

TRANSFORMAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE MILHO ATRAVÉS DE BOMBARDEAMENTO COM MICROPARTÍCULAS

Márcio José da Silva (expositor) e Paulo Arruda. CBMEG/Unicamp

A expressão transitória de genes em vários tipos de células e tecidos vegetais tem sido realizada utilizando-se o método biolístico descrito por Klein et al., 1987 e Sanford et al., 1987. O grão de pólen é um gametófito especializado que está preparado para germinar rapidamente e alongar-se o estilo/estigma liberando as células germinativas no saco embrionário maturo, possibilitando a fertilização. Apesar da semipermeabilidade da membrana do tubo polínico e possibilidade de difusão e absorção de DNA sugerida por De Wet et al., 1985, durante germinação e alongamento, a presença de DNA no interior do grão de pólen foi claramente demonstrada apenas quando o potencial dos processos de eletroporação e bombardeamento com micropartículas foram descritos como uma força ativa para transferir DNA em grãos de pólen de tabaco. Subseqüentemente, estudos de expressão transitória puderam ser realizados através do gene da (-glucuronidase (GUS) sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S ou promotor específico de antera de tomate LAT52 em grão de pólen de *Tradescantia* sp, *Lilium logiflorum*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*, *Paeonia lactiflora*. O bombardeamento de grãos de pólen de milho, antes da deiscência, foi relatado por Hamilton et al., 1992, não sendo considerado um sistema satisfatório devido a perda da viabilidade dos grãos de pólen mesmo em meio ótimo para a germinação. Nós descrevemos aqui os procedimentos para o sucesso da expressão transitória de GUS em grãos maduros de pólen de milho, utilizando o bombardeamento com micropartículas. Procurou-se viabilizar este sistema para que fatores importantes relacionados aos genes pólen-específicos pudessem ser realizados, sem o pré-requisito de uma planta transgênica. Grãos de pólen de milho foram espalhados sobre papel de filtro Whatman (42.5 mm ϕ), presos com uma micro tela de nylon e bombardeados utilizando-se um acelerador de micropartículas desenvolvido no CBMEG – UNICAMP. Os disparos foram realizados a 800, 1.200 e 1.600 psi de gás hélio no interior do canhão e as micropartículas de ouro (1,6 μ m) co-precipitadas com os plasmídeos pBI221, pAct1-F e pZm13 -260/GUS/NOS. Após o bombardeamento os grãos de pólen foram germinados e a atividade de GUS revelada histoquímica. A taxa de germinação dos grãos de pólen foi reduzida de 44% e 50% para as pressões de 1.200 e 1.600 psi, respectivamente, devido ao efeito das micropartículas e choque acústico gerado pelo acelerador durante os disparos. A maior frequência de transformação dos grãos de pólen foi de 0,69% observada a 1.600 psi, empregando-se o plasmídeo pZm13 -260/GUS/NOS e 9 cm a distância entre o canhão e o tecido alvo. A viabilidade *in vitro* e *in vivo* dos grãos de pólen transformados foi avaliada. Verificou-se que os grãos de pólen não perderam sua habilidade de germinar e alongar seus tubos polínicos em meio de germinação ou sobre os estilo/estigma de plantas receptoras no campo.