**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Transformação genética de milho com uma
nova proteína – a Zeolina**

Luciana Pimenta Ambrozevicius

**Tese apresentada, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2010**

Luciana Pimenta Ambrozevicius
Engenheiro Agrônomo

Transformação genética de milho com uma nova proteína – a Zeolina

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO**

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Ambrozevicius, Luciana Pimenta

Transformação genética de milho com uma nova proteína - a Zeolina / Luciana Pimenta
Ambrozevicius. - - Piracicaba, 2010.

144 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Aminoácidos 2. Melhoramento genético vegetal 3. Milho 4. Plantas transgênicas
Proteínas de plantas I. Título

CDD 633.15
A496t

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Continuo roendo as unhas, porque?

Não sei, acho que é pela mesma razão pela qual continuo colocando maiúscula na primeira letra de palavras que somente eu irei ler

Continuo chorando por nada, porque?

Não sei, talvez seja por tudo ou talvez seja por nada. O tudo que já me aconteceu e que me emociona quando olho fotos de pessoas que já se foram, e não se encontram mais nesse mundo, ou que já amei, e que não amo mais. O nada do que eu gostaria que tivesse acontecido, e que agora é muito tarde para acontecer

Isso são memórias? A saudade do que aconteceu e a vontade de ter acontecido naquele momento que já passou?

Então tenho memórias, e sinto saudades, de tudo aquilo que já se foi, e da promessa daquilo que está por vir

As pessoas, ahhhhh as pessoas que passam em nossas vidas... Essas sim eu tenho memórias, e saudades, de tudo que já tive e daquilo que quero ter. De cada simples momento compartilhado, de cada sorriso, de cada olhar. O olhar da família, o olhar dos amigos, o olhar dos amantes. Sorrisos e olhares, estes ficam para sempre

Será essa a inspiração ou será esse o sentimento?

Ao meu grande amor, Gleiber, companheiro de todos os momentos,
DEDICO

Aos meus queridos pais, Nelson e Nazareth, e a toda minha família,
pelo apoio incondicional,
OFEREÇO

A todos os meus amigos de coração, sempre presentes,
AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ricardo Azevedo, por permitir e apoiar, sempre, todas as idéias surgidas ao longo do trabalho.

Ao Departamento de Genética da ESALQ e à Universidade de São Paulo pela oportunidade de aprofundar o meu aprendizado e desenvolver um trabalho de pesquisa de qualidade.

À FAPESP pelos recursos financeiros concedidos durante a realização do doutorado.

Aos professores Alessandro Vitale e Paulo Arruda que contribuíram grandemente com o trabalho, cedendo clones e anticorpos utilizados na transformação do milho.

Ao professor Márcio de Castro pela estrutura do laboratório de biologia molecular, essencial para realização do trabalho.

Ao professor Daniel Scherer pelas valiosas contribuições e discussões ao longo de todo o trabalho.

À Embrapa Milho e Sorgo, principalmente à Dra. Andréa Carneiro, por todo o conhecimento sobre transformação de milho, gentilmente repassado.

Aos colegas do curso de Genética e Melhoramento de Plantas, pelas discussões teóricas e ajuda prática nos trabalhos.

A todos os amigos do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas pela convivência sempre agradável, em especial a Paula, Milca, Leila, Tiago, Salete e, principalmente a Daiana e a Gicka, sem os quais a realização do trabalho proposto não seria possível.

Aos meus queridos amigos “piracicabanos”, Pat, Felipe, Mateus e Renata, sempre presentes, apesar da distância.

Aos meus novos e velhos amigos de Brasília, Marquim, Márcia, Letícia, Claudinha, Juliana, Rodrigo, Marcus, Leonardo, Jaqueline, por acreditarem em mim e na conclusão deste trabalho.

Ler significa reler e compreender, interpretar. Cada um lê com os olhos que tem. E interpreta a partir de onde os pés pisam.

Todo ponto de vista é a vista de um ponto. Para entender como alguém lê, é necessário saber como são seus olhos e qual é sua visão de mundo. Isso faz da leitura sempre uma releitura. (...)

(...) Sendo assim, fica evidente que cada leitor é co-autor. Porque cada um lê e relê com os olhos que tem. Porque compreende e interpreta a partir do mundo que habita.

Estas são as palavras do teólogo Leonardo Boff, que na sua sabedoria podem ser extrapoladas para diversas áreas, inclusive do conhecimento científico. A descoberta está na curiosidade e na capacidade de interpretar a partir do mundo que habitamos. A possibilidade de questionar e tentar achar a resposta aos questionamentos levantados é, pra mim, o grande desafio de um trabalho de tese. Uma resposta que vai sendo construída aos poucos, com paciência e trabalho árduo, mas que nos têm permitido desvendar os grandes mistérios da biologia dos seres vivos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	19
INTRODUÇÃO.....	21
DESENVOLVIMENTO.....	27
2.1 Revisão Bibliográfica.....	27
2.1.1 Metabolismo da lisina.....	27
2.1.2 Proteínas de reserva.....	31
2.1.3 Estratégias para aumento da lisina em milho.....	35
2.1.3.1 Melhoramento convencional.....	35
2.1.3.2 Engenharia genética.....	37
2.1.3.2.1 Alteração do metabolismo da lisina.....	38
2.1.3.2.2 Alteração das proteínas de reserva.....	40
2.1.3.3 A síntese e o acúmulo da zeolina.....	44
2.2 Material e Métodos.....	50
2.2.1 Amplificação do promotor γ -kafirina e do gene da zeolina.....	50
2.2.2 Clonagem do promotor γ -kafirina nos vetores.....	53
2.2.3 Clonagem do gene zeolina nos vetores.....	54
2.2.4 Sequenciamento.....	55
2.2.5 Material vegetal para transformação.....	55
2.2.6 Meios utilizados.....	55
2.2.7 Transformação de explantes de milho por biobalística.....	57
2.2.8 Transformação dos explantes de milho com <i>Agrobacterium</i>	57
2.2.9 Seleção e regeneração das plantas transformadas.....	58
2.2.10 Aclimação das plantas em casa-de-vegetação.....	58
2.2.11 Produção de material vegetal.....	59
2.2.12 Identificação das plantas transformadas: testes biológicos, PCR, teste imunocromatográfico com tiras de fluxo lateral.....	60
2.2.13 Extração e análise do RNA.....	61

2.2.14 Extração e análise das proteínas de reserva.....	62
2.2.15 Western Blot.....	64
2.2.16 Hidrólise ácida das frações protéicas.....	64
2.2.17 Extração e dosagem dos aminoácidos solúveis.....	65
2.2.18 Separação e quantificação dos aminoácidos totais (solúveis + proteínas).....	65
2.3 Resultados.....	66
2.3.1 Síntese da construção usada na transformação do milho.....	66
2.3.2 Transformação dos explantes e seleção das plantas transformadas.....	71
2.3.3 Regeneração e aclimação das plantas transformadas (geração T ₀).....	76
2.3.4 Plantio e análise da geração T ₁	83
2.3.5 Plantio e análise da geração T ₂	88
2.3.6 Análise do padrão das proteínas de reserva.....	92
2.3.7 Análise da expressão gênica.....	105
2.3.8 Confirmação da transformação – Western Blot.....	108
2.3.9 Análise do perfil de aminoácidos.....	111
2.4 Discussão.....	115
3 CONCLUSÕES.....	131
REFERÊNCIAS.....	133

RESUMO

Transformação genética de milho com uma nova proteína – a Zeolina

A lisina é um dos aminoácidos essenciais e um dos fatores limitantes ao uso de cereais como o milho na alimentação pois, sem suplementação, não permite a obtenção de uma dieta balanceada. A fim de melhorar a qualidade nutricional dos cereais, várias tentativas têm sido feitas utilizando o melhoramento genético. Com o advento das técnicas de engenharia genética é possível, atualmente, utilizar a biotecnologia para aprofundar estes estudos, a fim de desvendar os complexos mecanismos que controlam o fluxo de aminoácidos nos grãos. O presente trabalho tem como objetivo principal testar uma nova estratégia que se baseia na expressão de uma proteína quimérica, a zeolina, sob controle de um promotor endosperma específico. A zeolina é uma combinação de 421 aminoácidos da faseolina do feijão com 89 aminoácidos da γ -zeína, inserida no genoma do milho sob controle de um promotor isolado da γ -kafirina de sorgo. Para que o objetivo do projeto fosse alcançado, o trabalho foi dividido nas seguintes etapas: i) Síntese da construção e clonagem nos vetores; ii) Transformação de embriões e calos de milho utilizando biobalística e *Agrobacterium tumefaciens*; iii) Cultura de tecidos para seleção e regeneração das plantas transformadas; iv) Verificação dos eventos de transformação através da análise do DNA, RNA e da proteína do transgene; v) Análises preliminares das plantas transformadas para o padrão das proteínas de reserva e perfil de aminoácidos dos grãos. A construção da zeolina foi amplificada por PCR com primers específicos e clonada nos vetores pCambia3301 e pTF102 sob controle do promotor da γ -kafirina. Os embriões e calos do milho híbrido Hill foram utilizados na transformação empregando-se a biobalística e *Agrobacterium tumefaciens*. No final do processo foram produzidas e multiplicadas oito plantas de milho transformadas com a zeolina, confirmadas por testes biológicos, PCR, sequenciamento e testes imunocromatográficos, representando seis eventos de transformação. A expressão gênica, verificada pela detecção do mRNA por PCR, foi constatada em seis eventos de transformação. Para detecção da proteína expressa pelo transgene foi utilizado anticorpo específico para faseolina, através do Western Blot. A banda relativa ao transgene foi detectada em três eventos de transformação. Nas análises preliminares não houve alteração no padrão das frações zeína, globulina, glutelina ou albumina nas plantas transformadas quando comparados com os controles. Também não houve diferenças significantes no teor de aminoácidos solúveis totais entre as plantas transformadas e os controles. Na determinação do perfil de aminoácidos no HPLC, o evento ZEO-3(3) apresentou as maiores concentrações para todos os aminoácidos analisados. Neste evento de transformação o teor de lisina foi de 25,76 mg/g de proteína, enquanto os controles apresentaram valores de 9,77 e 15,89mg/g de proteína. O evento ZEO-3(3) apresenta-se, portanto, como um candidato para estudos posteriores a fim de revelar os complexos mecanismos que controlam o fluxo de aminoácidos e o acúmulo das proteínas de reserva nos grãos de milho.

Palavras-chave: Milho; Zeolina; Lisina; Proteínas de Reserva

ABSTRACT

Maize genetic transformation with a new protein – the Zeolin

Lysine is an essential amino acid and a major factor limiting the use of cereals such as maize for food and feed as, without supplementation, does not allow obtaining a balanced diet. In order to improve the nutritional quality of cereals, several attempts have been made using the conventional breeding. With the advent of genetic engineering techniques it is now possible to use biotechnology to develop further studies and to unravel the complex mechanisms that control the flow of amino acids in grains. The present work aimed at testing a new strategy based on the expression of a chimeric protein, the zeolin, under the control of an endosperm specific promoter. The zeolin is a combination of 421 amino acids of bean phaseolin with 89 amino acids of the maize γ -zein inserted into the maize genome under the control of a promoter isolated from the protein γ -kafirin from sorghum. For the goal of the project to be reached, the work was divided into the following steps: i) Synthesis of the construction and the cloning vectors; ii) Transformation of embryos and callus of maize using the biolistic and *Agrobacterium tumefaciens* methods; iii) Tissue culture for selection and regeneration of transformed plants iv) Verification of transformation events through the analysis of the DNA, RNA and protein from the transgene; v) Preliminary analysis of transformed plants for the storage proteins pattern and amino acid profile of the grains. The zeolin construction was amplified by PCR with specific primers and cloned into the vectors pCambia3301 and pTF102 under the control of the promoter γ -kafirin. Embryos and callus of Hill hybrid were used in the transformation using the biolistic and *Agrobacterium tumefaciens*. At the end of the process of transformation, eight maize plants transformed with zeolin were produced and multiplied, confirmed by biological tests, PCR, sequencing and immunochromatographic tests, representing six transformation events. The gene expression, verified by detection of mRNA by PCR, was found in six events of transformation. The protein translation, verified by Western Blot using an antibody specific for phaseolin, was found in three transformation events. In the preliminary analysis, the pattern of zein, globulin, glutelin or albumin fractions did not change comparing transformed plants with the controls. There were also no significant differences in the content of soluble amino acids among the Western positive transformed plants and the controls. In the HPLC amino acid profile, the event ZEO-3(3) showed the higher concentrations for all amino acids analyzed. In this transformation event the content of lysine was 25,76mg/g protein, while the controls exhibited values of 9,77 and 15,89mg/g protein. Therefore, ZEO-3(3) event presents itself as a candidate for further studies to reveal the complex mechanisms that control the flow of amino acids and accumulation of storage proteins in maize kernels.

Keywords: Maize; Zeolin; Lysine; Storage Protein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aumento da produtividade do milho ao longo dos anos com a adoção de novas tecnologias.....	21
Figura 2 - Comparação entre os teores de proteína e de lisina em diferentes cereais.....	22
Figura 3 - Rota biosintética dos aminoácidos derivados do aspartato.....	28
Figura 4 - Mecanismos para síntese do DAP/Lisina em procariotos e em plantas.....	29
Figura 5 - Catabolismo da lisina e metabólitos derivados desta rota.....	31
Figura 6 - Esquema representando as estruturas que formam o grão de milho, bem como a localização das diferentes classes de zeína que formam o corpo protéico no endosperma.....	34
Figura 7 - Comparação do padrão das proteínas de reserva do milho selvagem e do mutante Opaco-2.....	36
Figura 8 - Seqüência de aminoácidos da proteína zeolina.....	45
Figura 9 - Esquema geral do plasmídeo pCambia3301 com os sítios de restrição e o mapa funcional.....	51
Figura 10 - Esquema geral do plasmídeo pTF102 com 125os sítios de restrição e o mapa funcional.....	52
Figura 11 - Gel de agarose mostrando o fragmento da γ -kafirina liberado após digestão enzimática.....	67

Figura 12 - Gel de agarose mostrando o fragmento da zeolina liberado após digestão enzimática.....	68
Figura 13 - Gel de agarose mostrando a banda relativa ao promotor γ -kafirina+zeolina amplificada.....	69
Figura 14 - Gel de agarose mostrando a banda relativa ao promotor γ -kafirina+zeolina amplificada por PCR direto das colônias de <i>A. tumefaciens</i>	69
Figura 15 - Gel de agarose para determinar a concentração do plasmídeos.....	70
Figura 16 - Alinhamento entre a seqüência do promotor da γ -kafirina de sorgo (Nº de acesso X62480 GI:671655 do Gene Bank) (“query”) e a seqüência obtida com o sequenciamento do inserto clonado no plasmídeo pTF102 (“sbjct”) utilizando o programa BLAST.....	71
Figura 17 - Embriões imaturos de milho híbrido Hill com 7 dias.....	72
Figura 18 - Calos tipo II desenvolvidos a partir de embriões do milho híbrido Hill ressaltando-se a estrutura friável dos calos obtidos.....	73
Figura 19 - Equipamento “Gene Gun” utilizado nos procedimentos de transformação por biobalística.....	73
Figura 20 - Embriões imaturos de milho híbrido Hill recém-coletados.....	74
Figura 21 - Calos embriogênicos tipo II transformados por biobalística crescendo em meio seletivo.....	75
Figura 22 - Calos embriogênicos tipo II transformados com <i>Agrobacterium</i> crescendo em meio seletivo.....	76

Figura 23 - Calos embriogênicos tipo II transformados por biobalística em fase de regeneração.....	77
Figura 24 - Plantas potencialmente transformadas em fase de aclimação em casa-de-vegetação.....	78
Figura 25 - Gel de agarose da PCR para confirmação da presença do transgene nas plantas transformadas com a construção γ -kafirina+zeolina.....	80
Figura 26 - Planta de milho transformada com a zeolina apresentando espiga.....	81
Figura 27 - Esquema geral do processo de transformação, indicando quantas plantas e eventos foram obtidos em cada etapa do processo.....	82
Figura 28 - Sementes do evento ZEO-7 mostrando a desuniformidade em relação ao tamanho das sementes obtidas.....	83
Figura 29 - Plântulas de milho antes e após aplicação do herbicida Finale usado como agente de seleção das plantas transformadas.....	84
Figura 30 - Gel de agarose da PCR para confirmação da presença do transgene nas plantas transformadas com a construção γ -kafirina+zeolina (650pb) e do controle com gene da actina (500pb).....	86
Figura 31 - Espigas das plantas ZEO-3(3) (a) e ZEO-9(10) (b).....	88
Figura 32 - Plântulas em fase de transplante para os vasos e visão geral do experimento na casa-de-vegetação.....	89

Figura 33 - Teste imunocromatográfico de 15 plântulas originadas do evento ZEO3(3).....	90
Figura 34 - Planta ZEO-3(3)-30 com desenvolvimento menos vigoroso do que a planta ZEO-4(9)-9.....	91
Figura 35 - (a) Planta ZEO-3(3) -16 apresentando crescimento indeterminado (b) Planta ZEO-3(3)-21 apresentando folhas estriadas. (c) Plantas ZEO-9(5)-4 apresentando encarquilhamento das folhas mais novas.....	92
Figura 36 - Testes com tiras de fluxo lateral para detecção da proteína PAT utilizando fragmentos de diferentes tamanhos do grão de milho.....	93
Figura 37 - Géis SDS-PAGE da fração Zeína I.....	96, 97, 98
Figura 38 - Géis SDS-PAGE da fração Zeína II.....	98, 99, 100
Figura 39 - Géis SDS-PAGE da fração Globulina + Albumina.....	101,102, 103
Figura 40 - Géis SDS-PAGE da fração Glutelina.....	103,104, 105
Figura 41 - Gel de agarose mostrando a banda relativa à amplificação de um fragmento da faseolina do mRNA expresso pelo transgene.....	108
Figura 42 - Western Blot da fração zeína I com anticorpo anti-faseolina.....	109, 110
Figura 43 - Western Blot da fração Zeína II com anticorpo anti-faseolina.....	110, 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Plantio, germinação e seleção das plantas transformadas na geração T ₂	85
Tabela 2 - Resumo da PCR realizada para detecção da zeolina nas plantas transformadas.....	87
Tabela 3 - Resumo do teste imunocromatográfico de tira em fluxo lateral.....	90
Tabela 4 - Resultados do teste com tiras de fluxo lateral para detecção da proteína PAT na geração T ₂ de plantas de milho transformadas com a zeolina.....	94
Tabela 5 - Determinação quantitativa da fração zeínaII nos grãos de milho através de leitura no espectrofotômetro.....	95
Tabela 6 - Teste para extração de RNA utilizando diferentes metodologias.....	106
Tabela 7 - Determinação dos aminoácidos solúveis totais nos grãos de milho.....	112
Tabela 8 - Determinação da proteína total e concentração de aminoácidos.....	114

1 INTRODUÇÃO

O milho originou-se na América Central e, através das navegações nos séculos 16 e 17, foi rapidamente adotado pelos povos da África, Ásia e Europa. Com a introdução dos híbridos de milho de alta produção na década de 50, o milho tornou-se a cultura mais cultivada em todo o mundo. O United States Department of Agriculture - USDA estima para a safra 2008/09 uma produção mundial de 777,56 milhões de toneladas de milho e, no Brasil, a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB prevê que a produção deve variar entre 54,317 e 55,210 milhões de toneladas cultivados em uma área entre 14,483 e 14,643 milhões de hectares. Os três principais países produtores de milho são os Estados Unidos, a China e o Brasil.

O melhoramento convencional do milho teve uma enorme contribuição no aumento da produtividade dessa cultura (Figura 1). Tal aumento de produtividade foi essencial para uma maior oferta de alimentos, importância esta que só deverá aumentar nas próximas décadas, visto que a população mundial cresce a taxas exponenciais, sendo estimado pela Organização das Nações Unidas – ONU uma população de 9,1 bilhão de pessoas em 2050, um valor 34% maior do que os 6,8 bilhões atuais. Neste cenário previsto, a Food and Agriculture Organization - FAO estimou que a agricultura terá que crescer 70% globalmente (cerca de 100% nos países em desenvolvimento) para atender a demanda por alimentos.

Figura 1 - Aumento da produtividade do milho ao longo dos anos com a adoção de novas tecnologias (http://www.seednews.inf.br/portugues/seed125/artigocapa125_shtml)

O milho é considerado uma cultura de grande importância na nutrição animal e humana, sendo uma importante fonte de energia metabolizável na forma de amido, mas que apresenta, no entanto, uma baixa qualidade protéica devido ao reduzido teor de alguns aminoácidos essenciais.

O teor de aminoácidos é um parâmetro de grande importância para determinar a qualidade nutricional das plantas. Dos 20 aminoácidos incorporados nas proteínas, 9 (lisina, treonina, metionina, fenilalanina, triptofano, isoleucina, leucina, valina e histidina) são considerados essenciais por não serem sintetizados por humanos e animais monogástricos e tem que ser, portanto, adquiridos através da alimentação (FERREIRA et al., 2005). Proteínas vegetais fornecem 65% do total de proteínas ingeridas no mundo inteiro, com grãos de cereais representando até 50% deste valor. Em países em desenvolvimento a importância dos cereais é ainda maior, sendo a principal fonte protéica na dieta da maioria da população (MILLWARD, 1999).

O quadro da Figura 2 adaptado da FAO (2002), apresenta, especificamente para lisina, as quantidades limitantes encontradas nos diferentes cereais. Visto que a qualidade protéica de um alimento está diretamente relacionada com a sua composição de aminoácidos, principalmente de aminoácidos essenciais, o milho apresenta os menores teores de lisina entre os cereais comparados.

Cultura	Proteína (%)	Lisina (%)
Milho	8.0-11.0	1.80-2.00
Trigo	11.0-14.0	2.50-3.20
Arroz	7.0-9.0	3.50-4.00
Cevada	8.0-11.0	2.90-3.20
Aveia	12.0-14.0	3.80-4.00
Sorgo	9.0-11.0	2.00-2.80

Figura 2 - Comparação entre os teores de proteína e de lisina em diferentes cereais

Estas limitações representam, por um lado, problemas na nutrição humana e animal que acarretam a necessidade de complementação da dieta com outras fontes protéicas (FAO, 1973), e por outro lado, o excesso de determinados aminoácidos causa problemas de contaminação ambiental devido ao excesso de nitrogênio excretado (OENEMA, 2004).

Estudos realizados por diferentes pesquisadores mostraram que crianças com problemas de nutrição alimentadas com variedades de milho com alta lisina obtêm melhoria de diferentes características, tais como ganho de peso e altura, quando comparadas à crianças alimentadas com o milho convencional (GRAHAM et al., 1980; ORTEGA et al., 2008). Da mesma forma o alto valor biológico do milho com alta lisina é importante na dieta animal, já que neste caso proteínas de plantas são as fontes primárias de proteínas. As formas comumente utilizadas para suplementar a dieta animal com relação à deficiência de determinados aminoácidos, no caso do milho em relação aos aminoácidos lisina, triptofano e treonina, são com o uso de farelo de soja, de aminoácidos produzidos por fermentação bacteriológica ou de variedades melhoradas para o aminoácido em questão. A utilização de lisina sintética para complementação da ração de porcos e frangos representa, no entanto, grandes gastos para o setor produtivo. Trabalho realizado nos EUA mostrou que, dobrando o conteúdo de lisina nos grãos de milho, sem alterar o conteúdo protéico, poderia representar uma economia de cerca de \$360 milhões anuais para os EUA no mercado mundial de rações (JOHNSON et al., 2001).

Um ponto constante do melhoramento genético de plantas tem sido então a alteração da composição dos aminoácidos a fim de torná-la mais adequada aos requerimentos nutricionais (FERREIRA et al., 2005). As estratégias utilizadas no melhoramento podem ser divididas em dois tipos, aquelas que utilizam o melhoramento convencional e as que utilizam técnicas de engenharia genética. O melhoramento convencional para aumento da lisina tem utilizado o mutante natural Opaco-2 (MERTZ; BATES; NELSON, 1964), que apresenta alteração no padrão das proteínas de reserva acumuladas e teores de lisina cerca de duas vezes maiores que o teor do milho convencional. Na engenharia genética, duas estratégias principais têm sido

empregadas: a alteração de enzimas envolvidas no metabolismo da lisina ou a alteração do padrão das proteínas de reserva. A transgenia apresenta grandes atrativos por possibilitar a identificação do gene de interesse em organismos diversos e a sua inserção específica no genoma da planta, permitindo diversos estudos e aplicações desse transgene (ZHU et al., 2007).

Na definição da estratégia utilizada no projeto, a fim de produzir plantas de milho transgênico com alto teor de lisina, foi feita uma revisão bibliográfica que possibilitou a comparação das vantagens e desvantagens de cada uma, optando-se por concentrar esforços na estratégia de expressão de proteínas de reserva de outras espécies vegetais ricas em lisina e, neste caso, a proteína que se apresentou mais promissora foi a zeolina, uma proteína quimérica contendo uma combinação de 421 aminoácidos da faseolina do feijão com 89 aminoácidos da γ -zeína, descrita por Mainieri et al. (2004). Para o objetivo do trabalho a zeolina possui o grande atrativo de conter 25 resíduos de lisina na porção da faseolina e os domínios responsáveis pela retenção no retículo endoplasmático (RE) no fragmento da γ -zeína do milho, o que poderia aumentar a estabilidade da proteína quimérica expressa no milho.

Dessa forma a hipótese do presente trabalho é de que a expressão estável de uma proteína de reserva nutricionalmente balanceada no endosperma de milho acarretará em mudanças nas rotas metabólicas e, conseqüentemente, nos teores finais de aminoácidos, principalmente de lisina, nos grãos. A fim de investigar esta hipótese foi definida a estratégia baseada na expressão de uma proteína quimérica, a chamada zeolina, sob controle de um promotor endosperma específico isolado da γ -kafirina de sorgo e a transformação de plantas de milho com essa construção. Para que o objetivo proposto fosse alcançado, o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- Síntese da construção a ser utilizada na transformação do milho: zeolina sob controle do promotor da γ -kafirina;
- Clonagem da construção nos vetores adequados para transformação;
- Transformação das plantas de milho com os plasmídeos contendo a construção γ -kafirina + zeolina, utilizando os métodos de biobalística e *Agrobacterium tumefaciens*;

- Seleção e regeneração das plantas transformadas;
- Multiplicação dos eventos em casa-de-vegetação;
- Verificação dos eventos de transformação através da análise do DNA, do RNA transcrito e da proteína traduzida;
- Análises preliminares das plantas transformadas para características de interesse, como padrão das proteínas de reserva e perfil de aminoácidos nos grãos.

Com a obtenção de plantas transformadas expressando a zeolina, questões relacionadas à regulação das relações fonte/dreno de aminoácidos na planta e dos controles enzimáticos da síntese, catabolismo e acúmulo das proteínas de reserva poderão ser investigadas em trabalhos subsequentes. Com o objetivo do presente projeto alcançado, teremos um material que apresenta possibilidades e aplicações diversas na pesquisa, a fim de responder questões relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e acúmulo das proteínas de reserva que, se melhor esclarecidas, aumentam as chances de sucesso do melhoramento genético visando às características nutricionais do milho.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Metabolismo da lisina

Plantas superiores sintetizam lisina, treonina, metionina e isoleucina utilizando como precursor comum o L-aspartato- β -semialdeído (ASA) conforme esquematizado na figura 3 (CRACIUM; JACOBS; VAUTERIN, 2000). Na via de síntese de lisina o principal controle é exercido pelas enzimas aspartato kinase (AK, EC 2.7.2.4) e dihidrodipicolinato sintase (DHDPS, EC 4.2.1.52). Embora ocorra retro-inibição das duas enzimas, a DHDPS apresenta uma sensibilidade maior a lisina (K_i 5-50 μ M) do que a AK (K_i 200-600 μ M). Alguns pontos de controle do metabolismo da lisina são conhecidos, mas ainda não se sabe como diferentes rotas regulam e distribuem o composto ASA de acordo com as necessidades de síntese de cada aminoácido. Estudos com mutantes apresentando uma menor atividade da DHDPS, a primeira enzima envolvida especificamente na síntese de lisina, mostram mudanças na síntese dos aminoácidos, com uma pequena redução na lisina acumulada, e mostram, principalmente, uma grande acúmulo de treonina nos mutantes, sugerindo que enzimas da via da lisina e da treonina competem pelo substrato comum, o composto ASA (SARROBERT et al., 2000). Cracium, Jacobs e Vauterin (2000) sugerem que a simples regulação por feedback negativo das enzimas chaves relacionadas a via do aspartato não poderia explicar os altos níveis de treonina acumulados pelos mutantes da DHDPS, sugerindo a existência de outros mecanismos, como a formação de complexos protéicos modulando a suscetibilidade dos sítios alostéricos, capazes de controlar o fluxo de carbono entre as diferentes rotas da via do aspartato.

Figura 3 -Rotas biosintéticas dos aminoácidos derivados do aspartato

As principais enzimas que determinam o fluxo para síntese dos diferentes aminoácidos estão indicadas com números. As setas curvas indicam a ocorrência de regulação por retroinibição

Assim como em procariotos, a biosíntese da lisina em plantas utiliza como intermediário o ácido diaminopimélico (DAP) (VOGEL, 1959). Em procariotos são conhecidas três rotas para síntese da lisina utilizando o DAP (Succinil CoA, Acetil CoA e Ddh) (HUDSON et al., 2006):

Até recentemente especulava-se que as plantas utilizavam uma destas rotas. A descoberta de qual rota seria utilizada pelas plantas começou a ser elucidada por Hudson et al. (2005) que verificou a existência de ortólogos dos genes bacterianos DapA, DapB, DapF e LysA em plantas, mas não encontrou atividade de Ddh, DapC, DapD e DapE nestas plantas. Apenas recentemente foi descoberta e caracterizada a existência de uma transaminase capaz de catalizar a formação de LL-DAP a partir do THDPA, a LL-DAP aminotransferase (LL-DAP-AT, EC 2.6.1.83), pulando os passos catalizados pela DapD, DapC e DapE nos procariotos e caracterizando uma quarta

variante das rotas do DAP já caracterizadas, conforme demonstrado no diagrama da figura 4 (HUDSON et al., 2006).

Figura 4 - Mecanismos para síntese do DAP/Lisina em procariotos e em plantas

Abreviaturas: **THDPA** = L-2,3,4,5-tetrahidrodipicolinato; **LL-DAP** = LL-2,5-diaminopimelato; **mDAP** = m-2,6diaminopimelato; **DapA** = dihidrodipicolinatosintase; **DapB** = dihidrodipicolinato-reductase; **DapD** = THDPA-aciltransferase; **DapC** = N-acyl-L-2-amino6oxopimelato-aminotransferase; **DapE** = N-acyl-LL-2,6diaminopimelato-deacilase; **DapF** = DAP-epimerase; **LysA** = m-DAP-decarboxilase; **Ddh** = m-DAP-desidrogenase; **LL-DAP-AT** = LL-DAP-aminotransferase

Além de *Arabidopsis thaliana* e cianobactéria, estudos posteriores comprovaram a existência da LL-DAP-AT também em *Chlamydia* sp, sugerindo a existência de um ancestral comum com a linhagem dos cloroplastos/plantas, e se apresentando como um potencial alvo para inibidores de síntese, já que infecções por *Chlamydia* ocorrem em humanos e animais em todo o mundo (McCOY et al., 2006). Esta é uma importante descoberta, pois esta enzima poderia se constituir num alvo atrativo para antibióticos ou herbicidas, visto que esta é uma rota metabólica ausente em humanos. A cristalização e determinação da estrutura tridimensional da LL-DAP-AT possibilita que novos estudos sejam feitos, a fim de se determinar a especificidade do substrato e os mecanismos catalíticos desta nova enzima (WATANABE et al., 2007).

Além da complexa regulação que existe entre as rotas para síntese do diferentes aminoácidos através de um precursor comum, o acúmulo de lisina também envolve a regulação do seu catabolismo. A lisina é catabolisada em plantas por duas enzimas, a lisina cetoglutarato redutase (LKR; EC 1.5.1.8) é a primeira desta via, a qual condensa lisina e cetoglutarato para formar sacaropina, que por sua vez é hidrolisada em ácido aminoadípico e ácido glutâmico em uma reação catalisada pela enzima sacaropina desidrogenase (SDH; EC 1.5.1.9) conforme esquema apresentado na figura 5 (STEPANSKI et al., 2006) A complexa regulação da atividade destas enzimas em parece estar intimamente associada com funções relacionadas ao desenvolvimento da planta e resposta ao stress (STEPANSKI; GALILI, 2003). Embora as enzimas LKR e SDH possam estar presentes em vegetais como enzimas monofuncionais, muitos trabalhos têm demonstrado que a maior parte da atividade da LKR e SDH está presente em um polipeptídeo bifuncional. Em *Arabidopsis* e milho foram isolados os genes que codificam a enzima bifuncional, a lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase (LKR/SDH), capaz de condensar lisina e cetoglutarato para formar sacaropina e subsequentemente converter sacaropina a ácido aminoadípico e glutamato (KEMPER et al., 1999).

Figura 5 - Catabolismo da lisina e metabólitos derivados desta rota
A seta interrompida indica a existência de diversas reações enzimáticas não especificadas na figura

2.1.2 Proteínas de reserva

As sementes representam um órgão especial com relação ao metabolismo de aminoácidos, já que estes são armazenados em grandes quantidades nas chamadas proteínas de reserva para serem utilizados como fonte de nitrogênio e energia durante o processo de germinação. Para que as proteínas de reserva executem a sua função na germinação, elas devem possuir três características principais (GALILI; HOFGEN, 2002):

- deposição em compartimentos intracelulares para evitar a degradação prematura por proteases;
- formação de uma estrutura especial, o corpo protéico, capaz de sofrer desidratação e de ser reidratado durante o processo de germinação;
- controle rigoroso do balanço entre aminoácidos livres e incorporados na proteína, que por sua vez depende do transporte de metabólitos de carbono, nitrogênio e enxofre produzidos nas partes vegetativas da planta.

As proteínas de reserva de cereais são classificadas em grupos de acordo com suas características de solubilidade (OSBORNE, 1924; LANDRY et al., 2005):

- albuminas (solúveis em água)
- globulinas (solúveis em soluções salinas)
- glutelinas (solúveis em soluções ácidas ou alcalinas diluídas)

- prolaminas (solúveis em álcool)

Normalmente os grãos de milho contêm aproximadamente 70-75% de carboidratos, 3-5% de lipídeos, 9% de fibras e 9-11% de proteínas, sendo que as proteínas de reserva representam cerca de 70-90% do total de proteína no grão. As frações albumina e globulina constituem aproximadamente 6% das proteínas totais, a fração glutelina 30-40% e a fração prolamina, denominada de zeína no milho, pode ser encontrada em até 60-70% do total de proteína dos grãos maduros (LANDRY et al., 2005).

As frações zeína e glutelina se localizam principalmente no endosperma, enquanto que as frações albumina e globulina, embora sejam encontradas em todo o grão, estão presentes principalmente no embrião e em baixas quantidades no endosperma. A fração não-zeína dos grãos apresenta função estrutural e metabólica, enquanto a fração zeína tem a função de prover nitrogênio durante a germinação e estágios primários de crescimento das plântulas (HOLDING; LARKINS, 2006).

As prolaminas, ou zeínas, são assim denominadas devido ao seu alto conteúdo de prolina e aminas (glutamina) e a sua evolução ocorreu a partir da amplificação de pequenos peptídeos hidrofóbicos ricos em prolina e glutamina (HERMAN; LARKINS, 1999). Os peptídeos que constituem a fração zeína se caracterizam pela deficiência dos aminoácidos lisina e triptofano, concentrações inadequadas de treonina e valina e um desbalanço entre os aminoácidos leucina e isoleucina. Em contraste, as frações albumina, globulina e glutelina apresentam concentrações balanceadas de aminoácidos essenciais, especialmente lisina e triptofano (HOLDING; LARKINS, 2006). As concentrações inadequadas de aminoácidos essenciais na fração zeína, predominante nos grãos, explicaria a concentração limitante de lisina no grão de milho (VASAL, 1994). Alguns trabalhos mostram que uma das explicações para a deficiência de alguns aminoácidos essenciais no milho poderia ser devido ao próprio processo de seleção e melhoramento ao longo das décadas para determinadas características agrônomicas, acarretando na perda de genes ao longo do processo que poderiam estar envolvidos com características diversas, dentre elas o metabolismo de aminoácidos e padrão das proteínas de reserva acumuladas (SWARUP et al., 1995; FLINT-GARCIA et al., 2009).

Baseado inicialmente na solubilidade diferencial em etanol 70% e nas suas relações estruturais e, posteriormente, na similaridade dos genes e na sequência de aminoácidos, as diferentes zeínas foram classificadas de forma distinta (SHEWRY; HALFORD, 2002):

- α -zeína (19 e 22 kDa) codificada por uma família multigênica;
- β -zeína (15 kDa) codificada por um gene;
- γ -zeína (16, 27 e 50 kDa) codificada por três genes;
- δ -zeína (10 e 18 kDa) codificada por dois genes.

Em milho as α -zeínas compreendem cerca de 60-70% do total de zeínas, as β -zeínas 10-15%, as γ -zeínas 10-15% e as δ -zeínas cerca de 5% (ADAMS et al., 2005).

Uma importante característica das proteínas de reserva é a formação do corpo proteico no endosperma, uma estrutura de cerca de 1-2 μ m que se forma através da interação entre as diferentes zeínas. Lending e Larkins (1989) propuseram um modelo inicial em que a β - e a γ -zeína iniciavam o processo e depois a α -zeína era incorporada no interior do corpo proteico. Neste esquema a α -zeína forma um núcleo central, com a β - e a γ -zeína formando uma camada externa. Posteriormente Esen e Stefler (1992) mostraram que pequenas quantidades das δ -zeínas também penetram no interior destes corpos proteicos, causando a expansão durante o seu desenvolvimento. Estudos usando o “two-hybrid system” (KIM et al., 2002) confirmaram que a γ -zeína 16 kDa e a β -zeína 15 kDa iniciam o processo nas células mais novas na região da sub-aleurona e determinam a região do RE em que o corpo proteico será formado. Passando para o endosperma o corpo proteico aumenta de tamanho, com a formação de lóculos centrais contendo α -zeínas. Finalmente esses lóculos se fundem para formar uma região central contínua constituída pelas α -zeínas e com as β - e γ -zeínas na região periférica do corpo proteico maduro, conforme esquematizado na figura 6 (GIBBON; LARKINS, 2005).

Figura 6 - Esquema representando as estruturas que formam o grão de milho, bem como a localização das diferentes classes de zeína que formam o corpo protéico no endosperma

Na biogênese do corpo protéico, 10 dias após a polinização (DAP), todos os genes da γ -zeína são expressos no endosperma, sendo a γ -zeína de 27 kDa expressa em maiores níveis, seguida pela γ -zeína de 16kDa e, em níveis mais baixos, a γ -zeína de 50kDa e a β -zeína de 15kDa. A expressão em altos níveis das α -zeínas de 19 e 22 kDa só ocorre em estágios posteriores (WOO et al., 2001). Estes trabalhos de expressão gênica foram complementados pelo trabalho de Kim et al. (2002) que mostrou todo o complexo processo de interações específicas entre os diferentes tipos de zeínas durante o desenvolvimento dos grãos de milho.

Após a montagem do corpo protéico, este pode ficar retido no RE ou ser armazenado no vacúolo, dependendo do tipo de proteína. As zeínas são retidas em corpos protéicos no RE, onde existem quatro hipóteses para explicar a formação do corpo protéico (VITALE; CERIOTTI, 2004):

- interação persistente com chaperonas moleculares;
- interação de domínios específicos com lipídeos da membrana do RE;
- ausência do sinal para exportação da proteína do RE;

- rápida agregação das proteínas para formação do corpo protéico que, devido ao seu tamanho, não pode ser carregada para região de empacotamento do RE.

Ainda não se conhece qual das alternativas explica a formação do corpo protéico e se mais de um mecanismo ocorre. Provavelmente diferentes proteínas de reserva possuam diferentes mecanismos de biogênese.

A formação do corpo protéico em milho é controlada em diversos níveis, incluindo a regulação espacial e temporal da expressão dos genes da zeína e a regulação da transcrição e das interações que ocorrem entre os diferentes tipos de zeínas (WOO et al., 2001; KIM et al., 2002).

2.1.3 Estratégias para aumento da lisina em milho

Dentro deste complexo cenário, onde atuam rotas metabólicas para síntese dos diferentes aminoácidos, para o controle dos processos de biossíntese e catabolismo da lisina e para a regulação do balanço entre aminoácidos livres e incorporados nas proteínas de reserva, diferentes estratégias têm sido utilizadas a fim de produzir plantas com maiores teores de lisina. Azevedo e Lea (2001) fazem uma revisão sobre os métodos utilizados para produzir variedades com altos teores de lisina, citando o melhoramento de plantas, a identificação de mutantes naturais, a indução de mutantes bioquímicos e a produção de plantas transgênicas como alternativas a serem utilizadas.

2.1.3.1 Melhoramento convencional

Uma estratégia para obtenção de plantas de milho com teores mais adequados de aminoácidos é a redução do acúmulo das α -zeínas, a fim de aumentar o acúmulo das outras classes de proteínas de reserva não-zeínas e, conseqüentemente, tornar a planta mais balanceada nutricionalmente.

Com este objetivo foram identificados uma série de mutações naturais do tipo opaco em milho. Tais mutações conferem um endosperma uniforme e amiláceo e maiores teores de lisina nos grãos. Estes mutantes podem ser recessivos (*opaque*), semi-dominantes (*floury*) ou dominantes (*Mucronate (Mc)* e *Defective Endosperm B30 (DE-B30)*).

O mutante natural Opaco-2 (*o2*) foi caracterizado e descrito em 1964 (MERTZ; BATES; NELSON, 1964). O mutante *o2* apresenta alteração no padrão das proteínas de reserva acumuladas, conforme observado na figura 7 (TABE; HAGAN; HIGGINS, 2002).

Figura 7 - Comparação do padrão das proteínas de reserva do milho selvagem e do mutante Opaco-2

A grande vantagem apresentada pelo mutante *o2* foram os níveis de lisina de cerca de 3,8%, enquanto o genótipo selvagem apresenta teores de 1,5%. Este aumento é resultado de um maior teor de lisina solúvel e de proteínas do tipo não-zeínas, além de uma redução do conteúdo das zeínas do grão (HUNTER et al., 2002).

Além da redução das zeínas e aumento das não-zeínas, os mutantes *o2* apresentam também alteração das proteínas e enzimas relacionadas ao metabolismo do açúcar e nitrogênio no endosperma de milho (HABBEN; KIRLEIS; LARKINS, 1993). A clonagem do gene *o2* revelou que este codifica um fator de transcrição do tipo zíper de leucina (bZIP) (SCHIMDT et al., 1992), capaz de, além de controlar a síntese das α -zeínas, fazer também o controle transcricional da enzima LKR/SDH, envolvida no catabolismo da lisina (BROCHETTO-BRAGA; LEITE; ARRUDA, 1992). Estudos realizados por Gaziola et al. (1999) mostraram que a atividade das enzimas envolvidas no catabolismo da lisina é reduzida de forma drástica, quando se compara o milho *o2* com as variedades convencionais. Nas variedades de milho *o2* parece existir, portanto, um mecanismo de controle que envolve tanto a redução da fração zeína quanto a

redução do catabolismo da lisina para que esta tenha os seus níveis totais aumentados no grão.

Apesar da grande vantagem de apresentarem quantidades de aminoácidos mais adequadas aos requerimentos nutricionais, as variedades de milho mutante do tipo opaco apresentam limitações para integração em programas de melhoramento comercial devido aos efeitos pleiotrópicos associados à característica de alta lisina. Nesses mutantes o endosperma mais amiláceo que o milho convencional acarreta problemas agrônômicos como maior susceptibilidade ao ataque de insetos e doenças, maiores teores de umidade e redução da produção. Para que características de um endosperma vítreo fossem introduzidas no mutante *o2*, um intensivo trabalho de melhoramento foi realizado pelo “International Maize and Wheat Improvement Center” (CIMMYT) desde a década de 60 que culminou no lançamento das variedades de milho denominadas QPM - “Quality Protein Maize”, que possui teores de lisina e triptofano maiores do que o milho convencional e níveis de produtividade semelhantes a este (Prasanna et al., 2001). A identidade molecular dos genes modificadores do *o2* introduzidos nas variedades QPM ainda não é totalmente conhecida e deve envolver diversos loci, mas foi demonstrado que o gene *Sugary2* que codifica a enzima amido sintase está envolvido (ZHANG et al., 2004). No QPM os níveis da γ -zeína de 27 kDa são 2-3 vezes maiores que no mutante *o2* (GEETHA et al., 1991), o que sugere o seu envolvimento nas modificações do endosperma tornando-o mais duro devido, provavelmente, a uma compactação dos corpos protéicos ricos na γ -zeína de 27 kDa ou a interação com a rede de amilopectina na superfície dos grãos de amido (DANNENHOFFER et al., 1995; GIBBON et al., 2003).

2.1.3.2 Engenharia genética

No melhoramento do milho utilizando a engenharia genética, duas estratégias principais têm sido utilizadas a fim de se produzir variedades com teores mais adequados de lisina: a alteração de enzimas envolvidas no metabolismo da lisina ou a alteração no padrão das proteínas de reserva.

2.1.3.2.1 Alteração do metabolismo da lisina

Na engenharia genética, a maioria dos esforços para aumentar o teor de lisina nas plantas têm utilizado a enzima DHDPS de bactérias que é muito menos sensível a retroinibição por lisina do que a DHDPS de plantas (FALCO et al., 1995; KWON et al., 1995; SHAUL; GALILI, 1992). Outra estratégia utilizada é a mutação da DHDPS de plantas tornando-a insensível a retroinibição (SHAVER et al, 1996). Ou seja, com essas alterações, a DHDPS não seria mais retroinibida por excesso de lisina e a rota de biosíntese desse aminoácido seria estimulada levando ao aumento da lisina.

Apesar dos promissores resultados bioquímicos obtidos pelos experimentos citados, a expressão constitutiva da enzima DHDPS de *E. Coli* em tabaco transgênico causou efeitos deletérios no fenótipo da planta, tais como degeneração dos órgãos florais e esterilidade (SHAUL; GALILI, 1992). A fim de solucionar este problema, foi utilizado o gene DHDPS de bactéria sob controle do promotor da faseolina, cuja expressão ocorre especificamente nas sementes. Sementes em desenvolvimento apresentaram um alto teor de lisina, mas este teor em sementes maduras foi o mesmo apresentado pelo controle com sementes não transformadas. Este resultado inesperado ocorreu, provavelmente, devido ao catabolismo, já que a superprodução de lisina nestas sementes estimulou a atividade das enzimas envolvidas no catabolismo da lisina (KARCHI; SHAUL; GALILI, 1994).

Diferentes respostas também podem ser obtidas de acordo com a espécie de planta testada. Experimentos com dicotiledôneas, como soja e canola, expressando a DHDPS de bactérias mostraram altos teores de lisina nas sementes, mas acarretaram em problemas na germinação destas (FALCO et al., 1995). Já em plantas transgênicas de milho, uma monocotiledônea, a expressão da DHDPS de bactérias no embrião das sementes aumentou os teores de lisina nos grãos, mas o mesmo resultado não foi obtido quando se utilizou um promotor endosperma específico devido, provavelmente, ao aumento do catabolismo da lisina nestas sementes (MAZUR; KREBBERS; TINGEY, 1999).

A significativa atividade de catabolismo da lisina em sementes observada em diferentes experimentos sugere que estratégias para aumentar o teor de lisina nos

grãos podem requerer a sua redução ou eliminação. No entanto, o procedimento exato para manipular este processo depende se esse é um processo essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta (GALILI; HOFGEN, 2002). Mutantes duplos de *Arabidopsis*, apresentando redução da expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na rota de catabolismo da lisina e expressando a DHDPS de bactérias, apresentaram um efeito sinérgico, onde o nível de lisina solúvel nas sementes foi até 80 vezes maior que o controle, mas neste caso as sementes também apresentaram germinação e desenvolvimento retardado (ZHU; GALILI, 2003).

A técnica do RNA interferente (RNAi) também tem sido utilizado para supressão do catabolismo da lisina. Em *Arabidopsis* foi utilizada uma seqüência dupla fita originada do domínio LKR da *LKR/SDH* com um promotor para expressão nas sementes e os resultados mostraram aumentos na lisina solúvel de 0,29-0,39mol% nas sementes controle para 0,21-2,11mol% nas sementes transformadas (ZHU; GALILI, 2004). Em milho também foram obtidos aumentos na lisina solúvel de 30 ppm para 500-700ppm quando se utilizou a transformação da planta com uma construção IR-*SDH* (seqüência repetida invertida do domínio SDH da *LKR/SDH*) sob controle de um promotor endosperma específico (HOUMARD et al., 2007).

A atividade da LKR/SDH já foi detectada tanto no endosperma quanto no embrião das sementes de milho (HOUMARD et al., 2007). Experimentos utilizando duas construções IR-*SDH*, uma sob controle de um promotor endosperma específico e outra embrião-específica foram utilizadas para transformação de milho. Os resultados mostraram que houve um efeito sinérgico no aumento da lisina solúvel nos grãos quando houve supressão da LKR/SDH tanto no endosperma quanto no embrião (REYES et al., 2009).

Frizzi et al. (2008) utilizaram um único cassete para suprimir a expressão da LKR/SDH (IR-*LKR/SDH*), reduzindo o catabolismo da lisina, e para expressar a enzima DHDPS de *Corynebacterium glutamicum* (CordapA), insensível a retro-inibição por lisina. Os resultados mostraram aumentos da lisina solúvel para 4000ppm e estimados 6500ppm de lisina total nos grãos, enquanto grãos convencionais apresentam cerca de 2500ppm de lisina, a maioria incorporada em proteínas na semente. Em trabalhos anteriores Huang et al. (2005) expressando a CordapA em embriões obtiveram

aumentos da lisina solúvel para 2000ppm, em um total de 4500ppm de lisina nos grãos de milho maduros. Os autores dos trabalhos apresentados não fizeram investigações suplementares sobre o efeito destas alterações no padrão das proteínas de reserva ou se existe um equilíbrio fonte/dreno entre o pool de lisina solúvel e a lisina incorporada nas proteínas do grão, pois neste caso parece que o aumento da lisina total dos grãos ocorreu exclusivamente devido a lisina que se concentra na forma livre no grão.

O único evento comercial de milho de alta lisina obtido pela engenharia genética, até o momento, é o milho LY038 da empresa Monsanto. O milho LY038 foi obtido através da introdução do gene *dapA*, de *Corynebacterium glutamicum*, que expressa uma forma da enzima DHDPs insensível à retro-inibição por lisina. Estudos com frangos alimentados com milho LY038, LY038xMON810 (outro evento de modificação genética que confere resistência a insetos) e milho convencional suplementado com lisina sintética L-Lys HCl mostraram valores superiores para as características de ganho de peso, eficiência alimentar e rendimento e composição da carcaça, quando comparados aos frangos alimentados com milho convencional. Os resultados mostraram que a bioeficácia da lisina do milho LY038 é equivalente ao milho convencional suplementado com a L-Lys HCl (LUCAS et al., 2007).

2.1.3.2.2 Alteração das proteínas de reserva

A alteração das proteínas de reserva é uma alternativa que se mostra promissora, com o uso da transformação de plantas para manipular estas proteínas, responsáveis pela incorporação da maioria dos aminoácidos em tecidos como sementes e tubérculos.

O primeiro trabalho para melhorar a qualidade nutricional das proteínas de reserva foi feito por Hoffman et al. (1988) utilizando a faseolina modificada com um peptídeo da β -zeína rico em metionina. Os resultados não mostraram acúmulo devido principalmente à falta de estabilidade da proteína nos vacúolos de armazenamento, mas os resultados mostraram que mesmo pequenas modificações na proteína podem alterar a sua estabilidade *in vivo*.

Experimentos posteriores foram realizados com tabaco expressando a β -zeína e a faseolina sob controle do promotor constitutivo 35S. Neste caso a faseolina só

mostrou algum acúmulo nas fases intermediárias e pós-maturação das sementes, enquanto a β -zeína apresentou-se estável, não só nas sementes em desenvolvimento, mas também nos tecidos vegetativos. Neste caso os autores especulam que a estabilidade/instabilidade da proteína do transgene pode ocorrer devido a menor solubilidade da zeína do que da faseolina em condições fisiológicas, com a conseqüente agregação das zeínas insolúveis que pode torná-la menos exposta à degradação proteolítica. Outra hipótese é de que proteases específicas para degradação de zeínas nativas não estejam presentes em dicotiledôneas (BAGGA et al., 1995).

A partir destes estudos iniciais para investigar os mecanismos que contribuem para a estabilidade das proteínas de reserva, diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de obter proteínas de reserva estáveis, ricas no aminoácido de interesse e com um acúmulo em altos níveis nas sementes.

No caso da transformação da planta com proteínas ricas em lisina, três estratégias têm sido abordadas por diferentes autores:

- a utilização de peptídeos sintéticos
- a transformação com uma proteína heteróloga
- a mudança no perfil das proteínas de reserva utilizando a técnica do RNAi

Utilizando a primeira estratégia Keeler et al. (1997) desenharam diferentes peptídeos sintéticos com uma conformação α -hélice contendo diferentes teores de lisina e triptofano e expressaram estes peptídeos inicialmente em *E. coli*. O peptídeo CP 3-5, contendo 31% de lisina e 20% de metionina, foi então selecionado e expresso em tabaco utilizando um promotor endosperma-específico. Os resultados mostraram a expressão do peptídeo de forma estável nas sementes maduras ao longo de três gerações, o que resultou num aumento do teor total de lisina nestas sementes.

Da mesma forma, Torrent et al. (1997) utilizaram uma proteína endógena modificada de milho, a γ -zeína com resíduos de lisina. Diferentes construções foram testadas e mostraram que somente um posicionamento correto do inserto contendo lisina produz uma proteína modificada com a correta conformação e estabilidade. Neste caso a construção da γ -zeína com cauda de lisina causou degradação da proteína modificada, enquanto a construção com maior chance de sucesso possui resíduos de

lisina inseridos no domínio Pro-Xaa mostrando que importantes características dos polipeptídeos engenheirados para expressão da lisina são a sua conformação, estabilidade e localização celular (TORRENT et al., 1997).

Resultados obtidos por Ohtani et al. (1991) em tabaco transgênico expressando α -zeínas modificadas com códons para expressão de lisina sob controle do promotor da β -faseolina mostram que estas α -zeínas são degradadas em tabaco, apresentando uma vida média de menos de uma hora. Em *Arabidopsis*, sequências ricas em lisina foram incorporadas no gene da α -zeína, entre a região N-terminal rica em prolina e a região C-terminal rica em cisteína, domínios necessários para a correta incorporação da α -zeína nos corpos protéicos do RE. Os resultados mostraram que estas α -zeínas transformadas sofreram uma modificação pós-transcricional e foram secretadas para a parede celular (ALVAREZ et al., 1998).

Com relação à segunda estratégia citada, algumas proteínas de plantas com potencial para aumentar o teor de lisina em milho já foram identificadas e clonadas. Um potencial candidato é a proteína inibidora da quimotripsina de cevada ("Barley Chymotrypsin Inhibitor-2", CI-2) uma proteína com apenas 84 resíduos e com 9,5mol% de lisina. Estudos têm sido realizados com mutantes desta proteína, enriquecidos em resíduos de lisina e, embora os mutantes identificados tenham uma menor estabilidade termodinâmica quando comparados à proteína nativa, apresentam interesse para transformação de plantas o mutante "loop" com 13,1mol% (FORSYTH et al., 2004) e o mutante BHL4 ("Barley High Lysine 4") com 20mol% de lisina (ROESLER; RAO, 1999). Estes mutantes apresentam um maior teor de lisina, alta estabilidade à desnaturação e atividade inibitória reduzida.

Resultados promissores que se encontram na fase de testes toxicológicos também foram alcançados com a expressão de uma proteína específica de pólen obtida de batatas (*Solanum berthaultii*), rica em resíduos de lisina, denominada sb401 (HE et al., 2009). A sb401 foi expressa em milho sob controle do promotor da α -zeína de 19kDa e aumentou os teores de lisina de 16,1 para 54,8% e a proteína total aumentou de 11,6 para 39% (% do peso do grão), comparando-se as plantas transformadas com o controle não transformado. Os aumentos observados foram mantidos por 6 gerações contínuas, indicando que a característica introduzida foi herdável (YU et al., 2004). A

proteína sb401 é, no entanto, pouco conhecida mas, devido a similaridade de sequência com a proteína de ligação aos microtúbulos, especula-se que esteja envolvida com a organização do citoesqueleto.

Além de proteínas de outras espécies de plantas, proteínas animais também têm sido pesquisadas para melhoria dos teores de aminoácidos no milho. Bicar et al. (2008) expressaram a proteína α -lactoalbumina do leite nos grãos de milho e obtiveram 2 eventos de transformação. A transformação foi confirmada por Southern blot e pelo Western blot e a análise dos teores de lisina no HPLC mostraram que os grãos transformados tiveram um aumento de 29 a 47% em relação aos controles.

No caso da terceira estratégia citada para transformação de plantas, baseada na utilização do RNAi, um alvo interessante para alteração do perfil de aminoácidos são as α -zeína, expressas de forma abundante no endosperma de milho e com uma composição desbalanceada de aminoácidos, principalmente lisina e triptofano. A fim de interromper ou reduzir a expressão da α -zeína de 22kDa, Segal, Song e Messing (2003) utilizaram a técnica do RNAi com uma construção da α -zeína inversamente repetida introduzida no genoma para silenciar os genes da α -zeína de 22kDa pós-transcrição (IR-22kDa). Os resultados mostraram uma redução da expressão da proteína de 22kDa, alterando o balanço de aminoácidos e aumentando de forma modesta os níveis de lisina nos grãos, com aumentos de 18,5 e 11,1% em cada evento obtido, em relação aos teores de lisina do controle não transformado.

Huang et al. (2004) empregaram a mesma estratégia, utilizando RNAi e tendo como alvo a α -zeína, no caso a 19kDa. Diferentes fragmentos isolados por PCR do gene da α -zeína de 19kDa foram inseridos em um cassete de expressão na orientação senso e antisenso e utilizados para transformar embriões imaturos de milho através de bombardeamento. A confirmação da redução de cerca de 30% da expressão da α -zeína de 19kDa foi feita através das técnicas de SDS-PAGE e MALDI-TOF MS. Os efeitos da redução da α -zeína de 19kDa na composição dos grãos mostraram aumento nos teores de metionina, lisina, triptofano e ácido aspártico e decréscimo dos aminoácidos prolina e leucina. Os teores de lisina e triptofano totais no evento com maiores aumentos apresentaram valores de 4,23% e 1,03%, respectivamente, percentuais dados em função do teor de proteína.

Em trabalhos posteriores, Huang et al. (2006) utilizaram novas construções expressando RNA fita dupla (dsRNA) a fim de aumentar a eficiência da supressão do gene e inseriram, além da α -zeína de 19kDa, seqüências da α -zeína de 22kDa. Os resultados mostram redução das α -zeínas de 19kDa e 22kDa e aumento dos níveis de lisina e triptofano. Os níveis de aminoácidos totais determinados no HPLC mostram valores de 5003ppm e 4533ppm em dois dos eventos de transformação que apresentaram redução ou supressão da α -zeínas de 19kDa e 22kDa, enquanto o genótipo não transformado apresentou valores de 2438ppm. Estes valores representam percentuais de até 5,62% de lisina no grão em função da proteína mensurada, quando comparados ao controles com 2,83% de lisina. É interessante observar que o maior conteúdo de lisina apresentado parece ser função de um aumento do teor de aminoácidos solúveis. A inibição da síntese de zeínas parece ter aumentado a síntese e/ou transporte de aminoácidos para os grãos em desenvolvimento. Nenhuma análise complementar para investigar o aumento das outras proteínas de reserva, visto que houve redução das zeínas mais abundantes no endosperma e não houve alteração na proteína total do grão foi, no entanto, realizado. A qualidade do endosperma das plantas transformadas também não foi mencionada no trabalho.

É importante ressaltar que a estratégia de suprimir a expressão das α -zeínas a fim de aumentar as proteínas não-zeínas no grão baseia-se nos mecanismos encontrados no mutante natural o2 e apresenta os mesmos potenciais efeitos negativos encontrados neste mutante, um endosperma opaco, altamente amiláceo, que apresenta uma série de características agronômicas não desejáveis.

2.1.3.3 A síntese e o acúmulo da zeolina

A zeolina é uma proteína quimérica composta por 421 aminoácidos da faseolina T343F do feijão com 89 aminoácidos da γ -zeína do milho (MAINIERI et al., 2004). A zeolina é composta pela seqüência completa da faseolina T343F, incluindo o peptídeo sinal, seguido por uma seqüência de ligação de 15 aminoácidos (GGGGS)₃ e 89 aminoácidos da γ -zeína, iniciando pelo décimo quinto resíduo após o peptídeo sinal da γ -zeína nativa (figura 8).

```

1  MMRARVPLLL LGILFLASLS ASFATSLREE EESQDNPFYF NSDNSWNTLF KNQYGHIRVL 60
61 QRFDDQSKRL QNLEDYRLVE FRSKPETLLL PQQADAELLV VVRSGSAILV LVKPDDRREY 120
121 FFLTSDNPIF SDHQKIPAGT IFYLVNPDPK EDLRIIQLAM PVNNPQIHEF FLSSTEAAQS 180
181 YLQEFKSHIL EASFNSKFEE INRVLFEEEG QQEGVIVNID SEQIKKLSKH AKSSSRKSL 240
241 KQDNTIGNEF GNLTERTDNS LNVLISSIEM EEGALFVPHY YSKAIVILVV NEGEAHVELV 300
301 GPKGNETLE YESYRAELSK DDVFVIPAAAY PVAIKATSNV NFFGFGINAN NNNRNLLAGK 360
361 TDNVISSIGR ALDGKDVGLL TFGSGGDEVM KLINKQSGSY FVDAHHHQQE QQKGRKGA 420
421 YGGGGSGGGG SGGGGSGGCG CQPPPPVHLP PPVHLPVHLP LPPPVHLPPP VHLPPPVL 480
481 PPVHVPPPVH LPPPPCHYPT QPPRPQHPQ PHPCPCQQPH PSPCQ

```

Figura 8 - Sequência de aminoácidos da proteína zeolina

Os resíduos 1 ao 421 representam a sequência completa da faseolina. O peptídeo sinal N-terminal está marcado em cinza-escuro e a sequência de ligação sintética está em cinza-claro. Os resíduos 437 ao 525 correspondem aos 89 resíduos da γ -zeína. Os resíduos de cisteína estão sublinhados

A expressão e direcionamento de proteínas nas plantas a fim de permitir a sua produção e acúmulo de forma estável tem sido extensivamente investigado (DORAN et al., 2006). A zeolina é uma proteína sintetizada de forma que permita a sua expressão e acúmulo em diferentes espécies vegetais, desenvolvida a partir dos resultados de diversos trabalhos que serão apresentados a seguir.

O polipeptídeo da γ -zeína de 27KDa pode ser dividido em três domínios principais: um domínio N-terminal constituído pelo hexapeptídeo PPPVHL repetido oito vezes (domínio “tandem repeat”), seguido por um domínio rico em prolina (domínio “Pro-rich”) e um domínio C-terminal rico em cisteína (domínio “Cys-rich”). Com o objetivo de investigar com mais detalhes os mecanismos que determinam o acúmulo dessas zeínas nos grãos, visto que não possuem a sequência sinal de peptídeos HDEL ou KDEL para retenção no RE, Geli et al. (1994) utilizaram mutações sítio-dirigidas para investigar os domínios funcionais da γ -zeína e mostraram a importância do domínio N-terminal e do domínio rico em prolina para retenção no RE, via interação com a membrana ou através de uma associação entre as proteínas. Em adição a esse resultado, esse trabalho inicial mostrou que somente os mutantes da γ -zeína contendo tanto o domínio N-terminal rico em prolina, quanto o domínio C-terminal rico em cisteína, era capaz de formar o corpo protéico, sugerindo que a retenção no RE e a formação do corpo protéico são eventos independentes controlados por domínios distintos da γ -zeína. É interessante observar que os resultados obtidos mostraram que é possível acumular a γ -zeína, independente do tipo celular em que ocorre a sua expressão. Nesse trabalho houve acúmulo da γ -

zeína em folhas de *Arabidopsis*, mesmo sendo uma proteína de reserva do grão de milho.

Em estudos com tabaco transformado para expressão da α -zeína, da γ -zeína ou de ambos, foi observado que o acúmulo estável da α -zeína requer a expressão da γ -zeína, mostrando que existe uma interação entre estas proteínas para formação do corpo protéico no RE (COLEMAN et al., 1996). Conforme trabalho anterior, estes resultados mostraram que a γ -zeína é capaz de formar corpos protéicos no RE tanto em tecidos vegetativos quanto de reserva, mesmo na ausência das demais classes de zeínas, indicando que nenhum outro fator tecido específico é requerido.

A faseolina, por sua vez, é uma glicoproteína da classe das proteínas de reserva 7S encontrada no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). As proteínas de reserva das leguminosas são classificadas de acordo com o seu coeficiente de sedimentação em globulinas 2S, 7S ou 11S. As proteínas nativas 7S são trímeros ou tetrâmeros com polipetídeos heterogêneos com M_r maior ou igual a 40kDa (CARBONARO, 2006). As subunidades da faseolina são rapidamente montadas dentro do lúmen do RE e mantidas juntas por interações hidrofóbicas, formando homotrímeros solúveis. Os trímeros seguem então para o complexo de Golgi e desta organela são transportados para os vacúolos de armazenamento, devido a um peptídeo sinal AFVY. A entrada da faseolina nos vacúolos depende de dois fatores principais: a montagem dos trímeros no RE (PEDRAZZINI et al., 1997) e um propeptídeo sinal na porção C-terminal (FRIGERIO et al., 1998).

Devido as suas características nutricionais, os primeiros estudos para melhoramento das qualidades protéicas foram feitos com a expressão da faseolina em plantas de arroz sob controle do promotor da glutelina. Os resultados mostraram um acúmulo da faseolina de até 4% da proteína total em corpos protéicos nos vacúolos tipo II. O arroz é o único cereal em que dois tipos de corpos protéicos coexistem no endosperma, o tipo-I é esférico, com estrutura concêntrica em anel e contém prolaminas enquanto o tipo-II contém glutelina e não possui o anel concêntrico. Os corpos protéicos tipo-I permanecem no RE enquanto o tipo-II são secretados e armazenados nos vacúolos (ZHENG et al., 1995). Resultados subseqüentes sobre análises de aminoácidos e teores nos grãos não foram reportados.

A zeolina foi sintetizada inicialmente por Mainieri et al. (2004) para estudos de acúmulo e localização subcelular em tabaco, a fim de investigar se o domínio da γ -zeína era capaz de alterar o endereçamento de uma proteína vacuolar. A zeolina é uma proteína quimérica, composta pela metade inicial da γ -zeína do milho, que inclui os domínios “tandem repeat” e “Pro-rich”, contendo seis resíduos de cisteína de um total de quinze da γ -zeína nativa, fusionados na região C-terminal à faseolina T343F do feijão. A faseolina T343F difere da faseolina nativa por apresentar apenas um sítio de glicosilação, ao invés de dois (PEDRAZZINI et al., 1997).

No Western Blot utilizando anti-faseolina, o polipetídeo mais abundante apresentou uma massa molecular de 60kDa, que é o tamanho esperado para zeolina intacta. Polipetídeos com cerca de 45kDa também foram detectados, massa esta que corresponde a faseolina, indicando que a zeolina pode ter se fragmentado na porção entre a zeína e a faseolina. No tabaco transformado a zeolina acumulou em níveis de 3,5% da proteína total extraída, sendo observada em corpos protéicos através da microscopia eletrônica e da imuno-marcação com anticorpos anti-faseolina e anti- γ -zeína.

O grande acúmulo da zeolina sugere que a proteína possui alta estabilidade no RE. Os resultados do trabalho de Mainieri et al. (2004) indicam que essa estabilidade ocorre porque a zeolina se torna insolúvel rapidamente, através da formação de pontes dissulfeto e a formação de oligômeros, e que esta zeolina insolúvel encontra-se associada aos chaperones moleculares BiP (“Binding Protein”). Com os resultados obtidos foi constatado que a característica de retenção no RE pode ser conferida a outra proteína através do domínio N-terminal da γ -zeína (domínios “tandem repeat” e “Pro-rich”); que a formação dos corpos protéicos ocorre mesmo que o domínio C-terminal da γ -zeína não esteja presente, talvez por uma própria tendência das proteínas da classe 7S de formar grandes complexos, e que a insolubilidade devido à formação de pontes dissulfeto pela γ -zeína pode ser transferida para zeolina. A estabilidade e acúmulo da zeolina no RE pode então ser explicada por um sistema de retenção baseado na baixa solubilidade da proteína e interação direta com lipídios da membrana e com o chaperone molecular BiP. Pompa e Vitale (2006) confirmaram que a formação de pontes dissulfeto inter-cadeia, devido aos seis resíduos de cisteína presentes na

zeolina, é essencial para insolubilidade da proteína e a sua retenção no RE com a formação dos corpos protéicos.

A descoberta da zeolina e a comprovação da sua capacidade de conferir a característica de retenção no RE a outras proteínas é de grande importância. Essa descoberta permite que a zeolina, ou o domínio N-terminal da γ -zeína que confere retenção no RE e formação dos corpos protéicos, seja estudada como uma ferramenta para expressar proteínas heterólogas em plantas, de forma que a expressão da proteína de interesse seja estável e possibilite um acúmulo em altos níveis. Neste sentido diversos trabalhos foram realizados nos últimos anos, visando à utilização de plantas como biorreatores para produção de medicamentos, hormônios, vacinas etc e, um dos pontos principais para produção e acúmulo destes compostos em plantas, é justamente o compartimento subcelular para o qual estes são direcionados (VITALE; PEDRAZZINI, 2005).

Com o objetivo futuro de produzir fármacos recombinantes, a zeolina foi expressa em alfafa com a zeolina sob controle do promotor constitutivo 35S. Os resultados mostraram um acúmulo nas folhas de 0,22-0,28mg de zeolina/g de peso fresco (aproximadamente 0,35% do total da proteína solúvel), o que, segundo os autores, representa uma quantidade razoável quando comparada a outras proteínas produzidas em alfafa (BELLUCI et al., 2007).

Virgilio et al. (2008) utilizaram a γ -zeína e a zeolina fundida ao fator negativo do vírus da imunodeficiência adquirida (Nef), um potencial antígeno para o desenvolvimento de uma vacina anti-viral, expressa em tabaco e verificaram que, neste caso, o acúmulo da proteína zeolina-Nef foi maior que 1% da proteína solúvel total, enquanto que a quimera γ -zeína-Nef foi degradada no RE. Os resultados obtidos mostram que polipeptídeos com defeitos estruturais são direcionados para degradação pela maquinaria de controle de qualidade do RE, seja por não serem capazes de formar os corpos protéicos com as zeínas ou por serem degradados antes que a zeína seja capaz de promover a sua montagem no corpo protéico. Já no caso da zeolina-Nef, características específicas desta construção permitiram a formação do corpo protéico. Os autores especulam que além das pontes dissulfeto formadas pela porção da zeína, o domínio da faseolina também seria importante por formar trímeros transientes ou por

promover interações precoces com a membrana do RE logo que a molécula é formada. Ambos os eventos poderiam evitar a degradação pelo controle de qualidade do RE logo após a síntese e dariam tempo suficiente para que a formação dos corpos protéicos fosse iniciada.

A expressão de transgenes é uma realidade no mercado, mas é também motivo de preocupações ambientais devido aos riscos potenciais de que este transgene seja disperso no ambiente através do fluxo gênico para cultivares não transgênicas e/ou para espécies selvagens. Com o objetivo de verificar a possibilidade de expressão da zeolina em cloroplastos, que apresentam a vantagem de, em muitas espécies vegetais, não terem o seu DNA transmitido através do pólen, BELLUCI et al., (2007) realizaram estudos de expressão da zeolina em cloroplastos de tabaco. Neste caso os resultados mostraram que a localização da zeolina no cloroplasto obteve acúmulo em níveis muito menores do que no RE. Os autores verificaram que no cloroplasto a zeolina não forma corpos protéicos e nem parece estar ligada por pontes dissulfeto inter-cadeias e, por não estar corretamente montada, a zeolina torna-se um substrato para ação das proteases responsáveis pelo controle de qualidade das proteínas do cloroplasto.

Além da zeolina, com a descoberta dos domínios “tandem repeat” e “Pro-rich” da γ -zeína responsáveis pela retenção no RE e capazes, em alguns casos, de formar os corpos protéicos, a chamada “Zera”, também tem sido testada para expressão estável de proteínas heterólogas. A zera é uma seqüência que pode ser fusionada a genes diversos para expressão da proteína de interesse em organismos eucariotos, tais como células de animais, fungos filamentosos e de insetos. Os corpos protéicos induzidos possuem as mesmas vantagens dos corpos protéicos formados nos cereais, incluindo a presença de chaperones para facilitar a montagem do corpo protéico, alta densidade que permite uma simples captura das proteínas alvo pelo corpo protéico e um isolamento do conteúdo do corpo protéico contra as atividades proteolíticas e enzimáticas do citosol (TORRENT et al., 2009).

Para o trabalho proposto no presente projeto a proteína quimérica zeolina apresentou maior interesse e deverá ser testada por apresentar-se como uma proteína duplamente atrativa para ser expressa em milho: por suas características nutricionais,

apresenta 25 resíduos de lisina, e por suas características de estabilidade, permitindo um grande acúmulo no endosperma.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Amplificação do promotor γ -kafirina e do gene da zeolina

As seqüências do promotor da γ -kafirina, com 1255 nucleotídeos, e do gene da zeolina, com 1575 nucleotídeos, foram amplificadas via reação em cadeia da polimerase (PCR). As reações utilizaram como DNA molde o plasmídeo pRT-PgK contendo a γ -kafirina (cedido pelo Dr. Paulo Arruda/Unicamp) e o plasmídeo pDHA contendo a zeolina (cedido pelo Dr. Vitale/Istituto Di Biologia e Biotecnologia Agraria) purificados de *E. coli* DH5- α utilizando-se o “Quick Plasmid Miniprep kit” (Invitrogen). A reação foi feita com 200ng do DNA molde, 5 μ L do tampão 10X, 0,4 μ L Taq Platinum 5U/ μ L (Invitrogen), 1 μ L dNTPs 10mM, 1,5 μ L MgCl₂ 50mM e 1 μ L de cada oligonucleotídeo 10 μ M, em uma reação total de 50 μ L. Na amplificação foi utilizado um programa com 30 ciclos (desnaturação: 96°C por 30 s eg.; anelamento: 60°C por 30 seg.; extensão: 72°C por 1 min.). Os oligonucleotídeos foram desenhados segundo a sequência da γ -kafirina (Nº de acesso X62480 GI:671655 do Gene Bank) e da zeolina (MAINIERI et al., 2004) e analisados com o programa “Gene Runner”. Para amplificação do promotor da γ -kafirina foi usado o oligo 5'-**CCGAATTC**GATATCAACCTTATCGAT-3' e 5'-AT**GGATCC**GGTGGCCACTCGACGGTATCGAGTTCTT-3'. Em negrito estão marcados os sítios das enzimas de restrição EcoRI e BamHI, respectivamente. Para amplificação da zeolina foram utilizados dois conjuntos diferentes de oligonucleotídeos: 5'-AGA**AAGCTT**ATGATGAGAGCAAGGGTT-3' e 5'-A**AGGTCACCT**ACGGCACGGGCTTGGAT-3' Em negrito estão os sítios das enzimas HindIII e da BstEII, respectivamente, e o oligo 5'-T**ACCCGGG**ATGATGAGAGCAAGGGTT-3' e 5'-CGA**AAGCTT**GGTACCCCTG GATTTT-3'. Em negrito estão os sítios das enzimas SmaI e HindIII, respectivamente. A designação dos sítios de restrição foi feita de acordo com a posição de inserção no vetor. Para a transformação do milho foram utilizados dois vetores, o pCambia3301 e o pTF102. O primeiro foi utilizado nos procedimentos de transformação por biobalística

enquanto o segundo foi utilizado na transformação com *Agrobacterium tumefaciens*, de acordo com protocolo descrito por Frame et al. (2000, 2002). O mapa dos vetores e a posição dos insertos estão indicados nas figuras 9 e 10 abaixo:

Figura 9 - Esquema geral do plasmídeo pCambia3301 com os sítios de restrição e o mapa funcional
Tamanho do plasmídeo = 11307pb

- Indicação dos sítios de clonagem do promotor γ -kafirina
- Indicação dos sítios de clonagem do gene da zeolina

Figura 10 - Esquema geral do plasmídeo pTF102 com os sítios de restrição e o mapa funcional
Tamanho do plasmídeo = 11622pb

- Indicação dos sítios de clonagem do promotor γ -kafirina
- Indicação dos sítios de clonagem do gene da zeolina.

O produto da PCR foi submetido à precipitação com acetato de potássio 3M e isopropanol, centrifugado e ressuspendido em 10 μ L de água ultra-pura. As bandas

amplificadas foram visualizadas em gel de agarose (0,6% p/v) corado com brometo de etídio e os fragmentos amplificados foram recortados do gel, purificados através do “QIAquick Gel Extraction kit” (Qiagen) e ressuspensos em 30µL de água ultra-pura.

2.2.2 Clonagem do promotor γ -kafirina nos vetores

Para clonagem foi feita a digestão enzimática dos vetores pCambia3301 e pTF102 purificados de *E. coli* DH5- α com o “Quick Plasmid Miniprep kit” (Invitrogen) e do promotor da γ -kafirina amplificado por PCR e purificado. Na reação de digestão foram adicionados 10µL de DNA, 1µL de EcoRI 10U/µL (Invitrogen), 1µL de BamHI 10U/µL (Invitrogen) e 1,5µL do tampão da enzima em um volume final de 15µL à 37°C por 1 hora. Em seguida foi feita a corrida em gel de agarose (0,6% p/v) com todo o volume da reação e as bandas visualizadas foram recortadas do gel, purificadas através do “QIAquick Gel Extraction kit” (Qiagen) e ressuspensos em 30µL de água ultra-pura. As bandas do inserto e do vetor, após recortadas do gel, foram colocadas em um mesmo tubo para purificação, procurando-se usar uma proporção de 3:1 do inserto:vetor e, do volume de 30µL ressuspensos, 22µL foram usados na reação de ligação com 6µL do tampão da enzima e 2µL da T4 DNA ligase 1U/µL (Invitrogen). A reação foi mantida à 4°C por 24 horas. A transformação de células competentes da estirpe DH5- α de *E. coli* foi feita por eletroporação com 1µL da reação de ligação para cada um dos vetores. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB com canamicina (50mg/L) para a transformação com pCambia3301 e em meio LB com espectinomicina (50mg/L) para transformação com pTF102 e crescidas à 37°C por 12 horas.

Dentre as diversas colônias crescidas na placa, seis para cada vetor foram repicadas para meio LB líquido contendo antibiótico e crescidas à 37°C por 12 horas. Os plasmídeos foram então purificados através do método da lise alcalina e foi feita a digestão enzimática com 3µL do plasmídeo purificado, 1µL do tampão da enzima, 0,5µL de EcoRI, 0,5µL de BamHI em um volume total de 10µL. Para corrida no gel de agarose (1% p/v) foi utilizado 5µL de cada digestão.

2.2.3 Clonagem do gene zeolina nos vetores

Para clonagem da zeolina foi feita a digestão enzimática dos vetores pCambia3301 e pTF102 contendo o promotor γ -kafirina purificados de *E. coli* DH5- α com o “Quick Plasmid Miniprep kit” (Invitrogen) e do gene da zeolina, amplificado por PCR e purificado. No caso desta clonagem foram feitas reações de digestão em separado para cada vetor: para o pCambia3301 e o produto da PCR usado na clonagem foram adicionados 5 μ L de DNA, 1 μ L de HindIII 10U/ μ L (Invitrogen), 1 μ L de BstEII 10U/ μ L (Fermentas) e 1,5 μ L do tampão da enzima em um volume final de 10 μ L à 37°C por 1 hora. Já para o pTF102 e o produto da PCR, a digestão foi feita inicialmente com 1 μ L de SmaI 10U/ μ L (Invitrogen) à 30°C por 1 hora. Foi feita então uma precipitação da reação e uma nova digestão com 8 μ L do DNA ressuspendido, 1 μ L de tampão e 1 μ L de HindIII em um volume final de 10 μ L à 37°C por 1 hora. Em seguida foi feita a corrida em gel de agarose (0,6% p/v) com todo o volume da reação. A purificação do gel, reação de ligação e transformação das células competentes por eletroporação foi realizada de acordo com a metodologia descrita na clonagem do promotor.

Dentre as diversas colônias crescidas na placa, seis para cada vetor foram repicadas para meio LB líquido contendo antibiótico e crescidas à 37°C por 12 horas. Os plasmídeos foram então purificados através do método da lise alcalina e foi feita a confirmação da clonagem, utilizando a PCR usando os oligonucleotídeos para amplificação completa do inserto para cada um dos vetores, com as mesmas condições da PCR acima descrita, modificando-se apenas o tempo de extensão à 72°C para 2 min.

Os plasmídeos purificados pCambia3301 e o pTF102 contendo o inserto foram utilizados na transformação por eletroporação de *A. tumefaciens* estirpe GV3101. A confirmação da transformação foi feita através da PCR direto das colônias com o oligo sentido 5'-CCGAATTCGATATCAACCTTATCGAT-3' e antisenso 5'-AAGGTCACCCTAC TGGCACGGGCTTGGAT-3' para o pCambia3301 e o antisenso 5'-CGAAGCTTGGTAC CCCTGGATTTT-3' para o pTF102.

2.2.4 Sequenciamento

Para confirmar a clonagem os plasmídeos pCambia3301 e pTF102 contendo o inserto foram purificados utilizando-se o “Qiagen Plasmid Midi kit” (Qiagen) quantificados no gel e no espectrofotômetro, e seqüenciados utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) pelo Centro de Estudos do Genoma Humano da USP. Para o seqüenciamento do inserto foram desenhados, com base nas seqüências da γ -kafirina e da zeolina, sete oligonucleotídeos apresentados a seguir: 5'-TGTCCGACTACTGTTCTTA-3'; 5'-AGATCAGGGGCAAAAGAA-3', 5'-GAGCCATGTTGATCTGAT-3'; 5'-TGA ACTCCACAAGACGGTA-3'; 5'-CTCTCAGTCAGGTTTCCAA-3', 5'-CCACCTCCGTACACAAAT-3' e 5'-CACCATCACC AACAGGAA-3'.

Os oligonucleotídeos sintetizados foram previamente testados utilizando-se as mesmas condições da PCR já descritas, ajustando as quantidades para um volume final de 25 μ L. Os testes foram feitos usando como DNA molde o pCambia3301 contendo o promotor γ -kafirina + zeolina, com combinações dos oligonucleotídeos dois a dois e em reações com cada oligonucleotídeo adicionado individualmente.

2.2.5 Material vegetal para transformação

Na transformação foi utilizado o híbrido Hill, desenvolvido a partir do cruzamento das linhagens A188 e B73, linhagens estas que são de domínio público. Sementes do híbrido Hill foram plantadas, autopolinizadas e os embriões imaturos coletados com 1,5-2,0mm (10-12 dias após a polinização). A coleta foi feita esterilizando a espiga, cortando o topo do grão e retirando o embrião com auxílio de uma escápula arredondada. O embrião foi então colocado com o escutelo para cima em meio de iniciação de calos e utilizado na transformação.

2.2.6 Meios utilizados

Nas diferentes fases do processo de seleção e regeneração das plantas transformadas, meios com composições diversas são utilizados tanto na transformação por biobalística quanto na transformação por *Agrobacterium*, todos contendo sais e

vitaminas N6 (CHU et al., 1975). Os reagentes que variam para cada meio são descritos a seguir:

- meio de iniciação de calos (MIC): 2mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 100mg/L de myo-inositol, 2,76g/L de L-prolina, 100mg/L de caseína hidrolisada, 30g/L de sacarose, 0,85mg/L de nitrato de prata e 3g/L de phytigel (pH 5.8);
- meio osmótico (MOS): 2mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 100mg/L de myo-inositol, 0,69g/L de L-prolina, 100mg/L de caseína hidrolisada, 30g/L de sacarose, 36,4g/L de sorbitol; 36,4g/L de manitol, 0,85mg/L de nitrato de prata e 3g/L de phytigel (pH 5.8);
- meio de infecção (MI): 1,5mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 0,7g/L de L-prolina, 68,4g/L de sacarose e 36g/L de glicose (pH 5.2), suplementado com acetoseringona 100µM;
- meio de co-cultivo (MCO): 1,5mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 0,7g/L de L-prolina, 30g/L de sacarose, 0,85mg/L de nitrato de prata, acetoseringona 100µM, 300mg/L de cisteína e 3g/L de phytigel (pH 5.8);
- meio de descanso (MD) contém 1,5mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 0,7g/L de L-prolina, 30g/L de sacarose, 0.5g/L de ácido 2-(4-morfolino)-etano sulfônico (MES), 0,85mg/L de nitrato de prata, 250mg/L de cefotaxima e 8g/L de agar (pH 5.8);
- meio de seleção (SE) contém 2mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 100mg/L de myo-inositol, 30g/L de sacarose, 0,17mg/L de nitrato de prata, 3mg/L, 6mg/L ou 9 mg/L de glufosinato de amônia (herbicida FinaleTM) e 3g/L de phytigel (pH 5.8);

Nos meios de maturação (RM) e regeneração (RE) são utilizados 4,3g/L de sais, 1ml/L de vitaminas (estoque 1000X) 100mg/L de myo-inositol, 60g/L e 30 g/L de sacarose e 4g/L e 3g/L de phytigel nos meios RM e RE, respectivamente (pH 5.8). No meio RM deve também ser acrescentado 6mg/L de glufosinato de amônia, enquanto no meio RE utiliza-se 3mg/L de glufosinato.

O meio de infecção foi filtro-esterilizado e todos os demais meios foram autoclavados. Os meios foram vertidos em placas de 25ml e armazenados à 4°C.

2.2.7 Transformação de explantes de milho por biobalística

Para transformação por biobalística foram utilizados embriões imaturos com 7 dias e calos embriogênicos tipo II bombardeados com o pCambia3301 contendo o gene da zeolina sob controle do promotor γ -kafirina. Como controle foram bombardeados explantes com o pCambia3301 sem o inserto.

Todo o procedimento de bombardeamento dos explantes de milho foi feito segundo Carneiro, Carneiro e Paiva (2004). Os explantes foram colocados em meio osmótico 3-5 horas antes do bombardeamento. Procedeu-se então à precipitação do DNA purificado (5 μ L na concentração de 1 μ g/ μ L) sobre as micropartículas de tungstênio, previamente preparadas, pela adição de etanol e CaCl₂ segundo protocolo descrito por Frame et al. (2000).

O DNA precipitado nas partículas de tungstênio foi então distribuído em alíquotas de 7 μ L na região central das membranas macrocarreadoras e, após duas horas, foi feito o bombardeamento dos explantes utilizando-se o equipamento “Gene Gun” de acordo com as recomendações específicas do equipamento.

2.2.8 Transformação dos explantes de milho com *Agrobacterium*

A transformação foi feita com *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101 contendo o plasmídeo pTF102 com gene da zeolina sob controle do promotor γ -kafirina e o plasmídeo pTF102 sem o inserto, usado como controle. A transformação com *Agrobacterium* contendo o plasmídeo pCambia3301 não foi realizada.

A *Agrobacterium* foi repicada para placas contendo meio YEP com gentamicina (50mg/L) e espectinomicina (50mg/L) e crescida à 19°C por 3 dias. As bactérias crescidas foram repicadas com a alça para meio de infecção e mantidas em agitador à 28°C por cerca de 4 horas. A absorbância foi medida após este período e a concentração das bactérias ajustada para OD₅₅₀ = 0,3-0,4. Os embriões imaturos foram colocados em meio de infecção em tubos de 1.5ml e lavados por duas vezes com o meio. Cerca de 1 -1,5ml da suspensão bacteriana foi então adicionada aos embriões e os tubos invertidos por 20 vezes e colocados no escuro por 5 min. Após a infecção os embriões foram transferidos para o meio de co-cultivo, mantendo o escutelo dos

embriões virados para baixo, e o excesso de *Agrobacterium* foi retirado do meio. As placas foram mantidas à 20°C por 3 dias (FRAME et al., 2002).

2.2.9 Seleção e regeneração das plantas transformadas

Após duas semanas em meio de iniciação de calos, no caso dos explantes bombardeados, ou em meio de descanso, no caso dos explantes transformados por *Agrobacterium*, estes foram transferidos para o meio de seleção (30 por placa) contendo 3mg/L de glufosinato de amônia (herbicida Finale) e mantidos à 27°C por duas semanas. Durante a quinta semana os explantes foram transferidos para novo meio SE suplementado com 6mg/L de glufosinato de amônia e mantidos por mais duas semanas em câmara escura à 27°C. Entre a oitava e décima semana, os calos que sobreviveram ao processo de seleção foram transferidos para o meio SE suplementado com 9mg/L de glufosinato de amônia e mantidos por duas semanas em câmara escura à 27°C.

Os calos que sobreviveram ao processo de seleção foram transferidos para o meio de maturação RM suplementado com 6mg/L de glufosinato de amônia e mantidos por duas a três semanas em câmara escura à 25°C. Os calos foram então transferidos para magentas contendo meio de germinação GE suplementado com 3mg/L de glufosinato de amônia e mantidos em luz à 27°C para germinação.

2.2.10 Aclimação das plantas em casa-de-vegetação

Plantas entre 3 e 5cm de altura que se desenvolveram no meio GE foram transferidas para vasos de 20L contendo uma mistura de 1/3 de solo e 2/3 de composto orgânico corrigido com os nutrientes recomendados para cultura do milho. Quando as plantas apresentavam 8-10 folhas foi feita a adubação com NPK 10-10-10. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação. Durante os três primeiros dias de aclimação as plantas foram mantidas sob uma cobertura plástica para manutenção da umidade. Nos dias seguintes, sucessivos furos foram feitos nos plásticos até a exposição total das plantas ao ambiente.

2.2.11 Produção de material vegetal

As plantas regeneradas e aclimatadas, denominadas de geração T_0 , tiveram a espiga coberta com um saco plástico assim que estas apareceram para evitar uma polinização indesejada. O pendão foi coberto com um saco de papel pela manhã e, à tarde, este saco contendo o pólen foi colocado sobre a espiga. Foi realizada a autopolinização de forma preferencial mas, para garantir a polinização, foram plantados de forma escalonada, sementes do híbrido Hill não transformado a fim de garantir a disponibilidade de pólen para as plantas transformadas, caso o amadurecimento da espiga e do pendão não estejam sincronizados nestas plantas.

Foram obtidas sementes representando a geração T_1 . Dessas sementes, 150 foram semeadas em casa-de-vegetação, nas instalações da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas (MG). As sementes foram plantadas em vasos de 20L contendo uma mistura de 1/3 de solo e 2/3 de composto orgânico, com as adubações recomendadas para cultura do milho, para multiplicação das sementes. Após coleta, uma parte dos grãos maduros (geração T_2) foi identificada e armazenada na câmara fria para análises posteriores. A outra parte dos grãos foi utilizada para um novo plantio visando à obtenção de grãos imaturos para análise da expressão gênica.

Para análise da expressão gênica foram plantadas sementes da geração T_2 em casa-de-vegetação nas dependências do Departamento de Genética da ESALQ para coleta de grãos imaturos. O experimento foi delineado em blocos inteiramente casualizados e foi feito o plantio de 30 sementes obtidas de cada uma das 8 plantas obtidas com a transformação, representando 6 eventos independentes, da geração T_2 e 30 sementes de 2 controles, o milho Hill não transformado e o milho Hill transformado sem a confirmação da presença do transgene. As sementes foram germinadas em copos descartáveis e depois transplantadas para os vasos, mantendo-se 1 planta por vaso no total de 10 plantas por evento e 10 plantas para cada controle.

Foi realizada a polinização controlada das plantas e a coleta de grãos imaturos 16, 20 e 24 dias após a polinização (DAP). Para cada DAP foram feitas três repetições, totalizando 90 plantas no final do experimento. As plantas que não germinaram foram substituídas por outras a fim de realizar o experimento conforme delineamento.

2.2.12 Identificação das plantas transformadas: teste biológico, PCR, teste imunocromatográfico com tira de fluxo lateral

O teste biológico para confirmação do transgene foi realizado na geração T_1 através da pulverização das plântulas, cerca de 15 dias após a germinação, com o herbicida Finale que possui como princípio ativo o glufosinato de amônio, visto que as plantas possuem o gene *Pat* como marcador de seleção, que confere resistência ao glufosinato.

Nas plantas da geração T_0 e nas plantas da geração T_1 que sobreviveram a aplicação do herbicida, a confirmação da presença do transgene foi feita através da PCR. Foi realizada a extração do DNA de 0,1g de tecido vegetativo das plântulas através do “Plant DNAzol Reagent” (Invitrogen), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Para amplificação de um fragmento de 650pb da construção γ -kafirina + zeolina foram utilizados os oligonucleotídeos 5'-GAGCCATGTTGATCTGAT-3' e 5'-TGAAGTCCACAAGACGGTA-3'. Como controle positivo da extração foram utilizados os oligonucleotídeos 5'-TATCACTATATATATCTGAGGCGACAG-3' e 5'-AAGTCTTTTCAACAAAGCAACTCTACT-3' para amplificar um fragmento de cerca de 500pb da actina, um gene constitutivo do milho. A reação foi feita com cerca de 100ng do DNA molde, 2,5 μ L do tampão 10X, 0,2 μ L Taq Platinum 5U/ μ L (Invitrogen), 0,5 μ L dNTPs 10 mM, 0,8 μ L MgCl₂ 50mM e 0,5 μ L de cada oligonucleotídeo a 10 μ M, em uma reação total de 25 μ L. Na amplificação foi utilizado um programa com 30 ciclos (desnaturação: 96°C por 30 seg.; anelamento: 60°C por 30 seg.; extensão: 72 °C por 1 min.). Na PCR foi utilizado um controle negativo com água, para verificar a contaminação, e um controle positivo que consistiu em uma planta transformada da geração T_1 previamente identificada como positiva. A eletroforese foi feita em gel de agarose 1%, tampão TBE 0,5X utilizando 5 μ L do DNA extraído por cavidade.

Na geração T_2 a confirmação do transgene foi feita de forma indireta através da detecção do marcador, a proteína Pat. O teste foi realizado através do método imunocromatográfico de tiras de fluxo lateral (“Lateral Flow Strip”) específica para detecção da proteína Pat (SDI). O procedimento consiste em se retirar um pequeno pedaço da folha das plântulas germinadas e colocar em tubo tipo eppendorf,

acrescentar 750ul de tampão PBS, macerar com um pistilo, colocar a fita e ler o resultado após 5 min.

2.2.13 Extração e análise do RNA

Foram coletadas espigas das plantas transformadas e dos controles representando a geração T₃, aos 16, 20 e 24 DAP. Estas espigas foram identificadas e armazenadas no -80°C. Para extração do RNA foram testados três diferentes protocolos, a fim de otimizar a pureza e concentração do RNA extraído. Nos testes de extração de RNA utilizou-se grãos de um controle e de 2 eventos transformados. Os testes foram feitos com Método do Trizol, de acordo com as recomendações da Invitrogen, o Método do Trizol com adaptações sugeridas pela Promega (MURILLO et al., 1995) e com o Método Brazol, de acordo com as instruções do fabricante, a LGC Biotecnologia.

O Método do Trizol selecionado para extração de RNA consiste na maceração de um pool de sementes de milho imaturas em nitrogênio líquido e adição de 1mL de reagente Trizol (Invitrogen), na proporção de 100mg:1mL de reagente. O homogeneizado foi incubado por 5 min. à temperatura ambiente. Para reduzir compostos indesejáveis como polissacarídeos, lipídeos e DNA o homogeneizado foi centrifugado a 13.000rpm, por 15 min. a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se 0,2mL de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 seg. e incubando-se por 3 min., à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se por 15 min. a 13.000rpm a 4°C. A mistura separa-se em uma fase vermelha no fundo do tubo, fase fenol/clorofórmio, uma interfase e a fase aquosa, que contém o RNA, com volume de aproximadamente 60% do volume de Trizol utilizado na homogeneização.

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o RNA foi precipitado adicionando-se 0,250mL de isopropanol e 0,250mL de citrato de sódio 0,8M com cloreto de sódio 1,2M, preparado com água tratada com DEPC 0,01%. As amostras foram misturadas e incubadas à temperatura ambiente, por 10 min. Centrifugou-se por 10 min. a 14.000rpm, a 2-8°C e o sobrenadante foi removido. O pellet foi lavado uma vez com 1mL de etanol 75% e centrifugado por 5 min. a 14.000rpm, à 2-8 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de RNA seco ao ar por 5-10 min. O RNA foi ressuspensionado em

água tratada com 0,01% de DEPC e foi incubado por 10 min. a 55°C, para denaturação do RNA.

Foi realizada a leitura da concentração do RNA no equipamento “NanoDrop” da Thermo Scientific e esta concentração foi ajustada com água para 0,5µg/µL. Para a RT-PCR foi utilizado o kit “SuperScriptIII” da Invitrogen, conforme instruções do fabricante. A concentração do cDNA foi novamente determinada no NanoDrop e ajustada com água para 0,5µg/µL. Para PCR foram desenhados os oligonucleotídeos 5′-GCATCGGTAGAGCTCTGGAC-3′ e 5′-GATGGTGTGCATCCACAAAG-3′ que amplificam 120 nucleotídeos da região C-terminal da faseolina. A reação da PCR foi feita com 500ng do DNA molde, 2,5µL do tampão 10X, 0,15µL Taq DNA Pol 5U/µL (Invitrogen), 0,5µL dNTPs 10mM, 1,5µL MgCl₂ 25mM e 0,5µL de cada oligonucleotídeo a 10µM, em uma reação total de 25µL. Na amplificação foi utilizado um programa com 30 ciclos (desnaturação: 96°C por 30 seg.; anelamento: 60°C por 30 seg.; extensão: 72°C por 15 seg.). Como controle negativo para verificar a contaminação foi utilizado uma amostra com água. A eletroforese foi feita em gel de agarose 1,2%, tampão TBE 0,5X utilizando 5µL do DNA extraído por cavidade.

2.2.14 Extração e análise das proteínas de reserva

Os grãos de milho obtidos na geração T₂ foram liofilizados e triturados, preparando-se uma fina farinha para ser utilizada nas análises do padrão das proteínas de reserva e na determinação do perfil de aminoácidos dos grãos. Previamente ao preparo da farinha, a metade de cada grão de milho foi testada para presença da proteína Pat com as tiras de fluxo lateral (SDI). Em caso positivo, a outra metade do grão foi utilizada para produção da farinha.

A extração e análise das proteínas de reserva foram realizadas conforme protocolo descrito por Osborne (1924) e modificado por Landry et al. (2000), com variações no método já testadas no laboratório a fim de se obter a melhor resolução possível. O processo de extração é seqüencial. Para a extração de globulinas 0,1g da farinha previamente tratada com 1mL de hexano para remoção de lipídios foi extraída com 1mL de uma solução 0,5M de NaCl por 30 min a 4°C com agitação periódica em

vortex. O sobrenadante obtido após centrifugação a 14.000rpm por 5 min. foi armazenado em alíquotas a -80°C.

Em seguida, a fração das albuminas foi extraída submetendo o pellet a nova extração com água milli-Q por 15 min. a 4°C com agitação periódica em vortex. Após a centrifugação a 14.000rpm por 5 min., o sobrenadante obtido foi alíquotado e mantido a -80°C.

As prolaminas foram obtidas em duas frações, zeínas I e II. As zeínas I foram extraídas resuspendendo o pellet anterior em uma solução (1mL) contendo 55% (v/v) de 2-propanol e 0.6% (v/v) de 2-mercaptoetanol por 30 min. a temperatura ambiente com agitação periódica em vortex. O sobrenadante obtido após centrifugação a 14.000rpm por 5 min. foi congelado a -80°C para análise posterior. As zeínas II foram obtidas pela extração do pellet obtido com uma solução (1mL) de NaCl 0,5M, pH 10 contendo 0.6% (v/v) 2-mercaptoetanol a temperatura ambiente por 30 min. com agitação periódica em vortex. Após este período, o extrato foi centrifugado a 14.000rpm por 5 min. e o sobrenadante armazenado a -80°C.

A última fração protéica, as glutelinas, foi obtida pela extração do pellet anterior com 1mL de uma solução de SDS 0.5% (p/v), pH 10, contendo 0.6% 2-mercaptoetanol por 30 min. a temperatura ambiente. Após a centrifugação a 14.000rpm por 5 min., o sobrenadante foi armazenado a -80°C para análise posterior.

Para a quantificação de proteínas foi utilizado o método de Bradford (1976) utilizando BSA como padrão da curva de calibração. A concentração de proteína em todas as frações extraídas foi quantificada utilizando-se o Kit da Bio-Rad e soro albumina bovina (BSA) como padrão. Os valores foram determinados em relação a curva padrão com leitura no espectrofotômetro a 595nm. As concentrações de BSA apresentaram uma ordem crescente de 0,1mg/mL (100µL BSA + 900µL de água deionizada) até 1mg/mL (1000µL BSA + 0µL de água deionizada).

Após a extração das proteínas, amostras com concentrações conhecidas de proteína de cada fração foram aplicadas aos géis de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O procedimento de preparação e corrida dos géis foi realizado conforme descrito por Laemmli (1970). Foi utilizada uma concentração de 30% de

acrilamida, 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 1,5M de Tris, 10% de persulfato de amônio (APS), 20µL de Temed, com volume completado para 60mL com água Mili-Q.

Após a polimerização do gel SDS, foi adicionado o gel de empacotamento, composto por 30% de acrilamida, 0,5M de Tris-HCl pH 6,8, 10% de SDS, 30µL de Temed, com volume final completado com água Mili-Q para 40mL.

A eletroforese foi inicialmente conduzida a 40Vh e depois aumentada para 100Vh, a uma temperatura de 10°C em tampão de corrida contendo 0,3% de tris base, 1,44% de glicina e 0,1% de SDS. Os géis foram corados com uma solução de nitrato de prata.

2.2.15 Western Blot

As proteínas da amostra, numa concentração de 6µg/µL, foram separadas em gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose de acordo com procedimento descrito por Towbin, Staehelin e Gordon (1979). A membrana foi incubada por 1 hora com 2µL do anticorpo policlonal anti-β-faseolina, produzido em coelho a partir da faseolina expressa em *E. coli*, na diluição 1:5000 e depois de lavagens com tampão TBS-T sob agitação, a membrana foi incubada por mais 1 hora com anticorpo secundário marcado com fosfatase alcalina na diluição 1:5000 e depois revelado para verificação do padrão de bandas.

2.2.16 Hidrólise ácida das frações protéicas

O método de hidrólise ácida utiliza HCl 6,0mol/L como reagente (BIELSKI; TURNER, 1966). A concentração de proteína da farinha de milho da geração T₃ foi determinada através da quantificação do nitrogênio total no laboratório do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP pelo método de Kjeldahl, com a proteína total sendo determinada pelo teor de N x 6,25. O volume de HCl a ser utilizado foi calculado em base na razão de 4mL de HCl para cada 10mg de proteína. Para realizar a hidrólise foi usado 2mg de proteína. A mistura (HCl + proteína) foi colocada em estufa à 110°C durante 24 horas. A proteína hidrolisada foi centrifugada por 20 min. e em seguida o sobrenadante foi liofilizado. Após a liofilização a amostra foi

ressuspensa em 500µL de água destilada e filtrada em filtro Millipore em PVDF, de 0,22µm e utilizada para leitura no HPLC.

2.2.17 Extração e dosagem dos aminoácidos solúveis

Foi utilizado 200mg de farinha de milho preparada de um pool de grãos da geração T₃, dos eventos transformados e dos controles, em 2mL de MCW (metanol: clorofórmio: água, na proporção 12:5:3). A mistura foi deixada overnight a 4°C e centrifugada a 10.000g durante 20 min, retirando-se o sobrenadante, ao qual foi adicionado 1mL de clorofórmio e 1,5mL de água para cada 4mL de MCW utilizado. Centrifugou-se novamente, retirando cuidadosamente a fase aquosa formada. A solução foi colocada por 1 hora à 38°C e em seguida quantificada.

Feita a extração, uma alíquota dessa solução foi analisada para determinação dos aminoácidos solúveis totais dos grãos de milho transformados e dos controles.

Uma curva foi feita utilizando-se leucina como padrão nas concentrações de 40, 80, 120, 160 e 200nmol/mL. Uma fração de 100µL da solução de aminoácidos foi colocada em um tubo de ensaio adicionando-se 900µL de água. Tanto para análise das amostras desconhecidas quanto para a curva padrão acrescentou-se 0,5mL de tampão citrato de sódio (0,2M, pH 5,0), 0,2 mL de reativo de ninidrina (5% em metilglicol) e 1mL de KCN (2% de uma solução 0,01M em metilglicol). Os tubos de ensaio foram cobertos com bolas de vidro, para que não houvesse evaporação, e colocados em banho-maria 100°C por 20 min. Após atingir a temperatura ambiente, completou-se o volume para 4mL com etanol 60% (1,3mL). A leitura em espectrofotômetro dos padrões e das amostras contra o branco foi feita em 570nm.

2.2.18 Separação e quantificação dos aminoácidos totais (solúveis + protéicos)

Para a separação e determinação quantitativa dos aminoácidos totais foi utilizada a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em fase reversa.

Antecedendo a separação dos aminoácidos pela coluna Spherisorb ODS-2 (C18), os aminoácidos foram derivatizados com o reagente o-ftalaldeído (OPA)

(MARUR; SODEK; MAGALHÃES, 1994). As amostras derivatizadas com OPA foram detectadas na coluna por fluorescência.

A partir da solução centrifugada das proteínas hidrolisadas, foram utilizados para a derivatização 10 μ L desta solução e 30 μ L do reagente OPA. O reagente OPA foi preparado dissolvendo-se 50mg de OPA em 1mL de metanol e misturando-se a 6,5mL de tampão borato-NaOH (ácido bórico 2,4% p/v em H₂O; pH ajustado com NaOH 2N). No dia de uso, 5 μ L de 2-mercaptoetanol foram adicionados a 625 μ L de OPA. Após exatamente 2 min. (os derivados glicina (GLY) e lisina (LYS) são instáveis), injetou-se 20 μ L da solução (aminoácidos + OPA) no aparelho de HPLC, iniciando a eluição da mistura em um gradiente linear (20-100% tampão “B” [metanol 65%]) em tampão “A” (tampão fosfato 50mM Na₂HPO₄.7H₂O, pH 7,5, 50mM CH₃COONa, 1,5mL de CH₃COOH, 20mL de tetrahidrofurano, 20mL de metanol num volume final de 1 L).

O fluxo usado foi de 0,8ml/min durante 50 min. O gradiente foi programado para aumentar linearmente a proporção de “B” em relação a “A”. Os derivados aminoácidos-OPA foram detectados por um monitor de fluorescência ajustado para λ de excitação de 265nm e para λ de emissão de 480nm. As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrados, comparados aos picos de um padrão na concentração de 250nmol/mL. Para a quantificação de lisina, especificamente, o gradiente teve que ser repetido, variando de 75-100%, de forma a permitir o aparecimento do pico de lisina antes da degradação do aminoácido.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Síntese da construção usada na transformação do milho

Primeiramente foi amplificado o promotor da γ -kafirina e, no produto amplificado, foram inseridos os sítios das enzimas EcoRI e BamHI, o que possibilitou o uso dos sítios destas enzimas para clonagem do promotor tanto no pCambia quanto no pTF102. É importante ressaltar que, apesar das enzimas EcoRI e BamHI liberarem a γ -kafirina diretamente do pRT-PgK, este procedimento não pôde ser usado devido ao sítio HindIII que permanece no promotor e que interfere com o passo seguinte da clonagem da zeolina que utiliza este mesmo sítio.

A clonagem da γ -kafirina no pCambia3301 e no pTF102 foi comprovada através da digestão enzimática com as enzimas EcoRI e BamHI, o que possibilitou a liberação dos fragmentos do tamanho esperado de aproximadamente 1200pb (figura 11). Todas as colônias testadas, tanto para o pCambia quanto para o pTF102, apresentaram o fragmento correspondente à γ -kafirina, confirmando a clonagem nestes vetores.

Figura 11 - Gel de agarose mostrando o fragmento da γ -kafirina liberado após digestão enzimática. M: 1Kb plus DNA ladder; 1-6: pCambia3301; 7: pRT-PgK controle; 8-13: pTF102; 14: pRT-PgK controle

Após a confirmação da clonagem do promotor, foi feita a amplificação e clonagem da zeolina nos sítios da HindIII e BstEII no pCambia3301, e nos sítios SmaI e HindIII no pTF102. Da mesma forma que com o promotor, nos oligonucleotídeos usados na amplificação da zeolina foram inseridos os sítios das enzimas de restrição mencionadas para que estas pudessem ser usadas na clonagem.

Na clonagem da zeolina foi retirada do plasmídeo a seqüência relativa ao gene repórter GUS que, para os objetivos do trabalho, não apresenta nenhuma aplicação. Na clonagem da zeolina no pCambia3301 o terminador 35S do CaMV, presente na construção original, foi retirado, utilizando-se como terminador a seqüência Nos poly-A

presente no próprio pCambia. Já para a construção do pTF102 o terminador 35S foi mantido na amplificação da zeolina e clonado no plasmídeo.

Para o pCambia3301 foi utilizado a digestão enzimática com HindIII e BstEII para liberação do fragmento relativo à zeolina com aproximadamente 1600pb (figura 12), mostrando que todas as colônias testadas contêm o inserto de tamanho esperado. A liberação do fragmento do pTF102 com as enzimas SmaI e HindIII não pôde ser testada por existir sítios no promotor que também seriam digeridos resultando em um maior número de fragmentos, não permitindo a obtenção de um resultado conclusivo sobre a clonagem.

Figura 12 - Gel de agarose mostrando o fragmento da zeolina liberado após digestão enzimática
M: 1Kb plus DNA ladder; 1-6: pCambia3301 contendo γ -kafirina; 7: pCambia3301 sem o inserto

Para a confirmação da clonagem no pTF102 foi utilizada a PCR com a amplificação completa do inserto isto é, do promotor γ -kafirina + zeolina, resultando num produto amplificado com aproximadamente 2800pb (figura 13). Este procedimento também foi feito com o pCambia3301 a fim de obter a confirmação do resultado obtido com a digestão enzimática. Foram testadas duas colônias de cada plasmídeo.

Figura 13 - Gel de agarose mostrando a banda relativa ao promotor γ -kafirina+zeolina amplificada
 M: 1Kb plus DNA ladder; 1 e 2: pCambia3301 contendo γ -kafirina+zeolina; 3: controle negativo (com água); 4 e 5: pTF102 contendo γ -kafirina+zeolina

Os plasmídeos pCambia3301 e pTF102 contendo o inserto γ -kafirina + zeolina foram utilizados na transformação de *A. tumefaciens* estirpe GV3101. Para confirmação da presença do inserto nas colônias transformadas, quatro colônias de cada plasmídeo foram testadas por PCR e todas apresentaram o fragmento esperado de aproximadamente 2800pb relativo ao inserto (figura 14), confirmando desta forma a transformação.

Figura 14 - Gel de agarose mostrando a banda relativa ao promotor γ -kafirina+zeolina amplificada por PCR direto das colônias de *A. tumefaciens*
 M: 1Kb plus DNA ladder; 1-4: colônias pCambia3301 contendo γ -kafirina + zeolina; 5: controle negativo (plasmídeo sem inserto); 6: controle positivo (plasmídeo com inserto); 7: controle negativo (com água); 8-11: pTF102 contendo γ -kafirina+zeolina; 12: controle negativo (plasmídeo sem inserto); 13: controle positivo (plasmídeo com inserto)

A metodologia usada na clonagem apresentou uma boa eficiência, com um grande número de colônias contendo o inserto de interesse, obtido em cada transformação. O resultado final desta etapa é a clonagem da construção promotor γ -kafirina + zeolina nos vetores pCambia3301 e pTF102 usados para transformação do milho.

Para uma reconfirmação da clonagem da construção de interesse nos vetores foi feito ainda o sequenciamento. Os oligonucleotídeos sintetizados para o seqüenciamento foram testados com combinações dos oligos 2 a 2 para verificar a sua eficiência de amplificação na temperatura de anelamento testada, e em reações com os oligo acrescentados individualmente, permitindo que se verifique se há formação de dímeros e se existe amplificação inespecífica de produtos da PCR. Ambas as condições testadas apresentaram os resultados esperados: ausência de bandas quando os oligonucleotídeos foram utilizados individualmente e presença da banda relativa ao produto da PCR quando os oligo foram testados em conjuntos.

Após confirmação da clonagem do promotor γ -kafirina e da zeolina nos plasmídeos pCambia3301 e no pTF102 por digestão enzimática e por PCR, os plasmídeos purificados foram enviados para o seqüenciamento a fim de obter uma confirmação final da identidade destes clones. De acordo com recomendações do Centro de Genoma Humano da USP, responsável pelo seqüenciamento, a concentração dos plasmídeos purificados foi determinada em gel (figura 15) e em espectrofotômetro e diluída para uma concentração final de 300ng/ μ L.

Figura 15 - Gel de agarose para determinar a concentração do plasmídeos

M: High mass DNA ladder; 1: pCambia3301 contendo γ -kafirina + zeolina; 2: pCambia3301 sem inserto; 3: pTF102 contendo γ -kafirina + zeolina; 4: pTF102 sem inserto

o híbrido Hill através dos métodos da biobalística e com uso de *Agrobacterium*, a fim de obtermos uma maior chance de sucesso na obtenção de uma planta transformada

Na transformação optou-se por utilizar o plasmídeo pCambia3301 na biobalística e o plasmídeo pTF102 com *Agrobacterium*. Esta opção foi feita conforme os dados de literatura, principalmente os protocolos descritos por Frame et al. (2000, 2002), e na experiência da Dra. Andréa Carneiro da Embrapa Milho e Sorgo, em cujo laboratório foram realizados todos os procedimentos iniciais de transformação.

Para transformação por biobalística foram utilizados dois tipos de explantes, embriões imaturos de 7 dias (figura 17) e calos tipo II (figura 18). Como controle foi utilizado o bombardeamento com o plasmídeo pCambia3301 sem o inserto. No total foram bombardeados cerca de 600 explantes, 300 embriões e 300 calos tipo II, metade de cada material foi bombardeada com a construção de interesse e a outra metade com o controle.

Figura 17 - Embriões imaturos de milho híbrido Hill com 7 dias

Figura 18 - Calos tipo II desenvolvidos a partir de embriões do milho híbrido Hill, ressaltando-se a estrutura friável dos calos tipo II obtidos

O equipamento de biobalística utilizado nos procedimentos de transformação utilizando o bombardeamento de partículas está demonstrado na figura 19.

Figura 19 - Equipamento “Gene Gun” utilizado nos procedimentos de transformação por biobalística

Para transformação com *Agrobacterium* foram utilizados embriões imaturos recém coletados, obtidos 10-12 dias após a polinização (figura 20), em um total de 200 embriões transformados. Neste procedimento também se utilizou como controle a transformação com plasmídeos que não contêm o inserto.

Nas transformações posteriores, cerca de 300 explantes com o uso de *Agrobacterium* e 1200 com biobalística, foram feitas utilizando-se apenas calos embriogênicos tipo II, pelo maior facilidade de obtenção e multiplicação do material. Não foram observadas, no entanto, diferenças entre o potencial de regeneração das transformações realizadas com calos tipo II quando comparadas com a utilização dos embriões.

Figura 20 - Embriões imaturos de milho híbrido Hill recém-coletados

A seleção iniciou-se na terceira semana após transferência dos explantes para meio de seleção suplementado com 6 mg/L de glufosinato de amônia (herbicida Finale) e mantidos em câmara escura à 27°C. Nas semanas seguintes os calos foram sucessivamente transferidos para meio de seleção contendo maiores concentrações do agente seletivo. No caso da transformação com *Agrobacterium* o meio foi suplementado com antibiótico cefotaxima.

Na transformação por biobalística observou-se claramente a diferenciação dos calos apresentando tolerância ao herbicida (figura 21), com potencial de terem incorporado o transgene, em relação aos calos não transformados, com ausência de crescimento e coloração mais escura, devido à oxidação e consequentemente morte celular causada pela toxicidade do herbicida.

Figura 21 - Calos embriogênicos tipo II transformados por biobalística crescendo em meio seletivo. Os calos selecionados para regeneração estão marcados

Já no caso da transformação com *Agrobacterium* os calos não tiveram um bom desenvolvimento, principalmente pela dificuldade de se eliminar a bactéria após a transformação, causando a contaminação e morte destes calos (figura 22).

Figura 22 - Calos embriogênicos tipo II transformados com *Agrobacterium* crescendo em meio seletivo

2.3.3 Regeneração e aclimação das plantas transformadas (geração T₀)

Os calos que sobreviveram ao processo de seleção foram transferidos para o meio de maturação suplementado com 6mg/L do herbicida Finale e mantidos por duas a três semanas em câmara escura à 25°C. Durante este período embriões somáticos que normalmente apresentam um aspecto brilhante e translúcido passam a apresentar um aspecto opaco e uma coloração branca leitosa, um indicativo de que estes calos estão prontos para a germinação. Os calos foram então transferidos para magentas contendo meio de germinação suplementado com 3mg/L do herbicida e mantidos sob 16 horas de luz à 27°C para germinação.

As primeiras transformações do milho foram realizadas na Embrapa Milho e Sorgo e, dentre os 300 explantes transformados com a construção da zeolina sob controle do promotor da γ -kafirina por biobalística, 4 foram capazes de regenerar plantas (figura 23). Dos 300 explantes transformados com o plasmídeo controle, nenhum foi capaz de regenerar plantas. A transformação de embriões de milho com *Agrobacterium* também não obteve sucesso na regeneração de plantas de milho. Dentre o total de cerca de 2300 explantes transformados por biobalística e com o uso de *Agrobacterium*, 41 explantes transformados por biobalística, representando 17 eventos de

transformação, foram capazes de se desenvolverem em meio seletivo e chegar à etapa de regeneração, representando uma eficiência de cerca de 0,7% na transformação. Dentre os embriões imaturos e calos embriogênicos transformados com o plasmídeo controle nenhum foi capaz de regenerar plantas. A transformação de embriões imaturos de milho e de calos embriogênicos tipo II com *Agrobacterium* também não produziram nenhum calo capaz de se desenvolver no meio seletivo e regenerar plantas de milho.

Figura 23 - Calos embriogênicos tipo II transformados por biobalística em fase de regeneração

Plantas regeneradas entre 3 e 5cm de altura foram transferidas para casa de vegetação e mantidas sob uma cobertura plástica para manutenção da umidade. Nos dias seguintes, sucessivos furos foram feitos até a exposição total das plantas ao ambiente (figura 24).

Figura 24 - Plantas potencialmente transformadas em fase de aclimação em casa-de-vegetação

A fase de aclimação mostrou-se como uma fase crítica do processo. Dentre as 41 plântulas inicialmente obtidas, representando 17 potenciais eventos de transformação, considerando que algumas plântulas são provenientes do mesmo calo e representam, portanto, um único evento de transformação, apenas 8 plantas, representando 6 eventos, sobreviveram ao processo de transferência para o solo. Ao

longo do processo as condições de transferência foram ajustadas em termos de quantidade de água, luminosidade, temperatura e composição do solo, de forma a propiciar o menor estresse para as plantas e aumentar o percentual de plantas que sobreviveram.

A fim de confirmar a transformação das plantas pela inserção do transgene, foi feita a extração do DNA utilizando 0,1g de tecido vegetativo das plantas na fase de polinização através do método do “DNAzol” (Invitrogen), determinação da concentração do DNA em espectrofotômetro e PCR usando oligonucleotídeos para amplificação da sequência da construção γ -kafirina + zeolina com tamanho aproximado de 600pb (figura 7 e 8). Como controle positivo foram utilizados oligo senso 5'-TATCACTATATATATCTGAGGCGACAG-3' e antisenso 5'-AAGTCTTTTTCAACAAAGCAACTCTACT-3' que amplificam um fragmento de cerca de 500pb de um gene constitutivo, no caso o gene da actina do milho.

A PCR confirmou a presença do transgene nas plantas transformadas identificadas com os números 12.1, 12.2 e 14 conforme gel da figura 25. Pode-se observar a presença de bandas na amplificação do gene da actina nas 6 amostras de milho extraídas, com bandas de 500pb na parte de cima do gel, e a presença de bandas com aproximadamente 650pb relativas à amplificação da construção γ -kafirina + zeolina nas amostras 12.1, 12.2 e 14. A amostra 16.2 foi utilizada como controle positivo da reação de PCR, já que a presença do transgene já havia sido confirmada em extrações anteriores. O controle negativo com água apresentou ausência de banda. As amostras 8 e 15 não apresentaram bandas relativas ao transgene.

Figura 25 - Gel de agarose da PCR para confirmação da presença do transgene nas plantas transformadas com a construção γ -kafirina+zeolina
 M: 1Kb DNA ladder; 1: Planta transformada evento 8; 2: evento 12.1; 3: evento 12.2; 4: evento 14; 5: evento 15; 6: controle negativo; 7: controle positivo

As plantas transformadas confirmadas por PCR foram então polinizadas. Nos casos possíveis foi feita a autopolinização e, no caso da ausência de pólen da planta transformada, foi utilizado pólen do híbrido Hill não transformado. Uma acentuada redução na produção de pólen das plantas transformadas e não transformadas foi observada durante os meses mais quentes devido, provavelmente, às altas temperaturas da casa-de-vegetação e ao fato do milho Hill utilizado ser um híbrido de clima temperado.

As plantas transformadas apresentaram um desenvolvimento mais rápido do que as plantas não transformadas no que se refere às fases de desenvolvimento vegetativo ao reprodutivo com a emissão precoce da espiga e pendão, apesar de apresentaram

plantas de menor porte, bem como espigas de pequeno tamanho e com poucos grãos (figura 26).

Figura 26 - Planta de milho transformada com a zeolina apresentando espiga

Dentre as 8 plantas que chegaram à fase de polinização, 6 plantas apresentaram resultado positivo na PCR para o transgene e deste total 3 plantas produziram sementes viáveis, representando 3 eventos de transformação. Devido à baixa eficiência, aproximadamente 0,1% se considerarmos o processo como um todo, considerando desde a fase inicial de transformação até a obtenção de plantas maduras capazes de produzir sementes viáveis, existe a necessidade de se transformar uma grande quantidade de material vegetal a fim de aumentar as chances de sucesso na obtenção de um evento de transformação.

É importante salientar que os mesmos procedimentos de transformação, regeneração e aclimatação foram realizados em paralelo na Embrapa Milho e Sorgo para o gene de interesse. Na Embrapa foram obtidas 7 plantas transformadas representando 5 eventos de transformação que chegaram a fase de polinização e produção de sementes viáveis e que serão avaliadas juntamente com as plantas obtidas nas dependências da ESALQ. A eficiência das transformações realizadas na Embrapa foi de cerca de 1%, considerando o processo como um todo, desde a fase de

transformação até a obtenção de plantas capazes de produzirem sementes viáveis. Essa maior eficiência deve-se, provavelmente, a toda experiência de trabalho com transformação de milho da Dra. Andréa Carneiro e de sua equipe, facilitando principalmente a fase de aclimação que se mostrou como uma fase crítica do processo.

No final de toda a fase de transformação / regeneração / aclimação foi obtido um total de 10 plantas transformadas com a zeolina capazes de produzirem sementes viáveis, representando 8 eventos de transformação (figura 27).

Figura 27 - Esquema geral do processo de transformação, indicando os números obtidos em cada etapa do processo

2.3.4 Plantio e análise da geração T_1

As plantas transformadas regeneradas foram denominadas de geração T_0 e identificadas como ZEO-1 à ZEO-10. Algumas características fenotípicas foram observadas nas plantas transformadas em relação ao controle não transformado, como o desenvolvimento precoce dos órgãos reprodutivos, produção de estigma no lugar do pendão, nanismo e produção de pouco pólen. Na figura 28 são apresentadas as sementes coletadas da planta ZEO-7 onde se observa uma grande desuniformidade em relação ao tamanho. Não se observam, no entanto, diferenças na característica do endosperma com relação ao controle não transformado. Para o plantio da geração T_1 foram selecionadas sementes de diferentes tamanhos a fim de eliminar qualquer efeito relacionado a esta característica.

Figura 28 - Sementes do evento ZEO-7 mostrando a desuniformidade em relação ao tamanho das sementes obtidas

As sementes das 10 plantas obtidas (ZEO-1 a ZEO-10) representando a geração T_0 foram cultivadas em casa-de-vegetação na Embrapa Milho e Sorgo sob condições controladas. O objetivo do plantio foi a multiplicação das plantas transformadas e a produção de material biológico para as análises de expressão e protéicas a serem realizadas em uma geração de plantas transformadas mais avançada, que possibilite uma maior estabilidade do transgene inserido no genoma. Além das plantas transformadas foram plantadas, de forma escalonada, sementes do híbrido Hill a fim de fornecer pólen. Preferencialmente foi realizada a auto-polinização mas no caso de haver uma falta de sincronia entre a emissão do pendão e da espiga na planta, as

plantas transformadas foram polinizadas com pólen do Hill não transformado e identificadas como tal.

Foram plantadas um total de 183 sementes representando a geração T_1 e cerca de 18 dias após a germinação as plântulas foram pulverizadas com o herbicida Finale que tem como princípio ativo o glufosinato de amônia. Na figura 29 podem ser observadas plântulas de milho antes e após a aplicação do herbicida. O gene *bar* codifica a enzima fosfinotricina acetil-trasferase (PAT) que confere resistência ao glufosinato de amônio. As plantas transformadas possuem o gene *bar* como marcador de seleção e apresentam resistência ao herbicida Finale, enquanto as plantas não transformadas são dessecadas e morrem pela ação do herbicida.

Figura 29 - Plântulas de milho antes e após aplicação do herbicida Finale usado como agente de seleção das plantas transformadas

Dentre as 183 sementes plantadas, 149 sementes germinaram e após aplicação do herbicida 107 plântulas sobreviveram, de acordo com o detalhamento da tabela 1. Na tabela estão indicados o parental doador do pólen, conforme mencionado anteriormente a auto-polinização (Auto-Pol.) foi realizada preferencialmente a fim de aumentar a homozigose do transgene na progênie e reduzir a segregação. Na impossibilidade de auto-polinização foi realizado o cruzamento com Hill não

transformado (Hill não transf.) e no caso do evento ZEO-3, devido à ausência de pólen, houve necessidade de utilizar pólen de uma planta com outro evento de transformação (Transf. 8).

Tabela 1 - Plantio, germinação e seleção das plantas transformadas na geração T₂

Evento de Transformação	Polinização	Nº de Sementes Plantadas	Nº de Sementes Germinadas	Nº Plântulas Sobreviventes
ZEO-1	Hill não transf.	7	3	0
ZEO-2	Hill não transf.	9	7	0
ZEO-3	Transf. 8	12	9	3
ZEO-4	Auto-Pol.	25	18	16
ZEO-5	Auto-Pol.	15	6	6
ZEO-6	Auto-Pol.	25	25	16
ZEO-7	Auto-Pol.	25	25	19
ZEO-8	Hill não transf.	25	24	21
ZEO-9	Hill não transf.	25	24	19
ZEO-10	Hill não transf.	15	8	7

A fim de confirmar a presença do transgene nas plantas transformadas, foi realizada a PCR para amplificação de um fragmento de cerca de 650pb da região terminal do promotor da γ -kafirina e da região inicial do gene da zeolina. Como controle da extração foi utilizado a PCR para amplificação de um gene endógeno do milho, a actina, produzindo um fragmento com cerca de 500pb. Todas as amostras que não apresentaram amplificação do gene da actina tiveram o DNA extraído novamente para uma nova reação de PCR. Resultados duvidosos com a presença de bandas fracas também foram submetidos a uma nova extração de DNA e/ou nova reação de PCR. Em caso de duas reações de PCR consecutivas apresentando resultado dúbio, a amostra foi considerada positiva.

Na figura 30 está exemplificado um dos géis obtidos com o resultado da PCR. As amostras de 1 a 12 representam diferentes plantas representando os 6 eventos de transformação da geração T₁ testada para confirmação da presença do transgene.

Figura 30 - Gel de agarose da PCR para confirmação da presença do transgene nas plantas transformadas com a construção γ -kafirina+zeolina (650pb) e do controle com gene da actina (500pb). M: 1Kb DNA ladder; 1-12: amostras de plantas transformadas; 13: controle positivo (milho Hill não transf.)

No final do procedimento de análise verificou-se que dentre as 107 amostras analisadas, com as devidas repetições, 81 apresentaram resultado positivo, considerando-se aquelas com resultados dúbios como positivas. A tabela 2 resume a quantidade de plantas positivas para cada evento de transformação. As plantas positivas foram mantidas para produção de sementes, enquanto as plantas apresentando resultado negativo foram descartadas.

Tabela 2 - Resumo da PCR realizada para detecção da zeolina nas plantas transformadas

Evento de Transformação	PCR Positivo	PCR Negativo	Total de Plantas
ZEO-3	3	0	3
ZEO-4	13	3	16
ZEO-5	4	2	6
ZEO-6	10	6	16
ZEO-7	14	5	19
ZEO-8	17	4	21
ZEO-9	14	5	19
ZEO-10	6	1	7

Como no caso do evento ZEO-1 e ZEO-2 não houve germinação das sementes, não foi feito nenhum avanço na análise destes eventos. Na geração T₁ obteve-se então 8 plantas, representando 6 eventos de transformação, visto que as plantas ZEO-4 e ZEO-5, ZEO-6 e ZEO-7, são provenientes do mesmo calo.

As plantas transformadas confirmadas por PCR foram polinizadas, considerando-se que nos casos possíveis foi feita a autopolinização e no caso da ausência de pólen da planta transformada foi utilizado pólen do híbrido Hill não transformado. As espigas produzidas pelas plantas apresentaram fenótipo muito variado, com espigas pequenas, pequeno número de grãos e presença de grãos chochos até espigas com um grande número de grãos com aspecto semelhante ao híbrido Hill não transformado (figura 31). Os grãos foram colhidos, secos e armazenados em pacotes devidamente identificados. A identificação consta do nome do evento (ZEO-3 à ZEO-10) seguido do número da planta da qual a progênie se origina, colocado entre parênteses.

Figura 31 - Espigas das plantas ZEO-3(3) (a) e ZEO-9(10) (b)
O n^o entre parênteses identifica a planta da qual a progênie se origina.

2.3.5 Plantio e análise da geração T₂

Com o objetivo de coletar grãos imaturos para análise da expressão gênica foi feito o plantio de 30 sementes obtidas de cada um dos 8 eventos da geração T₂ (ZEO-3 à ZEO-10) e 30 sementes de 2 controles, o milho Hill não transformado e o milho Hill transformado sem a confirmação da presença do transgene (PCR negativo). As plantas foram cultivadas sob condições controladas em casa-de-vegetação (figura 32).

Figura 32 - Plântulas em fase de transplântio para os vasos e visão geral do experimento na casa-de-vegetação

Para identificação das plantas positivas para presença do transgene, visto que existe segregação na progênie, foi utilizada a detecção da proteína PAT que confere resistência ao herbicida, usada como marcador de seleção. Antes do transplântio cada uma das plantas foi testada para detecção da proteína. Os testes imunocromatográficos foram realizados com as tiras de fluxo lateral. Foram testadas folhas de todas as plântulas germinadas para cada evento de transformação. A presença de uma única banda indica que a amostra é negativa para presença da proteína PAT, a presença de duas bandas indica que a amostra é positiva (figura 33).

Figura 33 - Teste imunocromatográfico de 15 plântulas (1 à 15) originadas do evento ZEO-3(3)
A 1ª banda na tira refere-se ao controle do teste. A 2ª banda refere-se ao resultado para presença da proteína PAT

Do total de 240 sementes plantadas, foram testadas com as tiras de fluxo lateral um total de 225 plântulas que germinaram, representando a progênie das 8 plantas transformadas na geração T₂. Na tabela 3 podem ser verificados o número de plântulas germinadas e o número de positivos para presença da proteína PAT, em percentuais que variaram de 71 a 97%, de acordo com o evento de transformação. A germinação das plantas parece não ser afetada pela transformação, visto que os eventos apresentaram valores médios de 94% de germinação das sementes.

Tabela 3 - Resumo do teste imunocromatográfico da tira em fluxo lateral

Identificação do Parental	Nº de Sementes Germinadas	Nº de Plântulas Positivas	Plântulas Positivas (%)
ZEO-3(3)	28	20	71
ZEO-4(9)	30	27	90
ZEO-5(15)	29	27	93
ZEO-6(3)	24	17	71
ZEO-7(6)	30	29	97
ZEO-8(6)	29	23	79
ZEO-9(5)	29	26	90
ZEO-10(7)	26	25	96

As plantas da geração T_2 foram observadas durante o seu desenvolvimento e algumas alterações fenotípicas foram constatadas. As plantas de alguns eventos de transformação apresentaram crescimento menos vigoroso do que as demais (figura 34).

Figura 34 - Planta ZEO-3(3)-30 (a) com desenvolvimento menos vigoroso do que a planta ZEO-4(9)-9 (b)

Foram observadas também alterações fenotípicas como crescimento indeterminado, presença de estrias amareladas nas folhas e encarquilhamento e rugosidade das folhas mais novas (figura 35).

Figura 35 - (a) Planta ZEO-3(3)-16 apresentando crescimento indeterminado
(b) Planta ZEO-3(3)-21 apresentando folhas estriadas
(c) Plantas ZEO-9(5)-4 apresentando encarquilhamento das folhas mais novas

Outro problema apresentado pelas plantas transformadas foi a baixa produção de pólen, acarretando em um pequeno número de grãos produzidos em algumas espigas. O híbrido Hill usado na transformação é um material genético suscetível à doenças e devido a isso tivemos um severo ataque de fungos na casa-de-vegetação que também levou a uma redução no material genético produzido. As plantas que sobreviveram foram polinizadas e identificadas para a coleta dos grãos imaturos aos 16, 20 e 24 DAP, representando a geração T_3 .

2.3.6 Análise do padrão das proteínas de reserva

Um pool de grãos da geração T_2 foi selecionado para as análises do padrão de proteínas de reserva e para as análises do perfil de aminoácidos. Foram selecionados grãos da progênie das 8 plantas transformadas, com 2 repetições. Cada repetição é constituída por uma espiga de uma planta transformada de determinado evento. Os grãos foram liofilizados e triturados para produção da farinha a ser utilizada nas análises. Antes da trituração cada grão foi testado com as tiras de fluxo lateral para presença da proteína Pat, usado como marcador de seleção. Utilizamos esta análise imunocromatográfica para não misturar grãos não transformados com os transformados, visto que existe segregação na progênie, o que poderia causar um efeito de diluição nas análises planejadas e causar uma interpretação errônea dos

dados. Desta forma uma parte do grão foi testada para detecção da Pat e a outra parte foi triturada para produzir a farinha.

Para determinar qual a quantidade do grão a ser utilizada com segurança nas análises imunocromatográficas, evitando resultados falso-negativos, foi realizada um teste retirando-se fragmentos de diferentes tamanhos do grão para maceração. A análise de metade do grão foi a que apresentou um resultado claramente positivo, conforme esquematizado na figura 36.

Figura 36 - Testes com tiras de fluxo lateral para detecção da proteína PAT utilizando fragmentos de diferentes tamanhos do grão de milho. 1: corte de um fragmento do grão; 2: corte de dois fragmentos do grão; 3: corte de metade do grão para maceração, conforme ilustrado

Para produzir a quantidade de farinha requerida nas análises de proteína foram testados um total de 159 sementes da repetição 1 e 179 sementes da repetição 2, com a maioria dos eventos apresentando percentual de sementes positivas que variaram de 80 a 100%, sendo que apenas os eventos ZEO-6(6) e ZEO-3(1) apresentaram percentual de positivos abaixo de 40%. Devido à pequena quantidade de sementes do evento ZEO-3(3) disponíveis, estas não foram testadas para a presença da proteína Pat. Foi produzido um mínimo de 2g de farinha para cada um dos eventos testados (tabela 4).

Tabela 4 - Resultados do teste com tiras de fluxo lateral para detecção da proteína PAT na geração T₂ de plantas de milho transformadas com a zeolina

Evento de Transformação	Nº Sementes	Massa (g)	Resultado Positivo	Resultado Negativo	Plantas Positivas (%)
REPETIÇÃO 1					
ZEO-3(3)	sem teste*				
ZEO-4(3)	25	4,20	25	0	100
ZEO-5(2)	25	5,13	24	1	96
ZEO-6(6)	26	4,11	9	17	35
ZEO-7(11)	20	5,04	20	0	100
ZEO-8(2)	18	4,22	14	4	78
ZEO-9(8)	15	4,11	15	0	100
ZEO-10(7)	30	4,25	27	3	90
REPETIÇÃO 2					
ZEO-3(1)	30	3,45	11	19	37
ZEO-4(9)	20	3,82	18	2	90
ZEO-5(15)	20	3,64	17	3	85
ZEO-6(3)	28	5,63	19	9	68
ZEO-7(6)	18	3,97	15	3	83
ZEO-8(6)	20	3,72	17	3	85
ZEO-9(5)	25	4,00	20	5	80
ZEO-10(9)	18	3,89	16	2	89

A farinha obtida foi utilizada para extração das frações protéicas dos grãos e análises do padrão das proteínas a fim de comparar os resultados apresentados pelos controles e pelas plantas transformadas. Foi realizada a quantificação das frações zeína, globulina+albumina e glutelina. As amostras são compostas pelo híbrido Hill não transformado (Controle I) e o Hill transformado sem o transgene (Controle II) e as duas repetições de plantas transformadas dos eventos ZEO-3 à ZEO-10.

Na tabela 5 são apresentadas as quantidades da Zeína II mensurada no espectrofotômetro nas duas repetições. A zeolina possui a solubilidade e propriedades das γ -zeínas e espera-se que esta seja extraída na fração zeína. Em testes preliminares utilizando o Western Blot para detecção da zeolina nas frações zeína I e II, foi verificada a presença da zeolina na fração zeína II, conforme esperado. Os resultados representam a média de duas leituras e foram feitas leituras dos grãos obtidos de duas plantas de cada um dos eventos de transformação ZEO-3 à ZEO-10. Na análise dos valores verifica-se que existe uma diferença entre os valores apresentados pelas plantas transformadas e os controles, com uma tendência de um pequeno aumento da fração zeína II nas plantas transformadas.

Tabela 5 - Determinação quantitativa da fração zeína II nos grãos de milho através de leitura no espectrofotômetro

Evento de Transformação	Total (mg/100 mg)	Evento de Transformação	Total (MG/100 mg)
ZEO-3(3)	0,134	ZEO-3(1)	0,114
ZEO-4(9)	0,115	ZEO-4(3)	0,112
ZEO-5(15)	0,139	ZEO-5(2)	0,125
ZEO-6(3)	0,136	ZEO-6(6)	0,119
ZEO-7(6)	0,135	ZEO-7(11)	0,115
ZEO-8(6)	0,117	ZEO-8(2)	0,124
ZEO-9(5)	0,128	ZEO-9(8)	0,137
ZEO-10(7)	0,143	ZEO-10(9)	0,143
Controle I (Hill não transf.)	0,103		
Controle II (Transf. s/ transgene)	0,100		

Após a quantificação foi feita a corrida no gel SDS-PAGE, das repetições 1 e 2 de todas as plantas transformadas e dos controles. Foram obtidos géis das frações zeínas I e zeína II, globulina+albumina e glutelina. Apesar da tendência de aumento da fração zeína II nas plantas transformadas, nos géis das zeínas não foram observadas alterações nos padrões das bandas principais observadas, comparando-se as plantas transformadas com as bandas dos controles (figuras 37, 38, 39 e 40).

Figura 37 - (a) Gel SDS-PAGE da fração Zeína I. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 1: ZEO-3(1); 2: ZEO-4(3); 3: ZEO-5(2); 4: ZEO-6(6)

Figura 37 - (b) Gel SDS-PAGE da fração Zeína I. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 5: ZEO-7(11); 6: ZEO-8(2); 7: ZEO-9(8); 8: ZEO-10(9)

Figura 37 - (c) Gel SDS-PAGE da fração Zeína I. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 9: ZEO-3(3); 10: ZEO-4(9); 11: ZEO-5(15); 12: ZEO-6(3)

Figura 37 - (d) Gel SDS-PAGE da fração Zeína I. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 13: ZEO-7(6); 14: ZEO-8(6); 15: ZEO-9(5); 16: ZEO-10(7)

Figura 38 - (a) Gel SDS-PAGE da fração Zeína II. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 1: ZEO-3(1); 2: ZEO-4(3); 3: ZEO-5(2); 4: ZEO-6(6)

Figura 38 - (b) Gel SDS-PAGE da fração Zeína II. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 5: ZEO-7(11); 6: ZEO-8(2); 7: ZEO-9(8); 8: ZEO-10(9)

Figura 38 - (c) Gel SDS-PAGE da fração Zeína II. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 9: ZEO-3(3); 10: ZEO-4(9); 11: ZEO-5(15); 12: ZEO-6(3)

Figura 38 - (d) Gel SDS-PAGE da fração Zeína II. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 13: ZEO-7(6); 14: ZEO-8(6); 15: ZEO-9(5); 16: ZEO-10(7)

A fração zeína é composta pelas seguintes classes: α -zeínas de 19 e 22kDa, β -zeína de 15kDa, γ -zeína de 16, 27 e 50kDa e δ -zeína de 10 e 18 kDa (WOO et al., 2001). O peso molecular das principais zeínas identificadas está indicado nos géis. Segundo o protocolo de extração utilizado (LANDRY; DELHAYE; DAMERVAL, 2000), as γ -zeínas de 27 e 50kDa são mais facilmente extraídas na fração zeína II. Neste trabalho os autores referem-se à presença de bandas de 27 e 60kDa no gel da zeína II, mas este gel não é apresentado. Além destas os autores citam a presença de polipeptídeos de 12 kDa e dímeros com 30-50 kDa.

A zeolina possui a solubilidade e propriedades da γ -zeína, desta forma esperava-se encontrar a proteína na fração zeína, com peso molecular em torno de 60kDa, considerando a proteína intacta. Não foram observadas, no entanto, nenhuma alteração significativa do padrão de bandas no gel, significando que a zeolina não está sendo traduzida, que a banda apresentada possui o mesmo peso molecular de alguma classe de zeína nativa, ou que o seu acúmulo não ocorre em quantidades detectáveis no gel

SDS-PAGE corado com nitrato de prata. Da mesma forma a expressão da zeolina parece não alterar o padrão de expressão das demais zeínas do milho.

Nos géis das demais frações extraídas e analisadas, a fração da globulina+albumina e da glutelina, também não foram observadas diferenças visuais significativas no padrão de bandas apresentado pelas plantas transformadas em relação aos controles (figura 39 e figura 40). Considerando a complexidade e número de polipetídeos apresentados nas frações globulina, albumina e glutelina, tal identificação demandaria análises mais detalhadas que não foram, no entanto, realizadas para detectar possíveis diferenças como, por exemplo, a intensidade das bandas, que poderia estar relacionada a maior ou menor síntese de determinada proteína em função da presença do transgene.

Figura 39 - (a) Gel SDS-PAGE da fração Globulina+Albumina. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 1: ZEO-3(1); 2: ZEO-4(3); 3: ZEO-5(2); 4: ZEO-6(6)

Figura 39 - (b) Gel SDS-PAGE da fração Globulina+Albumina. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 5: ZEO-7(11); 6: ZEO-8(2); 7: ZEO-9(8); 8: ZEO-10(9)

Figura 39 - (c) Gel SDS-PAGE da fração Globulina+Albumina. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 9: ZEO-3(3); 10: ZEO-4(9); 11: ZEO-5(15); 12: ZEO-6(3)

Figura 39 - (d) Gel SDS-PAGE da fração Globulina+Albumina. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 13: ZEO-7(6); 14: ZEO-8(6); 15: ZEO-9(5); 16: ZEO-10(7)

Figura 40 - (a) Gel SDS-PAGE da fração Glutelina. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 1: ZEO-3(1); 2: ZEO-4(3); 15: ZEO-5(2); 16: ZEO-6(6)

Figura 40 - (b) Gel SDS-PAGE da fração Glutelina. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 5: ZEO-7(11); 6: ZEO-8(2); 7: ZEO-9(8); 8: ZEO-10(9)

Figura 40 - (c) Gel SDS-PAGE da fração Glutelina. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 9: ZEO-3(3); 10: ZEO-4(9); 11: ZEO-5(15); 12: ZEO-6(3)

Figura 40 - (d) Gel SDS-PAGE da fração Glutelina. M: Marcador; Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene ; 13: ZEO-7(6); 14: ZEO-8(6); 15: ZEO-9(5); 16: ZEO-10(7)

2.3.7 Análise da expressão gênica

Para verificar a expressão gênica, o mRNA das plantas transformadas e controles foi extraído, feito um RT-PCR e o PCR para detecção da sequência relativa ao transgene. Para esta análise foram utilizadas as oito plantas transformadas e os dois controles. Visto que o interesse nesta etapa do trabalho é apenas confirmar a expressão do transgene por meio da detecção do mRNA, sem nenhuma avaliação quantitativa, foi escolhida apenas uma das repetições aos 16, 20 e 24 DAP, totalizando 30 reações. Previamente às análises, foram realizados testes preliminares utilizando três diferentes metodologias de extração, Trizol, Trizol com adaptações do protocolo Promega e Brazol, a fim de verificar aquela que permite uma melhor qualidade em termos de quantidade e pureza do RNA extraído (valores do grau de pureza entre 1,8 e 2,0). Os resultados obtidos com cada uma das metodologias testadas estão detalhados na tabela 6, onde são apresentados os valores obtidos com o controle transformado sem o transgene (evento 15, planta 5, 20 DAP), a planta transformada ZEO-5 (evento

ZEO-5(15)-26, 16 DAP) e a planta ZEO-7 (ZEO-7(6)-21, 24 DAP), com duas repetições de cada.

Tabela 6 - Teste para extração de RNA utilizando diferentes metodologias

Os valores entre parênteses representam a quantidade de material utilizado

Evento de Transformação	Abs 280	Abs 260	Grau de Pureza
MÉTODO TRIZOL			
CONT. (0,27g)	0,171	0,274	1,60
CONT. (0,31g)	0,140	0,208	1,48
ZEO-5 (0,20g)	0,124	0,229	1,84
ZEO-5 (0,20g)	0,097	0,155	1,60
ZEO-7 (0,14g)	0,039	0,065	1,66
ZEO-7 (0,27g)	0,037	0,056	1,65
MÉTODO BRAZOL			
ZEO-5 (0,21g)	#	#	#
ZEO-5 (0,11g)	0,207	0,267	1,29
ZEO-7 (0,18g)	#	#	#
ZEO-7 (0,13g)	#	#	#
MÉTODO TRIZOL (com adaptações protocolo Promega*)			
CONT.* (0,11g)	0,005	0,010	2,00
CONT. (0,10g)	0,064	0,105	1,64
ZEO-5* (0,10g)	0,018	0,035	1,94
ZEO-5 (0,14g)	0,033	0,058	1,76
ZEO-7* (0,13g)	0,012	0,024	2,00
ZEO-7 (0,15g)	0,069	0,110	1,59

#: Amostras muito gelatinosas não sendo possível a quantificação

Utilizando-se o método Brazol a maioria das amostras apresentou-se gelatinosa, devido ao excesso de amido, impossibilitando a leitura no espectrofotômetro. No teste de extração, o método que apresentou os melhores resultados, com valores de pureza

próximos de 2, foi o método Trizol reduzindo-se a quantidade de tecido vegetal (grão) utilizado. A proporção do protocolo inicial que era de 100mg tecido : 1mL de Trizol passou para 50mg de tecido:1mL de Trizol. Com as adaptações sugeridas no protocolo da Promega a pureza obtida foi melhor, mas houve muita perda de RNA na lavagem adicional e, dessa forma, optou-se por usar o protocolo do método Trizol base.

Após extração do RNA e RT-PCR foi feito o PCR para detecção da faseolina, o que é um indicativo de que a construção γ -kafirina+zeolina inserida no genoma do milho está transcrevendo o RNA mensageiro. Os resultados verificados no gel de agarose (figura 41) mostram que a banda esperada para o fragmento da faseolina (cerca de 120 bp) está presente nos eventos ZEO-3(3), ZEO-4(9), ZEO-5(15), ZEO-6(3), ZEO-8(6) e ZEO-10(7) e ausente nos controles Hill não transformado, Hill transformado sem o transgene, controle negativo com água, evento ZEO-7(6) e ZEO-9(5). O evento ZEO-3(3) é que apresenta uma maior expressão, com um pico aos 20 DAP. No evento ZEO-8(6) a expressão ocorre bem forte aos 16 DAP, mas depois parece não haver mais expressão. Nos demais eventos a expressão ocorre mais fraca aos 16, 20 e 24 DAP.

Figura 41 - Gel de agarose mostrando a banda relativa à amplificação de um fragmento da faseolina (120pb) do mRNA expresso pelo transgene

M = marcador 1 Kb plus DNA ladder; 1,2,3: Controle Hill não transformado; 4,5,6: Hill transformado sem o transgene; 7-31: Plantas transformadas; 7,8,9: ZEO-3(3); 10,11,12: ZEO-4(9); 13: Controle negativo; 14,15,16: ZEO-5(15); 17,18,19: ZEO-6(3); 20, 21,22: ZEO-7(6); 23,24,25: ZEO-8(6); 26,27,28: ZEO-9(5); 29,30,31: ZEO-10(7). Cada um dos eventos e controles representa a expressão aos 16, 20 e 24 DAP.

2.3.8 Confirmação da transformação – Western Blot

Para verificação da presença da proteína do transgene foi utilizado o Western Blot com anticorpo anti-faseolina (Figuras 42 e 43). A zeolina possui a solubilidade e propriedades da γ -zeína nativa e dessa forma é esperado que a zeolina seja extraída na fração zeína (MAINIERI et al., 2004). Com o objetivo de detectar a zeolina, a reação de Western foi realizada nos géis da fração zeína I e II. Foi verificada a detecção da proteína zeolina com cerca de 50-60kDa nos eventos ZEO-3(3), ZEO-5(15) e ZEO-6(3) no gel da zeína II (figura 43), apresentando uma banda muito forte para o evento ZEO-3(3). Na fração zeína I não houve detecção, comparando-se plantas transformadas com

o controle Hill não transformado (Cont.I) e transformado sem o transgene (Cont.II) (figura 42). O anticorpo policlonal anti-faseolina apresentou uma reação cruzada, com bandas nas posições relativas às zeínas mais abundantes do milho, a α -zeína de 19kDa, a γ -zeína de 16kDa e a β -zeína de 15kDa, no gel da zeína I (figura 42), e na posição das γ -zeínas de 50 e 27kDa, no gel da zeína II (figura 43), sendo observadas bandas tanto nos controles quanto em todos os eventos. Na planta ZEO-3(3) no gel da zeína II (figura 43) também são encontradas uma banda maior que 50kDa, bem fraca no gel, uma banda entre 27 e 50kDa e bandas menores que 27kDa.

Figura 42 - (a) Western Blot da fração Zeína II com anticorpo anti-faseolina. Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 1-4: Plantas transformadas; 1: ZEO-3(3); 2: ZEO-4(9); 3: ZEO-5(15); 4: ZEO-6(3)

Figura 42 - (b) Western Blot da fração Zeína I com anticorpo anti-faseolina. Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 5-8: Plantas transformadas; 5: ZEO-7(6); 6: ZEO-8(6); 7: ZEO-9(5); 8: ZEO-10(7)

Figura 43 - (a) Western Blot da fração Zeína II com anticorpo anti-faseolina. Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 1-4: Plantas transformadas; 1: ZEO-3(3); 2: ZEO-4(9); 3: ZEO-5(15); 4: ZEO-6(3)

Figura 43 - (b) Western Blot da fração Zeína II com anticorpo anti-faseolina. Cont. I: controle Hill não transformado; Cont. II: controle transformado sem o transgene; 5-8: Plantas transformadas; 5: ZEO-7(6); 6: ZEO-8(6); 7: ZEO-9(5); 8: ZEO-10(7)

2.3.9 Análise do perfil de aminoácidos

A expressão do transgene e a tradução da proteína zeolina foram constatadas nas plantas transformadas eventos ZEO-3(3), ZEO-5(15) e ZEO-6(3). A fim de realizar algumas análises preliminares com o objetivo de verificar as alterações metabólicas causadas pela expressão e acúmulo da zeolina no endosperma de milho, foram realizadas a análise dos aminoácidos solúveis totais e a determinação do teor individual de cada aminoácido, através da quantificação no HPLC dos aminoácidos totais, que inclui os aminoácidos solúveis e incorporados nas proteínas nos grãos de milho.

Na análise dos aminoácidos solúveis totais (tabela 7), não foi verificada diferença relevantes entre os valores mensurados nos eventos de transformação, principalmente naqueles em que foi detectada a presença da zeolina (ZEO-3(3), ZEO-5(15), ZEO-6(3)), em relação aos controles, visto que estes três eventos apresentaram tendências variáveis em relação aos controles e esta variação parece não estar correlacionada à transformação. Neste caso não é possível nenhuma conclusão sobre o aumento ou

redução dos aminoácidos solúveis disponíveis nos grãos em função da expressão de uma nova proteína. Os resultados representam a média de duas leituras.

Tabela 7 - Determinação dos aminoácidos solúveis totais nos grãos de milho

Evento de Transformação	Total aa solúveis (nmol/ml)
ZEO-3(3)	332,38
ZEO-4(9)	315,69
ZEO-5(15)	476,54
ZEO-6(3)	370,21
ZEO-7(6)	298,63
ZEO-8(6)	402,05
ZEO-9(5)	329,90
ZEO-10(7)	342,90
Controle I (Hill não trans.)	427,44
Controle II (Transf. s/ transgene)	385,12

A determinação do perfil de aminoácidos no HPLC (tabela 8) mostra resultados significantes para o aumento de diversos aminoácidos no evento ZEO-3(3), quando comparado aos controles Hill não transformado (Cont.I) e Hill transformado sem o transgene (Cont.II). Os eventos ZEO-5(15) e ZEO-6(3) não apresentaram, no entanto, diferenças significantes em relação a nenhum dos aminoácidos quantificados. Nestes eventos o teor de lisina (Lys) quantificado foi de, respectivamente, 16,28 e 12,71mg/g de proteína, teor este comparável aos controles que apresentaram 15,89 e 9,77mg/g de proteína. No evento ZEO-3(3), em negrito, todos os aminoácidos analisados aumentaram a sua concentração, comparando com os controles e os demais eventos. No evento ZEO-3(3) o teor de lisina quantificado é de 25,76mg/g de proteína, que representa 62% de aumento em relação ao controle II. Houve ainda aumento de todos os aminoácidos essenciais no evento ZEO-3(3), com valores aumentados em 79% para treonina (Thr), 274% para metionina (Met), 72% para isoleucina (Ile), 87% para leucina (Leu), 68% para valina (Val), 107% para histidina (His) e 73% para fenilalanina (Phe). O percentual de triptofano (Trp) não foi determinado. No evento ZEO-3(3) houve aumento

também de alguns aminoácidos não essenciais, com valores aumentados em 108% para asparagina (Asn), 91% para o ácido glutâmico (Glu), 111% para a glutamina (Gln), 52% para a arginina (Arg), 76% para o ácido aspártico (Asp), 40% para a glicina (Gly), 80% para a alanina (Ala), 84% para a serina (Ser) e 74% para a tirosina (Tyr). Todos estes aumentos foram determinados em relação ao controle II, que mostrou uma tendência de apresentar valores menores quando comparado ao controle I, exceto para lisina, em que o valor apresentado foi maior no Controle II. Consideramos o Controle II mais interessante para comparação visto que este passou por todas as fases da transformação e cultura de tecidos que podem causar mudanças metabólicas nas plantas. Apesar de pequena, o evento ZEO-5(15) mostrou uma tendência de apresentar valores maiores que o ZEO-6(3).

O teor de proteína total apresentado é maior no evento ZEO-3(3), mas este dado não pode ser diretamente relacionado à presença do transgene, visto que o Controle II, que também é originado de transformação, mas não expressa o transgene, apresentou um valor de proteína total ainda maior que o evento ZEO-3(3).

Tabela 8 - Determinação da proteína total e concentração de aminoácidos

Proteína total em g de proteína/Kg matéria seca (MS). Concentração dos aminoácidos em mg do aminoácido/g de proteína.

Amostras: Cont.I = Hill não transformado; Cont.II = Hill transformado sem o transgene; Eventos de transformação: ZEO-3(3); ZEO-5(15); ZEO-6(3);

Amostra	Proteína Total (g/Kg MS)	Concentração aminoácidos (mg/g proteína)																
		Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Tyr	Met	Val	Phe	Ile	Leu	Lys
Cont. I	98,19	53,02	130,15	48,07	11,76	6,63	7,24	17,73	31,78	36,71	64,76	21,33	12,56	36,25	42,53	25,42	138,06	9,77
Cont. II	132,06	46,25	117,47	45,82	10,59	6,06	6,96	17,33	28,75	33,54	59,32	29,37	11,08	34,31	41,84	24,60	133,13	15,89
ZEO-3(3)	114,56	81,46	224,56	95,31	19,49	12,77	14,42	24,31	51,57	51,09	106,82	35,72	41,48	57,50	72,36	42,41	248,82	25,76
ZEO-5(15)	88,63	58,24	140,77	52,36	13,81	7,93	9,49	15,96	35,39	40,80	66,89	18,67	14,77	39,99	48,45	28,34	158,13	16,28
ZEO-6(3)	96,69	50,82	136,67	47,49	12,28	6,23	7,06	16,53	29,77	34,69	58,58	17,42	12,09	34,07	39,78	24,15	138,55	12,71

2.4 DISCUSSÃO

Inicialmente foram analisadas duas estratégias para clonagem do promotor da γ -kafirina e do gene da zeolina nos vetores, a clonagem direta, através da digestão enzimática do inserto e do vetor com determinadas enzimas de restrição, ou a amplificação do inserto por PCR, digestão e clonagem no vetor. A primeira estratégia não pode ser utilizada já que, analisando-se as seqüências do inserto e do vetor com o programa “NebCutter” (www.nebcutter.com), não foram encontrados sítios de restrição que pudessem ser usados na clonagem. A estratégia da amplificação por PCR e posterior digestão com enzimas de restrição é que foi então utilizada.

A amplificação do promotor e do gene da zeolina e a posterior clonagem destes elementos nos plasmídeos pCambia3301 e pTF102 foram realizadas com sucesso, confirmada pela PCR para amplificação completa do inserto (figura 13) e pelo sequenciamento dos clones (figura 16). Esta etapa, crítica para que o objetivo do projeto fosse alcançado, teve um grande avanço com a contribuição do Dr. Paulo Arruda da Unicamp, que forneceu o plasmídeo pRT-PgK com o promotor da γ -kafirina de sorgo clonado, e do Dr. Vitale do Istituto Di Biologia e Biotecnologia Agrária, que forneceu o plasmídeo pDHA contendo o gene da zeolina clonado.

Em todos os procedimentos de transformação foi utilizado o híbrido Hill, que apresenta no seu background genético as linhagens A188 e B73, com as vantagens de ter uma grande capacidade de formar calos embriogênicos tipo II e de regeneração em meio de cultura (ZHAO et al., 2001). Foi utilizada a transformação pelos dois métodos, a biobalística e a *Agrobacterium*, a fim aumentar a chance de sucesso em obter um evento de transformação, visto que este sucesso dependia do número de transformações que fossem realizadas já que a eficiência da transformação de uma monocotiledônea como o milho é relativamente baixa. A biobalística é um método que vêm sendo usado há mais tempo para transformação do milho (Gordom-Kamm et al., 1990), enquanto protocolos reproduzíveis para uso de *Agrobacterium* na transformação do milho começaram a ser desenvolvidos e a mostrar algum sucesso com vetores binários apenas recentemente. Na revisão apresentada por Shrawat e Lörz (2006), são consideradas como maiores desvantagens da biobalística a variação observada na estabilidade, integração e expressão do transgene introduzido, enquanto com o uso de *Agrobacterium* é

possível obter uma integração mais precisa de um menor número de cópias do transgene, com um maior grau de estabilidade deste transgene na planta transformada.

No protocolo utilizado na transformação do milho com *Agrobacterium*, desenvolvido por Frame et al (2002), o meio de co-cultivo foi suplementado com L-cisteína que tem a importante função de agir como anti-oxidante, permitindo uma redução dos efeitos detrimenais da resposta de hipersensibilidade iniciada nas células infectadas por *Agrobacterium*. No trabalho de Frame et al. (2002), com o uso da L-cisteína a eficiência do processo foi aumentada, alcançando freqüências de transformação em torno de 5,5%. Protocolos mais recentes para transformação do híbrido Hill com vetores binários utilizando *Agrobacterium* reportam freqüências de transformação de até 18%, utilizando meios pouco salinos e com a adição de L-cisteína e de DTT (ditiotritol) no meio de co-cultivo (VEGA et al., 2008).

Apesar de desejável, a transformação com *Agrobacterium* não obteve sucesso e todos os embriões e calos tipo II transformados não se desenvolveram. Esta reação ocorreu provavelmente devido a reação de hipersensibilidade e consequente morte celular causada pela presença da *Agrobacterium*, reação esta que não pode ser evitada mesmo com a presença da L-cisteína no meio. Adaptações do protocolo deverão ser implementadas para que transformações futuras do milho com *Agrobacterium* possam ter sucesso, alcançado níveis de eficiência de transformação de até 24%, nível este alcançado em protocolo recente proposto por Hensel et al. (2009) onde fatores essenciais como a concentração dos nutrientes, temperatura, pH, presença e concentração de acetoseringona e de antioxidantes são descritos de forma detalhada. Outro ponto objeto de questionamento é que foi utilizada a estirpe GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*, enquanto em outros trabalhos de transformação com milho são utilizadas as estirpes hipervirulentas EHA101 e EHA105, que poderiam aumentar as chances de sucesso da transformação do milho com *Agrobacterium*.

Frame et al. (2000) adaptaram o protocolo para transformação de milho utilizando calos embriogênico tipo II, uma estrutura altamente friável e com rápido crescimento, derivada de embriões zigóticos imaturos do híbrido Hill. Nestes estudos foram obtidas freqüências de transformação de 10%, ou seja, de cada 100 calos bombardeados, 10 se desenvolveram como possíveis eventos independentes de transformação, 7,1 foram confirmados por PCR, 5,8 regeneraram plantas e 4,5

produziram sementes. O protocolo utilizado para transformação do milho com a zeolina por biobalística foi aquele descrito por Carneiro, Carneiro e Paiva (2004), sendo que a eficiência obtida no presente experimento foi, no entanto, bem inferior àquela obtida por Frame et al. (2000). Alguns fatores que podem afetar a eficiência da transformação, além do tecido vegetal, são o tipo de tratamento osmótico e os parâmetros da biobalística, que inclui, dentre outros, o tamanho das partículas utilizadas no bombardeamento. Neste sentido existem diferenças entre o protocolo utilizado nesse trabalho e aquele descrito por Frame et al. (2000), que podem ser testadas e comparadas em experimentos futuros para verificar aquele que apresenta os melhores resultados.

No final dos procedimentos de transformação foram obtidas por biobalística 41 plantas, representando 17 eventos distintos. A eficiência do processo de transformação, em termos de calos regenerados, foi de 0,7% considerando que foram transformados 2300 explantes. A fase de aclimação apresentou-se, no entanto, como uma fase crítica do processo, na qual muitas plantas não sobreviveram, reduzindo esta eficiência para 0,1% considerando o processo como um todo, que resultou na obtenção de 3 eventos de transformação de milho com a zeolina, capazes de produzir sementes viáveis. As transformações no milho com a construção γ -kafirina + zeolina foram realizadas em paralelo na Embrapa Milho e Sorgo, com a eficiência de 1% e, neste caso foram obtidas, também por biobalística, 7 plantas transformadas representando 5 eventos, de um total de 500 transformações realizadas (figura 27).

Ao final do processo, as plantas com o transgene confirmado por PCR e que foram capazes de produzir sementes viáveis resumiram-se à 8 plantas representando 6 eventos. Em plantas transformadas obtidas do híbrido Hill tais efeitos indesejáveis, de aclimação na casa-de-vegetação, baixa polinização e baixa produção de sementes viáveis, já foram relatados por Frame et al. (2002), de tal forma que cruzamentos entre o Hill e linhagens elite de milho foram obtidos e transformados, resultando em um material capaz de se desenvolver em casa-de-vegetação e produzir sementes em quantidades 3-5 vezes maiores do que os transformantes obtidos com o híbrido Hill (Horn et al., 2006).

Como controle foi utilizado o bombardeamento com o plasmídeo pCambia3301 sem o inserto, que permitiria diferenciar qualquer variação somaclonal ao longo dos procedimentos da cultura de tecido além de, quando obtidas as plantas

transformadas, permitir que se demonstre que os resultados obtidos em termos de perfil de aminoácidos e padrão das proteínas de reserva possam ser diretamente correlacionados à presença da zeolina. Infelizmente nenhuma planta controle chegou à fase final de produção de grãos. Como controle foi então utilizado o parental, o milho Hill não transformado, e a planta transformada evento 15, que passou por todas as etapas da transformação e da cultura de tecido mas na qual o transgene não foi detectado em nenhuma das análises realizadas.

Para análise e confirmação da transformação das plantas com a construção γ -kafirina + zeolina foram realizadas três tipos de análise: a verificação da inserção do DNA do transgene no genoma do milho através da PCR; a expressão gênica deste DNA através da RT-PCR e da PCR para detecção do mRNA transcrito; a comprovação da tradução da proteína do transgene através do Western Blot com anticorpo anti-faseolina. Com estas análises comprovamos que o DNA está presente, pode ser transcrito e pode ser traduzido de forma funcional nos grãos de milho ao longo de três gerações. A confirmação da presença do DNA do transgene foi obtida em 10 plantas, da transcrição do mRNA em 6 plantas e a tradução da proteína foi confirmada em 3 dos eventos de transformação analisados.

Visto que a expressão e a herança do transgene na primeira geração de plantas transformadas não são muitas vezes uma boa predição da estabilidade do transgene em gerações subseqüentes, devido à potenciais problemas com a transmissão e expressão do transgene após várias gerações de multiplicação via sexual (REGISTER et al., 1994), as análises de expressão gênica foram realizadas na geração T_3 e as análises protéicas na geração T_2 . Conseguimos avançar 3 gerações a fim de obter plantas com uma maior estabilidade do transgene mas, em função do tempo disponível, não foi possível obter plantas homozigotas para a característica de interesse. A homozigose seria uma condição desejável visto que a comparação em todas as análises realizadas foi feita entre plantas com a presença e ausência do transgene, mas nas plantas em que o transgene está presente, pode haver uma mistura de grãos homozigotos e heterozigotos. Caso haja um efeito de dose da proteína heteróloga expressa, os grãos homozigotos deveriam conter mais zeolina do que àqueles heterozigotos.

Na progênie do milho transformado com a zeolina não foram observadas as freqüências esperadas de segregação para a presença de um locus dominante, uma segregação 3:1, no caso de auto-polinização e 1:1, no caso do cruzamento com Hill

não transformado. Este desvio na segregação esperada poderia ser explicado pela presença de diferentes números de cópias do transgene em diferentes cromossomos que estão segregando de forma individual, ou a existência de diferentes locais de inserção do transgene no genoma da planta, que pode levar ao silenciamento ou a metilação do transgene. Em trabalho com milho expressando uma proteína heteróloga, a α -lactoalbumina do leite, foi observado que na geração F_2 quatro dos seis eventos analisados apresentaram uma segregação 3:1, de acordo com o modelo proposto para um locus dominante. Na geração F_3 , o número de homozigotos foi menor do que o esperado. Os autores especulam que este poderia ser um efeito de uma transmissão anormal do transgene ou de problemas de germinação das sementes transformadas (BICAR et al., 2008), embora os eventos tenham apresentado de 1 a 12 cópias do transgene, este fator não foi mencionado na discussão do padrão de segregação observado.

O objetivo do projeto foi expressar a zeolina em plantas de milho, independente do número de cópias do transgene. Desta forma todas as análises propostas foram feitas a fim de identificar tais plantas entre os eventos obtidos. A presença de grãos sem o transgene, devido a segregação na geração T_2 , e um possível efeito de diluição devido a presença destes no pool do qual foi feito a farinha utilizada na análise de aminoácidos solúveis e totais foi minimizado pelo uso de teste imunocromatográficos que identificaram a presença do marcador, a proteína Pat.

Na análise de expressão gênica foi observada a expressão do mRNA em 6 das 8 plantas transformadas (figura 41), mostrando que nestas plantas os insertos estão em posições do genoma que podem ser acessadas pela maquinaria de transcrição celular. A variação na expressão do transgene já foi observada entre eventos independentes de transformação em diversas espécies de plantas. Tem sido postulado que parte desta variação observada é devido à posição do cromossomo em que o transgene se integra e diferenças no número de cópias do transgene (YE; SINGER, 1996). O evento que apresentou uma expressão mais forte foi o ZEO-3(3), com pico aos 20 DAP, mas com banda detectável também aos 16 e 24 DAP. Todos os demais eventos apresentaram uma expressão mais fraca, detectável aos 16, 20 e 24 DAP, na maioria dos casos, com exceção do evento ZEO-8(6) que apresentou uma forte expressão apenas aos 16 DAP.

O promotor da γ -kafirina (número de acesso no GeneBank: X62480) utilizado na construção foi isolado por Freitas et al. (1994). Estes autores mostraram através de análises histoquímicas da atividade do GUS em sementes bombardeadas com deleções e quimeras do promotor, que este foi capaz de conferir níveis semelhantes de expressão do *gus* em *Coix*, milho e sorgo, e que esta expressão ocorreu somente no endosperma, indicando que fatores regulatórios controlando a expressão tecido-específica são conservados nas três espécies testadas. Os trabalhos realizados mostraram também que os elementos responsáveis pela especificidade de tecido estão localizados na região proximal de 285pb, enquanto o restante do promotor parece possuir os elementos necessários para resposta quantitativa. Trabalho mais recente realizado por Mishra et al. (2007) questiona, no entanto, esta informação e mostra que pelo menos três motivos são responsáveis pela expressão eficiente da kafirina em sorgo, dois “GCN4 box” (nas posições -478 e -193) e uma “prolamina box” (na posição -340). Os resultados mostram que um fragmento de 574pb amplificado com base na seqüência X62480 é capaz de expressar o *gus* de forma eficiente no endosperma aos 20 DAP. A expressão mais forte obtida com evento ZEO-3(3) aos 20 DAP está de acordo com estes resultados (figura 41).

Para uma análise mais conclusiva, a fim de verificar se as plantas transformadas são capazes de traduzir a proteína zeolina, foi realizado um Western Blot com anticorpo anti-faseolina, cedido pelo Dr. Vitale do Istituto Di Biologia e Biotecnologia Agrária de Milão. Foi verificada a detecção da zeolina nas plantas ZEO-3(3), ZEO-5(15) e ZEO-6(3), nos demais eventos não houve detecção da proteína, bem como nos controles (figura 43). Em alguns dos eventos a proteína não foi traduzida porque o mRNA não foi transcrito (evento ZEO-7(6) e ZEO-9(5)), enquanto nos outros eventos em que a proteína não foi detectada (eventos ZEO-4(9), ZEO-8(6) e ZEO-10(7)) a hipótese é de que tenha ocorrido o silenciamento do transgene ou a fragmentação do transgene durante o processo de transformação, fazendo que esta proteína truncada não fosse acumulada de forma estável nos corpos protéicos do endosperma do milho. Nos géis obtidos com a técnica de Western Blot (figura 42 e 43) pode ser observada uma reação cruzada com o anticorpo policlonal, onde as classes de zeínas mais abundantes, tanto na fração Zeína I (15kDa, 16kDa e 19kDa), quanto na fração Zeína II (27kDa e 50kDa) são detectadas pelo anticorpo, inclusive nos controles.

Nos trabalhos realizados com tabaco expressando a zeolina, o polipeptídeo mais abundante apresentou massa molecular em torno de 60kDa, tamanho esperado para zeolina intacta. Além da faseolina intacta, o anti-soro anti-faseolina detectou outras duas classes de polipeptídeos em tabaco, de 45kDa e 95kDa. O polipeptídeo de 45kDa corresponde a faseolina intacta, liberada da zeolina através da proteólise pós-transcricional, enquanto o polipeptídeo de 95kDa poderia representar a fração da zeolina que escapa do acúmulo no RE e sofre glicosilação durante o tráfico intracelular. Além destas, formas moleculares de alto peso molecular (maiores que 200kDa) foram observadas, originadas da desnaturação incompleta da proteína devido à formação de grandes polímeros mantidos juntos por pontes dissulfeto, que dificilmente são desnaturados por completo (MAINIERI et al., 2004).

No presente trabalho com milho expressando a zeolina, nos eventos ZEO-5(15) e ZEO-6(3) a zeolina parece ser detectada em quantidades muito pequenas, aparecendo apenas a banda relativa à zeolina intacta em torno de 50-60kDa (figura 43). No gel do Western pode ser observada a banda relativa à γ -zeína de 50kDa, originada da reação cruzada com anticorpo anti-faseolina, e a banda relativa à zeolina aparece logo acima desta. Da mesma forma no evento ZEO-3(3) pode ser detectada uma banda muito forte na posição em torno de 50-60kDa.

Considerando que a posição da zeolina intacta encontrada no gel apresenta um peso molecular que pode variar um pouco daquele encontrado em tabaco (60kDa) em função do padrão de glicosilação sofrido pela zeolina no milho, que o peso molecular da γ -zeína é descrito como 50kDa por alguns autores (WOO et al., 2001), mas no procedimento de extração da fração zeína II utilizado os autores referem-se a uma banda de 60kDa (LANDRY; DELHAYE; DAMERVAL, 2000) e que nos géis SDS-PAGE (figura 38) a banda da referida γ -zeína está um pouco acima do marcador com 50kDa, optamos por nos referir a zeolina intacta expressa em milho como na posição de 50-60kDa, visto não ser possível uma determinação mais precisa do seu peso molecular com as análises realizadas.

O padrão de glicosilação pode ser variável de acordo com a planta em que a proteína é expressa. Em trabalho realizado com a faseolina expressa em arroz, Zheng et al. (1995) verificaram que, enquanto no feijão a faseolina apresenta dois polipeptídeos, um de 48kDa que corresponde a forma glicosilada, nas posições Asn²²⁸ e Asn³¹⁷, e outro de 45,5kDa que corresponde a forma não glicosilada, no arroz a faseolina apresentou bandas de 51, 48, 47 e 45kDa no gel SDS-PAGE.

Quando feita a digestão enzimática, foi observada que no arroz a faseolina possui oligossacarídeos diferentes do feijão.

No milho expressando a zeolina, o padrão de glicosilação pode ser diferente, considerando as bandas apresentadas no gel e àquelas obtidas em outros trabalhos expressando a zeolina ou a faseolina. Além da proteína intacta, no evento ZEO-3(3) podem ser detectadas mais três bandas, uma banda entre 27 e 50kDa que poderia representar a faseolina com 45kDa após a clivagem da zeolina; uma banda de maior peso molecular que se apresenta bem fraca no gel, provavelmente relativa à zeolina que escapa ao acúmulo no RE e é glicosilada através do tráfico no Complexo de Golgi; e uma quarta banda, menor que 27kDa. Pedrazzini et al. (1997) reportam que a expressão da faseolina T343F, que possui apenas um sítio de glicosilação, enquanto a faseolina nativa possui dois sítios, em tabaco resultou em uma banda no gel em torno de 46kDa, que corresponde ao polipeptídeo intacto, e bandas de 20 a 25kDa, relativas ao direcionamento para o vacúolo. A fração proteica de baixo peso molecular observada no milho transformado com a zeolina poderia, portanto, representar fragmentos liberados da faseolina e direcionados para o vacúolo.

No caso da alfafa expressando a zeolina, o polipeptídeo de 95 kDa é que foi detectado de forma mais abundante, e neste caso os autores especulam que, enquanto em tabaco as proteínas heterólogas são altamente heterogêneas na sua estrutura de oligonucleotídeos, devido provavelmente à deficiência no processamento da glicosilação ou à ação de enzimas degradadoras de glicanos no compartimento do apoplasto, na alfafa a glicosilação é restrita à cadeia de oligossacarídeos predominante, que reflete um processo de maturação e secreção eficientes. A outra hipótese é de que em alfafa a quantidade de zeolina que escapa ao acúmulo no RE e é então glicosilada no Complexo de Golgi é maior do que em tabaco (BELLUCI; DE MARCHIS; ARCIONI, 2007).

Em tabaco expressando a zeolina, as diferentes bandas observadas no gel já foram investigadas por Pompa e Vitale (2006), que estudaram em detalhes os mecanismos que determinam a retenção da zeolina em tabaco. Os resultados mostraram que a zeolina acumula principalmente como polipeptídeos intactos (60kDa), mas foram observados também a presença de três outras bandas: trímeros da faseolina (45kDa) devido à proteólise da zeolina; fragmentos da faseolina devido a subsequente proteólise da porção da faseolina quando esta é direcionada para os vacúolos (fragmentos com peso molecular menor que 30kDa no gel); bandas com

95kDa relacionadas à fração da zeolina que provavelmente escapa do acúmulo no RE e sofre um processo de Pro-hidrolização e subsequente O-glicosilação. As conclusões deste trabalho mostram que o tratamento com 2-ME inibe a insolubilização da zeolina e faz com que ela seja liberada do RE, aumentando o tráfico da zeolina na maquinaria de secreção da célula e aumentando a produção dos polipeptídeos da faseolina com 45kDa, que são secretados ou direcionados para o vacúolo, com um balanço variável entre estas duas formas, e a formação dos polipeptídeos de 95kDa. Este balanço entre a secreção ou o direcionamento para o vacúolo ocorre, provavelmente, devido a variabilidade na manutenção do sinal vacuolar da proteína liberada após a clivagem da zeolina. Em milho tais mecanismos de controle do tráfico intracelular poderiam ocorrer, visto que as bandas observadas no gel, que diferem na planta transformada com a zeolina, evento ZEO-3(3), em relação aos controles, seguem o mesmo padrão daquelas apresentadas no trabalho citado.

A fim de verificar o padrão de expressão das diferentes frações protéicas nos grãos de milho das plantas transformadas, para os 8 eventos de transformação que produziram grãos representando a geração T_2 , foram extraídas as frações protéicas, quantificadas e analisadas no gel SDS-PAGE (Figuras 37, 38, 39 e 40). Não foram observadas alterações no padrão de bandas das frações zeína, globulina+albumina ou glutelina. No processo de extração as zeínas são extraídas em duas etapas, as chamadas zeínas I e as zeínas II. A fração zeína II é constituída principalmente pela γ -zeína de 27kDa, extraída com a adição de sal em meio aquoso ou alcóolico. É na fração zeína II que se espera encontrar a proteína zeolina introduzida, já que esta apresenta a mesma solubilidade e propriedades das γ -zeínas nativas (POMPA; VITALE, 2006). Com relação aos resultados quantitativos obtidos através da leitura em espectrofotômetro, estes mostram um pequeno aumento da fração zeína II nas plantas transformadas em relação aos controles, mas que não parece ser significativo visto que tal variação pode ser observada inclusive entre plantas diferentes de um mesmo evento de transformação, um indicativo dos fatores biológicos que podem afetar os resultados da quantificação.

Caso ocorressem alterações nas frações protéicas acumuladas nos grãos de milho devido a expressão de uma proteína exógena, estas eram esperadas principalmente para a classe das zeínas, visto que a expressão da construção γ -kafirina + zeolina ocorre no endosperma, com acúmulo esperado no RE. A questão

que permanece é: qual o comportamento da zeolina nos grãos de milho? No tabaco a zeolina forma corpos protéicos isolados no RE, mas no milho este comportamento pode ser diferente em função das zeínas nativas que interagem para formar o corpo protéico e neste caso a zeolina poderia ser incorporada neste “corpo protéico nativo” ou formar corpos individuais compostos somente pela zeolina. Especulando sobre estas possibilidades podemos pensar que a zeolina intacta é uma proteína grande (50-60kDa) quando comparada as demais zeínas do milho e, devido a este tamanho, pode não se encaixar no orquestrado processo de formação do corpo protéico dos grãos de milho. A zeolina poderia, portanto, formar um corpo protéico a parte devido à capacidade do domínio da γ -zeína de interagir por pontes dissulfeto fazendo com que a proteína se torne insolúvel, mantendo-a estável para a formação dos corpos protéicos e acúmulo no RE (POMPA; VITALE, 2006). Outra possibilidade seria a própria tendência da porção faseolina se agregar em trímeros. Estes trímeros seriam então compostos de forma transiente ou seriam muito instáveis, sendo desagregados na formação do corpo protéico. Alternativamente, a faseolina poderia promover uma interação precoce da zeolina com a membrana do RE. As duas hipóteses evitariam a degradação da proteína recém sintetizada pela maquinaria de controle de qualidade do RE e dariam tempo suficiente para a montagem do corpo protéico. A formação deste “corpo protéico artificial”, na forma de grandes oligômeros, seria a garantia da produção e acúmulo da proteína de interesse (VIRGILIO et al., 2008).

Por outro lado, já foi demonstrado que a presença da γ -zeína faz com que outras proteínas como a α -zeína (COLEMAN et al., 1996) seja capaz de formar corpos protéicos e, indo mais longe, a própria zeolina é capaz de fazer com que outra proteína fusionada a ela seja capaz de formar corpos protéicos (VIRGILIO et al., 2008). Dessa forma poderiam outras classes de zeína nativa terem sido incorporadas ao corpo protéico formado pela zeolina? Essas são questões que por enquanto permanecem em aberto, mas que poderiam ser respondidas utilizando a planta transformada evento ZEO-3(3) para estudos de localização celular utilizando a microscopia eletrônica e a imunomarcção, conforme foi realizado no estudo com tabaco expressando a zeolina (MAINIERI et al., 2004).

Nos trabalhos expressando a proteína heteróloga da α -lactoalbumina sob controle do promotor da γ -zeína no endosperma de milho, o padrão das zeínas nativas foi investigado usando a análise por HPLC para verificar se o acúmulo de

uma proteína exógena poderia afetar o acúmulo das zeínas, ou se o uso do promotor da zeína poderia competir por fatores de transcrição utilizados na transcrição das zeínas nativas ou se poderia causar o silenciamento dos genes da zeína. Apesar de terem sido verificadas algumas diferenças entre os grãos expressando a α -lactoalbumina e os controles, estas diferenças não foram consistentes em todos os eventos. Dessa forma os autores concluíram que a presença da α -lactoalbumina nos grãos de milho poderia afetar algumas classes de zeínas, mas o efeito encontrado no acúmulo total das zeínas foi muito pequeno (BICAR et al., 2008).

Com o objetivo de verificar uma possível alteração no perfil de aminoácidos dos grãos das plantas transformadas em função da expressão de uma nova proteína, foram feitas análises preliminares para verificar a concentração dos aminoácidos solúveis totais e para determinar os aminoácidos totais, incluindo aminoácidos livres e incorporados nas proteínas, na farinha obtida com os grãos de uma das repetições. A dosagem dos aminoácidos solúveis não mostrou diferenças significantes entre as plantas controle e transformadas, considerando àquelas que mostraram resultados positivos no Western. A variação observada nos valores parece não estar ligada à transformação ou a presença do transgene, visto que alguns eventos apresentaram valores maiores e outros menores do que os controles. Já a determinação dos aminoácidos no HPLC mostrou valores de 40% a 274% maiores para todos os aminoácidos quantificados no evento ZEO-3(3) em relação ao controle. Com relação a lisina, o evento ZEO-3(3) apresentou valores de 25,76mg/g de proteína, que representa um aumento de 62%, enquanto os eventos ZEO5-(15) e ZEO-6(3) apresentaram, respectivamente, valores de 16,28 e 12,71mg de lisina/g de proteína, teor este comparável aos controles que apresentaram 9,77 e 15,89mg/g de proteína.

Dos diversos trabalhos para o aumento da lisina em milho, o único produto desenvolvido pela biotecnologia que está no mercado é o milho LY038 da empresa Monsanto. Este milho geneticamente modificado apresenta teores de lisina nos grãos de 3,70mg/g MS (convencional com 2,55mg/g MS), com o maior aumento em relação ao convencional na forma de lisina solúvel (0,96mg/g MS, em comparação ao convencional com 0,05mg/g MS). O milho LY038 apresenta teores dos outros aminoácidos essenciais em níveis 3 a 15% maiores do que as variedades convencionais e 3% menores ou iguais, no caso, respectivamente, da arginina e do

triptofano (LUCAS et al., 2007). Neste caso com o aumento da lisina solúvel os níveis de sacaropina encontrados também são altos, devido ao aumento do catabolismo da lisina.

Outros trabalhos para aumento da lisina nos grãos de milho utilizando a engenharia genética obtiveram aumentos variáveis de lisina nos grãos com a técnica do RNAi para supressão/redução da expressão das α -zeínas de 19kDa (SEGAL; SONG; MESSING, 2003) ou das α -zeínas de 22kDa (HUANG et al., 2004). Os melhores resultados, em termos de aumento de lisina nos grãos, foram obtidos quando as duas α -zeínas foram suprimidas nos grãos, com percentuais de até 5,62% de lisina nas plantas transformadas, enquanto o genótipo selvagem apresentou níveis de 2,83% de lisina nos grãos (HUANG et al., 2006).

Com relação aos mutantes naturais de milho com alta lisina, dos mutantes da série *opaque* e *floury* o mutante *opaque2* e *floury2* apresentaram os maiores níveis de lisina, na faixa de 5,17mg/g MS e 3,55mg/g MS de lisina incorporada em proteína, respectivamente, e 0,08mg/g MS de lisina solúvel em cada um dos mutantes. O genótipo selvagem apresentou valores de 2,78mg/g MS de lisina incorporada em proteínas e 0,04mg/g MS de lisina solúvel. Os demais aminoácidos analisados apresentaram níveis variáveis nos mutantes, com valores, em alguns casos, menores do que o genótipo selvagem (VARISI, 2007).

Hunter et al. (2002) e Azevedo et al. (2003) investigaram os mutantes naturais de alta lisina da série *opaque*, *floury*, *Mc* e *DeB30* em termos da composição de aminoácidos apresentada. Os resultados mostram que, dentre os mutantes analisados, o mutante *opaque2* apresentou os maiores níveis de lisina nos grãos (3,1 a 3,8%) quando comparado ao genótipo selvagem (1,5%). Hunter et al. (2002) mostram ainda que os teores dos demais aminoácidos apresentam alguma variação, com redução ou aumento, dependendo do aminoácido analisado e do mutante, mas estes valores não são tão expressivos quanto o aumento dos níveis de lisina e nem existe uma tendência geral de aumento dos níveis apresentados em um único mutante.

Da mesma forma, Zakarda et al. (2000) investigaram a qualidade protéica através da análise de aminoácidos dos grãos de 15 cultivares QPM contendo modificadores do *opaque-2* e de 2 cultivares comerciais de milho. A proteína total das cultivares QPM variou de 8% a 10,2%, enquanto as cultivares comerciais apresentaram valores de 7,9% e 10,3%. Dentre as quinze cultivares QPM, quatro

apresentaram níveis de lisina mais altos (4,43 a 4,58g de lisina/100g de proteína), enquanto os valores médios das demais cultivares ficaram entre 3,43 a 4,21g de lisina/100g de proteína. As duas cultivares comerciais apresentaram valores de 2,9 e 3,1g de lisina/100g de proteína. Segundo os autores, os níveis de lisina apresentados pelas cultivares QPM poderiam suprir aproximadamente 70% dos requerimentos protéicos humanos, comparado aos cerca de 50% apresentado pelas cultivares comerciais.

No presente trabalho, o evento ZEO-3(3) apresentou maiores concentrações do que os controles para todos os aminoácidos analisados, e considerando que não houve diferença significativa na quantidade de aminoácidos solúveis totais em relação ao controle transformado sem o transgene, esta diferença se refere provavelmente aos aminoácidos incorporados na proteína zeolina. Parece então existir uma demanda para que os aminoácidos sejam produzidos em quantidades maiores, mas estes são direcionados à síntese da zeolina e não ficam disponíveis na forma de aminoácidos livres no endosperma devido. Este resultado sugere que, existindo um dreno na planta, as rotas metabólicas são capazes de se ajustarem a fim de atender a este novo dreno. A zeolina, pela demanda de aminoácidos, poderia ser então uma ativadora das rotas metabólicas e também uma receptora destes aminoácidos.

Em trabalho realizado por Zhu e Galili (2003) com *Arabidopsis* expressando a DHDPS insensível a retro-inibição e com knockout do gene *LKR/SDH*, que interrompe o catabolismo da lisina na planta, mostrou um efeito sinérgico com níveis de lisina solúvel 80 vezes maiores que o controle, aumento da glutamina e asparagina e redução do glutamato e aspartato, bem como redução da treonina e aumento da metionina. Com base nestes resultados, os autores propõem que o metabolismo da lisina exerce um papel principal no metabolismo de aminoácidos na semente, controlado pela DHDPS e pelo catabolismo. Quando esse equilíbrio é quebrado, o glutamato e o aspartato são convertidos de forma eficiente em lisina, que por sua vez ativa um outro circuito regulatório que estimula a produção de glutamina e asparagina e a sua conversão para glutamato e aspartato, respectivamente. Este trabalho mostra que existe uma rede complexa de fluxos metabólicos que interagem e mecanismos de controle destas interações através da síntese e do catabolismo, mas não permite maiores conclusões sobre um ponto

principal, as proteínas de reserva e o seu papel como dreno dos aminoácidos livre nos grãos.

Um resultado interessante obtido por Bicar et al. (2008) em milho expressando a α -lactoalbumina mostra que a mudança no balanço de aminoácidos dos grãos de milho reflete a composição de aminoácidos da α -lactoalbumina. Os teores observados seriam então um resultado direto da expressão de uma proteína heteróloga e não o resultado de uma mudança na expressão dos genes e/ou do metabolismo que resultaram no aumento de outras proteínas de reserva ou do aumento do acúmulo de aminoácidos solúveis.

Tais inferências não podem ser feitas no caso da zeolina. A faseolina, como outras globulinas 7S, é caracterizada pela presença de altos percentuais de ácido aspártico e glutâmico, lisina e arginina, mas contém baixos níveis de aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) (CARBONARO, 2006). No evento ZEO-3(3) houve aumentos de mais de 100% no nível de todos os aminoácidos, incluindo àqueles que apresentam deficiência na faseolina. Uma constatação direta comparando a expressão da zeolina e as mudanças nos níveis de aminoácidos não pode, no entanto, ser feita, visto que o acúmulo da zeolina no endosperma de milho não foi mensurado. O evento ZEO-3(3) é, no entanto, o único que acumulou a zeolina em altos níveis, o que pode ser constatado pela presença de uma forte banda detectada pelo anticorpo no gel do Western (figura 43). No caso dos eventos ZEO-5(15) e ZEO-6(3) existe a detecção da zeolina, mas essa aparece como uma banda bem fraca no gel. É interessante observar também que os níveis de proteína total encontrados se mantêm nas plantas controle e transformadas, ou seja, a expressão da zeolina é de alguma forma regulada pela menor expressão/tradução de outras proteínas.

Considerando também que as rotas metabólicas estão diretamente conectadas e o acúmulo de um composto pode afetar a síntese de outro, é pouco provável que a mudança no perfil de aminoácidos de uma planta transformada com uma proteína heteróloga se deva exclusivamente à expressão desta nova proteína. Em tabaco, por exemplo, expressando as enzimas insensíveis a retroinibição, DHDPs para síntese de lisina e AtCGS para síntese de metionina, foram observados aumentos nos níveis de metionina maiores do que nas plantas expressando apenas a AtCGS. Neste caso foi observado que os níveis de lisina levam a uma redução dos transcritos que codificam a enzima SAMS, que leva a uma redução no composto

SAM, que por sua vez regula de forma negativa os transcritos da enzima AtCGS. A expressão da AtCGS é aumentada e, conseqüentemente, a síntese de metionina (Hacham et al., 2007). Esta poderia ser a resposta ao trabalho de Zhu e Galili (2003) que especulam sobre a possível existência de um circuito transregulatório entre o metabolismo da lisina e da metionina em *Arabidopsis*, em função dos aumentos observados nos níveis destes dois aminoácidos. O próprio resultado da análise de aminoácidos por HPLC do presente trabalho mostra que para as plantas de milho evento ZEO-3(3) foi observado, além do aumento da lisina, um grande aumento na concentração de metionina nos grãos (274%), que poderia ser explicado pelos resultados apresentados acima.

Especulando-se sobre os resultados obtidos, no trabalho com a transformação do milho com a zeolina não existiu apenas a alteração de uma rota metabólica, existiu sim uma demanda nova por aminoácidos, que levou a um aumento tanto dos precursores (aspartato, glutamato, asparagina, glutamina) quanto dos demais aminoácidos das diferentes rotas metabólicas, que estão todas interligadas. As questões que permanecem são se as enzimas das vias de síntese de aminoácidos terão uma maior atividade ou se haveria uma readequação das proteínas sintetizadas a fim de suprirem a nova demanda por aminoácidos nos grãos.

É no equilíbrio entre o pool de aminoácidos livres nos grãos e a incorporação destes aminoácidos nas proteínas que parece existir um delicado controle na planta. Hagan et al. (2003) expressaram a albumina de girassol, uma proteína rica em aminoácidos sulfurados, em arroz. Não foram observadas alterações significativas no teor total dos aminoácidos metionina e cisteína nas plantas transformadas em relação aos controles e os autores constataram que havia um redirecionamento destes aminoácidos de proteínas endógenas para o novo dreno expresso na planta. Estas proteínas endógenas foram substituídas por outras contendo pouco ou nenhum aminoácido sulfurado. Os mecanismos envolvidos parecem ser complexos, envolvendo controles transcricionais e pós-transcricionais, provavelmente semelhantes àqueles que modulam as proteínas de reserva das sementes em resposta a disponibilidade de nitrogênio e enxofre. Esta plasticidade fenotípica permite que a planta se adeque, em termos da composição das proteínas de reserva, mantendo um nível constante de proteína total.

Em milho, com a redução de uma proteína dreno como as α -zeínas observa-se um aumento das não-zeínas, que são mais ricas em lisina, de forma que a proteína total se mantém, alterando apenas o perfil dos aminoácidos nos grãos. Huang et al. (2006) mostraram que existe uma correlação linear entre o aumento da lisina e o acúmulo de proteínas nos grãos de plantas transformadas com a supressão das α -zeínas de 19 e 22kDa. Nesta correlação, para cada 723ppm de lisina existe o aumento de 1 ponto percentual no acúmulo de proteína no grão, preferencialmente de não-zeínas. Estes autores verificaram também uma correlação positiva entre o nível de aminoácidos solúveis e o conteúdo protéico nas plantas transformadas. A hipótese levantada é de que a inibição da síntese das zeínas iniciou o acúmulo das proteínas nos grãos em desenvolvimento. A redução na síntese de proteínas foi compensada pela síntese e/ou transporte de mais aminoácidos para os grãos, o que explicaria o maior acúmulo destes aminoácidos solúveis, principalmente da asparagina, em comparação com o genótipo selvagem.

No entanto, o trabalho de Reyes et al. (2009) mostrou que um aumento da lisina solúvel no endosperma e no embrião não implica em um aumento da síntese de proteínas contendo lisina. Neste trabalho, plantas com a supressão da expressão da LKR/SDH no embrião e no endosperma acumularam altos níveis de lisina solúvel, sem que houvesse aumento da incorporação desta lisina em proteínas.

Se a disponibilidade de aminoácidos livres não é o fator limitante para síntese de proteínas contendo lisina nos grãos de milho, existem outros controles que determinam o direcionamento dos aminoácidos nos grãos e a síntese das proteínas de reserva que ainda não são conhecidos? Os resultados apresentados mostram resultados variáveis, determinados pela espécie de planta utilizada, da proteína expressa e das rotas metabólicas alteradas.

Toda a discussão apresentada refere-se às possibilidades e questões em aberto que precisam ser respondidas. O objetivo do presente projeto foi desenvolver uma planta de milho que expressasse um dreno novo para os aminoácidos sintetizados, que seja uma ferramenta com a qual possa se utilizar técnicas bioquímicas e moleculares para dissecar os mecanismos regulatórios da síntese, catabolismo e acúmulo dos aminoácidos, nesta complexa rede de interação que constitui as proteínas de reserva dos grãos, responsáveis por grande parte da alimentação animal e humana.

3 CONCLUSÕES

- Foi sintetizada a construção do promotor γ -kafirina + zeolina e clonada nos vetores pCambia 3301 e pTF102, confirmada por PCR e por sequenciamento;
- Na transformação dos explantes de milho via *Agrobacterium* e biobalística, somente a biobalística resultou em explantes transformados, com uma eficiência do processo de transformação de aproximadamente 1%;
- Na geração T₁ foi obtido um total de oito plantas transformadas, representando seis eventos de transformação. A presença do transgene foi detectada por PCR nas oito plantas, a expressão gênica através da detecção do mRNA por RT-PCR foi verificada em seis plantas e a proteína do transgene foi detectada por Western Blot em três dos eventos de transformação;
- Não houve diferenças visuais no padrão de bandas das frações protéicas zeína, globulina+albumina e glutelina, apresentado pelo controle e pelas plantas transformadas;
- Não houve diferenças significantes, devido à transformação, no teor de aminoácidos solúveis totais apresentado pelo controle e pelas plantas transformadas;
- A análise dos aminoácidos totais no HPLC apresentou diferenças significantes apenas para o evento ZEO-3(3). Este evento apresentou níveis 40% a 274% maiores do que o controle para todos os aminoácidos analisados;
- O nível de lisina total do evento ZEO-3(3) foi de 25,76mg/g de proteína, representando um aumento de 62% em relação aos controles, que apresentaram níveis que variaram de 9,77 a 15,89mg/g de proteína.

REFERÊNCIAS

ADAMS, W.; HUANG, S.; KRIZ, A.; LUETHY, M. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of zeins in mature maize kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 1842-1849, 2005.

ALVAREZ, I.; GELI, M.I.; PIMENTEL, E.; LUDEVID, D.; TORRENT, M. Lysine-rich gamma-zeins are secreted in transgenic Arabidopsis plants. **Planta**, Berlin, v. 205, n. 2, p. 420-427, 1998.

AZEVEDO, R.A.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; LEA, P.J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; LE GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; TORO, A.A.; GAZIOLA, S.A.; BERDEJO, B.D.A. Regulation of maize lysine metabolism and endosperm protein synthesis by opaque and floury mutations. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 270, n. 24, p. 4898-4908, 2003.

AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J. Lysine metabolism in higher plants. **Amino Acids**, New York, v. 20, n. 3, p. 261-279, 2001.

BAGGA, S.; ADAMS, H.; KEMP, J.D.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Accumulation of 15-kilodalton zein in novel protein bodies in transgenic tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, n. 1, p. 13-23, 1995.

BELLUCCI, M.; DE MARCHIS, F.; NICOLETTI, I.; ARCIONI, S. Zeolin is a recombinant storage protein with different solubility and stability properties according to its localization in the endoplasmic reticulum or in the chloroplast. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 97-105, 2007.

BELLUCI, M.; DE MARCHIS, F.; ARCIONI, S. Zeolin is a recombinant storage protein that can be used to produce value-added proteins in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 90, n. 1, p. 85-91, 2007.

BICAR, E.H.; WOODMAN-CLIKEMAN, W.; SANGTONG, V.; PETERSON, J.M.; YANG, S.S.; LEE, M.; SCOTT, P. Transgenic maize endosperm containing a milk protein has improved amino acid balance. **Transgenic Research**, London, v. 17, n. 1, p. 59-71, 2008.

BIELESKY, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROCHETTO-BRAGA, M.R.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate reductase in normal and *opaque-2* maize endosperms. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, n. 3, p. 1139-1147, 1992.

CARBONARO, M. 7S globulins from *Phaseolus vulgaris* L.: Impact of structural aspects on the nutritional quality. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 70, n. 11, p. 2620-2626, 2006.

CARNEIRO, A.A.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, E. **Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2004. 44p. (Documentos, 32 – Embrapa Milho e Sorgo).

CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y.; Bi, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. **Scientia Sinica**, Peking, v. 18, n. 5, p. 659-668, 1975.

COLEMAN, C.; HERMAN E.M.; TAKASAKI, K.; LARKINS, B.A. The maize gamma-zein sequesters alpha-zein and stabilizes its accumulation in protein bodies of transgenic tobacco endosperm. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 12, p. 2335-2345, 1996.

CRACIUM, A.; JACOBS, M.; VAUTERIN, M. *Arabidopsis* loss-of-function mutant in the lysine pathway points out complex regulation mechanisms. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 487, n. 2, p. 234-238, 2000.

DANNENHOFFER, J.M.; BOSTWICK, D.E.; OR, E.; LARKINS, B.A. Opaque-15, a maize mutation with properties of a defective *opaque-2* modifier. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 6, p. 1931-1935, 1995.

DORAN, P.M. Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 9, p. 426-432, 2006.

ESEN, A.; STETLER, D.A. Immunocytochemical localization of δ -zein in protein bodies of maize endosperm cells. **American Journal of Botanical**, Columbus, v. 79, n. 3, p. 243-248, 1992.

FALCO, S.C.; GUIDA, T.; LOCKE, M.; MAUVAIS, J.; SANDRES, C.; WARD, R.T. ; WEBBER. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. **Nature Bio-Technology**, New York, v. 13, p. 577-582, 1995.

FAO. **Energy and Protein Requirements: report of a Joint FAO/WHO Ad Hoc Experts Committee**. Rome, Italy, 1973. p.118 (FAO Nutritional Meeting Report Series, n. 52; WHO Technical Report Series, n. 522.)

FAO. Protein **Sources for the Animal Feed Industry**. Expert Consultation and Workshop Bangkok, 2002. p.25.

FERREIRA, R.R.; VARISI, V.A.; MEINHARDT, L.W.; LEA, P.J; AZEVEDO, R.A. Are high-lysine cereal crops still a challenge? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 985-994, 2005.

FLINT-GARCIA SA, BODNAR, AL, SCOTT MP. Wide variability in kernel composition, seed characteristics, and zein profiles among diverse inbreds, landraces and teosinte. **Theoretical Applied Genetics**, Heidelberg, v. 119, p. 1129-1142, 2009.

FORSYTH, J.L.; BEAUDOIN, F.; HALFORD, N.G.; SESSIONS, R.B.; CLARKE, A.R.; SHEWRY, P.R. Design, expression and characterization of lysine-rich forms of the barley seed protein CI-2. **Biochimica Et Biophysica Acta General Subjects**, Amsterdam, v. 1747, v. 2, p. 221-227, 2005.

FRAME, B.; ZHANG, H.; COCCIOLOONE, S.; SIDORENKO, L.; DIETRICCH, C.; PEGG, S.; ZHEN, S.; SCHNABLE, P.; WANG, K. Production of transgenic maize from bombarded Type II callus: effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. **In Vitro Cellular and Developmental. Biology- Plant**, Heidelberg, v. 36, n. 1, p. 21-29, 2000.

FRAME, B.R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R.K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T.M.; PEGG S.E.K.; LI, B.; NETTLETON, D.S.; PEI, D.; WANG, K. *Agrobacterium tumefaciens* – Mediated transformation of maize embryos using standard binary vector system. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 1, p. 13-22, 2002.

FREITAS, F.A.; YUNES, J.A.; da SILVA, M.J.; ARRUDA, P.; LEITE, A. Structural characterization and promoter activity analysis of the γ -kafirin gene from sorghum. **Molecular and General Genetics**, Heidelberg, v. 245, n. 2, p. 177-186, 1994.

FRIGERIO, L.; VIRGILIO, M.; PRADA, A.; FAORO, F.; VITALE, A. Sorting of phaseolin to the vacuole is saturable and requires a short C-terminal peptide. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 6, p. 1031-1042, 1998.

FRIZZI, A.; HUANG, S.; GILBERTSON, L.A.; ARMSTRONG, T.A.; LUETHY, M.H.; MALVAR, T.M. Modifying lysine biosynthesis and catabolism in corn with a single bifunctional expression/silencing transgene cassette. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 13-21, 2008.

GALILI, G.; HÖFGEN, R. Metabolic engineering of amino acids and storage proteins in plants. **Metabolic Engineering**, Belgium, v. 4, n. 1, p. 3-11, 2002.

GAZIOLA, S.A.; ALESSI, E.S.; GUIMARÃES, P.E.O.; DAMERVAL, C.; AZEVEDO, R.A. Quality protein maize: a biochemical study of enzymes involved in lysine metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 3, p. 1268-1275, 1999.

GEETHA, K.; CRAIG R.; LENDING, B.; LOPES, JOHN, C.; WALLACE, C.; LARKINS, B.A. *opaque-2* modifiers increase γ -zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. **The Plant Cell**, Rockville, v. 3, n. 11, p. 1207-1219, 1991.

GELI, M.I.; TORRENT, M.; LUDEVID, D. Two structural domains mediate two sequential events in γ -zein targeting: Protein endoplasmic reticulum retention and protein body formation. **Plant Cell**, Rockville v. 6, n. 12, p. 1911-1922, 1994.

GIBBON, B.C.; LARKINS, B.A. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. **Trends in Genetics**, London, v. 21, n. 4, p. 227-233, 2005.

GIBBON, B.C.; WANG, X.L.; LARKINS, B.A. Altered starch structure is associated with endosperm modification in Quality Protein Maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 26, p. 15329-15334, 2003.

GODOI, R.E.Z. **Produção de sementes de milho híbrido**. Disponível em: <<http://www.seednews.inf.br/portugues/seed125/artigocapa125.shtml>>. Acesso em: 10 set. 2009.

GORDON-KAMM, W.; SPENCER, T.; MANGANO, M.L.; ADAMS, T.; DAINES, R.; START, W.; O'BRIEN, J.; CHAMBERS, S.; ADAMS, J.R.W., WILLETTS, N.; RICE, T.;

GRAHAM, G.G.; GLOVER, D.V.; ROMANA, G.L.; MORALES, E.; MACLEAN, W.C. Nutritional value of normal, opaque-2 and sugary-2, opaque-2 maize hybrids for infants and children. I. Digestibility and utilization. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 110, n. 5, p. 1061-1069, 1980.

HABBEN, J. E.; KIRLEIS, A.W.; LARKINS, B.A. The origin of lysine-containing proteins in the *opaque-2* maize endosperm. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 23, n. 4, p. 825-838, 1993.

HACHAM, Y.; SONG, L.; SCHUSTER, G.; AMIR, R. Lysine enhances methionine content by modulating the expression of S-adenosylmethionine synthase. **The Plant Journal**, Oxford, v. 51, p. 850-861, 2007.

HAGAN, N.D.; UPADHYAYA, N.; TABE, L.M.; HIGGINS, T.J.V. The redistribution of protein sulfur in transgenic rice expressing a gene for a foreign, sulfur-rich protein. **The Plant Journal**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 1-11, 2003.

HE, X.Y.; TANG, M.Z.; LUO, Y.B.; LI, X.; CAO, S.S.; YU, J.J.; DELANEY, B.; HUANG, K.L. A 90-day toxicology study of transgenic lysine-rich maize grain (Y642) in Sprague–Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 425-432, 2009.

HENSEL, G.; KASTNER, C.; OLESZCZUK, S.; RIECHEN, J.; KUMLEHN, J. Agrobacterium-Mediated Gene Transfer to Cereal Crop Plants: Current Protocols for Barley, Wheat, Triticale, and Maize. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 2009, n. 835608, p. 1-9, 2009.

HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. Protein storage bodies and vacuoles. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 4, p. 601-613, 1999.

HOFFMAN, L.M.; DONALDSON, D.D.; HERMAN, E.M. A modified storage protein is synthesized, processed and degraded in the seeds of transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 11, n. 6, p. 717-729, 1988.

HOLDING, D.R.; LARKINS, B.A. The development and importance of zein protein bodies in maize endosperm. **Maydica**, Bergamo, v. 51, n. 22, p. 243-254, 2006.

HORN, M., HARKEY, R., VINAS, A.K., DREES, C.F., BARKER, D.K. AND LANE, J.R. Use of Hi II-elite inbred hybrids in *Agrobacterium*-based transformation of maize. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, Heidelberg, v. 42, n. 4, p. 359–366, 2006.

HOUMARD, N.M.; MAINVILLE, J.L.; BONIN, C.P.; HUANG, S.; LUETHY, M.H.; MALVAR, T.M. High-lysine corn generated by endosperm-specific suppression of lysine catabolism using RNAi. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 605–614, 2007.

HUANG, S.; ADAMS, W.R.; ZHOU, Q.; MALLOY, K.P.; VOYLES, D.A.; ANTHONY, J.; KRIZ, A.L.; LUETHY, M.H. Improving nutritional quality of maize proteins by expressing sense and antisense zein genes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 7, p. 1958-1964, 2004.

HUANG, S.; FRIZZI, A.; FLORIDA, C.A.; KRUGER, D.E.; LUETHY, M.H. High lysine and high tryptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD alpha-zeins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 61, n. 3, p. 525-535, 2006.

HUANG, S.; KRUGER, D.E.; FRIZZI, A.; D'ORDINE, R.L.; FLORIDA, C.A.; ADAMS, W.R.; BROWN, W.E.; LUETHY, M.H. High-lysine corn produced by the combination of enhanced lysine biosynthesis and reduced zein accumulation. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 3, n. 6, p. 555-569, 2005.

HUDSON, A.O.; BLESS C.; MACEDO P.; CHATTERJEE, S.P.; SINGH, B.K.; GILVARG C.; LEUSTEK T. Biosynthesis of lysine in plants: evidence for a variant of the known bacterial pathways. **Biochimica Et Biophysica Acta General Subjects**, Amsterdam, v. 1721, n. 1/3, p. 27-36, 2005.

HUDSON, A.O.; SINGH, B.K.; LEUSTEK, T.; GILVARG, C. An ϵ -diaminopimelate aminotransferase defines a novel variant of the lysine biosynthesis pathway in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 1, p. 292-301, 2006.

HUNTER, B.G.; BEATTY, M.K.; SINGLETARY, G.W.; HAMAKER, B.R.; DILKES, B.P.; LARKINS, B.A.; JUNG, R. Maize Opaque Endosperm Mutations Create Extensive Changes in Patterns of Gene Expression. **The Plant Cell**, Rockville v. 14, n. 10, p. 2591–2612, 2002.

JOHNSON, L.A.; HARDY, C.L.; BAUMEL, C.P.; YU, T.H.; SELL, J.L. Identifying valuable corn quality traits for livestock feed. **Cereal Foods World**, Minneapolis, v.46, n. 10, p. 472-481, 2001.

KARCHI, H.; SHAUL, O.; GALILI, G. Lysine synthesis and catabolism are coordinately regulated during tobacco seed development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.91, n. 7, p. 2577-2581, 1994.

KEELER, S.J.; MALONEY, C.L.; WEBBER, P.Y.; PATTERSON, C.; HIRATA, L.T.; FALCO, S.C.; RICE, J.A. Expression of *de novo* high-lysine α -helical coiled-coil proteins may significantly increase the accumulated levels of lysine in mature seeds of transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 15-29, 1997.

KEMPER, E.L.; CORD-NETO, G.; PAPES, F.; MORAES, K.C.M.; LEITE, A.; ARRUDA, P. The role of *Opaque2* in the control of lysine-degrading activities in developing maize endosperm. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 10, p. 1981–1993, 1999.

KIM, C.S.; WOO, Y.; CLORE, A.M.; BURNETT, R.J.; CARNEIRO, N.P.; LARKINS, B.A. Zein protein interactions, rather than the asymmetric distribution of zein mRNAs on endoplasmic reticulum membranes, influence protein body formation in maize endosperm. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 3, p. 655-672, 2002.

KOWN, T.; SASAHARA T.; ABE T. Lysine accumulation in transgenic tobacco expressing dihydrodipicolinate synthase of *Escherichia coli*. **Journal of Plant Physiology**, Lancaster, v.146, n. 5/6, p.615-621, 1995.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Improved method for isolating and quantitating R-amino nitrogen as nonprotein, true protein, salt-soluble proteins, zeins, and true gluteins in maize endosperm. **Cereal Chemistry**, St Paul, v. 77, n. 5, p.620-626, 2000.

LANDRY, J; DAMERVAL,C.; AZEVEDO, R.A.; DELHAYE,S. Effect of the opaque and floury mutations on the accumulation of dry matter and protein fractions in maize endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 6, p. 549-556, 2005.

LENDING, C.R.; LARKINS, B.A. Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development **Plant Cell**, Rockville, v. 1, n. 10, p. 1011-1023, 1989.

LUCAS, D.M.; TAYLOR, M.L.; HARTNELL, G.F.; NEMETH, M.A.; GLENN, K.C.; DAVIS, S.W. Broiler Performance and Carcass Characteristics When Fed Diets Containing Lysine Maize (LY038 or LY038 X MON 810), Control, or Conventional Reference Maize. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, n. 10, p. 2152–2161, 2007.

MAINIERI, D.; ROSSI, M.; ARCHINTI, M.; BELLUCCI, M; De MARCHIS, F.; VAVASSORI, S.; POMPA, A.; ARCIONI, S.; VITALE, A. Zeolin. A new recombinant storage protein constructed using maize gamma-zein and bean phaseolin. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 3, p. 3447-3456, 2004.

MARUR, C. J., SODEK, L., E MAGALHÃES, A C. N. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 103-108, 1994.

MAZUR, B.; KREBBERS, E.; TINGEY, S. Gene discovery and product development for grain quality traits. **Science**, Washington, v. 285, n. 5426, p. 372-375, 1999.

McCOY, A.J.; ADAMS, N.E.; HUDSON, A.O.; GILVARG, C.; LEUSTEK, T.; MAURELLI, A.T. L,L-diaminopimelate aminotransferase, a trans-kingdom enzyme shared by Chlamydia and plants for synthesis of diaminopimelate-lysine. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 47, p. 17909-17914, 2006.

MERTZ, E.T.; BATES, L.S.; NELSON, O.E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. **Science**, Washington, v. 145, n. 3629, p. 279-280, 1964.

MILLWARD, D.J. The nutritional value of plant-based diets in relation to human amino acid and protein requirements. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 58, n. 2, p. 249-260, 1999.

MISHRA, A.; TOMAR, A.; BANSAL, S.; KHANNA, V.K.; GARG, G.K. Temporal and spatial expression analysis of *gamma* kafirin promoter from Sorghum (*Sorghum bicolor* L. moench) var. M 35-1. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 35, n. 2, p. 81-88, 2007.

MURILLO, I.; RAVENTOS, D.; JAECK, E.; SEGUNDO, B.S. Isolation of total RNA and mRNA from plant tissues. **Promega Notes Magazine**, Madison, n. 54, p. 02, 1995.

OENEMA, O. Governmental policies and measures regulating nitrogen and phosphorus from animal manure in European agriculture. **Journal of Animal Science**, Stanford, v. 82, p. E196-E206, 2004.

OHTANI, T.; GALILI, G.; WALLACE, J.C.; THOMPSON, G.A.; LARKINS, B.A. Normal and lysine-containing zeins are unstable in transgenic tobacco seeds. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 16, n. 1, p. 117-128, 1991.

ORTEGA ALEMÁN EDEL, C.; COULSON ROMERO, A.J.; ORDÓÑEZ ARGUETA, L.I.; PACHÓN, H. The effect of consuming quality protein maize or conventional maize on the growth and morbidity of malnourished Nicaraguan children 1 to 15 years of age. **Archives of Latinoamerica Nutrition**, Caracas, v. 58, n. 4, p. 377-85, 2008.

OSBORNE, T.B. **The vegetable proteins**, 2^a ed., London: Longmans, 1924, p. 154.

PEDRAZZINI, E.; GIOVINAZZO, G.; BIELLI, A.; VIRGILIO, M.; FRIGERIO, L.; PESCA, M.; FAORO, F.; BOLLINI, R.; CERIOTTI, A.; VITALE, A. Protein quality control along the route to the plant vacuole. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 10, p. 1869-1880, 1997.

POMPA, A.; VITALE, A. Retention of a bean phaseolin/maize γ -zein fusion in the endoplasmic reticulum depends on disulfide bond formation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 10, p. 2608-2621, 2006.

PRASANNA, B.M.; VASAL, S.K.; KASSAHUN, B.; SINGH, N.N. Quality protein maize. **Current Science**, Bagalore, v. 81, n. 10, p. 1308-1319, 2001.

REGISTER, J.C.; PETERSON, D.J.; BELL, P.J.; BULLOCK, W.P.; EVANS, E.J.; FRAME, B.; GREENLAND, A.J.; HIGGS, N.S.; JEPSON, I.; JIAO, S.; KLEWNAU, C.J.; SILLICK, J.M.; WILSON, H.M. Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 25, n. 6, p. 951–961, 1994.

REYES, A.R.; BONIN, C.P.; HOUMARD, N.M.; HUANG, S.; MALVAR, T.M. Genetic manipulation of lysine catabolism in maize kernels. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 1/2, p. 81–89, 2009.

ROESLER, K.R.; RAO, A.G. Conformation and stability of barley chymotrypsin inhibitor-2 (CI-2) mutants containing multiple lysine substitutions. **Protein Engineering**, Oxford, v. 12, n. 11, p. 967–973, 1999.

SARROBERT, C.; THIBAUD, M.-C.; CONTARD-DAVID, P.; GINESTE, S.; BECHTOLD, N.; ROBAGLIA, C.; NUSSAUME, L. Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutant accumulating threonine resulting from mutation in a new dihydronicotinate synthase gene. **The Plant Journal**, Washington, v. 24, n. 3, p. 357–367, 2000.

SCHMIDT, R.J.; KETUDAT, M.; AUKERMAN, M.J.; HOSCHEK, G. Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, n. 6, p. 689–700, 1992.

SEGAL, G.; SONG, R.; MESSING, J. A New opaque variant of maize by a single dominant RNA-interference-inducing transgene. **Genetics**, Baltimore, v. 165, n. 1, p. 387–397, 2003.

SHAUL, O.; GALILI, G. Increased lysine synthesis in transgenic tobacco plants expressing a bacterial dihydronicotinate synthase in their chloroplasts. **Plant Journal**, Oxford, v. 2, p. 203–209, 1992.

SHAVER, J.M.; BITTEL, D.C.; SELLNER, J.M.; FRISCH, D.A.; SOMERS, D.A.; GENGENBACHT, B.G. Single-amino acid substitutions eliminate lysine inhibition of maize dihydronicotinate synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 5, p. 1962–1966.

SHEWRY, P.; HALFORD, N. Cereal seed storage protein: structure, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 947–958, 2002.

SHRAWAT, A.K.; LÖRZ, H. Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 575–603, 2006.

STEPANSKI, A.; GALILI, G. Synthesis of the Arabidopsis bifunctional lysineketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase enzyme of lysine catabolism is concertedly regulated by metabolic and stress-associated signals. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, n. 3, p. 1407-1415, 2003.

STEPANSKY, A.; LESS, H.; ANGELOVICI, R.; AHARON, R.; ZHU, X.; GALILI, G. Lysine catabolism, an effective versatile regulator of lysine level in plants. **Amino Acids**, New York, v. 30, n. 2, p. 121-125, 2006.

SWARUP, S.; TIMMERMANS, M.C.; CHAUDHURI, S.; MESSING, J. Determinants of the high-methionine traits in wild and exotic germplasm may have escaped selection during early cultivation of maize. **Plant Journal**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 359-368, 1995.

TABE, L.; HAGAN, N.; HIGGINS, T.J.V. Plasticity of seed protein composition in response to nitrogen and sulfur availability. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 3, p. 212-217, 2002.

TORRENT, M.; ALVAREZ, I.; GELI, M.I.; DALCOL, I.; LUDEVID, D. Lysine-rich modified gamma-zeins accumulate in protein bodies of transiently transformed maize endosperms. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 139-149, 1997.

TORRENT, M.; LLOMPART, B.; LASSERRE-RAMASSAMY, S.; LLOP-TOUS, I.; BASTIDA, M.; MARZABAL, P.; WESTERHOLM-PARVINEN, A.; SALOHEIMO, M.; HEIFETZ, P.B.; LUDEVID, M.D. Eukaryotic protein production in designed storage organelles. **BMC Biology**, London, v. 7, n. 5, p. 1-14, 2009.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

VARISI, V.A. **Caracterização de enzimas envolvidas na síntese de lisina de milho e quinoa**. 2007. 121p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Planta) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

VASAL, S.K. High quality protein corn. In: HALLAWER, A.R. (Ed.). **Specialty corns**. Local: CRC Press, 1994. p. 79-120.

VEGA, J.M.; YU, W.; KENNON, A.R.; CHEN, X.; ZHANG, Z.J. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 27, n. 2, p. 297-305, 2008.

VIRGILIO, M.; DE MARCHIS, F.; BELLUCI, M.; MAINIERI, D.; ROSSI, M.; BENVENUTO, E.; ARCIONI, S.; VITALE, A. The human immunodeficiency virus antigen Nef forms protein bodies in leaves of transgenic tobacco when fused to zeolin. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 10, p. 2815–2829, 2008.

VITALE, A.; CERIOTTI, A. Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interests? **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 3, p. 3420-3426, 2004.

VITALE, A.; PEDRAZZINI, E. Recombinant Pharmaceuticals from Plants – The plant endomembrane system as a bioreactor. **Molecular Interventions**, Rockville, v. 5, n. 4, p. 216-225, 2005.

VOGEL, H.J. On biochemical evolution: lysine formation in higher plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 45, n. 12, p. 1717-1721, 1959.

WATANABE, N.; MAIA M.; CHERNEY, M.M; VAN BELKUM, M.J.; MARCUS, S.L.; FLEGEL, M.D.; CLAY, M.D.; DEYHOLOS, M.K.; VEDERAS, J.C.; JAMES, M.N.G. Crystal structure of LL-diaminopimelate aminotransferase from *Arabidopsis thaliana* a recently discovered enzyme in the biosynthesis of L-lysine by plants and chlamydia. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 371, n. 3, p. 685–702, 2007.

WOO, Y.M.; HU, D.W.N.; LARKINS, B.A.; JUNG, R. Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zein gene expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 10, p. 2297-2317, 2001.

YE, F.; SIGNER, E.R. RIGS (repeat-induced gene silencing) in *Arabidopsis* is transcriptional and alters chromatin configuration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 20, p. 10881-10886, 1996.

YU, J.J.; PENG, P.; ZHANG, X.; ZHAO, Q.; ZHY, D.; SUN, X.; LIU, J.; AO, G. Seed-specific expression of a lysine rich protein *sb401* gene significantly increases both lysine and total protein content in maize seeds. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 14, n. 1, p. 427-431, 2004.

ZARKADAS, C.G.; HAMILTON, R.I.; YU, Z.R.; CHOI, V.K.; KHANIZADEH, S.; ROSE, N.G.W.; PATTISON, P.L. Assessment of the protein quality of 15 new northern adapted cultivars of quality protein maize using amino acid analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 48, n. 11, p. 5351-5361, 2000.

ZHANG, X.L.; COLLEONI, C.; RATUSHNA, V.; SIRGHLE-COLLEONI, M.; JAMES, M.G.; MYERS, A.M. Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene *sugary2* codes for the starch synthase isoform SSIIa. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, n. 6, p. 865-879, 2004.

ZHAO, Z.Y.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L.; HONDRED, D.; BOND, D.; SCHROEDER, S.; RUDERT, M. AND PIERCE, D. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 8, n. 4, p. 323-333, 2001.

ZHENG, Z.; SUMI, K.; TANAKA, K.; MURAI, N. The bean seed storage protein β -phaseolin is synthesized, processed, and accumulated in the vacuolar type-II protein bodies of transgenic rice endosperm. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 3, p. 777-786, 1995.

ZHU, C.; NAQVI, S.; GOMEZ-GALERA, S.; PELACHO, A.M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 12, n. 12, p. 548-555, 2007.

ZHU, X.; GALILI, G. Increased lysine synthesis coupled with a knockout of its catabolism synergistically boosts lysine content and also transregulates the metabolism of other amino acids in *Arabidopsis* seeds. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n.4, p. 845-853, 2003.

ZHU, X.; GALILI, G. Lysine metabolism is concurrently regulated by synthesis and catabolism in both reproductive and vegetative tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, n. 1, p. 129-136, 2004.