

Transformação genética de milho com construções gênicas contendo o gene *AtDREB2A* visando tolerância à seca¹

Vanessa Diniz Barcelos Vasconcelos², Newton Portilho Carneiro³

¹ Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig

² Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas, Bolsista PIBIC do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/ FAPED

³ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

Introdução

O milho, uma das culturas mais antigas do mundo, é considerado hoje a terceira cultura mais importante no mundo, não só pelo seu valor nutritivo, mas também economicamente (DUARTE et al., 2008). Em termos de área semeada e de produção de grãos é o segundo cereal mais importante no Brasil (VILARINHO, 2005).

As alterações climáticas, como a seca, acarretam grandes problemas na cultura do milho. Esse cereal, apesar de tolerar temperaturas de até 30°C, necessita de uma boa irrigação, pois absorve uma quantidade alta de água por dia. O déficit hídrico faz com que o intervalo da emergência do pendão até o aparecimento dos estigmas aumente de três a quatro dias fazendo com que, por falta de polinização, se desenvolvam espigas estéreis ou com poucos grãos. Há a inibição do alongamento do estilete e o retardamento na emergência dos estigmas, que fazem com que estes fiquem menos expostos à polinização. A seca acarreta ainda a diminuição no número de grãos por espigas no milho. Considerando a importância da cultura do milho, a necessidade de essa cultura atingir regiões remotas de pouca água e os efeitos climáticos que podem influenciar as precipitações anuais, tornam-se extremamente importantes estudos de mecanismos de tolerância à seca nessa planta como solução de parte desses problemas.

Dentre esses estudos para amenizar o déficit hídrico, deve-se aumentar a irrigação nas plantações agrônomicas e desenvolver mecanismos morfofisiológicos, que conduz as plantas a economizar água para uso em períodos posteriores.

A engenharia genética ganha importância para o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas sendo uma solução alternativa para os grandes produtores de todo o mundo. Pesquisadores do JIRCAS descobriram o gene *DREB2A* (*Dehydration Responsive Elements Binding protein*) que, ao ser introduzido à planta, possibilita uma tolerância a ambientes mais secos e de maior salinidade. Esse trabalho tem por objetivo testar a hipótese de superexpressar o gene *DREB2A* em milho e verificar o seu efeito em condições de estresse hídrico.

Material e Métodos

O genótipo utilizado para transformação foi o A188. As sementes foram plantadas a cada 7 dias e depois de 60 dias elas foram autofecundadas. Após 10 dias, as espigas foram retiradas com água sanitária diluída 50% por 10 minutos e os embriões foram retirados e colocados em meio de cultura conforme Tabela 1.

Os plasmídeos utilizados foram: 1) pBRACT 309 *DREB2A* CA; 2) pBRACT 302 35S *DREB2A* CA e; 3) pBRACT 302 Zm Rab17Pro *DREB2A* CA (Figura 1). As bactérias *Escherichia coli* contendo esses plasmídeos foram estriadas em placas contendo meio LB sólido contendo antibiótico Canamicina (100 ug/mL) e incubadas por 18 h a 37°C. Colônias isoladas dessas 3 bactérias foram crescidas individualmente em 2 ml de LB líquido contendo Canamicina na mesma concentração e incubadas por

18 h a 37°C com agitação. No dia seguinte foi extraído os plasmídeos dessas bactérias conforme o Alkaline Lysis Miniprep (AUSBEL et al., 1998).

Construction points:

1. *HindIII-ZmRAB17 pro-SmaI* fragment is inserted through *HindIII* and *EcoRV* sites.
2. *PstI-DREB2A-CA:NosT-EcoRI* fragment is blunted and inserted through *SmaI* site.

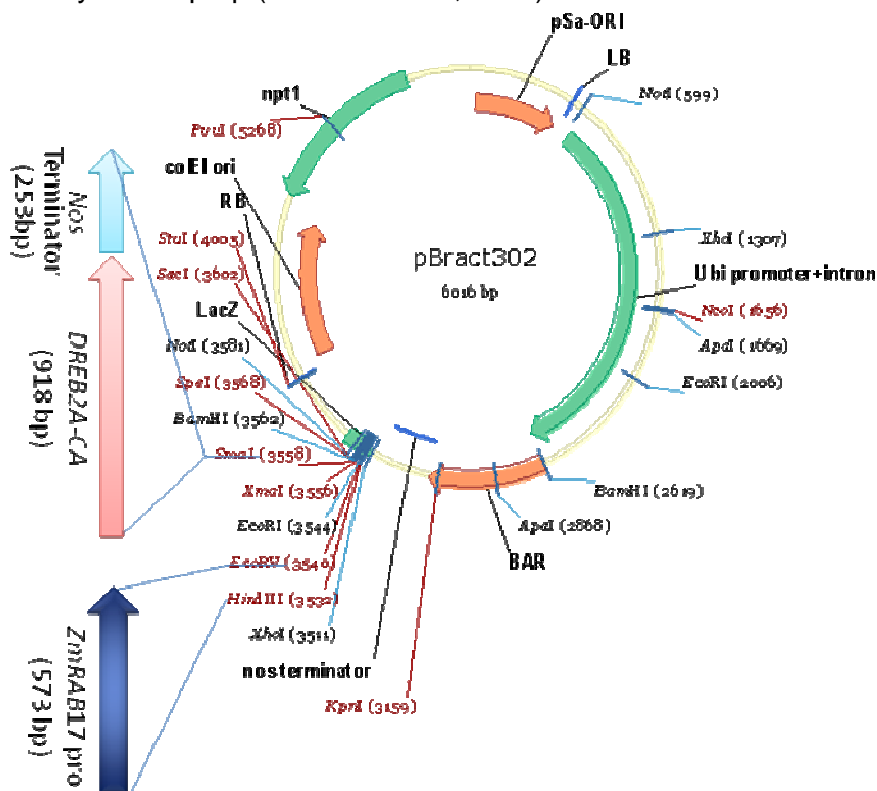


Figura 1: Plasmídeo pBract302 contendo a construção gênica promotor+DreB+Terminador

Após a extração de plasmídeos foi feita a clivagem com enzima de restrição. Para a clivagem foi realizado o seguinte processo: 1 µL de enzima de restrição (*EcoRI*, *BamHI* e *HindIII* – 10 U/uL), 1 µL de tampão, 2 µL de plasmídeo (200 ng/ul - Nanodrop) e 6 µL de água. Posteriormente, a reação foi colocada em banho-maria por uma hora a 37°C e submetida à eletroforese em gel de agarose 1% a 100 V com tampão TBE 1 X por 1 hora, corado com brometo de etídio e visualizado em UV. Os géis foram digitalizados.

A extração do plasmídeo para a transformação foi realizada através do Max Prep Plasmidial (QIAGEN).

O bombardeamento foi feito com embriões de 1 mm a 2 mm posicionados com o eixo embrionário em contato com o meio. O meio de cultura no momento em que é feita a retirada dos embriões é o meio IC que contém basicamente sais, vitaminas, carboidrato e água. A replicagem de calo é feita apenas das regiões embriogênicas saudáveis.

A concentração dos plasmídeos foi de 1 ug/uL com a aplicação de 5 a 8 µL em cada bombardeamento. Os embriões foram incubados no meio IC por uma semana e transferidos para meio de seleção (SE+3ppt) por duas semanas. Após esse período os embriões foram transferidos para novas placas com o mesmo meio de seleção anterior.

Como controle, embriões não bombardeados passaram pelos mesmos meios de seleção.

Como teste, foi também bombardeado calos do genótipo HI II com o plasmídeo pBRACKT 302 Zm Rab17Pro DREB2A CA, submetido os mesmos procedimentos que os embriões transformados.

Resultados e Discussão

Os resultados de clivagem dos plasmídeos estão conforme descrito na figura 2.

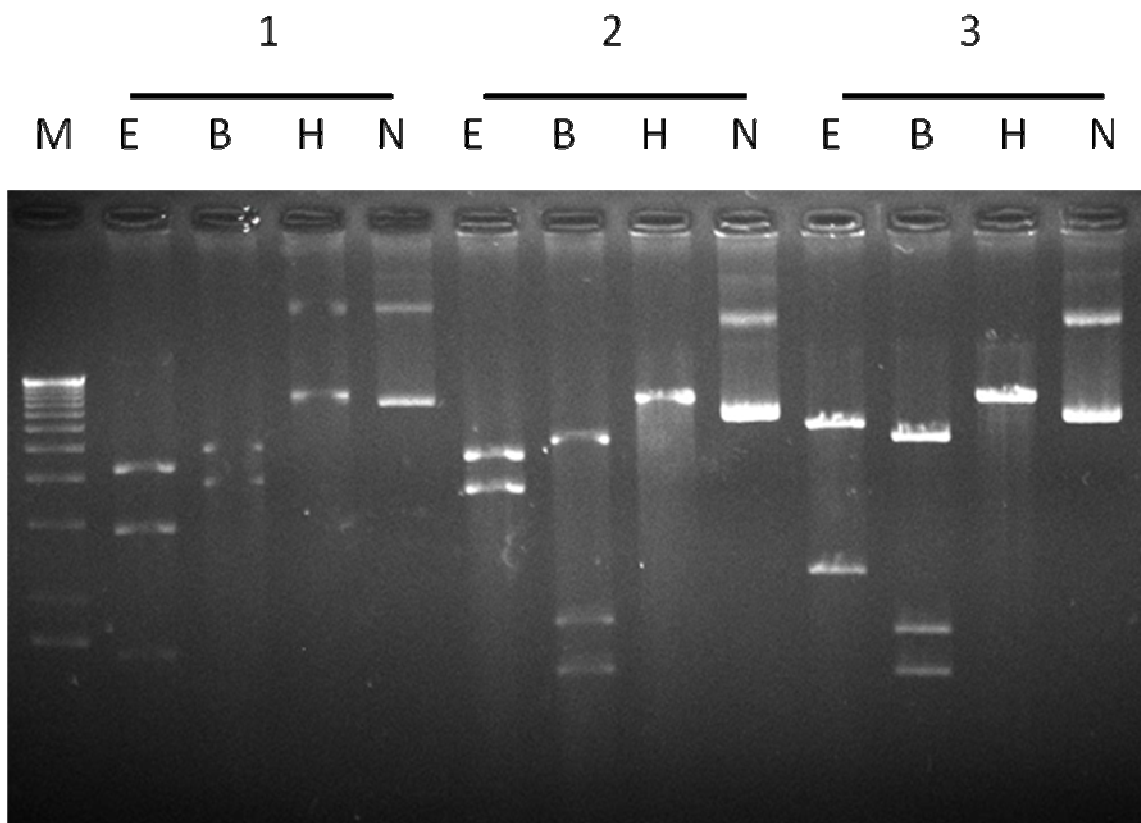


Figura 2 – Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio com os plasmídeos. 1) pBRACT 309 DREB2A CA; 2) pBRACT 302 35S DREB2A CA e; 3) pBRACT 302 Zm Rab17Pro DREB2A CA, clivados com as enzimas EcoRI, BamHI e HindIII. M = marcador molecular de 1 kb, E = EcoRI, B = BamHI; H = HindIII, N = plasmídeos não clivados

Foram realizados 10 experimentos até o momento, sendo que os 5 que estão no estágio mais avançado se encontram na tabela 1.

Quadro de Materiais de A188 Transformados por Biobalística

Data Bomb.	Explante	Plasmídeo	Meio IC		Meio SE+3ppt				Meio SE+6ppt				Meio RM+3ppt	
			Data	Nº Placas	Data 1ª trans	Nº Placas	Data 2ª trans	Nº Placas	Data 1ª trans	Nº Placas	Data 2ª trans	Nº Placas	Data	Nº Calos
18/11/2009	Embrião	pBRAC T 302 Zm Rab17Pro DREB2A CA	19/11/2009	30	17/12/2009	97	04/01/2010	156	-----	-----	-----	-----	22/02/2010	35
26/11/2009	Embrião	pBRAC T 309 DREB2A CA	27/11/2009	37	11/12/2009	109	04/01/2010	223	-----	-----	-----	-----	18/02/2010	48
05/10/2009	Calo	pBRAC T 302 Zm Rab17Pro DREB2A CA	05/10/2009	49	13/10/2009	106	-----	-----	30/10/2009	320	13/11/2009	498	07/01/2010	136
05/10/2009	Calo	pBRAC T 302 35S DREB2A CA	05/10/2009	31	13/10/2009	84	-----	-----	30/10/2009	197	13/11/2009	304	07/01/2010	104
06/10/2009	Calo	pBRAC T 302 Zm Rab17Pro DREB2A CA	07/10/2009	15	14/10/2009	53	-----	-----	28/10/2009	139	11/11/2009	299	07/01/2010	16

Tabela 1: Quadro com a relação das transformações de A188 em estágios mais avançados. 5 dos 10 realizados. Cada placa corresponde a 25 explantes.

Verifica-se um melhor interesse de experimentos com o plasmídeo pBRACT 302 Zm Rab17Pro DREB2A CA, intermediário com o pBRACT 309 DREB2A CA, e um menor interesse ao plasmídeo pBRACT 302 35S DREB2A CA, devido à região promotora, que é justamente o que os diferenciam. Sendo o 35S um promotor constitutivo, o *ZmDREB2A* acumula em plantas em resposta estresses de frio, desidratação, salinidade e calor.

Conclusão

Possíveis resultados positivos foram observados em calos crescendo em meio seletivo. Após a conformação dessa seleção, esse calos serão submetidos a meio de maturação e transferidos para cada de vegetação. As plantas T0 serão autofecundadas e parte das sementes usadas na fenotipagem. DNA das plantas T0 serão analisadas quanto a presença do gene.

Referências

AUSBEL, F. M; BRENT, R.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. Massachusetts: Jonh Wiley & Sons, 1998.

DUARTE, J. de O.; CRUZ, J. C.; GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J. Economia da produção. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 4. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de producao,2).

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 287-294, 1998.

VILARINHO, A. A. **Densidade e espaçamento como fatores de produtividade na cultura do milho**. 2005. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=237>>. Acesso em: 27 fev. 2010.