

OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO TRANSITÓRIA DE SOJA VIA BOMBARDEAMENTO DE CONJUNTOS EMBRIOGÊNICOS

OPTIMIZATION OF SOYBEAN TRANSFORMATION METHOD VIA BOMBARDMENT OF EMBRIOGENIC CLUSTERS

Vera Lucia Bobrowski¹; Luciana Bicca Dode²

- NOTA TÉCNICA -

RESUMO

Diferentes parâmetros do bombardeamento de partículas, como pressão de gás hélio, concentração de agente osmótico e diferentes períodos de pré-condicionamento foram otimizados utilizando a análise da expressão transiente do gene da β -glicuronidase em conjuntos embriogênicos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Para todas as combinações testadas, foi observado um aumento na expressão transiente quando os tecidos embriogênicos foram pré-condicionados em meio contendo 0,25 M de manitol por 1 h e pressão de gás hélio de 300 psi. Nos experimentos com esta pressão, foi observado um aumento de uma vez e meia no número de pontos azuis quando comparado à pressão de 600 psi.

Palavras-chave: soja, *Glycine max*, expressão transiente, bombardeamento de partículas, manitol.

ABSTRACT

Several particle bombardment parameters such as helium pressure, osmotic concentration and pre-conditioning period were optimized using transient expression assays of a β -glucuronidase gene in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) embryogenic clusters. An increase in transient gene expression events was observed when embryogenic tissues were pre-conditioned in 0.25 M mannitol for 1 h and the particles were helium accelerated under 300 psi. In comparison with the number of transient signals found by blasting with 600 psi, a 1.5-fold improvement was observed.

Key words: soybean, *Glycine max*, transient expression, particle bombardment, mannitol.

A soja é uma cultura de importância mundial e muitos esforços na área de biotecnologia têm sido realizados para complementar os métodos de melhoramento convencional desta espécie. Um componente essencial da biotecnologia para a soja é a transferência exógena de genes para explantes com alto potencial de regeneração, principalmente de cultivares elite.

Os dois métodos mais utilizados para transferência de genes em plantas são a transferência direta utilizando o bombardeamento (SANFORD, 1988; CHRISTOU et al., 1991, DROSTE et al., 2002) ou indireta via *Agrobacterium* (TRICK & FINER, 1998; DROSTE et al., 2000). O método de bombardeamento tem sido um dos mais eficiente na transformação genética da soja. Por esta técnica, várias cultivares têm sido lançadas no mercado apresentando genes exógenos de importância agrônômica como resistência a insetos, doenças ou herbicidas (CHRISTOU, 1996; STEWART et al., 1996). Normalmente são utilizados, nos procedimentos de transformação para soja, tecidos embriogênicos ou

suspensão de células embriogênicas como alvo para o bombardeamento (SIMMONDS & DONALDSON, 2000; DROSTE et al., 2002).

Este trabalho teve como objetivo testar a eficiência do bombardeamento de conjuntos de embriões somáticos de soja utilizando diferentes pressões de hélio e diferentes concentrações de manitol como pré-condicionamento osmótico.

Foram utilizados aglomerados embriogênicos obtidos a partir de cotilédones imaturos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill cv. Bragg] induzidos e mantidos como descrito por DROSTE et al. (2002). Os tecidos embriogênicos foram bombardeados com o plasmídeo pGusHyg, que contém o gene repórter *gusA* (β -glicuronidase) e o gene marcador de seleção *hpt* (higromicina fosfotransferase), que confere resistência à higromicina; sob controle do promotor 35S CaMV (ENDT & PASQUALI, 1996).

A influência do tratamento osmótico na expressão transiente foi testada pela incorporação de diferentes concentrações de manitol (0 M; 0,25 M e 0,4 M) no meio de proliferação de embriões, usado como pré-condicionante antes do bombardeamento. O pré-condicionamento inicial consistiu de 15, 30, 60 min e 4 h pré-bombardeamento. Para cada tratamento, foram utilizadas três repetições.

Para o bombardeamento, foi utilizado um acelerador de partículas de alta pressão, modelo PDS 1000/He. Os plasmídeos foram precipitados sobre partículas de tungstênio de acordo com procedimento descrito por RECH & ARAGÃO (1998) com modificações, isto é, utilizando 48 μ L de etanol absoluto para ressuspender as partículas cobertas com o DNA.

Antes do bombardeamento, 10 aglomerados embriogênicos foram colocados no centro da placa contendo meio de pré-condicionamento osmótico e incubados como descrito anteriormente. Os parâmetros de bombardeamento utilizados para o teste da pressão de gás hélio foram 300 e 600 psi; distância entre a tela de parada e o tecido-alvo de 60 mm. Depois do bombardeamento, os aglomerados embriogênicos ficaram 12 h no mesmo meio para, então, serem transferidos para meio de proliferação sem manitol.

O ensaio histoquímico para avaliar a expressão transiente do gene *gusA* foi realizado de acordo com o protocolo de JEFFERSON et al. (1987), 24 h após o bombardeamento. Para tanto, foram utilizados três aglomerados removidos de cada placa ao acaso. A atividade da enzima GUS foi avaliada pela contagem do número de pontos azuis no tecido embriogênico bombardeado.

¹ Eng. Agr., Prof., Dra, Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Depto. de Zoologia e Genética, Campus universitário s/n, Cx. P. 354, Pelotas, RS, CEP 96010-970. e-mail: vera.bobrowski@ufpel.tche.br

² Eng. Agr., Prof, Dra, Universidade Católica de Pelotas, Escola de Ciências Ambientais, Gonçalves Chaves, 373, Pelotas, RS, CEP 96015-560

Foi realizada análise da variância pelo pacote estatístico SANEST (ZONTA & MACHADO, 1984). O delineamento experimental foi um fatorial com três fatores (concentração de manitol x pressão de hélio x tempo de pré-condicionamento). Os dados foram transformados usando raiz quadrada de $x+k$, onde x = número de pontos azuis e $k=1$, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan.

Os resultados obtidos para o parâmetro concentração osmótica, não mostraram diferença estatisticamente significativa entre as três concentrações, porém podemos notar que houve um maior número de pontos azuis quando utilizado 0,25 M de manitol no meio de pré-condicionamento independente do tempo utilizado.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados da interação entre tempo e meios de pré-condicionamento e entre o fator pressão de gás hélio e tempo de exposição.

Quando utilizada a pressão de 300 psi e nenhum agente osmótico no meio de cultivo, o maior número de pontos azuis foi obtido condicionando os explantes por 30 e 60 min, sendo que estes não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 1). Porém, com a mesma pressão, mas variando a concentração osmótica do meio, observamos que com 0,25 M de manitol, os melhores resultados foram obtidos com um tempo maior de exposição (60 min), enquanto com 0,4 M de manitol, o tempo necessário de exposição foi menor (30 min; Tabela 1).

Outros autores testando variações na concentração de manitol verificaram que quando utilizada no pré-condicionamento concentrações acima de 0,4 M aumentou o número de eventos de expressão transiente (VAIN et al., 1993; GLESS et al., 1998; NADANDEVA et al., 1999). Estes resultados corroboram os encontrados neste experimento, pois verificamos um aumento da expressão transiente quanto utilizado 0,4 M de manitol, porém não diferiu dos obtidos com 0,25 M com um tempo maior de exposição.

Ao analisarmos os resultados dos tratamentos com 600 psi de pressão verificamos que em meio sem a presença de

manitol, não houve diferença significativa entre os tempos de 15, 30 min e 4 h de exposição. Entretanto, o número de pontos azuis foi baixo em todos os tratamentos. Nesta pressão, os melhores resultados foram obtidos quando o explante foi pré-condicionado por 30 min tanto em meio com 0,25 M quanto 0,4 M de manitol. Porém, o resultado obtido com a dose mais alta de manitol no período de 30 min não diferiu significativamente do resultado de 4 h de exposição ao agente osmótico (Tabela 1).

Tabela 1 - Interação entre os diferentes parâmetros utilizados no bombardeamento de aglomerados embriogênicos de soja pela análise de pontos azuis obtidos.

Concentração de Manitol	Tempo de exposição	300 psi	600 psi
0 M	15min	6,6 b A	7,0 ab A
	30min	32,4 a A	11,1 a B
	60min	27,1 a A	0,9 b B
	4 h	6,2 b A	5,1 b A
0,25 M	15min	19,8 a A	3,4 c B
	30min	8,3 bc B	32,0 a A
	60min	48,5 a A	12,9 b B
	4 h	2,9 c A	3,4 c A
0,4 M	15min	5,7 b A	4,1 b A
	30min	28,5 a A	19,9 a A
	60min	5,3 b A	6,3 b A
	4 h	0 b B	20,7 a A

* Letras minúsculas nas colunas correspondem a comparação das médias para diferentes períodos de exposição dentro do mesmo meio osmótico.

** Letras maiúsculas nas linhas correspondem a comparação das médias para diferentes pressões no mesmo tempo de exposição.

Médias acompanhadas de mesmas letras não diferem entre si significativamente pelo teste de Duncan ($\alpha=0,05$).

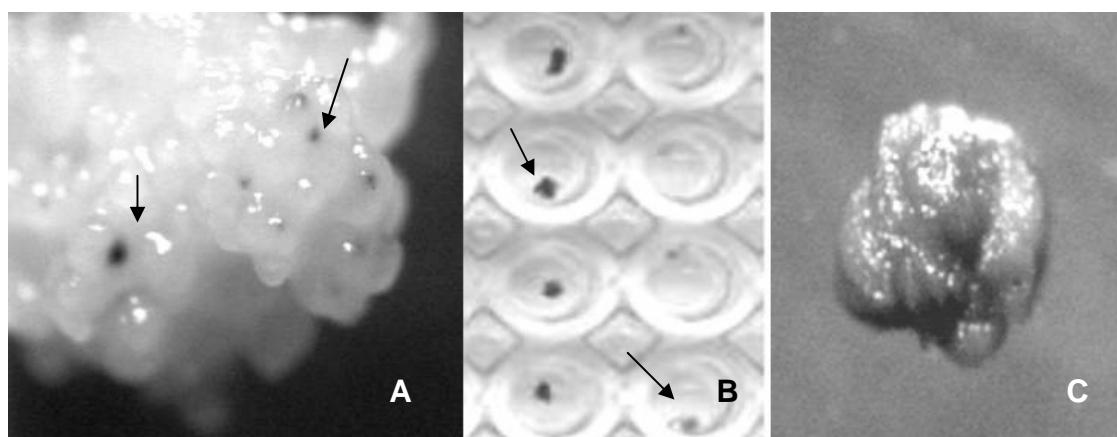


Figura 1 - Ensaio histoquímico da expressão transiente do gene *gusA*. A) Expressão transiente do gene *Gus* em aglomerados embriogênicos 24 h após o bombardeamento. B) Diferenças de expressão observadas após 3 meses em seleção; aglomerados dispostos a esquerda da microplaca apresentando coloração mais escura são resultantes da combinação de 0,25 M de manitol por 1 h e 300 psi de pressão de gás hélio para o bombardeamento. C) Detalhe de um dos aglomerados mostrado anteriormente.

A exposição do tecido-alvo ao meio hiperosmótico durante 30 min aumentou a expressão transiente em comparação com os outros tempos avaliados (Tabela 1),

porém o período de 4 horas mostrou maior intensidade na coloração dos pontos, sugerindo um alto nível de expressão transiente (Figura 1). Resultados similares de expressão

transiente foram encontrados quando avaliadas suspensões de células transformadas de arroz (NADANDEVA et al., 1999), de milho (VAIN et al., 1993) e de centeio (YE et al., 1997). O pré-cultivo em meio com maior concentração do agente osmótico pode aumentar a sobrevivência das células por reduzir o turgor, evitando o rompimento das células e perda do líquido citoplasmático (HUNOLD et al., 1994).

A expressão transiente pode variar devido a parâmetros físicos como pressão de hélio, uma vez que esta afeta a profundidade de penetração das partículas. Qualquer aumento na velocidade das partículas é acompanhado por um aumento na profundidade de penetração, bem como de danos pelo impacto. Todavia, a plasmólise das células-alvo, obtida pelo tratamento dos tecidos com manitol, pode reduzir os danos, aumentando as chances de sobrevivência das células à onda de choque causada pelo bombardeamento e, assim, maximizar a resposta embriogênica (NADANDEVA et al., 1999).

De todas as combinações testadas, o maior aumento na expressão transiente do gene *gusA* foi observada quando tecidos embriogênicos foram pré-condicionados em meio com 0,25 M por 1 h e as partículas aceleradas a 300 psi de pressão. Quando comparamos esta expressão ao mesmo tratamento pré-condicionante, mas com 600 psi de pressão verificamos que a expressão foi 4 vezes menor (Tabela 1). Estes resultados menos expressivos obtidos com 600 psi de pressão estão de acordo com aqueles obtidos por HUNOLD et al. (1994) que relata que a morte das células pode ser induzida por danos mecânicos causados por bombardeamento sob alta pressão.

REFERÊNCIAS

- CHRISTOU, P.; FORD, T.; KOFRON, M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. **Biotechnology**, London, v.9, p. 957-962, 1991.
- CHRISTOU, P. Transformation technology. **Trends in Plant Sciences**, London, v.1, n. 12, p. 423-431, 1996.
- DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H., Integrated bombardment & *Agrobacterium* transformation system: An alternative method to obtain transgenic soybean. **Plant Molecular Biology Reports**, Tucson, v.18, p.51-59, 2000.
- DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H., Transgenic fertile plants of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) obtained from bombarded embryogenic tissue. **Euphytica**, Wageningen, v.127, n.3, p.367-376, 2002.
- ENDT, D. V.; PASQUALI, G. Design and construction of plasmid vectors for plant transformation. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, n. 3, p.317, C.102, 1996.
- GLESS, C.; LÖRZ, H.; JÄHNE-GÄRTNER, A. Transgenic oat plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of leaf base segments, **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 152, n.2-3, p.151-157, 1998.
- HUNOLD, R.; BRONNER, R.; HARNER, G. Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. **Plant Journal**, York, v.5, n. 4, p.593-604, 1994.
- JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.W. Gus fusion: β -glucuronidase as sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, Heidelberg, v.6, p. 3901-3907, 1987.
- NADANDEVA, Y.L.; LUPI, C.G.; MEYER, C.S. et al. Microprojectile-mediated transient and integrative transformation of rice embryogenic suspension cells: effects of osmotic cell conditioning and of the physical configuration of plasmid DNA. **Plant Cell Reports**, New York, v.18, n.6, p. 500-504, 1999.
- RECH, E.; ARAGÃO, F. Biobalística, In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Eds) **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF, SPI, 1998. 307p.
- SANFORD, J.C. The biolistic process. **Trends Biotechnology**, Cambridge, v. 6, n.12, p.299-302, 1988.
- SIMMONDS, D.H.; DONALDSON, P.A. Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes. **Plant Cell Reports**, New York, v.19, n.5, p.485-490, 2000.
- STEWART, JR C.N.; ADANG, M.J.; ALL, J.N. et al. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene. **Plant Physiology**, Rockville, v.112, n.1, p. 121-129, 1996.
- TRICK, H.N.; FINER, J.J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. **Plant Cell Reports**, New York, v.17, n.6-7, p. 482-488, 1998.
- VAIN, P.; MCMULLEN, M.D.; FINER, J.J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cell Reports**, New York, v.12, n.2, p.84-88, 1993.
- YE, X.; WANG, Z-Y.; WU, X. et al. Transgenic italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. **Plant Cell Reports**, New York, v.16, n.6, p. 379-384, 1997.
- ZONTA, E.P., MACHADO, A. A. **SANEST - Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores**. Registrado na Secretaria Especial de Informática sob nº 066060 - categoria A. Pelotas, RS: Universidade Federal de Pelotas, 1984.