

## EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA VIA BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS DE CULTIVARES DE MANDIOCA DO NORDESTE DO BRASIL (*Manihot esculenta* Crantz)

**Fabíola Fernandes Heredia<sup>1</sup>; Juliana Brasil<sup>2</sup>; Juliana Rocha Vaez<sup>3</sup>; Terezinha Feitosa<sup>4</sup>; Francisco de Assis de Paiva Campos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular/UFC; <sup>2</sup>Curso de Ciências Biológicas/UFC; <sup>3</sup>Depto. Bioquímica e Biologia Molecular/UFV; <sup>4</sup>Embrapa Agroindústria Tropical. E-mail: bioplant@ufc.br.

### INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é cultivada extensivamente em países tropicais, onde se estima que alimenta mais de 600 milhões de pessoas (FAO, 2003). A engenharia genética pode ser utilizada como ferramenta em programas de melhoramento em diversas áreas, incluindo resistência a pragas e doenças, melhoria na qualidade nutricional e aumento de vida pós-colheita das raízes (Konan et al., 1997). A eficácia da transformação depende de sistemas eficientes de regeneração da planta. Dentre os sistemas de regeneração, a embriogênese somática se destaca por permitir uma rápida e elevada multiplicação de plantas elite *in vitro* e vem sendo utilizada para produção de plantas transgênicas em outras espécies (Guerra et al., 1998). Este trabalho teve por objetivo desenvolver protocolos de embriogênese somática e transformação genética via biobalística, de genótipos de mandioca cultivados no nordeste brasileiro.

### MATERIAL E MÉTODOS

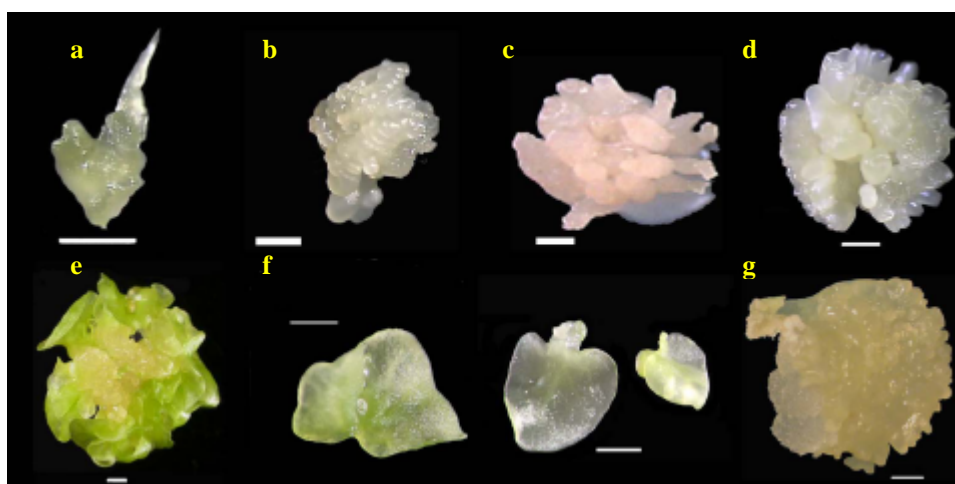
#### Embriogênese somática

**Primária** (Fig. 1, a-d): ápices caulinares de plantas cultivadas *in vitro*, cvs. Água Morna e Rosinha, foram transferidos para placas de Petri contendo 25 mL do meio de indução de embriogênese somática (MIES - sais e vitaminas MS, sacarose 2%, CuSO<sub>4</sub> 0,5 mg/L, picloram 1, 3, 6, 9, 12 ou 15 mg/L, agar 0,7%, pH 5,8). As placas foram incubadas a 28 ± 2°C no escuro e avaliadas após 3 semanas.

**Secundária** (Fig. 1, e-g): embriões somáticos primários da cv. Rosinha foram subcultivados em meio MIES 8 (suplementado com 8 mg/L de picloram), para um ou mais ciclos de multiplicação e depois transferidos para meio de maturação (MM - sais e vitaminas MS, sacarose 2%, CuSO<sub>4</sub> 0,5 mg/L, BAP 0,1 mg/L, agar 0,7%, pH 5,8). Cotilédones verdes de embriões somáticos foram seccionados em pedaços de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> e transferidos para meio de indução de embriogênese (MIES 8), variando a superfície de contato do explante com o meio (AB - superfície abaxial em contato com o meio, AD - superfície adaxial em contato com o meio). Após três semanas de incubação no escuro a 25 ± 2°C, a frequência de embriogênese somática secundária em cada um dos tratamentos foi avaliada.

## Transformação genética

O estudo dos parâmetros de bombardeamento, pressão de tiro (900 e 1200 psi) e tamanho das partículas (0,5 e 1,0  $\mu\text{m}$ ), foi realizado utilizando-se o plasmídeo pBI426, contendo o gene repórter *uidA*, e um acelerador de partículas a base de gás hélio a alta pressão. Foram utilizados 5  $\mu\text{L}$  do DNA plasmidial (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 50  $\mu\text{L}$  de partículas de tungstênio (60 mg/mL), 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  (2,5 M) e 20  $\mu\text{L}$  de espermidina (0,1 M), e incubados à temperatura ambiente sob agitação lenta, por 10 minutos. Após remoção do sobrenadante, o precipitado foi lavado e ressuspensionado em 24  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto. Pedacos de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> de cotilédones verdes, de embriões somáticos maduros da cv. Rosinha foram distribuídos em placas contendo meio constituído de ½ sais e vitaminas MS, sacarose 3%, solidificado com phytigel 0,8%, pH 5,8, e em seguida foram bombardeados com 3,2  $\mu\text{L}$  da suspensão preparada. A análise histoquímica de GUS mostrou a frequência de transformação transiente.



**Fig. 1.** Embriogênese Somática da Mandioca, cv. Rosinha. **Embriogênese somática primária:** a) ápice caulinar; b) embriões somáticos em estágio globular, após 10 dias de cultivo; c) embriões somáticos em estágio torpedo, após 14 dias de cultivo; d) embriões somáticos em início do estágio cotiledonar entre 14 e 21 dias de cultivo. **Embriogênese somática secundária:** e) embriões somáticos maduros após 25 dias, em meio de maturação; f) cotilédones; g) embriões somáticos em estágio globular. Barra de 1,0 mm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Embriogênese somática

**Primária:** a indução de embriogênese somática foi influenciada pelo genótipo e pela concentração de picloram utilizada. A cv. Rosinha mostrou-se mais embriogênica que Água Morna, em todas as concentrações testadas (Tabela 1).

A maior média de embriões por explante isolado, foi obtida no tratamento com 9 mg/L de picloram com a cv. Rosinha (36,5%). Depois de 10 dias de cultivo, embriões somáticos na forma globular foram visíveis e entre 14 e 21 dias, já era possível observar o aparecimento de embriões somáticos no estágio cotiledonar (Fig. 1- a, b, c, d).

**Tabela 1.** Efeito da concentração de picloram na indução de embriogênese somática primária (ES1<sup>a</sup>) em cultivares de mandioca.

Picloram (mg/L)	Água morna		Rosinha	
	Frequência de ES1 <sup>a</sup> (%)	Nº de embriões por explante	Frequência de ES1 <sup>a</sup> (%)	Nº de embriões por explante
1	14,4±3,8 <sup>bA</sup>	27,7±10,1 <sup>dB</sup>	7,0±1,8 <sup>b</sup>	8,5±4,5 <sup>b</sup>
3	36,6±15,2 <sup>abA</sup>	14,7±8,4 <sup>ab</sup>	48,8±9,6 <sup>cB</sup>	25,6±6,5 <sup>a</sup>
6	44,4±10,7 <sup>abA</sup>	16,2±4,7 <sup>ab</sup>	72,1±7,6 <sup>abB</sup>	34,3±3,7 <sup>a</sup>
9	37,2±12,0 <sup>abA</sup>	18,1±2,6 <sup>ab</sup>	61,1±10,1 <sup>bcB</sup>	36,5±6,1 <sup>a</sup>
12	55,5±18,9 <sup>aA</sup>	18,9±3,2 <sup>ab</sup>	80,0±5,7 <sup>aB</sup>	24,4±7,6 <sup>a</sup>
15	54,4±33,3 <sup>aA</sup>	25,0±1,2 <sup>a</sup>	76,6±8,7 <sup>abB</sup>	27,7±5,5 <sup>a</sup>

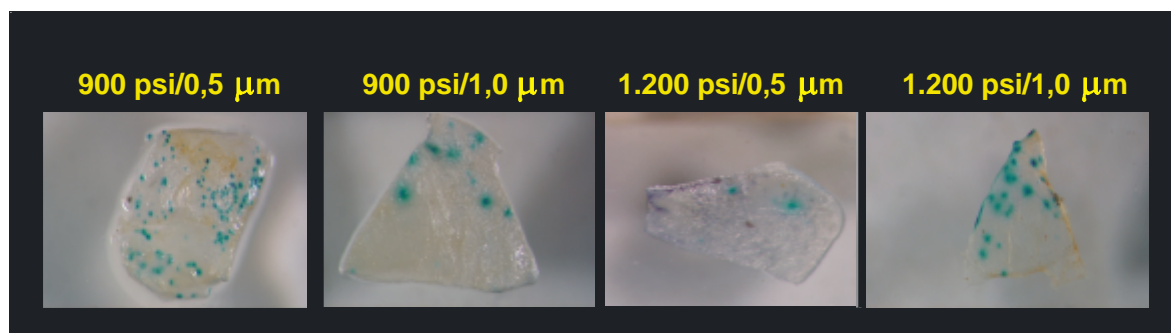
**Secundária:** a indução de embriogênese secundária foi influenciada tanto pela posição do explante. Todos os explantes do tratamento AB mostraram-se mais embriogênicos, apresentando uma maior quantidade de embriões por explante isolado (Tabela 2). Foi observado que apenas o tecido adaxial dos cotilédones eram morfogeneticamente competentes (Fig. 1g). O contato desse tecido com o meio de cultura promoveu uma super produção de calo, razão pela qual o número de embriões por explante isolado foi menor nos tratamentos AD.

**Tabela 2.** Efeito da superfície de contato do explante sobre a indução de embriogênese somática secundária (ES2<sup>a</sup>) de mandioca, cv. Rosinha.

Superfície de contato	Frequência de ES2 <sup>a</sup> (%)	Nº de embriões por explante	%
ABaxial	100	1-20	0
		21-40	6,7
		41-80	23,3
		Mais 80	70
ADaxial	96,7%	1-20	31
		21-40	20,7
		41-80	20,7
		Mais 80	27,6

### Transformação genética

Os estudos realizados se basearam na análise histoquímica do gene *uidA*. (Fig. 2). O maior número de manchas azuis foi observado quando partículas de 0,5 µm de diâmetro e pressão de tiro de 900 psi foram utilizados (Tabela 3). Possivelmente isso se deve ao menor dano causado às membranas celulares, possibilitando uma subsequente recuperação das células após o choque causado pela penetração das partículas.



**Fig. 2.** Análise histoquímica em cotilédones de embriões somáticos de mandioca cv. Rosinha .

**Tabela 3.** Efeito dos diferentes parâmetros de bombardeamento (pressão de tiro e tamanho das partículas) em cotilédones somáticos de mandioca cv. Rosinha utilizando o gene repórter *uidA*.

Tratamentos Pressão/partícula	Nº máximo de spots por explante	% explantes com spots	Nº médio de spots por explante
900 psi/0,5 µm	122	98,5	23,5
900 psi/1,0 µm	24	70,6	4,9
1.200 psi/0,5 µm	11	47,3	2,3
1.200 psi/1,0 µm	74	81,3	12,2

## CONCLUSÃO

Âpices caulinares são explantes adequados para induzir embriogênese somática em meio suplementado com picloram de 1 a 15 mg/L, porém a embriogênese somática secundária mostrou ser o caminho mais rápido para a obtenção de grandes quantidades de embriões em um curto espaço de tempo. Os resultados mostraram que há uma tendência à uma maior eficiência de transformação quando pressão de tiro de 900 psi e partícula com 0,5 µm de diâmetro são utilizados. Os protocolos descritos estão sendo utilizados para a transformação genética da cultivar Rosinha, com o gene que codifica para o peptídeo anti-microbiano sarcotoxina IA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, Statical Database, 2002. Disponível em: <<http://www.apps.fao.org/page/prm?collection=production>>. Acesso em: 31 mar. 2003.

KONAN, K.; SCHÖPKE, C.; CÁRCAMO, R.; BEACHY, N.; FAUQUET, C. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta Crantz*) based on nodal explants and axillary bud-derive meristems. **Plant Cell Reports**, v.16, 444-449, 1997.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A., (eds.), Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPQ, p.533-568, 1998.