

Introdução de genes em segmentos foliares de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* schumm.) usando biobalística¹

Genes introduction in foliar segments of cupuassu (*theobroma grandiflorum* schumm.) using biolistic

Maria das Graças Rodrigues Ferreira² Carlos Henrique Siqueira de Carvalho³
Andréa Almeida Carneiro⁴ Fernando Enrique Ninamango Cárdenas⁵

- NOTA -

RESUMO

A técnica da biobalística foi utilizada com o objetivo de adaptar um protocolo para transformação de plantas de cupuaçu. Segmentos foliares de cupuaçu foram bombardeados com um plasmídeo contendo o gene reportador da antocianina, utilizando-se as pressões de hélio de 650, 1000 e 1100psi. Após o bombardeamento, os explantes foram transferidos para meio MS por 24 horas e, após este período de incubação, pontos vermelhos foram detectados utilizando-se um estereomicroscópio Stemi SV11 Zeiss (Germany). A expressão do gene da antocianina foi observada nas pressões de 650 e 1000psi, entretanto necroses foram encontradas na pressão de 1100psi. Demonstrou-se que os genes *CI* e *R'* da síntese de antocianina, sob o controle do promotor 35S, podem ser utilizados como repórteres para o monitoramento dos eventos de transformação em cupuaçu.

Palavras-chave: micropartículas, *Theobroma grandiflorum*, transformação.

ABSTRACT

The biolistic technique was used with the objective of adapting a transformation protocol to cupuassu plants. Foliar paths of cupuassu were bombed with a plasmid, containing the antocianine reporter gene with helium pressures of 650, 1000 and 1100 psi. The bombarded explants were transferred to half MS medium for 24 hours for incubation and red points were detected using a stereomicroscope Stemi SV11 Zeiss (Germany). The expression of the antocianine gene (red points) was observed with pressures of 650 and 1000 psi and necroses were found when 1100 psi were used. Genes *CI* and *R'* of the antocianine synthesis, under the control of the promoter 35S, can be used as reporters to monitor transformation events in cupuassu.

Key words: microparticles, *Theobroma grandiflorum*, transformation.

A técnica da biobalística (balística biológica), também conhecida por biolística, aceleração de partículas ou bombardeamento de partículas foi descrita inicialmente por SANFORD et al. (1987). O método consiste na aceleração de micropartículas que atravessam a parede celular e a membrana plasmática, de forma não letal, carregando substâncias adsorvidas, como DNA, RNA ou proteínas, para o interior da célula (KLEIN et al., 1987; SANFORD, 1988). São utilizados microprojéteis de ouro ou tungstênio, com diâmetro em torno de 1 µm, nos quais são precipitadas as moléculas de DNA. O tipo de aparelho usado para acelerar as micropartículas envolvidas pelo DNA pode ter propulsão a ar, pólvora, gás hélio ou eletricidade (KLEIN & FITZPATRICK-McELLIGOTT, 1993).

Os sistemas que utilizam gás hélio são, atualmente, os mais utilizados (SANFORD et al., 1991; KIKKERT, 1993). A onda de choque é gerada pela rápida liberação de uma descarga de alta pressão de gás hélio (1000-1200 psi). A onda de choque gerada impulsiona o macrocarregador, no qual as micropartículas cobertas com DNA (microprojéteis) foram previamente depositadas. Ao atingir a tela de retenção, a membrana é retida e as micropartículas contendo o DNA continuam em direção às células-alvo, penetrando na parede celular e membrana plasmática (LACORTE et al., 1999).

Diversos parâmetros físicos e biológicos devem ser levados em consideração para se estabelecer um protocolo de transformação utilizando-se esse método, tais como a espécie vegetal e seu estado fisiológico, o tipo de explante, tipo e tamanho da partícula, método de precipitação,

¹Parte da Tese de Doutorado apresentada pelo primeiro autor à Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), para obtenção do título de Doutor em Agronomia/Produção Vegetal (Bolsa concedida pela CAPES).

²Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisador da Embrapa Rondônia, BR 364, Km 5,5, CP 406, 78970-900, Porto Velho, RO. E-mail: mgraca@cpafro.embrapa.br. Autor para correspondência.

³Engenheiro Agrônomo, PhD, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG.

⁴Biólogo, PhD, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG.

⁵Engenheiro Agrônomo, Doutorando do Curso de Genética e Melhoramento de Plantas, ESALQ/USP, Av. Pádua Dias, CEP 13400-970, Piracicaba-SP

velocidade das partículas, tipo de equipamento (SANFORD et al., 1993).

A biobalística tem se mostrado um método promissor para a introdução de novas e desejáveis características em diversas espécies de plantas, com vários protocolos de regeneração e transformação sendo publicados. Assim, esta técnica poderá ser de grande valia na produção de cupuaçu transgênico. Plantas de cupuaçu transformadas podem ser incorporadas a programas de melhoramento tradicional, diminuindo o tempo e o custo na produção de novos genótipos resistentes a doenças, como a vassoura de bruxa. O objetivo deste trabalho foi adaptar um protocolo para transformação de cupuaçu mediada por biobalística.

Folhas jovens foram empregadas como explantes para os estudos iniciais de bombardeamento de cupuaçu, pelo fato de apresentarem as melhores respostas no processo de embriogênese somática. Sendo assim, segmentos foliares foram bombardeados com microprojéteis de tungstênio usando esquema de aceleração por partícula de hélio. Uma solução estoque de microprojétil foi preparada pela lavagem de 60 mg de tungstênio M10 (Sylvania, GTE chemicals/Towanda-USA) com 1ml etanol a 70% durante 15 minutos, seguida por 3 lavagens em água destilada estéril. Após a lavagem, microprojéteis foram ressuspensos em 1 ml de solução de glicerol estéril à 50%. Para precipitar o DNA sobre as micropartículas, 8µl de DNA plasmidial (estoque 1µg/µl) (Figura 1) foram adicionados à 50µl de solução estoque da partícula de tungstênio (60mg/ml) sob baixa agitação (Vortex -1). Em seguida, 50µl CaCl₂ (estoque 2,5 M) e 20µl de espermidina (estoque 0,1 M) foram adicionados e homogeneizados. A mistura foi mantida sob baixa agitação durante 3 minutos e mais 3 minutos sem agitação. Após esse estágio, partículas cobertas com DNA foram centrifugadas por cinco segundos, enxaguadas cuidadosamente 3 vezes com etanol 100% e ressuspensas em 60µl de etanol 100%. Alíquotas de seis µl foram depositadas no centro de um disco (24mm) Kapton estéril (Du Pont) que foram usadas para bombardear os explantes.

Foram avaliadas 3 pressões de aceleração do hélio (650, 1000 e 1100psi), sendo mantida a distância do alvo (6cm), usando-se como repórter os genes C1 e R' da síntese da antocianina. Após o bombardeamento, os explantes foram transferidos para meio de cultura constituído apenas de sais MS por 24 horas. Utilizando-se um estereomicroscópio Stemi SV11 Zeiss (Germany) pontos vermelhos foram detectados após este período de incubação. A expressão do gene da antocianina foi observada às pressões de 650 e 1000psi, entretanto necroses foram encontradas na pressão de 1100psi (Figura 1). A necrose de tecidos pode ocorrer em função da má distribuição das partículas metálicas cobertas com DNA plasmidial ou em decorrência de um choque acústico gerado pela liberação do gás hélio mantido sob alta pressão.

Durante a elaboração de um protocolo para biobalística, a concentração de DNA usado para recobrir

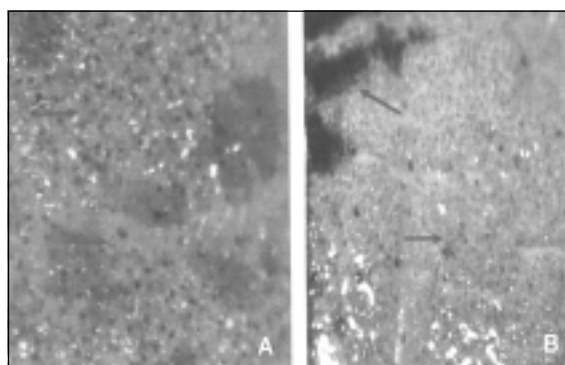


Figura 1 - Segmentos foliares de cupuaçu expressando o gene antocianina. A) Pressão de 650 psi. B) Pressão de 1000 psi. As setas indicam os locais nos quais ocorreu expressão do gene. Partes mais escuras onde ocorreu pressão de 1100psi.

as partículas metálicas, aceleração do gás hélio, distância percorrida pelo microcarreador, número de tiros por placa, tratamento osmótico dos explantes estão entre os fatores que devem ser otimizados. Demonstrou-se que os genes C1 e R' da síntese de antocianina, sob o controle do promotor 35S, podem ser utilizados como repórteres para o monitoramento dos eventos de transformação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KIKKERT, J.R. The biolistic PDS-1000/He device. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, p. 221-226, 1993.
- KLEIN, T.M.; FITZPATRICK-McELLIGOTT, S. Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues. **Current Opinion Biotechnology**, v. 4, p. 583-590, 1993.
- KLEIN, T.M. et al. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, London, v.327, p.70-73, 1987.
- LACORTE, C. et al. Biobalística. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, 1999. V.2, p.761-781.
- SANFORD, J.C. The biolistic process. A new concept in gene transfer and biological delivery. **TIBTech**, v.6, p. 299-302, 1988.
- SANFORD, J.C.; SMITH, F.D.; RUSSEL, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzymology**, v.217, p.483-510, 1993.
- SANFORD, J.C. et al. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Journal Particulate Science Technology**, v.5, p.27-37, 1987.
- SANFORD, J. C. et al. An improved, helium-driven biolistic device. **Technique**, v.3, p.3-16, 1991.