aldemita *et al.*, 1994).

Os primeiros três produtos comerciais obtidos de semente de milho transgênico foram a avidina, a β -glucoronidase (GUS) (Hood & Jilka, 1999) e a aprotina, que é um inibidor de protease (Zhong *et al.*, 1999). Essas proteínas divergem quanto as suas características físicas e químicas e tipo de organismo de origem: GUS é uma proteína de bactéria, a avidina é uma glicoproteína de aves (proteína encontrada na clara de ovo) e a aprotina é um inibidor de proteases em bovinos. Desde a utilização da engenharia genética, a transferência de genes cuja exploração através de métodos tradicionais de melhoramento são inviáveis, têm sido introduzidos via transformação e mostrado capacidade de conferir resistência a importantes pragas e doenças,

bem como tolerância a herbicidas (Koziel *et al.*, 1993; Murry *et al.*, 1993; Armstrong *et al.*, 1995). Esses trabalhos demonstram a versatilidade das sementes de milho na produção de proteínas heterólogas.

As sementes de milho também possuem um importante papel como biorreatores na produção de biofármacos, além de ser um método de produção economicamente viável, produz a proteína heteróloga de interesse em altos níveis. De Lucca (2003) conseguiu expressar o hormônio de crescimento humano (hGH) e a pró-insulina em plantas transgênicas de milho e concluiu que os hormônios produzidos possuem características iguais a dos hormônios nativos do homem.

Na transformação de plantas comumente têm-se utilizado genes marcadores de seleção. A finalidade do uso do gene marcador de seleção é permitir que apenas as células transformadas cresçam. Um marcador de seleção muito utilizado é gene *bar* que codifica para a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT), que por sua vez, inativa o herbicida fosfinotricina (PPT) ou o análogo glifosinato de amônia (GA) por meio da acetilação do grupo amino livre do herbicida (Thompson *et al.*, 1987). As chances de uma planta regenerada em meio seletivo ser transgênica aumentam bastante uma vez que o gene *bar* confere resistência ao herbicida e auxilia na seleção de possíveis eventos transgênicos.

Entretanto, a produção de plantas geneticamente transformadas depende da integração do gene exógeno na célula alvo e da eficiência de regeneração a partir destas células.

1.6. Regeneração de calos de milho

Nos últimos anos tem crescido o interesse na utilização de culturas embriogênicas de milho visando a produção de plantas geneticamente transformadas. Até o presente, os sistemas mais utilizados para transformação em milho têm sido a cultura de calos embriogênicos, ou mesmo o cultivo direto de embriões imaturos ou pré-cultivados (Armstrong, 1999).

O primeiro trabalho relatando a regeneração de plantas de milho foi realizado por Green & Phillips em 1975, desde então a cultura de tecidos de milho tem tido avanços significativos. Várias linhagens e híbridos adaptados a regiões de clima temperado têm sido utilizados para indução de culturas de calos, porém, a regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos têm sido obtida eficientemente a partir de poucos genótipos, destacando-se a linhagem A188, que apresenta pouco valor agrônômico, mas é muito superior a outras linhagens de milho em sua capacidade para regenerar plantas a partir de calos embriogênicos (Armstrong & Phillips, 1988; Armstrong *et al.*, 1992). Um outro genótipo de milho bastante utilizado para a regeneração de calos é o híbrido Hi-II, resultante do cruzamento entre A188 e B73 (Rudenko & Walbot, 2001). Esse genótipo também foi desenvolvido para condições de clima temperado

1.7. Silenciamento de genes mediado por RNA interferente (RNAi)

Em plantas, o mecanismo de silenciamento pós-transcricional de genes [Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS)], evoluiu provavelmente para regular a expressão anormal de genes (Morel *et al.*, 2000) e proteger as células contra vírus de RNA. O RNA interferente é uma antiga estratégia antiviral naturalmente usada por plantas, larvas e outras espécies inferiores. O silenciamento de genes está associado ao silenciamento mediado por um RNA de dupla fita (dsRNA) e metilação da região codificadora do RNA. O pequeno RNA interferente, ou siRNA, direciona a degradação do RNA mensageiro, que é o material genético que interpreta as instruções do DNA para criar proteínas.

O mecanismo do RNA interferente consiste basicamente em se obter, a partir da transcrição do DNA dupla fita da planta, um dsRNA. Este RNA de dupla fita será reconhecido por um complexo protéico dependente de RNA dupla fita denominado DICER que, então cliva o RNA dupla fita em pequenos fragmentos (de 21 a 23 nucleotídeos). Estes pequenos fragmentos chamados de pequenos RNA de interferência, em inglês *small interference RNA* (siRNA, se associam então a outro complexo enzimático chamado RISC (*RNA-induced silencing complex*) e os direcionam para outras moléculas de RNA complementares, que podem ser fitas simples ou duplas, e quando houver homologia total, clivará também esta fita complementar (em geral um mRNA). Cada novo RNA clivado torna-se, então, um novo pequeno RNA interferente em potencial. Esse mecanismo permite que a interferência de RNA continue

mesmo após todo o RNA dupla fita inicial ter sido degradado. Isso permite que as células da progênie continuem realizando a interferência de RNA que foi iniciada nas células parentais (Figura 2). E pode também ser espalhada de célula para célula pela transferência de fragmentos de RNA de célula para célula, o que permite a uma planta inteira tornar-se resistente a um vírus de RNA, ou silenciar determinado gene endógeno, mesmo quando algumas de suas células foram transfectadas (Alberts *et al.*, 2004).

Em *Arabidopsis thaliana*, essa técnica foi utilizada para promover a perda de função dos genes AGAMOUS, CLAVATA 3, APETALA 1 e PERIANTHIA, o que demonstrou a eficácia do processo de silenciar genes específicos (Chuang & Meyerowitz, 2000).

Os pequenos RNA de interferência são considerados por cientistas como técnica de ouro para estudar a função dos genes. Existe muita expectativa para o desenvolvimento de novos medicamentos alvo-específico e mais poderosos para a saúde humana. A combinação de silenciamento do gene e imunostimulação em uma molécula de RNA poderão trazer a cura para algumas viroses e até mesmo para o câncer (Schlee *et al.*, 2006).

Cientistas japoneses selecionaram seqüências específicas do RNA mensageiro com instruções para a produção de uma enzima, a CaMXMT1 e a utilizaram para construir o gene de um RNA interferente com o objetivo de gerar uma planta de café (*Coffea canephora*) com redução da cafeína por meio do silenciamento da enzima teobromina sintase. Esse gene foi transferido para a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. As plantas

transgênicas foram analisadas e tinham um teor de cafeína de 50 a 70% menor que o da planta convencional (Ogita *et al.*, 2003).

Recentemente no Laboratório de Transferência de Genes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram obtidas plantas de feijão resistentes ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro BGMV (*Bean golden mosaic virus*) por meio do silenciamento via RNAi do gene viral AC1. O vírus é transmitido pela mosca-branca *Bemisia tabaci*. A virose causa diversos danos à cultura do feijoeiro na América Latina, sendo as perdas da ordem de 40 a 100%. Das 18 plantas obtidas, cada uma delas foi submetida a 300 moscas virulíferas durante o ciclo de vida e 93% dessas ficaram livres de sintomas da doença (Bonfim *et al.*, 2007).

No mesmo laboratório, foram obtidas plantas de soja com silenciamento total ou parcial do gene *mipsGm* (*mio-inositol-1-fosfato sintase de soja*) por RNAi com a finalidade de redução do fitato que é um fator antinutricional, porém mostrou-se que a expressão do gene *mipsGM* é fundamental para o desenvolvimento da semente (Nunes *et al.*, 2006).

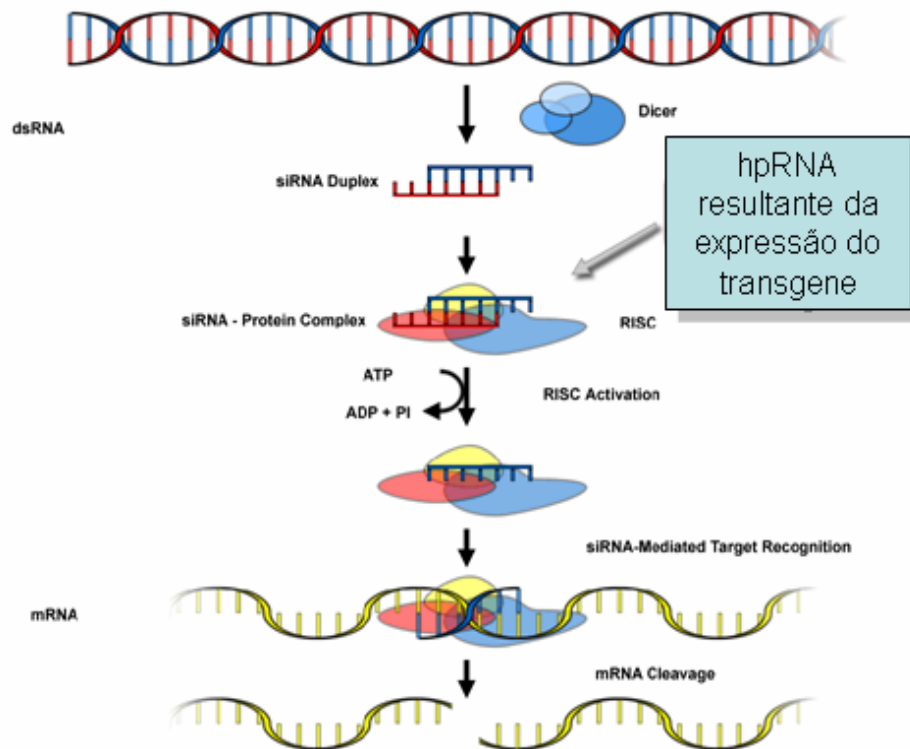


Figura 2. Mecanismo de silenciamento gênico mediado por RNA interferente (RNAi). Dupla fita de RNA (dsRNA) clivada em pequenos fragmentos (siRNAs) pelo complexo DICER. O siRNAs se associam ao complexo RISC, quando há homologia este também clivará a fita complementar. Cada novo RNA clivado torna-se um novo pequeno RNA interferente em potencial.

1.8. Direcionamento da expressão do gene para o endosperma

O promotor é responsável pela regulação, pela ativação ou inibição, da expressão, sendo capaz de responder a diversos estímulos, controlando o nível de expressão do gene em função da natureza do tecido e seu estágio de desenvolvimento. Comumente o gene de interesse é incluído em um cassete de expressão precedido por um promotor (região 5') que pode ser constitutivo ou tecido-específico por uma região 3'UTR contendo um sítio de

poliadenilação. Uma boa escolha do promotor é fundamental para o sucesso da expressão heteróloga de genes.

As folhas não constituem órgãos adequados para o armazenamento de proteínas recombinantes, pois seus tecidos apresentam grande quantidade de água e alta atividade hidrolítica, resultando em baixa estabilidade da proteína produzida. Já as sementes possuem tecidos especializados, capazes de armazenar proteínas de maneira eficiente por longos períodos (Leite, 2001).

Os genes que codificam proteínas de reserva de sementes representam excelente fonte de promotores específicos de sementes. O promotor do gene da γ -Kafirina (PGK) de sorgo promove expressão específica em endosperma de sementes (Freitas *et al.*, 1994).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar a expressão e o efeito do silenciamento do gene *sbe1* que codifica para a enzima de ramificação do amido SBE I (*starch-branching enzyme I*) em milho, por meio da análise morfológica e molecular das sementes geneticamente modificadas com silenciamento específico do gene *sbe1*.

Objetivos Específicos

1. Isolar e clonar uma região da seqüência codificante do gene *sbe1*, que codifica para a enzima SBE I do milho.
2. Construir um vetor para silenciamento do gene *sbe1* em milho utilizando a estratégia do RNA interferente (RNAi).
3. Caracterizar a expressão do gene *sbe1* durante o desenvolvimento da planta de milho transgênica.

4. Obter linhagens de milho transgênico silenciando o gene *sbe1* que codifica para a enzima SBE I.

5. Realizar análises moleculares e bioquímicas dos eventos de transformação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Esterilização de sementes e preparo do material vegetal

Espigas de milho híbrido Hi-II, com 12 DAP foram despalhadas, lavadas superficialmente com etanol 70% e colocadas dentro de um béquer em imersão com hipoclorito de sódio comercial (água sanitária 2%) durante 30 minutos. Em seguida foram lavadas três vezes em água destilada estéril, e deixadas em água até o momento da retirada dos embriões. As espigas podem ficar submersas em água destilada por até 4 horas.

O plaqueamento de embriões foi realizado utilizando-se apenas utensílios estéreis. Uma pinça foi inserida na base da espiga para facilitar o manuseio. A espiga foi apoiada sobre uma placa de Petri e com o auxílio de uma lâmina de Bisturi foi cortada uma camada de 1 a 2 mm das pontas de algumas fileiras de grãos para exposição do endosperma e também facilitar a retirada dos embriões. Os embriões encontram-se alojados na base dos grãos, em direção à ponta da espiga. Os embriões são retirados com o auxílio de uma espátula de ponta fina e no momento da retirada foram plaqueados em meio de iniciação de calos (IC) em placas de Petri 100 x 15 mm, com o eixo embrionário em contato com o meio de cultura.

3.2. Estabelecimento das culturas embriogênicas

As placas contendo embriões zigóticos em meio IC foram incubadas em câmara de crescimento no escuro. Após 15 dias de cultura, foram isolados calos embriogênicos dos explantes que responderam à morfogênese *in vitro* por meio do estímulo com o hormônio 2,4-D. Este material foi repicado em intervalos quinzenais e em até no máximo cinco vezes. O material foi mantido na ausência de luz e com temperatura entre 26 e 28°C. Na preparação das placas para o bombardeamento, os calos embriogênicos que visualmente apresentaram estágio de embrióides, foram dispostos verticalmente em meio osmótico para o bombardeamento (OSM). Cerca de 50 embriões são colocados por placa de bombardeamento.

Inicialmente foram realizados dois experimentos de bombardeamento, um com 500 e outro com 2000 calos, totalizando 2500 calos friáveis bombardeados. Após oito horas do bombardeamento, as culturas foram transferidas para meio de seleção (SE) com adição de 6,0 mg/L de glufosinato de amônia (GA), onde permaneceram em condições de escuro por 15 dias. Calos resistentes à seleção inicial foram transferidos para meio de seleção (SE), este com adição de 9,0 mg/L de GA. Durante a seleção os calos possivelmente selecionados cresceram e apresentaram aspecto brilhante e translúcido, diferenciando-se dos não-selecionados que escureceram até morrer.

O material resistente à seleção no escuro foi transferido para o meio de maturação (RM), onde permanecem por cerca de 20 dias. Após o amadurecimento os embriões foram transferidos para o meio de germinação de calos. No meio de germinação (GE), as plantas ficam na presença de luz a 25 °C com fotoperíodo de 16h por cerca de um mês. Os diferentes meios de cultura utilizados durante a transformação genética, via biobalística do milho Hi-II, podem ser verificados na tabela 1.

As plantas obtidas foram transferidas para solo em copos descartáveis e com cobertura plástica para casa de vegetação quando atingiram entre 5 e 8 cm de altura. No mesmo dia da aclimatação de possíveis linhagens transgênicas, foram plantadas sementes de milho não-transgênicos para que houvesse a produção de pólen para a fecundação de plantas transgênicas. Após uma semana de crescimento, as plantas foram transferidas para vasos de 5 litros de capacidade. As plantas que atingiram o estágio V3 de crescimento (Ritchie *et al*, 1996), isso é, com aproximadamente seis folhas cada, foram transferidas para vasos maiores, desta vez, com 20 litros de capacidade, onde permaneceram até serem submetidas a diferentes análises.

Tabela 1. Composição dos meios de cultivo utilizados para transformação genética do milho Hi-II via biobalística.

Reagentes	Iniciação de Calos IC 1L	Meio osmótico OSM 1L	Meio de Seleção SE 1L	Meio de Maturação RM 1L	Meio de Germinação GE 1L
N6 sais (Chu <i>et al.</i> , 1975)	3,98 g	3,98 g	3,98 g	0	0
N6 vitaminas	10 mL	10 mL	10 mL	0	0
MS sais (Murashige & Skoog, 1962)	0	0	0	4.3 g	4,3 g
MS vitaminas	0	0	0	1 mL	1 mL
2,4 D	2 mL	2 mL	2 mL	0	0
Myo-Inositol	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg
Prolina	2,76g	0,69 g	0	0	0
Caseína hidrolisada	100 mg	100 mg	0	0	0
Sacarose	30 g	60 g	30 g	60 g	30 g
Ph	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
Phytigel	2,5 g	2,5	2,5	2,5	2,5
Esterilização	Autoclavar 121°C/24min/ 1 atm	Autoclavar 121°C/24min/ 1 atm	Autoclavar 121°C/24min/ 1 atm	Autoclavar 121°C/24min/ 1 atm	Autoclavar 121°C/24min/ 1 atm
Acrescentar após autoclavar*					
Nitrato de prata	25 µM	25 µM	5 µM	0	0
Glufosinato de amônia	0	0	6 ou 9 mg	6mg	3mg

* Nos meios de cultura acima descritos, foram utilizados o nitrato de prata e o glufosinato de amônia filtrados em filtro de 0,45 µm. Os reagentes foram adicionados aos meios de cultura logo após a autoclavagem.

3.3. Precipitação de DNA sobre as micropartículas

A etapa de bombardeamento dos calos foi realizada no Laboratório de Transformação Genética de Milho na Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), em Sete Lagoas, MG.

Os calos embriogênicos foram colocados no centro de placas de 60 x 15 mm, em meio OSM, aproximadamente 4 horas antes do bombardeamento. Cada precipitação é suficiente para 6 tiros. Para cada precipitação, uma alíquota de 50 µl de suspensão de micropartículas de tungstênio de 1mm de Ø (60µg/µL de glicerol) foi transferida para tubo de microcentrífuga em agitação constante em vórtex. Em seguida adicionou-se 1 µl de DNA plasmidial (estoque 5 µg/µl). Logo após adicionou-se 50 µl de CaCl₂ 2,5 M e 20 µl de espermidina 0,1 M. O tubo ficou em temperatura ambiente sob constante agitação por 3 minutos e em seguida sem agitação por mais 3 minutos. Centrifugou-se o material por 5 segundos a 5.000 rpm. O DNA foi lavado com 150 µl de etanol 70% por duas vezes. Adicionou-se 60 µl de etanol absoluto para ressuspender o precipitado. Foram utilizados 7 µl de DNA precipitado para cada bombardeamento.

3.4. Bombardeamento

O bombardeamento de calos embriogênicos com o vetor pPKZmBE foi conduzido como previamente descrito por Aragão *et al.* (1996) e por

Rech *et al.* (2008). Inicialmente empregou-se um acelerador de micropartículas, que utiliza gás hélio sob alta pressão. Para tanto, é necessário adotar alguns parâmetros físicos: umidade relativa do ar no laboratório em até 50%, distância de 8 mm entre a câmara de gás de alta pressão (gerador de onda de choque) e a membrana carreadora contendo as micropartículas cobertas com DNA, 13 mm de distância entre a membrana carreadora e a tela de retenção, 80 mm de distância entre a tela e o material a ser bombardeado, 27 polegadas de Hg de pressão de vácuo, 900 psi de pressão de gás hélio.

O bombardeamento utilizando as micropartículas de DNA foi realizado da seguinte forma:

- Abriu-se a válvula de saída do gás hélio e ajustou-se a pressão do regulador para 900 psi;
- Imergiram-se quatro membranas de ruptura em isopropanol e estas foram imersas na câmara de alta pressão de gás hélio. Apertou-se o parafuso de vedação. Inverteu-se a câmara de alta pressão, encaixando-a na câmara de vácuo;
- Posicionou-se a placa com o material a ser bombardeado;
- A tela de retenção e o suporte da membrana carreadora, já contendo o DNA, foram posicionados no cilindro de suporte. Cuidadosamente fechou-se a câmara de vácuo;
- Abriu-se a válvula de entrada de vácuo e depois a válvula de entrada de gás hélio para a câmara de alta pressão;

- Quando a pressão de vácuo atingiu 27 polegadas de Hg, fechou-se a válvula de entrada de vácuo. Aguardou-se de 2 a 3 segundos e liberou-se a onda de choque através do disparador que ativa a válvula solenóide;
- Abriu-se a válvula de saída do vácuo e depois a válvula de saída do resíduo do gás hélio da câmara de alta pressão;
- Abriu-se a câmara de vácuo e retirou-se o material bombardeado;
- Descartaram-se as membranas carreadoras e retirou-se a tela de retenção utilizada;
- Repetiu-se o processo com a mesma placa e em seguida repetiu-se o processo com as demais amostras;
- Para terminar, fechou-se a válvula de saída do cilindro de gás hélio e retirou-se o gás remanescente da mangueira. Desligou-se a bomba de vácuo e o disparador.

Após esse procedimento os calos embriogênicos foram transferidos para meio de indução de calos (IC).

3.5. Construção do vetor para silenciamento

O RNA total de sementes imaturas de milho, em diferentes estágios de desenvolvimento, foi isolado para a amplificação e clonagem de um fragmento do gene *sbe1*, seguindo o protocolo do kit de extração Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen, USA) a partir de 250 mg de semente

(Huang *et al.*, 2000). O mRNA total foi utilizado para construção do cDNA utilizando a enzima Superscript III (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

A reação de RT-PCR foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Researcher) em 25 µL de solução contendo 40 ng do cDNA sintetizado a partir de mRNA de semente de milho, 60 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 250 nM de cada dNTP; 200 nM de cada *primer* e 5 U da enzima taq DNA polymerase Platinum High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A mistura foi desnaturada a 94 °C (2 min) e submetida a 34 ciclos de amplificação (94°C por 30 s, 55 °C por 1 min, 68 °C por 3 min) com um ciclo final de 10 min a 68 °C.

Os *primers* BEBAMZ (5'CGGATCCTGTACTGACTGGCATGTCAGACTTG-3') [no qual foi adicionado um sítio de *Bam* HI (sublinhado)] e BEHINDZm (5'CAAGCTTATCCACGTCGTGGCCAAC-3') [no qual foi adicionado um sítio de *Hind* III (sublinhado)] foram utilizados para amplificar uma região de 524 pb da seqüência codificante do gene *sbe1* (chamada de BEf - *forward*). Os *primers* BEXHONCOZm (5'GCTCGAGCCATGGTGTAAACTGGCATGTCAGACTTG-3') [no qual foi adicionado um sítio de *Xho* I (sublinhado) e um sítio de *Nco*I (em negrito)] e BEKPNZm (5'GCTCGAGCCATGGTGTAAACTGGCATGTCAGACTTG-3') [no qual foi adicionado um sítio de *Kpn*I (sublinhado)] foram utilizados para amplificar uma seqüência de 530 pb da região codificante do gene *sbe1* (chamada BEr - *reverse*).

Após a reação de RT-PCR, duas amostras foram aplicadas no gel de agarose 1% (Anexo I) e submetidas à eletroforese por 1 hora a 100V. Após a

eletroforese os fragmentos correspondentes a 530 pb (amostra 1) e 524 pb (amostra 2) foram extraídos do gel utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN).

Em seguida, realizou-se a clonagem, separadamente, dos dois fragmentos correspondentes às regiões codificantes do gene *sbe1* no vetor de clonagem pGEM T-Easy (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Esses vetores iniciais foram amplificados e purificados utilizando-se o kit Flexi prep (Pharmacia Biotech), e seqüenciados utilizando-se os *primers* universais M13 e T7 em seqüenciador automático (ABI Prism1 3700, Foster City, CA, USA). As seqüências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank (The National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Tigr (Institute for Genomic Research; <http://www.tigr.org>). Para a checagem do fragmento do gene *sbe1* do milho foi utilizada a seqüência do gene que codifica para a enzima SBEI do milho encontrada no GenBank (número de acesso AY176762).

Os dois fragmentos que correspondem a duas regiões codificantes do gene *sbe1* foram retirados do vetor pGEM T-Easy a partir da restrição com as respectivas enzimas (*Bam* HI / *Hind* III e *Xho* I / *Kpn* I). Os dois fragmentos foram clonados no vetor pKannibal (GenBank AJ311873), separados pelo íntron do gene da piruvato ortofosfato diquinase (*pdk*) de *Flaveria trinervia*, gerando o cassete de silenciamento do gene *sbe1* chamado de pKANBE. Logo após, o cassete de interferência foi retirado do vetor pKannibal com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Nco* I e em seguida foi clonado no vetor pPK103 (Leite *et al*, 2000), gerando um vetor RNA interferente (pPKZmBE).

Esse vetor contém o promotor do gene da proteína de reserva de sorgo pGK (γ -Kafirina), as duas regiões codificantes do gene *sbe1* (BEr e BEf), o íntron pdk e terminador 35St (Anexo II) . O último passo foi ligar ao vetor de silenciamento do gene *sbe1*, um cassete para expressão do gene *bar*, que consiste no promotor 35SCaMV, na região codificante do *bar* e do terminador 35St (Murakami *et al.*, 1986). O gene *bar* foi retirado do vetor PUCbar nos sítios de *Eco* RI e posteriormente foi realizada a ligação ao vetor RNAi também no sítio *Eco* RI (Figura 3).

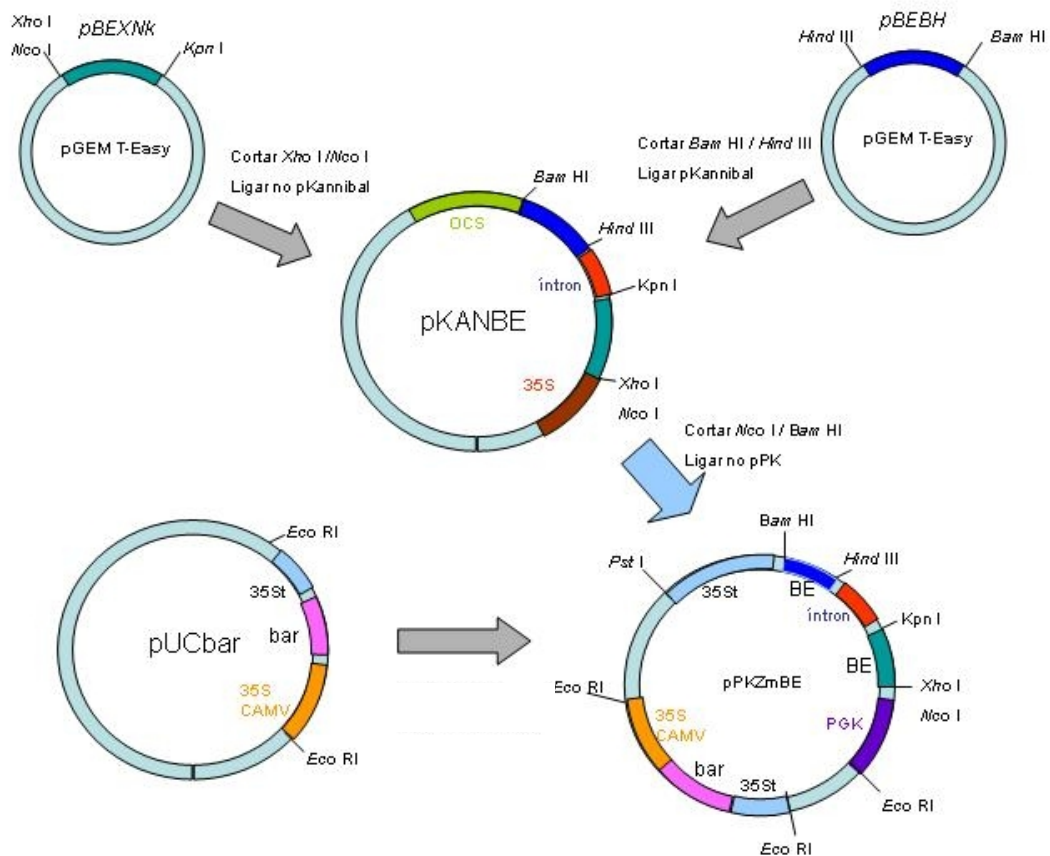


Figura 3. Estratégia para a construção do vetor pPKZmBE.

3.6. Teste da proteína PAT

Um disco foliar de cada planta de milho transformada foi macerado com bastão de vidro em tubo de microcentrífuga. Adicionou-se ao extrato vegetal 200 μ l de tampão PBS 1X. Em seguida uma tira do Kit de Testes para Milho Trait LL (Strategic Diagnostics Inc., USA) foi inserida no tubo de microcentrífuga, com a seta indicativa voltada para baixo. A tira ficou em contato com o extrato até o aparecimento dos resultados (cerca de 5 minutos).

3.7. Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Para análise de PCR dos eventos potencialmente positivos para PAT, o DNA das plantas selecionadas foi isolado de discos foliares de acordo com metodologia de Doyle & Doyle (1987), utilizando-se CTAB 2X (CTAB 2%p/v, 100 mM Tris pH 8,0; 20 mM EDTA 0,2 M pH 8,0; 1,4M NaCl, 1%PVP-40). Cada reação de PCR foi realizada em volume de 25 μ L, contendo 10mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 160 μ M de cada dNTP, 200nM de cada *primer*, 2U de *Taq* polimerase (GIBCO BRL) e cerca de 20ng de DNA genômico. A mistura foi coberta com óleo mineral e desnaturada por 5 minutos a 95°C em um termociclador (MJ thermal cycler, EUA), e amplificada por 35 ciclos (95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) com um ciclo final de 7 minutos a 72°C. A reação foi aplicada em gel de agarose 1% e

visualizada em luz UV por coloração por brometo de etídio. Foram utilizados 4 oligonucleotídeos (*primers*) para verificar a amplificação do gene *sbe1* nas plantas obtidas (Tabela 2).

Tabela 2: Seqüência de oligonucleotídeos utilizados como *primers* para análise de PCR.

Primer	Seqüência 5' → 3'	Orientação
BEBAMZm	CGGATCCTGTACTGTCAGACTTG	Antisenso
BEHINDZm	CAAGCTTATCCACGTCGTGGCCAAC	Senso
BEXHONCOZm	GCTCGAGCCATGGTGTAAACTGGCATGTCA	Antisenso
BEKPNZm	GCTCGAGCCATGGTGTAAACTGGCATGTCA	Senso

3.8. Análise por *Western blot*

Os extratos protéicos totais de folhas, embriões e endosperma de plantas com 20DAP foram isolados e quantificados de acordo com o protocolo descrito no Manual de Transformação Genética de Plantas (Marcellino & Grossi de Sá, 1998). Foram aplicados 10 µg de extrato protéico de cada amostra por poço no gel. Os extratos foram separados por eletroforese em dois géis de poliácridamida (SDS-PAGE, gel concentrador 5% e gel separador 15%), isso é, um gel para cada anticorpo. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond). Em seguida as membranas foram incubadas a 4°C em solução de bloqueio [leite em pó (5%), TBS (1X) e tween 20 (0,1%)] durante à noite. No dia seguinte as membranas foram incubadas com solução de bloqueio contendo o anticorpo primário. Uma membrana foi incubada com o anticorpo anti-SBEI e a outra com o anticorpo anti-SBEII, ambos em diluição de 1:1000. Após lavagem com PBS 1X (Na₂HPO₄ 10 mM,

KH₂PO₄ 1,7mM, NaCl 140mM e KCl 2,7mM) os *blots* foram incubados em solução anti-soro e foram revelados utilizando-se 10mL do tampão de revelação (200µL de NaCl 5M; 1mL Tris 3M pH 9.5 e 50µL MgCl₂ 1M) acrescidos dos substratos cromogênicos para fosfatase alcalina NBT 50mg/mL (*Nitro blue tetrazolium* em dimetil formamida 70%) e BCIP 25mg/mL (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato).

3.9. Extração de açúcar livre (Glicose)

Sementes de quatro linhagens positivas e de uma linhagem controle negativo foram maceradas em N₂ líquido até obter-se um pó fino. Uma porção de aproximadamente 200mg de cada semente foi diluída em 600µL de etanol 85% em H₂O milli-Q. Foram realizadas três lavagens (12.000 rpm, 4 °C, 40 min). O sobrenadante das três lavagens foram misturados em um mesmo tubo e em seguida foram evaporados em N₂ gasoso até ficar um volume de cerca de 100 µL. Todas as amostras foram ressuspensas em 1 mL de água milli-Q. Essas amostras foram em seguida submetidas à quantificação da glicose.

O precipitado que resta no *ependorf* foi centrifugado (12.000 rpm, 4 °C, 40 min) com 400 mL de H₂O milli-Q, por duas vezes. O polímero solúvel em água, o glicogênio foi liberado e ficou no sobrenadante. O sobrenadante de cada amostra foi em seguida liofilizado e posteriormente foi ressuspensado em 1 mL de água milli-Q. Essas amostras foram digeridas com o reagente de digestão do amido (Kit Starch Assay /Sigma) para a liberação da glicose de

acordo com as instruções do fabricante. A glicose dessas amostras também foi submetida à quantificação da glicose.

Após a centrifugação com água, resta um precipitado, que é o amido não solúvel em água. Esse precipitado foi seco em liofilizador e em seguida foi solubilizado em água numa proporção de 50 mg de amido/10 mL de H₂O milli-Q. A solubilização ocorreu por uma hora em água fervente. Em seguida foi separada uma alíquota de 1 mL que foi digerida com o reagente de digestão do amido (Kit Starch Assay /Sigma) para a liberação da glicose. Prosseguiu-se a quantificação da glicose.

3.10. Quantificação da Glicose

A quantidade de glicose foi estimada por meio da reação enzimática da glicose oxidase peroxidase adaptado de Fox & Robyt (1991), com pequenas modificações. A curva padrão foi preparada com glicose (Kit de Glicose Katal Biotecnologia) numa concentração de 1-50 mg/L para linearidade. Para cada amostra foram realizadas três repetições

3.11. Análise de progênie

A progênie das plantas geneticamente modificadas (R₁) foram analisadas para a presença do transgene através da análise de suas folhas por PCR e pela presença da PAT seguindo protocolo descrito anteriormente. As análises de segregação foram realizadas através do teste do qui-quadrado

(χ^2) para determinação de padrões de segregação Mendelianos. Quando necessário foi feita a correção de Yates (Steel & Torrie, 1980) para determinar se a proporção da segregação observada foi coerente com a razão mendeliana.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Construção do vetor para transformação e silenciamento do gene *sbe1*

Foram obtidas duas seqüências complementares, senso e anti-senso, referentes ao gene *sbe1* do milho a partir da utilização dos *primers* previamente desenhados. A primeira seqüência possui 524 pb e foi obtida a partir da utilização dos *primers* BEBAMZm e BEHINDZm criados com os sítios de *Bam* HI e de *Hind* III, respectivamente. A outra seqüência do gene *sbe1* possui 530 pb e nesse caso foram utilizados os *primers* BEXHONCOZm e BEKPNZm que possuem os sítios de *Xho* I e *Kpn* I. O seqüenciamento mostrou que essas seqüências possuem 100% de similaridade com a seqüência do gene *sbe1* (figura 4) depositada no GenBank (acesso AY176762). A partir dessas seqüências foi realizada a clonagem dos dois fragmentos do gene *sbe1* (*BEf* e *BEr*), separadamente, no vetor pGEM T-Easy

O cassette para silenciamento do gene ZmSBEI (*BEf*-intronpdk-*BEr*) foi gerado no vetor pKANNIBAL e transferido para o vetor pPK103 nos sítios de *Nco* I e *Bam* HI. O sítio de *Nco* I foi incluído no *primer* para amplificação do fragmento *BEf*. O cassette contendo o gene *bar* (35S-*bar*-T35S) foi removido do vetor pUCBar com *Eco* RI e ligado no sítio de *Eco* RI do pPK103. O vetor

RNA interferente para silenciamento do gene *sbe1* que codifica para a enzima de ramificação do amido SBE I foi identificado como pPKZmBE e possui 7340 pb (figura 5).

```

ATGCTGTGCCTCGTGTGCGCCCTCTTCCTCGCCGACTCCGCTTCCGCGCCGCGCGGCGCTCTCGC
TCGCATGCTGATCGGGCGGCACCGCCGGGGATCGCGGGTGGCGGCAATGTGCGCCTGAGTGTG
TTGTCTGTCCAGTGCAAGGCTCGCCGGTCAAGGGTGCAGGGTGCAGGGTCAAGAGCAAATTCGCCACT
GCAGCTACTGTGCAAGAAGATAAAAATATGGCAACTGCCAAAGGCGATGTCGACCATCTCCCC
ATATACGACCTGGACCCCAAGCTGGAGATATTCAAGGACCATTTTCAGGTACCGGATGAAAAGA
TTCCTAGAGCAGAAAGGATCAATTGAAGAAAATGAGGGAAAGTCTTGAATCTTTTTCTAAAGGC
TATTTGAAATTTGGGATTAATACAAATGAGGATGGAAGTGTATATCGTGAATGGGCACCTGCT
GCGCAGGAGGCAGAGCTTATTGGTGACTTCAATGACTGGAATGGTGCAAACCATAAGATGGAG
AAGGATAAATTTGGTGTGGTGGTGCATCAAATGACCATGTCAAAGGGAAACCTGCCATCCCT
CACAAATCCAAGGTTAAATTTGCTTTCTACATGGTGGAGTATGGGTTGATCGTATTCCAGCA
TTGATTCGTTATGCGACTGTTGATGCCTCTAAATTTGGAGCTCCCTATGATGGTGTTCATTGG
GATCCTCCTGCTTCTGAAAGGTACACATTTAAGCATCCTCGGCCTTCAAAGCCTGCTGCTCCA
CGTATCTATGAAGCCCATGTAGGTATGAGTGGTGAAAAGCCAGCAGTAAGCACATATAGGGAA
TTTGCAGACAATGTGTTGCCACGCATACGAGCAAATAACTACAACACAGTTCAGTTGATGGCA
GTTATGGAGCATTGCTACTATGCTTCTTTCCGGTACCATGTGACAAATTTCTTTGCGGTTAGC
AGCAGATCAGGCACACCAGAGGACCTCAAATATCTTGTGATAAGGCACACAGTTTGGGTTTG
CGAGTTCTGATGGATGTTGTCCATAGCCATGCAAGTAATAATGTCACAGATGGTTTAAATGGC
TATGATGTTGGACAAAGCACCCAAGAGTCTATTTTCATGCGGGAGATAGAGGTTATCATAAA
CTTTGGGATAGTCGGCTGTTCAACTATGCTAACTGGGAGGTATTAAGGTTTCTTCTTTCTAAC
CTGAGATATTGGTTGGATGAATTCATGTTTGTATGGCTTCCGATTTGATGGAGTTACATCAATG
CTGTATCATCACCATGGTATCAATGTGGGGTTTACTGGAAACTACCAGGAATATTTTCAGTTTG
GACACAGCTGTGGATGCAGTTGTTTACATGATGCTTGCAAACCATTTAATGCACAAACTCTTG
CCAGAAGCAACTGTTGTTGCTGAAGATGTTTCAGGCATGCCGGTCTTTGCCGCCAGTTGAT
GAAGGTGGGGTTGGGTTTACTATCGCCTGGCAATGGCTATCCCTGATAGATGGATTGACTAC
CTGAAGAATAAAGATGACTCTGAGTGGTGCATGGGTGAAATAGCGCATACTTTGACTAACAGG
AGATATACTGAAAAATGCATCGCATATGCTGAGAGCCATGATCAGTCTATTGTTGGCGACAAA
ACTATTGCATTTCTCCTGATGGACAAGGAAATGTACACTGGCATGTCAGACTTGCAGCCTGCT
TCACCTACAATTGATCGAGGGATTGCACTCCAAAAGATGATTCAC TTCATCACAAATGGCCCTT
GGAGGTGATGGCTACTTGAATTTTATGGGAAATGAGTTTGGTCACCCAGAATGGATTGACTTT
CCAAGAGAAGGGAACAACCTGGAGCTATGATAAATGCAGACGACAGTGGAGCCTTGTGGACACT
GATCACTTGCGGTACAAGTACATGAATGCGTTTGGACCAAGCGATGAATGCGCTCGATGAGAGA
TTTTCTTCTTTTTCGTCGTCAAAGCAGATCGTCAGCGACATGAACGATGAGGAAAAGGTTATT
GTCTTTGAACGTGAAAGATTTAGTTTTTGTGTTTTCAATTTCCATCCCAAGAAAAC TTACGAGGGC
TACAAAGTGGGATGCGATTTGCTGGGAAATACAGAGTAGCCCTGGACTCTGATGCTCTGGTC
TTCGGTGGACATGGAAGAGTTGGCCACGACGTGGATCACTTCACGTCGCCTGAAGGGGTGCCA
GGGGTCCCCGAAACGAAC TTCAACAACCGGCCGAAC TCGTTCAAAGTCTTTTCTCCGCCCCGC
ACCTGTGTGGCTTATTACCGTGTAGACGAAGCAGGGGCTGGACGACGTCTTCACGCGAAAGCA
GAGACAGGAAAGCGTCTCCAGCAGAGAGCATCGACGTCAAAGCTTCCAGAGCTAGTAGCAA
GAAGACAAGGAGGCAACGGCTGGTGGCAAGAAGGGATGGAAGTTTGC GCGGCAGCCATCCGAT
CAAGATACCAAATGA

```

Figura 4. Região codificante do gene *sbe1* que codifica para a enzima de ramificação do amido I depositada no GenBank (acesso n° AY176762). A seqüência utilizada para gerar o cassete de interferência está marcada em amarelo.

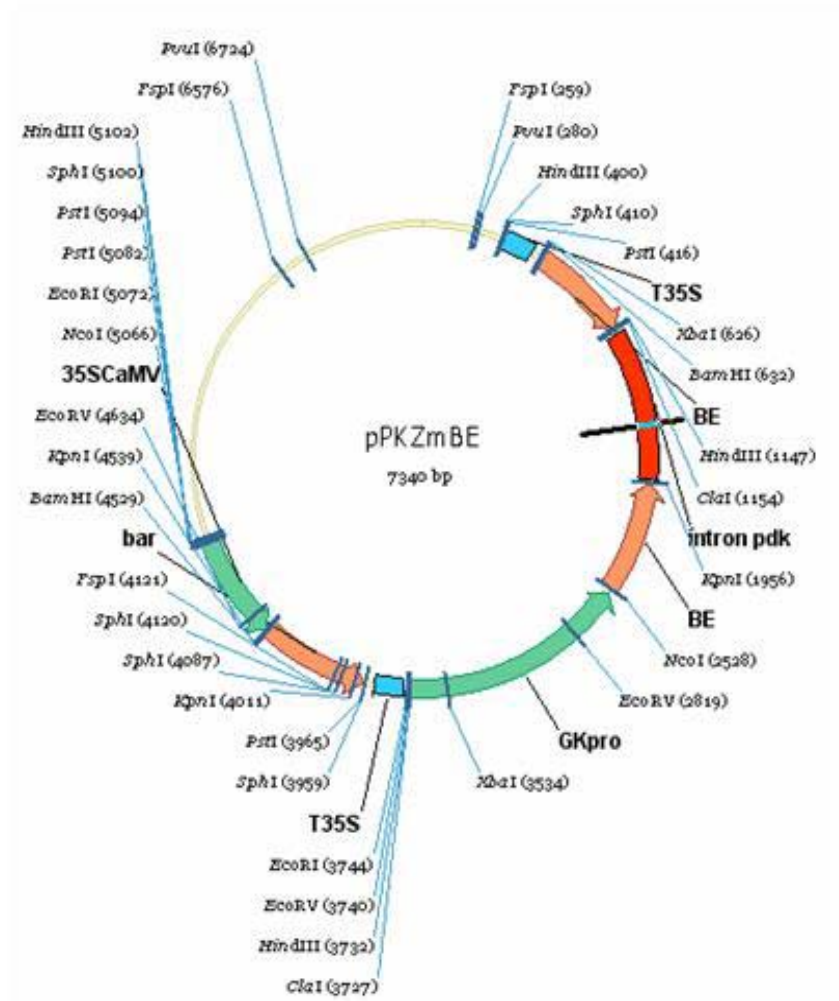


Figura 5. Vetor pPKZmBE para silenciamento do gene *sbe1*

4.2. Obtenção de plantas de milho geneticamente modificadas

Na Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), localizada em Sete Lagoas (MG), foram realizados dois experimentos de bombardeamento de calos, um com 500 e outro com 2000 calos, totalizando 2500 calos friáveis bombardeados. Os calos friáveis, em meio de iniciação de calos, são facilmente diferenciados dos outros, pois são macios e de crescimento rápido, além de apresentarem estruturas ramificadas, que indicam que o calo está embriogênico. Os calos bombardeados foram submetidos a uma severa seleção *in vitro*, com a presença do agente seletivo glufosinato de amônia (GA) como fonte de fosfotricina. Durante essa seleção, apenas as plantas que possuem integradas ao seu genoma o gene *bar*, sobrevivem com a presença de GA, portanto são resistentes ao herbicida e provavelmente possuem o gene de interesse (Figura 6). Alguns calos resistem à seleção branda com 6 mg/L de GA, porém ao serem submetidos à seleção mais severa, isso é, com 9 mg/L GA vão escurecendo até a morte total dos tecidos, sendo esses considerados não-transgênicos.

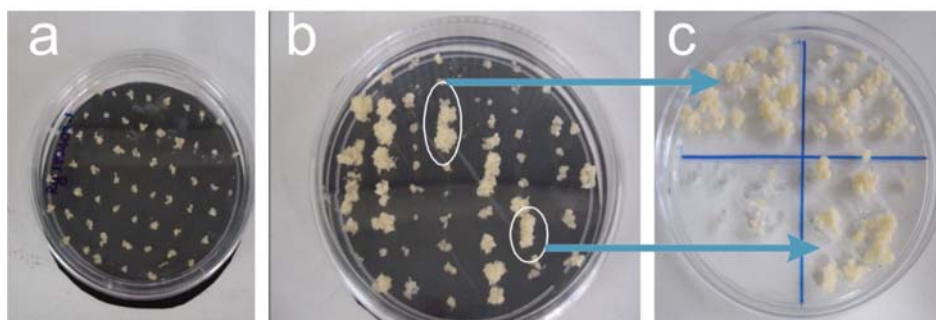


Figura 6. Calos de milho em meio de seleção. a) nenhum calo transgênico; b) seleção de possíveis calos transgênicos resistentes ao herbicida; c) repicagem de possíveis transgênicos.

Todos os calos resistentes à seleção, cerca de 30% do total, foram transferidos para o meio de cultivo de regeneração de plantas, o meio de maturação (RM). Esse é o meio no qual surgem estruturas com aspecto opaco e coloração branco leitosa, caracterizando o início da maturação, que pode ocorrer no período de uma a quatro semanas. Isso é um indicativo de que os calos estão prontos para serem submetidos ao meio de germinação. Os calos maturados foram transferidos para o meio de germinação (GE) sob iluminação a 25 °C, onde finalmente desenvolveram as primeiras partes vegetativas. O desenvolvimento e a diferenciação de calos em diferentes estágios até a formação de plantas podem ser observados na figura 7.

No primeiro experimento, realizado em dezembro de 2006, foram obtidas 8 plantas de milho transformadas a partir dos 500 calos bombardeados, que posteriormente foram aclimatizadas em casa de vegetação. Durante a aclimação, uma planta morreu. As outras sete plantas foram transferidas para vasos. Todas foram analisadas e destas 7 possuem integradas ao seu genoma o gene *bar*. A identificação da integração do gene *bar* deu-se pela análise com o Kit de teste para Milho Trait LL, que a partir de anticorpos específicos, detectam a presença da proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT) no extrato vegetal (figura 8). A presença da proteína PAT é confirmada com o aparecimento da linha inferior na tira. Esse ensaio utiliza um anticorpo em formato de sanduíche. Quando a planta não apresenta a expressão da proteína, apenas a linha superior (controle) é visualizada. Quando a tira é colocada numa pequena quantidade de extrato da planta que contém a proteína PAT, um sanduíche de anticorpo é formado com algum,

porém não todo anticorpo incorporado que está acoplado ao reagente colorido. Esse sanduíche flui através da membrana porosa da tira. As zonas de captura exibem uma coloração avermelhada na linha inferior quando detectam a presença de uma amostra positiva. Dessas sete plantas positivas, uma morreu e uma desenvolveu-se lentamente não apresentando a parte feminina (espiga). As outras cinco plantas foram polinizadas e todas produziram sementes.

No segundo experimento, realizado em 2007, foram obtidas 28 plantas a partir do bombardeamento de 2000 calos. Dentre essas, 23 confirmaram a presença da proteína PAT no teste das tiras. As outras cinco plantas resistiram ao processo de seleção, porém não apresentaram a integração do transgene ao genoma analisado, isso é, foram negativas para o ensaio com as tiras e por PCR, sendo consideradas plantas escape.

Os sistemas adotados de transformação genética de plantas de milho e de regeneração dos calos foram muito eficientes. No total, foram obtidas 30 plantas de milho geneticamente modificadas. A eficiência de obtenção de plantas transgênicas, via biobalística, na Embrapa Milho e Sorgo é da ordem de 0,5 a 1,0% do total de calos bombardeados (Andréa Carneiro, CNPMS, comunicação pessoal). O bombardeamento de calos de milho com o plasmídeo pPKZmBE ultrapassou os resultados esperados, visto que a frequência de transformação final foi de 1,2%.

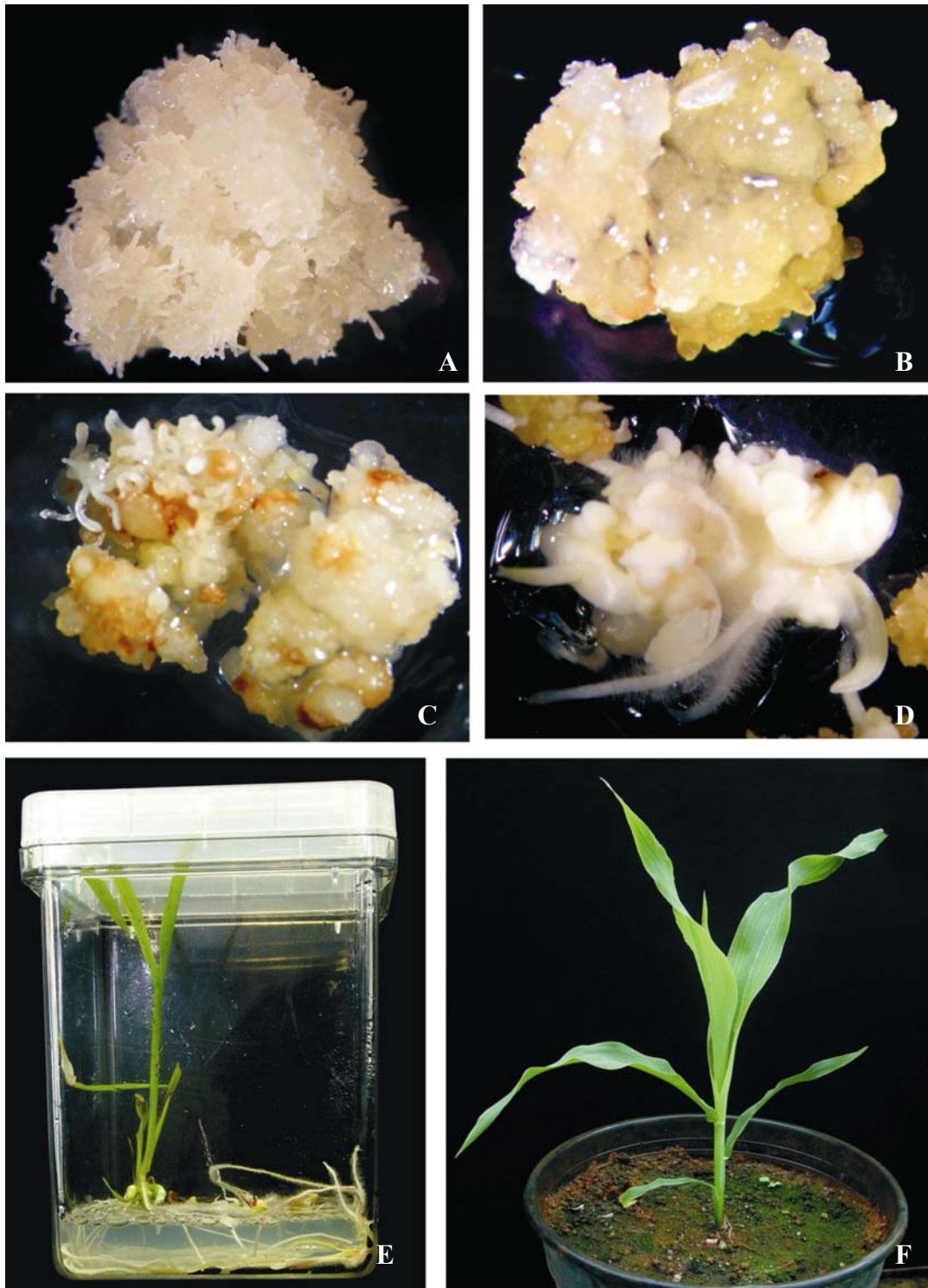


Figura 7. Diferenciação de calos de milho *in vitro* até a formação da planta. A) Calo embriogênico friável ideal para ser bombardeado; B) Calo bombardeado em meio MS com 6 mg/L de GA, apresentando sinais de resistência à seleção; C) Calo apresentando uma região embriogênica selecionada em meio MS com 9 mg/L de GA; D) Calo resistente iniciando a maturação em meio RM; E) Germinação de plântula em meio GE. F) Milho transgênico.

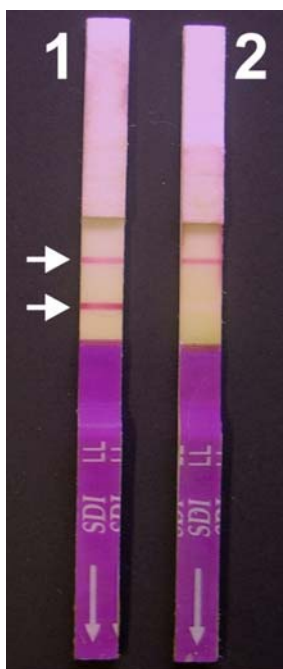


Figura 8. Teste realizado com extrato de folhas de milho para detecção da proteína PAT. 1) Teste com uma planta transgênica, o aparecimento da linha inferior demonstra a presença da proteína PAT. 2) Controle negativo realizado com folha de milho Hi-II não-transformada, apenas a linha controle negativo foi observada.

4.3. Avaliação de fenótipo de linhagens geneticamente modificadas

As plantas identificadas como 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 31 apresentaram deficiências e alterações no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo. A altura máxima dessas plantas foi de 18 cm. Algumas desenvolveram os órgãos reprodutivos precocemente (figura 9). Os órgãos reprodutivos dessas plantas apresentaram morfologia diferenciada da morfologia comum do milho. Algumas espigas desenvolveram-se fundidas ao pendão do milho e sem a presença da palha protetora. As folhas e caules apresentaram deficiência no crescimento. Quatorze dessas

plantas não apresentaram sementes e apenas quatro apresentaram o desenvolvimento de poucas sementes que morreram ainda na planta.

Das 18 plantas acima relacionadas, 16 foram provenientes de um mesmo calo embriogênico transformado por bombardamento. O calo foi repicado durante a seleção e foi identificado como calo embriogênico número 2. Nos primeiros 20 dias após a aclimação as plantas apresentaram características normais. A partir desse período iniciaram as alterações no crescimento.

Essas alterações podem ter ocorrido devido a uma variação somaclonal, pois em plantas regeneradas por meio de cultura de tecidos, freqüentemente podem surgir indivíduos que diferem em um ou mais caracteres, sendo essas alterações estáveis e transmissíveis aos descendentes (Illg,1990). As causas prováveis para esse fenômeno são várias e de naturezas bastante distintas como: variação pré-existente, mutação nuclear ou citoplasmática (Brettell *et al.*,1986; Evans & Sharp, 1984), poliploidia ou outras aberrações cromossômicas (Orton, 1983). Outro fator relevante é a composição do meio de cultura, por exemplo, a utilização de reguladores de crescimento como o 2,4-D pode provocar um crescimento desordenado das estruturas celulares, com conseqüente surgimento de células com anomalias. As condições físicas do meio de cultura (sólida ou líquida), podem afetar o comportamento dos organismos desenvolvidos nessas condições (Caldas *et al.*, 1990)



Figura 9. Plantas transgênicas de milho apresentando crescimento anormal de suas partes vegetativas e reprodutivas.

4.4. Análise fenotípica das sementes

Em todas as espigas das plantas transformadas com o vetor pPKZmBE foi observado o enrugamento dos grãos de milho das espigas maduras. A planta identificada como número 3 apresentou a espiga com a maior quantidade de grãos.

Os grãos das espigas das cinco linhagens transgênicas são visivelmente enrugados e quando comparadas a uma espiga de milho híbrido Hi-II não-transgênica é notável a alteração fenotípica dos grãos (Figura 10). Este fenótipo apresenta um afundamento no endosperma, fenótipo semelhante ao de mutantes de milho que não expressam o gene *sbe1*. Isso

também confirma o acontecido com o mutante de Mendel, onde houve o enrugamento dos grãos de ervilha com ausência da expressão do gene *sbe1*. Com esse resultado é possível afirmar que está ocorrendo alteração da expressão do gene *sbe1*.

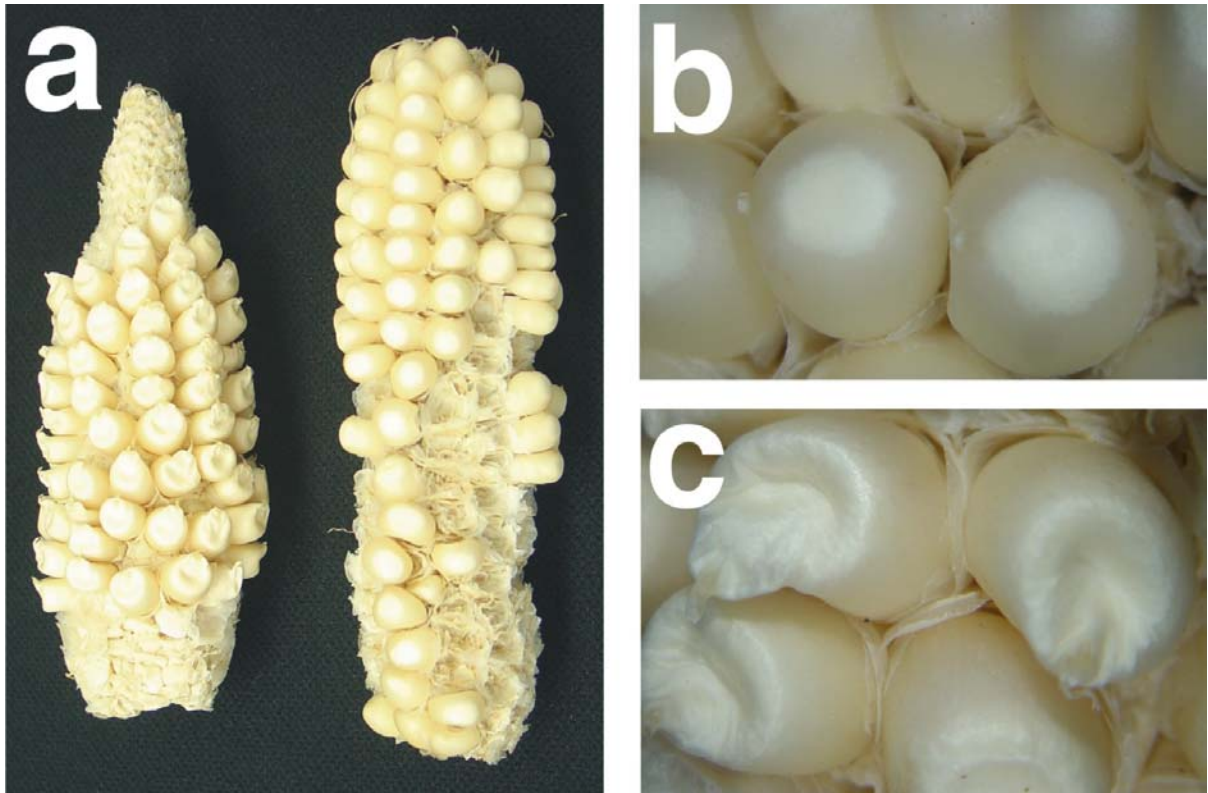


Figura 10. Comparação fenotípica entre sementes transgênicas e não-transgênicas. a) espiga esquerda proveniente da planta transgênica 3 e à direita espiga de uma planta não-transgênica (não-transformada); b) Detalhe de grãos de milho Hi-II de uma espiga não-transgênica. c) detalhe de grãos de milho da espiga proveniente de uma planta transgênica com silenciamento do gene *sbe1* apresentando rugosidade e afundamento do endosperma.

Os grãos produzidos foram armazenados no laboratório de transformação genética de plantas e serão submetidos a análises com o objetivo de monitorar as alterações na estrutura da amilopectina do grão de

amido. Os grãos também serão utilizados para análise de segregação da progênie.

4.5. Reação de polimerase em cadeia - PCR

Foram realizadas reações de PCR com todas as plantas de milho obtidas. O resultado da análise por PCR confirmou o resultado do teste com as tiras LL.

A primeira reação foi com o par de *primers* BEBAMZm e BEHINDZm que amplifica um fragmento de 524 pb (Figura 11). A segunda reação foi realizada com BEXHONCOZm e BEKPNZm, amplificando um fragmento de 530 pb.

Das 35 plantas de milho obtidas, 30 apresentaram amplificação de suas seqüências com o par de *primers* BEBAMZm e BEHINDZm. Já o outro par de *primers* teve uma baixa amplificação das seqüências.

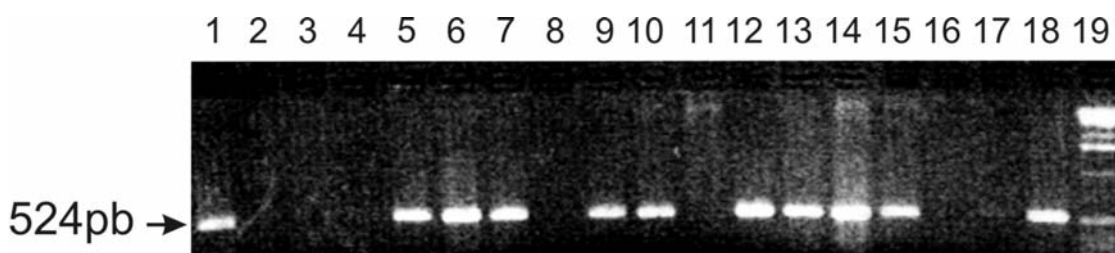


Figura 11. PCR de plantas de milho utilizando os *primers* BEBAMZm e BEHINDZm. As amostras 1,5, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 14 e 15 são plantas positivas que demonstraram a amplificação de um fragmento de 524 pb. As amostras 2, 3, 4, 8 e 11 são plantas negativas do segundo experimento. O número 16 é o controle negativo (planta não-transformada). A amostra 17 é o controle branco (amostra sem DNA) e a 18 é o controle positivo (plasmídeo pPKZmBE). 19: marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen).

4.6. Análise por *Western blot*

A espiga da linhagem positiva número 10 foi colhida com 20DAP e algumas sementes foram analisadas pelo teste da PAT. Os embriões e endospermas positivos foram macerados separadamente e utilizados para o *Western blot*. Para o experimento também foram usadas folhas transgênicas. Como controle, foram utilizadas folhas, embriões e endospermas de uma planta Hi-II não-transformada.

Foram realizados dois experimentos utilizando uma alíquota do mesmo extrato protéico para cada anticorpo. Testaram-se os anticorpos anti-SBEI e o anti-SBEII produzidos em coelho (Fig. 12). O peso molecular da proteína SBEI é de 90 KD (Blauth *et al.*, 2002) e o da SBE II é de 85 KD (Blauth *et al.*, 2001)

Em folhas não houve detecção da proteína SBEI e nem da SBE II. Já nos embriões e endospermas tanto positivos quanto não-transformados houve o aparecimento de bandas. A intensidade das bandas não variou entre embriões positivos e embriões controle. Essas bandas foram dos tamanhos esperados.

No endosperma transgênico aparece uma banda de menor intensidade que a banda do endosperma não-transgênico. Essa variação indica que está ocorrendo alteração em nível transcricional e, portanto, o gene *sbe1* está sendo silenciado parcialmente. A diferenciação das bandas exclusivamente no endosperma é explicado pelo direcionamento da expressão do gene para o endosperma pelo promotor pGK.

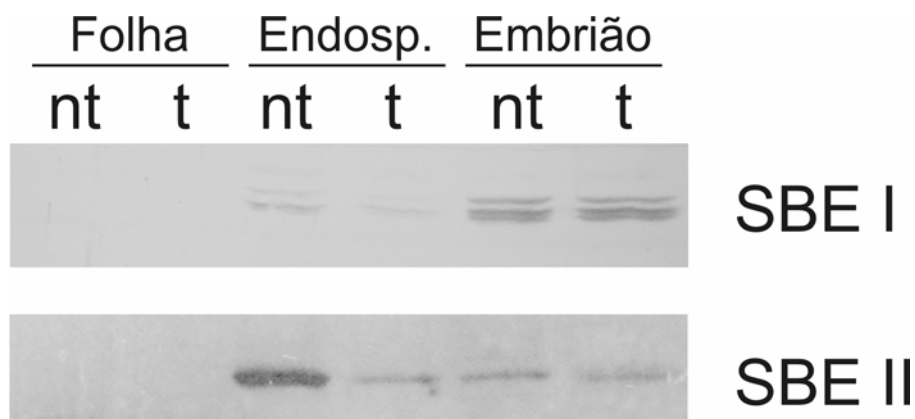


Figura 12. Western blot realizado com extratos protéicos de folhas, endospermas e embriões transgênicos (t) e não-transgênicos (nt) com 20DAP. Os anticorpos específicos não reconheceram as proteínas SBE I e SBE II em folhas. Já nos embriões há a expressão das proteínas em níveis similares entre transgênicas e não-transgênicas. No endosperma transgênico houve redução da expressão da SBE I e da SBE II. Isso demonstra o silenciamento parcial da SBE I e da SBE II em endosperma transgênico.

4.7. Quantificação da Glicose

A quantificação de glicose em sementes de quatro linhagens transgênicas e não-transgênicas demonstrou variação na quantidade de açúcar livre entre as diferentes linhagens.

As linhagens L5 e L3 possuem maior quantidade de glicose do que as linhagens L6 e L7. Quando comparadas a sementes de uma planta não-transgênica (controle negativo Hi-II), a maioria das linhagens transgênicas demonstra significativo aumento da quantidade de glicose.

Portanto, o silenciamento do gene *sbe1* aumentou a quantidade de glicose na maioria das linhagens estudadas.

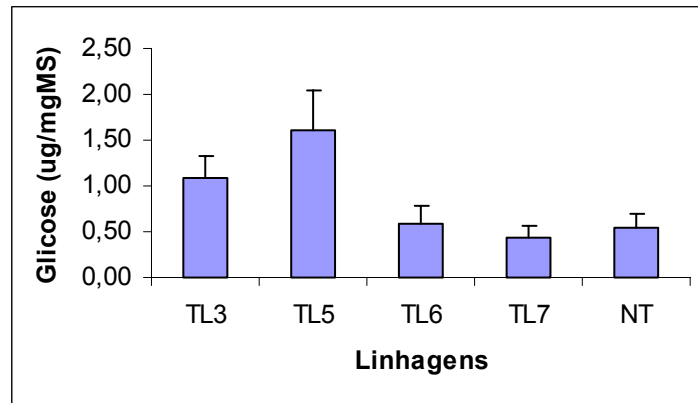


Figura 13. Quantificação de glicose em sementes de milho de linhagens transgênicas (TL3, TL5, TL6 e TL7) e não-transgênicas (NT). As linhagens transgênicas identificadas como 3 e 5 tiveram aumento significativo da quantidade de glicose em relação à linhagem não-transgênica. A linhagem 6 teve um pequeno aumento. Já na linhagem 7 a quantidade de glicose foi menor que a da linhagem não-transgênica.

4.8. Linhagem 3 X Não-transgênica

➤ Quantificação da Glicose

A quantidade de glicose foi estimada em um novo experimento entre três sementes da linhagem 3 e três sementes do controle negativo. O resultado demonstra diferenças de quantidade de amido entre cada semente transgênica e entre cada semente não-transgênica.

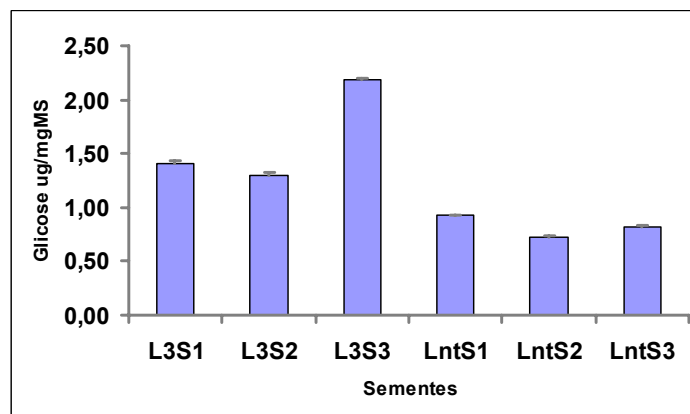


Figura 14. Quantificação de glicose entre sementes da linhagem 3 (L3S1, L3S2, L3S3) e da linhagem não-transgênica (Lnt1, Lnt2, Lnt3). A semente L3S3 demonstrou aumento significativo da quantidade de glicose em relação às outras sementes.

➤ Quantificação do Amido

No experimento com o amido não solúvel em água, houve aumento de amido apenas na semente 3 da linhagem 3. Não houve diferenças significativas entre as outras sementes transgênicas e não-transgênicas (Figura 15).

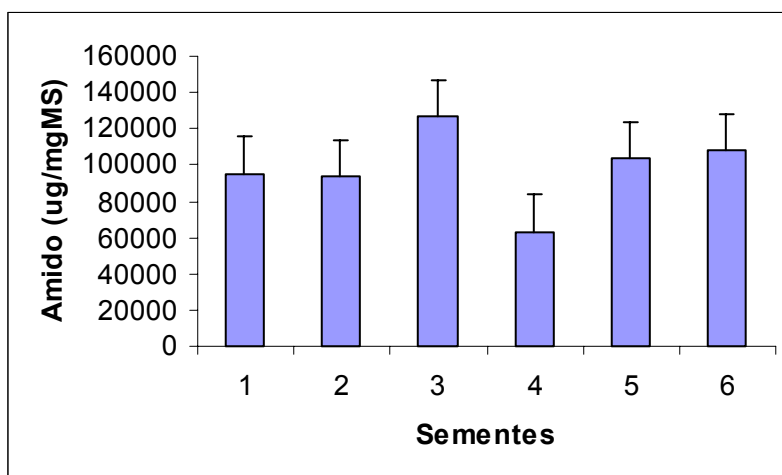


Figura 15. Quantificação de amido entre sementes da linhagem 3 (1, 2, 3) e da linhagem não-transgênica (1, 2, 3). A semente L3S3 demonstrou aumento significativo da quantidade de glicose em relação às outras sementes.

➤ Quantificação do Glicogênio

A quantidade do polímero não solúvel em água, o glicogênio, foi inferior em sementes transgênicas quando comparadas às sementes não-transgênicas. Portanto, houve redução de glicogênio em todas as sementes transgênicas analisadas.

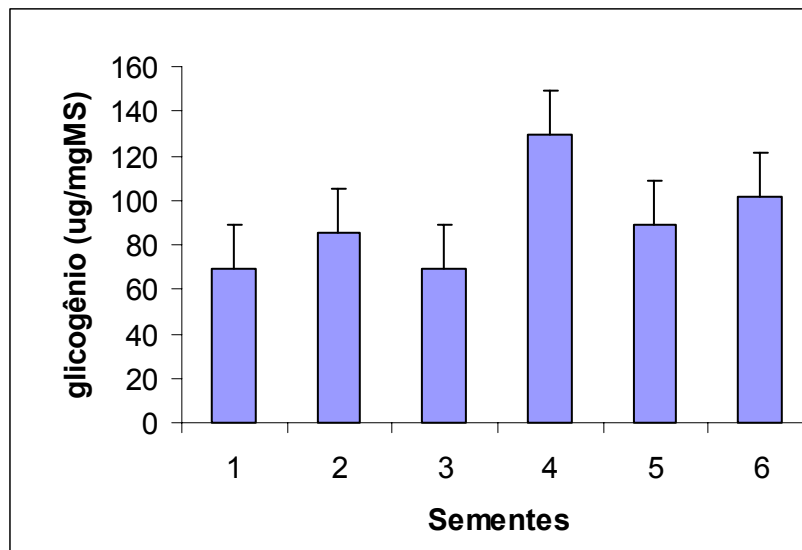


Figura 16. Quantificação de glicogênio entre sementes da linhagem 3 (1, 2, 3) e da linhagem não-transgênica (1, 2, 3). As sementes não-transgênicas demonstraram aumento da quantidade de glicogênio em relação às sementes transgênicas.

4.9. Análise de segregação do transgene na progênie

Até o presente momento apenas as plantas 3, 4, 5, 6, 7 e 10 produziram sementes.

Para avaliação da geração R1 foram plantadas cinco sementes provenientes de espigas das plantas 3, 4, 5, 6, 7. Algumas sementes não germinaram. As plantas R1 foram analisadas por PCR e pelas tiras. A espiga da planta 10 foi colhida com 20 DAP e algumas sementes foram analisadas pelo teste da PAT.

De acordo com os resultados dos testes é possível afirmar que as progênes das plantas de milho transgênicas estão segregando numa proporção de 3:1. O resultado dos testes de segregação da progênie das linhagens transgênicas de milho pode ser visualizado na tabela 3.

Tabela 3. Análise da segregação da progênie (geração R1) de 6 linhagens transgênicas de milho pelo teste do qui-quadrado (χ^2) e correção pelo teste de Yates

Linhagem	Presença de PAT		χ^2	P*(%)
	Positivas	Negativas		
P3	4	1	0,46	0,79*
P4	1	-	ND	ND
P5	2	-	ND	ND
P6	5	1	0,66	0,63*
P7	2	1	ND	ND
P10	9	3	0,11	1,00*

*Teste para uma proporção de 3:1 com correção de Yates.

ND: Não determinado devido ao baixo número de sementes obtidas.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O objetivo do presente trabalho era o estudo da expressão e o efeito do silenciamento do gene *sbe1* em plantas de milho. Com os resultados obtidos foi possível estabelecer as seguintes conclusões:

1. Foi construído o vetor de RNAi (pPKZmBE) para a transformação genética de milho.
2. Foi possível obter plantas transgênicas com o vetor de transformação para silenciamento do gene *sbe1* que codifica para a enzima de ramificação do amido.
3. As sementes das plantas transgênicas apresentaram fenótipos enrugados, semelhantes aos mutantes de milho e ervilha com ausência do gene *sbe1* relatados na literatura.
4. A redução da expressão da proteína SBE I e da SBE II somente no endosperma das sementes transgênicas indica que houve silenciamento parcial gene *sbe1* e do gene *sbe2* simultaneamente.
5. Houve aumento da quantidade de glicose nas sementes de milho transgênicas.

Serão realizados testes nos Estados Unidos de espectrometria de massa do amido isolado de sementes com o silenciamento parcial do gene *sbe1* para avaliação da estrutura do grão de amido. Também serão estudadas

possíveis alterações morfológicas nas células de armazenamento de amido, bem como seus efeitos para o desenvolvimento vegetal.

O estudo por *Southern blot* será realizado para correlacionar o número de cópias do transgene aos níveis de expressão da proteína.

Outro estudo que será realizado é o *Real Time PCR* para avaliação da especificidade dos *primers* com o gene *sbe1* e avaliar sua expressão em cDNA de endospermas, embriões e folhas transgênicas e não-transgênicas.

A perspectiva para publicação do presente trabalho é de submeter um artigo mostrando um estudo do efeito do silenciamento do gene *sbe1* sobre a síntese e estrutura do amido em plantas de milho geneticamente modificadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS B, BRAY D, LEWIL J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD (1994) Molecular Biology of the Cell, São Paulo, 4^a ed. **Artmed**.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P (2004) Biologia molecular da célula. Trad. Ana Beatriz Gorini da Veiga *et al.* 4^a ed. Porto Alegre: **Artmed**. 451-452.
- ALDEMITA RR & HODGES TK (1994) *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of japonica and indica rice varieties. **Planta**. 199:612-617.
- ARAGÃO FJL & RECH EL (1998) Biobalística. In: Brasileiro, ACM, Carneiro VTC **Manual de Transformação Genética de Plantas**. *Embrapa-SPI*, Brasília. 51-64.
- ARAGÃO FJL, BARROS LMG, BRASILEIRO ACM, RIBEIRO SG, SMITH FD, SANFORD JC, FARIA JC, RECH EL (1996) Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**. 93: 142-150.
- ARAGÃO FJL, SAROKIN L, VIANNA GR, RECH EL (2000) Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* L. (Merril)] plants at a high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**. 101:1-6.

- ARAGÃO FJL, VIANNA GR, ALBINO MC, RECH EL (2002) Transgenic Dry Bean Tolerant to the Herbicida Glufosinate Ammonium. **Crop Science**. 42:1298-1302. 2002.
- ARMSTRONG CL & PHILLIPS RL (1988) Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize. **Crop Science** 28: 363-369.
- ARMSTRONG CL, PARKER GB, PERSHING JC, BROWN SM, SANDERS PR, DUNCAN DR, STONE T, DEAN DA, DEBOER DL, HART J, HOWE AR, MORRISH FM, PAJEAU ME, PETERSEN WL, REICH BJ, RODRIGUEZ R, SANTINO CG, SATO SJ, SCHULER W, SIMS SR, STEHLING S, TAROCHIONE L, FROMM ME (1995) Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Crop Science** 35: 550-557.
- ARMSTRONG CL, ROMERO-SEVERSON J, HODGES TK (1992) Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, 84: 755-762.
- ARMSTRONG, C.L (1999) The first decade of maize transformation: a review and future perspective. **Maydica**. 44: 101-109.
- BHATTACHARYYA MK, SMITH AM, NOEL ELLIS TH, HEDLEY C, MARTIN C (1990) The Wrinked-Seed Character of Pea Described by Mendel is

Caused by Transposon-like Insertion in a Gene Encoding Starch-Branching Enzyme. **Cell** 60:115-122.

BLAUTH SL, KIM K, KLUCINEC J, SHANNON JC, THOMPSON D, GUILTINAM T. (2002) Identifier of *Mutator* insertional mutants of starch-branching enzyme I (sbe1) in *Zea mays* L. **Plant Molecular Biology** 48: 287-297

BLAUTH SL, KLUCINEC DJ, SHANNON JC, THOMPSON DB, GUILTINAN MJ. (2001) Identification of *Mutator* insertional mutants of starch branching enzyme 2a (*Sbe2a*) in *Zea mays* L. **Plant Physiology** 125:1396-1405.

BONFIM K, FARIA JC, NOGUEIRA EOPL, MENDES EA, ARAGÃO FJL (2007) RNAi-Mediated Resistance to *Bean golden mosaic virus* in Genetically Engineered Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) **Molecular Plant-Microbe Interactions** 20:6, 717-726.

BRASILEIRO ACM & CARNEIRO VTC (1998) **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Embrapa, Brasília.

BRETTELL RIS, DENNIS ES, SCOWCROFT WR, PEACOCK WJ (1986) Molecular analysis of somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. **Molecular and General Genetics**, New York, 202:235-239.

BURTON RA, BEWLEY JD, SMITH AM, BHATTACHARYYA MK, TATGE H, RING S, BULL V, HAMILTON WDO, MARTIN C. (1995) Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are

- differentially expressed during pea embryo development. **Plant Journal**. 7: 3-15
- CALDAS LS, HARIDASAN P, FERREIRA M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, AC, CALDAS LS, (eds). (1990) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas/EMBRAPA, p. 37-69.
- CARVALHO LJCB, SOUZA, CRB, CASCARDO JCM, BLOCH JR C, CAMPOS L. (2004) Identification and characterization of a novel cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clone with high free sugar content and novel starch. **Plant Molecular Biology**. 56(4): 643-659.
- CHU CC, WANG CC, SUN CS, HSU KC, YIN CY, CHU CY, BI FY. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica** 16:659-688.
- CHUANG CF & MEYEROWITZ EM (2000) Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Science**. 97 (9): 4985-4990
- CNPMS (Centro Nacional de Pesquisa de milho e Sorgo - EMBRAPA). 2005 <http://www.cnpms.embrapa.br/> (acesso em 03/07/2006).
- DANG PL & BOYER CD (1988) Maize Leaf and Kernel Starch Synthases and starch Branching Enzymes. **Phytochemistry** 17(5)1255-1259.
- DE LUCCA PC (2003) Produção de Hormônios Recombinantes de Crescimento e Pró-insulina em Plantas Transgênicas de Milho.

- Universidade Estadual de Campinas. Campinas. Tese de Doutorado. p 92.
- D'HALLUIN K, BONNE E, BOSSU M, DE BEUCELEER M, LEEMANS J (1992) Transgenic Maize Plants by Tissue Electroporation. **Plant Cell**. 4: 1495-1505.
- DOYLE JJ & DOYLE JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin** 19: 11-15.
- EVANS DA, SHARP WR, MEDINA-FILHO HP (1984) Somaclonal and gametoclonal variation. **American Journal of Botany**. 71(6):759- 774.
- FERREIRA ME, RIMMER R, WILLIAMS PH, OSBORN TC (1998) Mapping of *loci* controlling *Brassica napus* resistance to *Leptosphaeria maculans*, under different screening conditions. **Phytopathology** 85(2): 213-217.
- FOX JD & ROBYT JR (1991) Miniaturization of tree carbohydrate analyses using a microsample plate reader. **Analytical Biochemistry**.195: 93-96.
- FREITAS FA, YUNES JA, SILVA MJ da , ARRUDA P, LEITE A. (1994) Structural characterization and promoter activity analysis of the γ - kafirin gene from sorghum. **Molecular and General Genetics** 245:177-186.
- FROMM ME, MORISH F, Armstrong C, Williams R, Thomas J. & Klein TM (1990) Inheritance and expression of chimeric. genes in the progeny of transgenic maize plants. **Bio/Tecnology**. 8: 883-889.
- GAO M, FISHER DK, KIM KN, SHANNON JC, GUILTINAN MJ. (1996) Evolutionary conservation and expression patterns of maize starch

- branching enzyme I and IIb genes suggests isoform specialization, **Plant Molecular Biology** 30 (6): 1223 - 1232
- GODOY L.J.G. (2002) Manejo do nitrogênio em cobertura na cultura do milho (*Zea mays* L.) em solo arenoso baseado no índice relativo de clorofila. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- GREEN CE & PHILLIPS RL (1975) Plant regeneration from tissue cultures of maize. **Crop Science** 15: 417-421.
- GUAN HP & PREISS J. (1993) Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*). **Plant Physiology** 102: 1269-1273
- GUERRA PM, TORRES AC, TEIXEIRA JB. (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2: 533-568.
- HAMILTON AJ, LYCETT GW, GRIESERSON D (1990) Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. **Nature** 346: 284-287.
- HAMMOND J, MCGARVEY P, YUSIBOV V (1999). Plant biotechnology: new products and applications; **Complementary Therapies in Medicine**. 240.
- HOEKEMA A, HIRSCGH PR, HOOYKAAS PJJ, SCHILPEROOT RAA. (1983) A binary vector strategy based on a separation of *vir* and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti- plasmid. **Nature**, 303: 179-180.

- HOLST I, MORENO JE, PPERNO DR. (2007) Identification of teosinte, maize, and *Tripsacum* in Mesoamerica by using pollen, starch grains and phytoliths. **Proceedings of the National Academy of Science** 104 (45) 17608-17613.
- HOOD EE & JILKA JM, (1999) Plant-based product of xenogenic proteins. **Current Opinion in Biotechnology** 382-386.
- HUANG L, LEE J, SITARAMAN K, GALLEGRO A, RACHTCHIAN A. (2000) A New Highly Sensitive Two-Step RT-PCR System. **Focus**. 22:6-7.
- IBGE (**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**). (2007). <http://www.ibge.gov.br/> (Acesso em 07/06/2007).
- IBGE (**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**). (2008). <http://www.ibge.gov.br/> (Acesso em 08/02/2008).
- ILLG RD. Variação somaclonal. In: TORRES AC, CALDAS LS. (eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas/EMBRAPA, 1990. p. 287-295.
- KIM K-N & GUILTINAN MJ (1999) Identification of cis-Acting Elements Important for Expression of the Starch-Branching Enzyme I Gene in Maize Endosperm. **Plant Physiology**. 121:225-236.
- KOZIEL MG, ELAND GL, BOWAMAN C, COROZZI NB, CRENSHAW R, CROSSLAND L, DAWSON J, DESAI N, HILL M, KADWELL S, LAUNIS K, LEWIS K, MADDOX D, McPHERSON K, MEGHJI MR, MERLIN E, RHODES R, WARREN GW, WRIGHT M, EVOLA SV (1993) Field

- performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology** 11:194-200.
- LABORDA PR (2003) Diversidade genética entre linhagens de milho tropical. Campinas, SP. Dissertação de mestrado.
- LAWSON C, KANIEWSKI W, HALEY L, ROZMAN R, NEWELL C, SANDERS P, TUMER NE (1990) Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Yin transgenic Russet Burbank. **Biotechnology** 8: 127-134.
- LAZERRI EL & SHEWRY PR (1993) Biotechnology of cereals. **Biotechnology Genetic Engineering Review** 11: 79-146.
- LEITE A, KEMPER EL, SILVA MJ, LUCHESSI AD, SILOTO RMP, BONACCORSI ED, EL-DORRY HF, ARRUDA P. (2000) Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. **Molecular Breeding**. 6: 47-53.
- LEITE A. Expressão de proteínas heterólogas em plantas (2001). In: Nass LL, Valois ACC, de Melo IS, Valadares-Inglis MC (eds.) Recursos genéticos & melhoramento. **Plantas**. Fundação MT, Rondonópolis. 1057-1083.
- MALIK KA & SAXENA PK (1992) Somatic embryogenesis and shoot regeneration from intact seedlings of *Phaseolus acutifolius* A. **Plant Cell Rep** 11:163-168
- MARCELLINO LH, GROSSI de SÁ MF. (1998) Detecção e Análise de Proteínas pela Técnica *Western Blot*. In: Brasileiro, ACM, Carneiro VTC **Manual de Transformação Genética de Plantas**. *Embrapa-SPI*, Brasília. 251-267.

- MARIANI C, GROSSELE V, BEUCKELER M, BLOCK M, GOLDBERG RB, GREEF W, LEEMANS J (1992) A chimeric ribonuclease inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. **Nature** 357: 384-387.
- MOREL J, MOURRAIN P, BECLIN C, VAUCHERET H. (2000) DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. **Current Biology**. 10:1591-1594.
- MORELL MK, BIENNOW A, KOSAR-HASHEMI B, SAMUEL MS (1997) Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm. **Plant Physiology** 113: 201-208
- MURAKAMI T, ANZAI H, IMAI S, SATOH A, NAGAOKA K, THOMPSON CJ (1986) the bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster. **Molecular and General Genetics**. 205: 42-50.
- MURASHIGE T & SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**,15: 473-497.
- MURRY LE, ELLIOT L, CAPITANT SA, WEST JA, HANSON KK, SCARAFIA L, JOHNSTON S, DELECAFLAHERTY C, NICHOLS S, CUNANAN D, DIETRICH PS, METTLER IJ, DEWALD S, WARNICK DA, RODES C, SINIBALDI RM, BRUNKE KJ. (1993) Transgenic corn plants expressing MDMV strain B coat protein are resistant to mixed infections of maize

dwarf mosaic virus and maize chlorotic motle virus. **Bio/Technology**, 11: 1559-1564.

NAIR RB, BAGA M, SCOLES GJ, KARTHA KK, CHIBBAR RN (1997) Isolation, characterization and expression analysis of a starch branching enzyme II cDNA from wheat. **Plant Science** 122: 153-163.

NUNES ACS, VIANNA GR, CUNEO F., AMAYA-FARFÁN J, CAPDEVILLE G, RECH EL, ARAGÃO FJL. (2006) RNAi-mediated silencing of the *myo*-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPS1*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. **Planta** 224:

OGITA S, UEFUJI H, YAMAGUCHI Y, KOIZUMI N, SANO H. (2003) RNA interference: Producing decaffeinated coffee plants. **Nature** 423: 823-827.

OLSEN O. (2004) Nuclear Endosperm Development in Cereals an *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**. 16:214-227.

ORTON, T.J. (1983) Experimental approaches to the study of somaclonal variation. **Plant Molecular Biology Report** 1: 67-76.

PREISS J & SIVAK MN (1996) Starch synthesis in sinks and sources. In E Zamski, AA Schaffer, eds, Marcel Dekker, Inc. **Publishers**, New York, Basel, Hong Kong, p 63-96

- PREISS J. (1991) Biology and molecular biology of starch biosynthesis and its regulation. In BJ Miflin, ed, **Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology**. 7: 59-114
- RECH EL, VIANNA GR, ARAGÃO FJL. (2008) High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature Protocols**. 3 (3): 1-9.
- REGINA A, BIRD A, TOPPING D, BOWDEN S, FREEMAN J, BARSBY T, KOSAR-HASHEMI B, LI Z, RAHMAN S, MOREELL M. (2006) High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 103: 3546-3551
- REPELLIN A, NAIR BR, BAGA M, CHIBBAR NR (1997) Isolation of a Starch Branching Enzyme I cDNA from a Wheat Endosperm library **Plant Physiology**. 114: 1135
- RITCHIE SW, HANWAY JJ, BENSON GO (1996) How a corn plants develops. Iowa State University of Science and Technology Cooperative extension Service Ames. **Special Report**. 48: 17-19.
- ROGERS SG, HORSH RB, FRALEY RT (1986) Gene transfer in plants: production of transformed plants using Ti plasmid vectors. In: Weissbach h, ed. **Plant molecular biology**. San Diego: Academic Press. p. 627-640.

- RUDENKO GN & WALBOT V (2001) Expression and Post-Transcriptional Regulation of Maize Transposable Element *MuDR* and Its Derivatives. **Plant Cell**. 13 (3) 553-570.
- RUSSELL SD (1992) Double fertilization. **International Review of Cytology**. 140: 357-388.
- SANFORD JC, KLEIN TM, WOLF ED, ALLEN N. (1987) Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particle Science Technology**. 5: 27-37.
- SCHLEE M, HORNING V, HARTMANN G (2006) siRNA and isRNA: Two Edges of One Sword . **Molecular Therapy**. 14, 463–470.
- SCHWALL GP, SAFOFORD R, WESTCOTT RJ, TAYAL A, SHI Y, GIDLEY M, JOBLING SA (2000) Production of very-high-amilose potato starch by inhibition of SBE A and B. **Nature Biotechnology**. 18: 551- 554.
- SEO B-S, KIM S, SCOTT PM, SINGLETARY GW, WONG K-S, JAMES MG, MYERS AM (2002) Functional Interactions between Heterologously Expressed Starch-Branching Enzymes of Maize and the Glycogen Synthases of Brewer's Yeast. **Plant Physiology**. 128: 1189-1199
- SHARP WR, SONDAHL MR, CALDAS LS, MARAFFA SB (1980) The physiology of in vitro asexual embryogenesis, **Horticultural Reviews**. 2268–310.
- SHEWRY PR & CASEY R. (1999) Seed Proteins. **Kluwer Academic Publishers**. 1: 1096.

- SMITH AM, DENYER K, MARTIN C (1997) The Synthesis of starch granule. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 48: 65-87.
- STELL RGD, TORRIE JH (1980) **Principles and Pcedures of Statistics**. New York: McGraw-Hil.
- TAKEDA Y, GUAN HP, PREISS J (1993) Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. **Carbohydrate Research**. 240: 253-263.
- THOMPSON CJ, MOVVA NR, TIZARD R, CRAMERI R, DAVIES JE, LAUWEREYS M, BOTTERMAN J (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. **EMBO Journal**. 6: 2519-2523.
- TSUNECHIRO A & PEREZ LH. Avanço do etanol nos Estados Unidos torna o Brasil terceiro maior exportador mundial de milho. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v. 2, n. 5, maio 2007. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=8942>>. Acesso em.: 30 de maio 2007.
- ZHONG GY, PETERSON D, DELANEY DE, BAILEY M, WITCHER DR, REGISTER III JC, BOND D, Li C-P, MARSHALL L, KULLISEK E, RITLAND D, MEYER T, HOOD EE, HOWARD JA (1999) Commercial production of Aprotinin in transgenic maize seeds. **Molecular Breeding**. 5: 345–356.

Anexo I**Soluções e Reagentes****TE pH 8,0**

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris-HCl 1 M, pH 8,0	1 mL	10 mM
EDTA 500 mM, pH 8,0	200 µL	1 mM
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

TBE 10X

Dissolver 108 g de Tris base, 55 g de ácido bórico e 40 mL de EDTA 500 mM, pH 8,0, em água destilada. Completar o volume até 1 litro.

SDS 20%

Dissolver 200 g de SDS em 700 mL de água destilada, em banho-maria a 50 °C, no mínimo. Completar o volume até 1 L com água destilada.

Gel de agarose 1%

Para preparar 100 mL de gel. Pesar 1 g de agarose e dissolver por aquecimento em tampão TBE 0,5 X.

Tampão SSPE 20X

Componente	Quantidade	Concentração final
NaCl	175,3 g	3 M
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	27,6 g	0,2 M
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	7,4 g	20 mM
H ₂ O	q.sp. 1 L	

Ajustar o pH para 7,4 com 10 N NaOH.

Tampão SSC 20X

Componente	Quantidade	Concentração final
NaCl	175,3 g	3 M
Citrato de sódio	88,2 g	0,3 M
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

EDTA 500 mM, pH 8,0

Adicionar 186,1 g de Na₂.EDTA.2H₂O a 800 mL de água destilada e homogeneizar com agitador magnético. Ajustar o pH para 8,0 com NaOH.

O EDTA não irá solubilizar totalmente até que a solução atinja o pH 8,0.

Completar o volume até 1 litro. Esterilizar em autoclave.

Glicerol 10%

Misturar 10 mL de glicerol puro a 90 mL de água destilada e autoclavar.

Tampão Tris HCL 1

Dissolver 121,1 g de Tris base em 800 mL de água destilada. Ajustar o pH adicionando HCl concentrado, nas seguintes quantidades:

pH	HCl
7,4	70 mL
7,6	60 mL
8,0	42 mL

Solução de pré-hibridização

Componente	Quantidade	Concentração Final
SSC 20X	12,5 mL	5 X
Solução de Denhardt 100X	2,5 mL	5X
SDS 10%	2,5 mL	0,5%
DNA de esperma de salmão	100 µL	20 µg/mL
Água	q.s.p. 50 mL	

Solução de Lavagem I

Componente	Quantidade	Concentração Final
SSC 20X	50 mL	2X
SDS 10%	5 mL	0,1%
Água	q.s.p. 500 mL	

Solução de Lavagem II

Componente	Quantidade	Concentração Final
SSC 20X	25 mL	1X
SDS 10%	5 mL	0,1%
Água	q.s.p. 500 mL	

Solução de Lavagem III

Componente	Quantidade	Concentração Final
SSC 20X	2,5 mL	0,1X
SDS 10%	5 mL	0,1%
Água	q.s.p. 500 mL	

Tampão PBS 10X

Componente	Quantidade
Na ₂ HPO ₄	2,88 g
KH ₂ PO ₄	0,48 g
NaCl	16 g
KCl	0,4 g
H ₂ O	q.s.p. 200 mL

Anexo II

Detalhamento do cassete de interferência do gene pPKZmBE

BamHI-**BEf**-**HindIII**-**IntronPDK**-**KpnI**-**BEr**-**NcoI**

GGATCCTGTACTGGCATGTCAGACTTGCAGCCTGCTTCACCTACAATTGATCGAG
 GGATTGCACTCCAAAAGATGATTCACCTCATCACAATGGCCCTTGGAGGTGATGGCT
 ACTTGAATTTTATGGGAAATGAGTTTGGTCACCCAGAATGGATTGACTTTCGAAGAG
 AAGGGAACAACCTGGAGCTATGATAAATGCAGACGACAGTGGAGCCTTGTGGACTG
 ATCACTTGGCGGTACAAGTACATGAATGCGTTTGACCAAGCGATGAATGCGCTCGATG
 AGAGATTTTCCTTCCTTCGTGTCGTCAAAGCAGATCGTCAGCGACATGAACGATGAGG
 AAAAGGTTATTGTCTTTGAACGTGAAGATTTAGTTTTTGTTCATTTCCATCCCA
 AGAAAACCTTACGAGGGCTACAAAGTGGGATGCGATTTGCCTGGGAAATACAGAGTAG
 CCCTGGACTCTGATGCTCTGGTCTTCGGTGGACATGGAAGAGTTGGCCACGACGTGG
 ATAAGCTTATCGATTTTGAACCCAATTTCCCAACTGTAATCAATCCAAATGTAAGAT
 CAATGATAACACAATGACATGATCTATCATGTTACCTTGTTTATTCATGTTGACTA
 ATTCATTTAATTAATAGTCAATCCATTTAGAAGTTAATAAAAACCTACAAGTATTATTT
 AGAAATTAATAAGAATGTTGATTGAAAATAATACTATATAAAAATGATAGATCTTGCG
 CTTTGTTATATTAGCATTAGATTATGTTTTGTTACATTAGATTACTGTTTCTATTAG
 TTTGATATTATTTGTTACTTTAGCTTGTTATTTAATATTTTGTTCATTTGATAAATTA
 CAAGCAGATTGGAATTTCTAACAAAATATTTATTAACTTTTAAACTAAAATATTTAG
 TAATGGTATAGATATTTAATTATATAATAAACTATTAATCATAAAAAAATATTTATTT
 TAATTTATTTATTTCTTATTTTTACTATAGTATTTTATCATTGATATTTAATTCATCA
 AACCAGCTAGAATTACTATTATGATTAAAACAAATATTAATGCTAGTATATCATCTT
 ACATGTTTCGATCAAATTCATTAATAAATAATACTTACTCTCAACTTTTATCTTCTT
 CGTCTTACACATCACTTGTCATATTTTTTTTACATTACTATGTTGTTTATGTAACAA
 TATATTTATAAATTATTTTTTTCACAATTATAACAACCTATATTATTATAATCATACTA
 ATTAACATCACTTAACTATTTTTATACTAAAAGGAAAAAAGAAAATAATTATTTCTT
 ACCAATTGGGGTACCATCCACGTCGTGGCCAACCTTCCATGTCCACCGAAGACCAG
 AGCATCAGAGTCCAGGGCTACTCTGTATTTCCAGGCAAATCGCATCCCACTTTGTA
 GCCCTCGTAAGTTTTCTTGGGATGGAAATTGAAAACAAAACCTAAATCTTCACGTT
 AAAGACAATAACCTTTTCTCATCGTTCATGTCGCTGACGATCTGCTTTGACGACGA
 AAGGAAGGAAAATCTCTCATCGAGCGCATTTCATCGCTTGGTCAAAGCGTAAGTACAT
 GAACATGGCGTTCACTAGTCACAGGTGTTCCGAGGTGACAGCAGACGTGCGATTTCAT
 GTACTTGTACCGCAAGTGATCAGTGTCCACAAGGCTCCACTGTGCTGTCATTTATC
 ATAGCTCCAGTTGTTCCCTTCTCTTGGAAAGTCAATCCATTCTGGGTGACCAAACCTC
 ATTTCCATAAAAATTCAAGTAGCCATCACCTCCAAGGGCCATTGTGATGAAGTGAAT
 CATCTTTTGGAGTGCAATCCCTCGATCAATTGTAGGTGAAGCAGGCTGCCAAGTCTG
 ACATGCCAGTGTACAACATGG

Anexo III

Trabalho Apresentado em Congresso

Silenciamento mediado por RNA interferente do gene *be1* que codifica para a Enzima de Ramificação do Amido I (SBE I) em Milho (*Zea mays* L.).

Cipriano, Thaís de Moura¹; Carvalho, Luiz Joaquim Castelo Branco²; Carneiro, Newton Portilho³; Carneiro, Andréa Almeida³; Aragão, Francisco José Lima²

¹Mestranda do Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Caixa Postal 04457, CEP 70910-970, Brasília, Distrito Federal, fone (61) 307-2828, e-mail thais@cenargen.embrapa.br; ² Pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa-Cenargen), Parque Estação Biológica (PqEB), Av. W5 Norte, Caixa Postal 02372, CEP 70770-900, Brasília, Distrito Federal, fone: (61) 3448-4700, e-mail: aragao@cenargen.embrapa.br; ³ Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), Rod. MG 424 KM 45, Caixa Postal 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, Minas Gerais, fone (31) 3779 1000, e-mail : newtonc@cnpmis.embrapa.br.

O milho é uma cultura de grande importância econômica e o amido contido em seus grãos é altamente utilizado na nutrição humana, animal e também na indústria. O amido é composto de dois tipos de polímeros da glicose estruturalmente diferentes, a amilose constituída por cadeia linear, e a amilopectina com cadeia ramificada. A enzima de ramificação do amido (*Starch-Branching Enzyme* - SBE) catalisa a formação de ligações glicosílicas α -1,6, que podem afetar diretamente a estrutura da amilopectina. Esta diferenciação está associada à especificidade de substrato, que por sua vez é dependente das isoformas desta enzima. Em milho foram identificadas três isoformas da enzima de ramificação, a SBE I, SBE IIa e SBE IIb. As isoformas da enzima possuem propriedades diferentes entre si. O presente trabalho visa estudar o efeito do silenciamento do gene *be1* que codifica para a enzima de ramificação do amido I (SBE I) em milho e monitorar as alterações na estrutura da amilopectina do grão de amido. Para o silenciamento do gene *be1* foi construído um vetor de RNA interferente (pPKZmBE), que contém o gene *bar* como marcador de seleção. O plasmídeo foi utilizado na transformação genética de calos embriogênicos de milho via biobalística. Foram obtidas 6 plantas de milho transgênico com o silenciamento do gene *be1*. As plantas transgênicas estão em fase de desenvolvimento em casa de vegetação. Após a fecundação, a progênie será avaliada por meio da análise molecular, morfológica e anatômica das sementes geneticamente modificadas.

PALAVRAS-CHAVE

Enzima de ramificação do amido I (SBE I) ; RNA interferente (RNAi); *Zea mays*;