

**Transferência de genes em segmentos foliares  
de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*  
Schumm.) usando biobalística**





ISSN 1677-8618  
Outubro, 2006

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 39***

**Transferência de genes em segmentos  
foliares de cupuaçu (*Theobroma  
grandiflorum* Schumm.) usando  
biobalística**

Maria das Graças Rodrigues Ferreira

Porto Velho, RO  
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Rondônia**

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 406, CEP 78900-970, Porto Velho, RO

Telefones: (69) 3901-2510, 3225-9387, Fax: (69) 3222-0409

www.cpafrro.embrapa.br

**Comitê de Publicações**

Presidente: *Flávio de França Souza*

Secretária: *Marly de Souza Medeiros*

Membros:

*Abadio Hermes Vieira*

*André Rostand Ramalho*

*Luciana Gatto Brito*

*Michelliny de Matos Bentes Gama*

*Vânia Beatriz Vasconcelos de Oliveira*

Normalização: *Daniela Maciel*

Editoração eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*

Revisão gramatical: *Wilma Inês de França Araújo*

**1ª edição**

1ª impressão: 2006, tiragem: 100 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.  
Embrapa Rondônia.

---

Ferreira, Maria das Graças Rodrigues.

Transferência de genes em segmentos foliares de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schumm.) usando biobalística / Maria das Graças Rodrigues Ferreira. -- Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2006.

12 p.: il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Rondônia, ISSN 1677-8618; 39).

1. Frutas tropicais. 2. *Theobroma grandiflorum*. 3. Biobalística.  
4. Genética Vegetal. I. Título. II. Série.

---

CDD 634.65

© Embrapa – 2006

# Sumário

<b>Resumo</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	6
<b>Introdução</b> .....	7
<b>Material e métodos</b> .....	9
<b>Resultados e discussão</b> .....	9
<b>Conclusões</b> .....	10
<b>Referências</b> .....	10



# Transferência de genes em segmentos foliares de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schumm.) usando biobalística

---

*Maria das Graças Rodrigues Ferreira*

## 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 (Alemanha). 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 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 em cupuaçu.

**Termos para indexação:** *Theobroma grandiflorum*, biobalística, transformação genética.

<sup>1</sup> Eng. Agrôn., D.Sc., Embrapa Rondônia, Caixa Postal 406, CEP 78900-970, Porto Velho, RO. E-mail: mgraca@cpafro.embrapa.br.

# Genes transfer in foliar segments of cupuassu using biolistic

---

## Abstract

*The biolistic technique was used with the objective of adapting a transformation protocol to cupuassu plants. Leaf segments 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 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 C1 and R ' of the antocianine synthesis, under the control of the promoter 35S, can be used as reporters to monitor transformation events in cupuassu.*

**Index terms:** *Theobroma grandiflorum, genetic transformation, biobalistic.*

## Introdução

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 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 um  $\mu\text{m}$ , 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, onde 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.

Embora a biobalística tenha sido desenvolvida inicialmente para a introdução de material genético no genoma nuclear de plantas superiores (SANFORD et al., 1987; KLEIN et al., 1987), também tem se demonstrado efetiva para a introdução e expressão de genes em bactérias, protozoários, fungos, algas, células e tecidos animais (insetos, peixes, aves e mamíferos), e em organelas como cloroplastos e mitocôndrias (BUTOW; FOX, 1990; SANFORD et al., 1993; KLEIN; FITZPATRICK-McELLIGOTT, 1993).

Vários tipos de explantes e células podem ser utilizados para a transformação por biobalística, tais como folhas, calos e caule. De modo geral, a transformação de meristemas apicais e células embriogênicas tem demonstrado maior eficiência para obtenção de plantas transgênicas. A transformação de tecidos meristemáticos por meio da biobalística apresenta a vantagem de evitar variantes somaclonais, decorrentes da cultura de calo (CHRISTOU, 1993; De BLOCK, 1993; WALDEN; WINGENDER, 1995; ARAGÃO et al., 1996; BIRCH, 1997).

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

A biobalística também pode ser utilizada junto com a inoculação com *Agrobacterium*, em tecidos bombardeados cujos microferimentos ampliam a área de infecção, aumentando a eficiência de transformação (BIDNEY et al., 1992; BRASILEIRO et al., 1996).

A utilização de métodos de transformação genética envolvendo *Agrobacterium tumefaciens* tem várias vantagens, uma vez que permite a introdução de segmentos relativamente grandes de DNA com baixa frequência de rearranjos. Ademais, o método permite integração de baixo número de cópias do gene de interesse nos cromossomos da planta a ser transformada. Uma das desvantagens em se usar biobalística é que normalmente várias cópias do inserto gênico são transferidas para a planta, mas este problema já está sendo contornado por vários laboratórios ao redor do mundo, utilizando não apenas técnicas de genética básica mas também de biologia molecular (De BLOCK et al., 1997; FU et al., 2000). A grande desvantagem desse método é que ele precisa de uma aparelhagem e de material relativamente onerosos.

Numerosos trabalhos de pesquisa têm sido publicados reportando transformações positivas obtidas com plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas usando a biobalística.

Dois grupos obtiveram plantas férteis de milho transformadas e demonstraram a possibilidade de se transferir os genes introduzidos para a progênie (GORDON-KAMM et al., 1990; FROMM et al., 1990). A estratégia descrita por Gordon-Kamm et al. (1990) envolveu três componentes principais: a) culturas de calos embriogênicos em suspensão, b) introdução de DNA via bombardeamento com partículas metálicas cobertas com DNA, e c) um sistema de seleção baseado em marcadores dominantes. A cultura de células em suspensão foi iniciada de calos embriogênicos friáveis do Tipo II e o bombardeamento com microprojéteis foi calibrado de maneira a introduzir partículas com dano mínimo em um grande número de células.

Casas et al. (1993) publicaram um protocolo de regeneração e transformação de sorgo bicolor usando biobalística. Entretanto, apenas 0,3% dos embriões usados produziram calos embriogênicos. Embriões de aveia, bombardeados com partículas de ouro revestidas com o gene repórter GUS sobre o controle do promotor Adh1 de milho, germinaram normalmente e produziram quatro plantas transgênicas a partir de 90 plantas analisadas (RITALA et al., 1994).

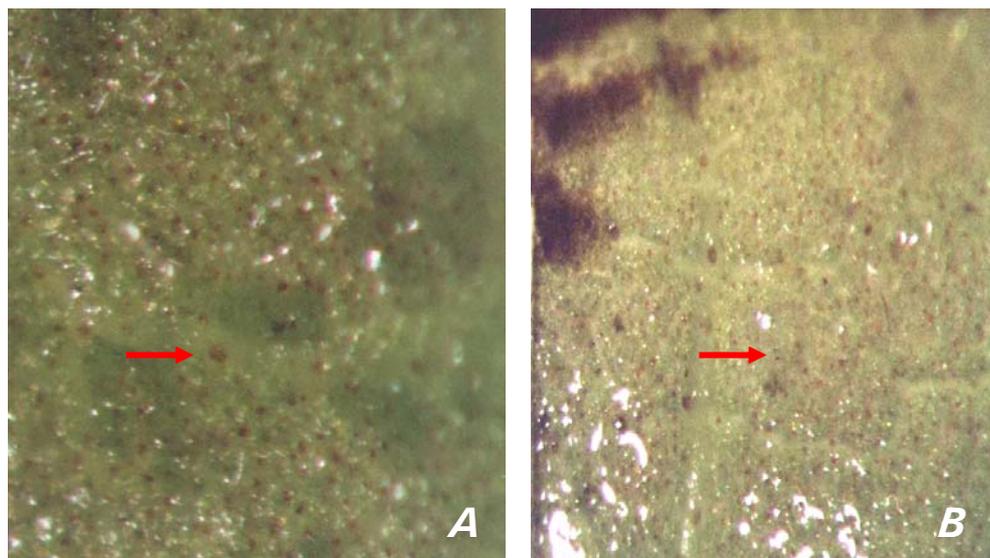
Para espécies recalcitrantes como milho, sorgo, trigo, arroz e outras, vários métodos de transformação direta com DNA livre, como a microinjeção, eletroporação e biobalística (transformação via gene-gun) foram desenvolvidos (BATTY; EVANS, 1992; OFFRINGA et al., 1992; SAUTERR et al., 1995; WANG et al., 1995; CHRISTOU, 1995). Atualmente centenas de espécies de plantas podem ser manipuladas geneticamente por técnicas moleculares. A lista inclui praticamente todas as dicotiledôneas mais importantes e o número de monocotiledôneas também está aumentando rapidamente (CHRISTOU, 1995; TAYLOR; FAUQUET, 2002).

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) é uma das fruteiras mais atrativas da Região Amazônica, devido às características de sabor e aroma de sua polpa, que é empregada na fabricação de sucos, sorvetes, licores, compotas, geléias, cremes, doces, etc. Nas últimas três décadas, com o aumento da demanda, o cupuaçuzeiro passou por um processo de transição do extrativismo para a forma cultivada, emergindo nos últimos anos, com o aumento da área plantada e com a ampliação do cultivo para outras regiões brasileiras (EMBRAPA, 1999), como uma das fruteiras amazônicas mais promissoras.

As mudas produzidas são, na sua maioria, provenientes de sementes, sem uma prévia seleção da planta matriz, ocasionando a formação de plantios com elevada variabilidade quanto à produção e formato dos frutos, arquitetura de copa, formato das folhas, entre outros (ALVES et al., 1998). Instituições de pesquisas na Região Norte têm implementado programas de melhoramento com ênfase à seleção de materiais com características de alta produção de frutos, rendimento de polpa e resistência à vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*), principal enfermidade da cultura. Clones de cupuaçuzeiro foram introduzidos no Banco Ativo de Germoplasma de Cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, oriundos de coletas de borbulhas e ponteiros realizadas nos Estados do Amapá, Amazonas e Pará nos anos 80. Após as avaliações de campo, selecionaram-se quatro clones com boa produtividade e tolerância à vassoura de bruxa: Coari, Codajás, Manacapuru e Belém (CRUZ; ALVES, 2002).

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. O objetivo deste trabalho foi adaptar um protocolo para transformação de cupuaçu mediada por biobalística.





**Fig. 2.** 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 1100 psi.

## Conclusões

Durante a elaboração de um protocolo para biobalística a concentração de DNA usado para recobrir 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. 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 pragas, como a vassoura de bruxa.

## Referências

ALVES, R. M.; CORRÊA, J. R. V.; GOMES, M. R. O. Avaliação preliminar de clones de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*), em áreas de produtores de Tomé-Açu, PA. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 13., 1998, Feira de Santana. **Anais...** Feira de Santana: UEFS, 1998. 359 p.

ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, n. 1-2, p. 142-150, 1996.

BATTY, N. P.; EVANS, J. M. Biological ballistics - no longer a shot in the dark. **Transgenic Research**, v. 1, n. 3, p. 107-113, 1992.

BIDNEY, D.; SCELONGE, C.; MARTICH, J.; BURRUS, M.; SIMS, L.; HUFFMAN, G. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, v. 18, p. 301-313, 1992.

BIRCH, R. G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 297-326, 1997.

BRASILEIRO, A. C.; ARAGÃO, F. J. L.; ROSSI, S.; DUSI, D. M. A.; BARROS, L. M. G.; RECH, E. L. Susceptibility of common and therapy beans to *Agrobacterium spp.* strains and improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation using microprojectile bombardment. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 121, p. 810-815, 1996.

BUTOW, R. A.; FOX, T. D. Organelle transformation: shoot first, ask questions later. **TIBS**, v. 15, p. 465-468, 1990.

CASAS, A. M.; KONONOWICZ, A. K.; ZEHR, U. B.; TOMES, D.T.; AXTELL, J. D.; BUTLER, L. G.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 90, p.11212-11216, 1993.

CHRISTOU, P. Philosophy and practice of variety-independent gene transfer into recalcitrant crops. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 29, p. 119-124, 1993.

CHRISTOU, P. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. **Euphytica**, v. 85, n. 1-3, p. 13-27, 1995.

CRUZ, E. D.; ALVES, R. M. **Clones de cupuaçuzeiro tolerantes à vassoura-de-bruxa**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 2002. 4 p.

DE BLOCK, M. The cell biology of plant transformation: Current state, problems, prospects and the implications for the plant breeding. **Euphytica**, v. 71, p. 1-14, 1993.

DE BLOCK, M.; DEBROUWER, D.; MOENS, T. The development of a nuclear male sterility system in wheat. Expression of the barnase gene under the control of tapetum specific promoters. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p.125-131, 1997.

EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. **Programa de melhoramento genético e de adaptação de espécies vegetais para a Amazônia Oriental**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. 137 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 16).

FROMM, M. E.; MORRISH, F.; ARMSTRONG, C.; WILLIAMS, R.; THOMAS, J.; KLEIN, T. M. Inheritance and expression of chimeric genes in progeny of transgenic maize plants. **Bio/Technology**, v. 8, p. 833-839, 1990.

FU, X.; DUC, L. T.; FONTANA, S.; BONG, B. B.; TINJUANGJUN, P.; SUDHAKAR, D.; TWYMAN, R. M.; CHRISTOU, P.; KOHLI, A. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. **Transgenic Research**, v. 9, p.11-19, 2000.

GORDON-KAMM, W. J.; SPENCER, T.M.; MANGANO, M.L. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **Plant Cell**, v. 2, p. 603-618, 1990.

KIKKERT, J. R. The biolistic PDS-1000/He device. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, p. 221-226, 1993.

KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R.; SANFORD, J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, v. 327, p. 70-73, 1987.

KLEIN, T. M.; FITZPATRICK-McELIGOTT, S. Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues. **Current Opinion Biotechnology**, v. 4, p. 583-590, 1993.

OFFRINGA, R.; VAN-DEN-ELZEN, P. J. M.; HOOYKAAS, P. J. J. Gene targeting in plants using the *Agrobacterium tumefaciens* vector system. **Transgenic Research**, v. 1, n. 3, p. 114-123, 1992.

RITALA, A.; ASPEGREN, K.; KURTÉN, U.; SALMENKALLIO-MARTTILA, M.; MANNONEN, L.; HANNUS, R.; KAUPPINEN, V.; TEERI, T. H.; ENARI, T.M. Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. **Plant Molecular Biology**, v. 24, n. 317-325, 1994.

SANFORD, J. C.; DEVIT, M. J.; RUSSEL, J. A.; SMITH, F. D.; HARPENDING, P. R.; ROY, M. K.; JOHNSTON, S. A. An improved, helium-driven biolistic device. **Technique**, v. 3, p. 3-16, 1991.

SANFORD, J.C.; KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Journal of Particle Science Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.

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 Enzimology**, v. 217, p. 483-510, 1993.

SAUTTER, C.; LEDUC, N.; BILANG, R.; IGLESIAS, V. A.; GISEL, A.; WEN, X.; POTRYKUS, I. Shoot apical meristems as a target for gene transfer by microballistics. **Euphytica**, v. 85, n. 1-3, p. 45-51, 1995.

TAYLOR, N.J.; FAUQUET, C. M. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. **DNA and Cell Biology**, New York, v. 21, n. 12, p. 963-977, 2002.

WALDEN, R.; WINGENDER, R. Gene-transfer and plant-regeneration techniques. **TIBTech**, v. 13, p. 324-331, 1995.

WANG, K.; DRAYTON, P; FRAME, B; DUNWELL, J; THOMPSON, J. Whisker-mediated plant transformation: An alternative technology. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 31, n. 2, p. 101-104, 1995.

**Embrapa**

---

**Rondônia**

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**