



¹BRANDÃO, R.L.; ¹COSTA, G. T.; ¹GONÇALVES, M.C.A.; ¹UTIDA, R.H.;
²SCHAFFERT, R.E.; ¹CARNEIRO, N.P. e ³CARNEIRO, A.A.

Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG – Caixa Postal 151 –
andreas@cnpmis.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, principalmente em países em desenvolvimento, vem aumentando continuamente o consumo de produtos agrícolas. Para enfrentar tal situação, o incremento da produtividade, por incorporação de novas tecnologias ao processo de produção, é estratégia chave para se alcançar a auto-suficiência e independência tecnológica.

Dos meios modernos disponíveis e utilizáveis para a geração de novas tecnologias de produção de alimentos e controle de pragas, nenhum individualmente ofereceu maior potencial de ganho do que o melhoramento de plantas. No entanto, o que se percebe atualmente, é que a aplicação dos métodos tradicionais da genética tem levado o rendimento das culturas a patamares cada vez mais estacionários e a custos cada vez mais elevados. A integração da bioquímica e da fisiologia vegetal permitiu o desenvolvimento de técnicas básicas, para cultura de tecido e células, que têm o potencial para melhorar nosso conhecimento sobre a biologia da planta (Kresovich *et al.*, 1987).

Sorgo, o sexto cereal mais cultivado do mundo, é uma cultura economicamente importante (Emani *et al.*, 2002). O desenvolvimento de cultivares mais produtivos, pela introdução de genes de resistência a vários estresses bióticos e abióticos é altamente desejável. Entretanto, este cereal, tem-se mostrado extremamente recalcitrante quando cultivado *in vitro*, onde o sucesso da aplicação das modernas técnicas de transformação genética de plantas requer a utilização de genótipos com alta capacidade de regeneração em cultura de tecidos. A produção e liberação de pigmentos fenólicos pelos explantes de sorgo cultivados são características que dificultam a regeneração de plantas em cultura de tecido e a transformação genética dessa espécie (Zhu *et al.*, 1998; Kresovich *et al.*, 1987; Cai & Butler, 1987).

Artigos recentes (Zhao *et al.* 2000; Able *et al.* 2001) têm estudado o problema da transformação de sorgo por meio de estratégias como a otimização das condições de bombardeamento, minimização da produção de pigmentos, e por ajuste da composição do meio de cultura para melhoria da regeneração do sorgo *in vitro*. Entretanto, otimizações adicionais de protocolos de transformação principalmente com relação aos diferentes genótipos de sorgo utilizados são necessários. Estes protocolos são mais eficientemente desenvolvidos quando se utilizam genes repórteres de fácil detecção, tal como o gene repórter que codifica para um pigmento vermelho ou roxo conhecido como antocianina. A formação deste pigmento é controlada por genes estruturais, que codificam enzimas envolvidas na biossíntese da antocianina (Mol *et al.*, 1998) e por genes regulatórios, os quais ativam a expressão dos genes estruturais em nível transcricional (Ludwig e Wessler, 1990).

O gene repórter antocianina é atrativo para ser utilizado em estudos de expressão transiente, por várias razões, tais como: (i) visualização da expressão da antocianina não é destrutiva, não requer fixação ou substrato histoquímico; (ii) antocianina acumula-se em células isoladas; e, (iii) quando condições drásticas de bombardeamento são empregadas e o tecido vegetal é seriamente ferido, este não consegue expressar a antocianina (Bowen, 1992). Tais características são especialmente vantajosas quando se utiliza a biobalística como o sistema de transformação, porque as células expressando este gene, transientemente, podem ser facilmente contadas com o auxílio de um estereoscópio. Neste artigo, com o objetivo de otimizar os parâmetros para a transferência gênica, calos embriogênicos de sorgo foram bombardeados, utilizando parâmetros diversos, com o gene repórter antocianina sob o controle do promotor da ubiquitina e, a expressão transiente da antocianina foi analisada.

MATERIAL E MÉTODOS

No processo de obtenção de calos embriogênicos de sorgo, inflorescências imaturas, da linhagem CMSXS 102B, de 3 a 5cm de comprimento foram desinfestadas em etanol 70% e água estéril, cortadas (~5mm) e cultivadas em placas de Petri contendo o meio CI (N6 sais e vitaminas, 30 g.L⁻¹ sacarose, 100 mg.L⁻¹ myo-inositol, 2,9 g.L⁻¹ prolina, 100 mg.L⁻¹ caseína enzimática e 2 mg.L⁻¹ 2,4-D) suplementado ou não com 500 mg.L⁻¹ asparagina (CIA), a 25°C, na ausência de luz, durante quatro semanas com subcultivos a cada duas semanas.

Nos experimentos de bombardeamento foram utilizados, simultaneamente dois plasmídeos contendo as construções gênicas: (i) Promotor da Ubiquitina direcionando a expressão do gene repórter antocianina e terminador NOS (Ubiquitina+antocianina+NOS), (ii) Promotor CaMV35S direcionando a expressão do gene da fosfinotricina acetiltransferase (*bar*) e o terminador CaMV35S (CaMV35S+*bar*+CaMV35S). DNAs plasmidiais usados no bombardeamento foram purificados por gradiente de cloreto de céσιο como descrito por Sambrook *et al.* (1989). Alguns parâmetros importantes para o transporte do DNA para dentro da célula de sorgo foram analisados, incluindo pressão do gás hélio, distância percorrida pelo microcarreador ao explante, número de tiros por placa, tipo de partículas (ouro e tungstênio) e permanência dos explantes em meio osmótico.

Durante o bombardeamento foram utilizadas micropartículas de tungstênio ou ouro aceleradas através de um aparelho movido à hélio. DNA de cada um dos dois plasmídeos na concentração de 5 µg/µL das construções Ubiquitina+antocianina+NOS e CaMV35S+*bar*+ CaMV35S foram juntamente precipitados sobre as micropartículas metálicas. Em seguida estas foram cuidadosamente lavadas e ressuspendidas em 60 µL de etanol 100%. Seis microlitros foram depositados no centro dos macrocarreadores, discos (24 mm) de membranas Kapton (Du Pont). Estas membranas foram usadas no bombardeamento dos tecidos de interesse utilizando 1100 ou 1200 psi de pressão de gás hélio e os explantes foram posicionadas à 3, 6 ou 9 cm da plataforma de lançamento das micropartículas. Foram mantidos constante a distância entre a câmara de gás de alta pressão e a membrana carreadora contendo as micropartículas cobertas com DNA (8 mm), distância entre a membrana carreadora e a tela de retenção (12 mm) e a pressão de vácuo (27 mm Hg).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aproximadamente 600 calos embriogênicos foram produzidos e utilizados para iniciar os estudos de otimização do protocolo de transformação de sorgo via biobalística.

Um passo delicado na transformação por biobalística é o dano sofrido pelo explante durante a penetração da micropartícula na célula. Usualmente, para minimizar esse tipo de problema e aumentar a capacidade de embriogênese somática e da regeneração de planta, as células alvo são plasmolisadas por um pré-tratamento osmótico (Armaleo *et al.*, 1990; Vain *et al.*, 1993; Brettschneider *et al.*, 1997; Bohorova *et al.*, 1999). A elevação da pressão osmótica é geralmente obtida pela adição de manitol, sorbitol, maltose ou sacarose no meio de cultura. Neste estudo, os calos embriogênicos de sorgo foram subcultivados durante 4 horas, antes do bombardeamento, em meio contendo 12% de sacarose. Um número elevado de pontos vermelhos (expressão transiente da antocianina) foi observado quando os calos embriogênicos foram subcultivados em meio osmótico quando comparado com calos embriogênicos bombardeados sem pré-tratamento osmótico (Figura 1A). Em todos os bombardeamentos seguintes, os explantes foram incubados por 4 horas em meio contendo 12% de sacarose.

A pressão de aceleração é outro parâmetro que influencia na habilidade do transporte de DNA para dentro dos explantes. Uma gama de pressões tem sido utilizada em experimentos de biobalística, sendo que os melhores resultados obtidos para transformação de cereais utilizam pressões entre 650 psi (Frame *et al.*, 2000) a 1.000 psi (Brettschneider *et al.*, 1997; Bohorova *et al.*, 1999). Nesse trabalho, expressão transiente de antocianina foi maior quanto os calos embriogênicos foram bombardeados com 1000 psi (Figura 1B).

Para aumentar a possibilidade de atingir um maior número de células capazes de sofrer embriogênese somática, foi testada a influência de mais de um tiro por placa na expressão transiente de antocianina. Não foi detectada nenhuma diferença na expressão transiente de antocianina utilizando um ou dois tiros por placa. Por conseguinte, foi determinado que um tiro por placa seria a condição ótima, uma vez que o explante sofre menor dano e regenera mais facilmente (Figura 1B).

A distância percorrida pela micropartícula ao alvo biológico pode afetar a velocidade da micropartícula e, conseqüentemente, das taxas de transformação. Klein *et al.* (1988), procurando otimizar os parâmetros para bombardeamento de culturas de células de milho, observou que a menor distância percorrida pelas partículas apresentou maior expressão transiente do gene GUS. Porém, de acordo com Sanford *et al.* (1993) a distância menor percorrida pelas micropartículas pode ter um efeito indesejável na dispersão das partículas e pode danificar os explantes devido o forte choque do gás. Neste trabalho não foi encontrada diferença entre 3 cm e 6 cm, assim os explantes passaram a ser posicionados a 6 cm da plataforma de lançamento dos microprojéteis (Figura 1C).

Micropartículas de ouro e tungstênio foram testadas para verificar o desempenho das mesmas no transporte do DNA para células de calos embriogênicos. Não houve nenhuma diferença entre os dois tipos de partículas testadas, assim as micropartículas de tungstênio foram escolhidas por terem menor custo (Figura 1D).

Calos embriogênicos bombardeados estão agora no processo de seleção. Assim que plantas de sorgo forem regeneradas nos diversos tratamentos citados acima, e a transgenia confirmada, os melhores parâmetros biobalísticos para transformação permanente de calos embriogênicos de sorgo poderão ser identificadas.

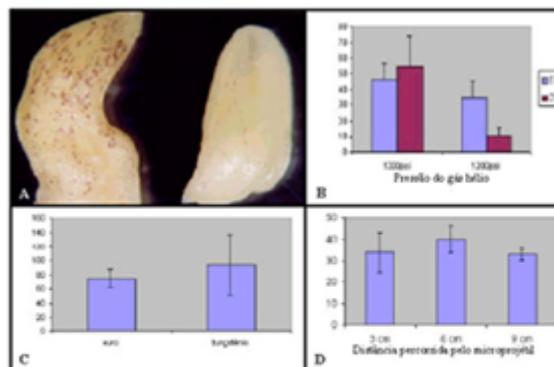


Figura 1: Parâmetros Biobalísticos. (A) Pré-tratamento osmótico: o explante à direita foi subcultivado por 4 horas em meio com 12% de sacarose antes do bombardeamento, o da esquerda não foi cultivado em meio osmótico, as pintas vermelhas representam a expressão da antocianina. (B) Expressão da antocianina sob diferentes pressões de hélio e número de tiros por placa (T). (C) Expressão da antocianina utilizando micropartículas de ouro e tungstênio. (D) Expressão da antocianina utilizando diferentes distâncias percorridas pelas micropartículas. No eixo das ordenadas estão representados os números de pintas de antocianina presentes após 48 horas de bombardeamento dos explantes.

LITERATURA CITADA

- ABLE JR, RATHUS C, GODWIN ID. (2001). The investigation of optimal bombardment parameters for transient and stable transgene expression in sorghum. *In Vitro cell. Dev. Biol. Plant.* 7: 341-348.
- ARMALEO D, YE GN, KLEIN TM, SHARK KB, SANFORD JC, JOHNSTON SA (1990) Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Curr Gen* 17:97-103
- BOHOROVA N, ZHANG W, JULSTRUM P, MCLEAN S, LUNA B, BRITO RM, DIAZ L, RAMOS, ME, ESTANOL P, PACHECO M, SALGADO M, HOISINGTON D (1999) Production of transgenic tropical maize with *cryIAb* and *cryIAc* genes via microprojectile bombardment of immature embryos. *Theor Appl Genet.* 99:437-444
- BOWEN B. (1992). Anthocyanin genes as visual markers in transformed maize tissue. In: GUS Protocols: Using the GUS gene as a reporter of gene expression. Gallagher ed. Academic Press, NY, 221p.

- BRETTSCHNEIDER R, BECKER D, LÖRZ H (1997) Efficient transformation of scutellar tissue of immature embryos. *Theor Appl Genet* 94:737-748
- CAI, T.; DALY, B.; BUTLER, L. (1987). Callus induction and plant regeneration from shoot portions of mature embryos of high tannin sorghums. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 9: 245-252.
- EMANI, C.; SUNILKUMAR, G.; RATHORE, K.S. (2002). Transgene silencing and reactivation in sorghum. *Plant Science*. 162: 181-192.
- FRAME BR, ZHANG H, COCCIOLONE SM, SIDORENKO LV, DIETRICH CR, PEGG SE, ZHEN S, SCHNABLE PS, WANG K (2000) Production of transgenic maize from bombarded type II callus: Effect of gold particle and callus morphology on transformation efficiency. *In Vitro Cell. Dev. Biol. –Plant* 36:21-29
- KLEIN TM, GRADZIEL T, FROMM ME, SANFORD JC (1988) Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Bio/Technology* 6:559-563
- KRESOVICH S., MCGEE, R. E., PANELLA, L., REILLEY A. A., MILLER, F. R. (1987). Application of cell and tissue culture techniques for the genetic improvement of sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench: progress and potential. *Advances in Agronomy*. 41: 147-170.
- LUDWIG SR, WESSLER SR. (1990). Maize R gene family: tissue-specific helix-loop-helix proteins. *Cell* 62: 849-851.
- MOL JNM, STUITJE AR, GERATS AGM, KOES RE. (1988). Cloned genes of phenylpropanoid metabolism. *Plant Mol. Biol. Rep.* 6: 274-279.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- SANFORD JC, SMITH FD, RUSSEL JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol* 217:483-509
- VAIN P, MCMULLEN MD, FINER JJ (1993) Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Rep* 12:84-88
- ZHAO ZY, CAI T, TAGLIANI L, MILLER M, WANG N, PANG H, RUDERT R, SCHRODER S, HONDRED D, SELTZER J, PIERCE D. (2000). *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. *Plant Mol. Biol.* 44: 789-798.
- ZHU, H., MUHUKRISHNAN, S., KRISHNAVENI, S., WILDE, G., JEOUNG, J.M., LIANG. G.H. (1998). Biolistic transformation of sorghum using a rice chitinase gene. *J. Genet. Breed.* 52: 243-252

