

# TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM CEVADA POR BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS

*Juliana Schmitt de Nonohay*

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Genética e Biologia  
Molecular da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul para obtenção do  
título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Profa. Dra. Helga Winge

Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

Porto Alegre

2002

# SUMÁRIO

<b>Capítulo 1.</b> Introdução geral e Objetivos .....	1
<b>Capítulo 2.</b> Revisão Bibliográfica .....	6
Transformação genética vegetal .....	7
Bombardeamento de partículas .....	11
Genes repórteres, seletores e de interesse .....	15
Estratégias de aquisição de resistência a fungos: enzimas quitinolíticas e microrganismos antagonistas .....	19
Integração, expressão e herança de transgenes .....	24
<b>Capítulo 3.</b> Transformação genética em cevada ( <i>Hordeum vulgare ssp. vulgare</i> ) .....	27
<b>Capítulo 4.</b> Analysis of particle bombardment conditions for genetic transformation of Brazilian barley cultivars .....	45
<b>Capítulo 5.</b> Genetic transformation of Brazilian barley cultivar by low helium pressure biolistic .....	66
<b>Capítulo 6.</b> Identificação de genes de quitinases potencialmente capazes de conferir resistência vegetal ao fungo <i>Bipolaris sorokiniana</i> .....	88
<b>Capítulo 7.</b> Discussão geral, Conclusões e Perspectivas .....	111
<b>Bibliografia dos capítulos 1, 2 e 7</b> .....	122
<b>Resumo</b> .....	135
<b>Abstract</b> .....	137

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS**

## Introdução geral e Objetivos

---

A cevada cultivada (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) é uma espécie de planta anual, diplóide ( $2n=14$ ), de autofecundação, pertencente à tribo *Triticeae*, da família Poaceae (Gramineae).

Os cereais, incluindo a cevada, estão entre as primeiras plantas domesticadas pelo homem, quando a agricultura gradualmente substituiu a caça e a coleta no período Neolítico (Vasil, 1994). De acordo com achados arqueológicos, a cevada foi domesticada há aproximadamente 10.000 anos, a partir da espécie *H. spontaneum* Koch, encontrada somente na Ásia (Hancock, 1992; El Rabey e Salamini, 2000). A região do "Crescente Fértil" no Oriente Médio, que atualmente abrange os países Israel, Jordânia, Síria, Turquia, Irã e Iraque, é considerada como o centro de origem da cevada cultivada (Harlan, 1979). Na moderna taxonomia, *H. vulgare* L. e *H. spontaneum* Koch são consideradas subespécies de *H. vulgare*, sendo agrupadas no "pool" gênico primário de cevada (Bothmer, 1995).

A cevada é atualmente cultivada em todas as regiões temperadas do mundo, principalmente na Europa. Em ordem de importância e em termos mundiais, a cevada é utilizada na alimentação animal, como forragem, pastagem, feno e silagem, na produção de malte e na alimentação humana, sendo consumida na forma integral, malte ou farinha (Minella, 1999). A cevada é considerada a quinta maior cultura mundial e a quarta maior cultura entre os cereais, sendo precedida por trigo, milho e arroz (Hancock, 1992; Minella, 1999). A produção média mundial de cevada foi de 143,9 milhões de toneladas nos anos de 1995 a 1999, segundo dados da FAO, com previsão de acréscimo de 20% nestes valores nos anos seguintes (Friedt e cols., 2000).

No Brasil, o plantio de cevada é realizado nas regiões de planalto dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, adequadas

às características de cultivo da espécie em regiões de clima temperado (Minella, 1999). Além destas regiões, desde 1999, a cevada vem sendo cultivada de forma irrigada no cerrado (Minella, 2000). A área cultivada nos últimos anos cresceu de 57.018 hectares em 1992 para 137.664 hectares em 2000 e o rendimento médio da lavoura no período aumentou cerca de 40%, passando de 1.700 para 2.400 kg/ha, da primeira para a segunda metade da década de 90 (Minella, 2001). A produção da cevada no Brasil é destinada quase que exclusivamente à obtenção de malte para a fabricação de cerveja (Minella, 1999). Em 1999, aproximadamente 90% da produção foi absorvida pela indústria cervejeira (Minella, 2000).

Duas grandes empresas brasileiras, a Cia. de Bebidas das Américas (AMBEV), fusão dos grupos Cia. Cervejaria Brahma e Cia. Antártica Paulista, e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), trabalham intensivamente no melhoramento genético da cevada, utilizando métodos de cruzamentos convencionais. Entretanto, apesar de todos os avanços alcançados até o momento, existem limitações relacionadas aos métodos tradicionais de melhoramento genético. Tal como outras plantas cultivadas, a cevada apresenta variabilidade restrita do germoplasma, sendo a maior parte das cultivares geneticamente semelhantes por parentesco (Peeters, 1988; Luizzi e Castro, 1991; Maris, 1992). Adicionalmente, embora não existam barreiras de isolamento reprodutivo entre *H. v. vulgare* e *H. v. spontaneum*, a transferência de genes da subespécie nativa - com grande variabilidade genética - para a cultivada, exigiria enorme número de retrocruzamentos e seleção, a fim de recuperar as combinações genéticas obtidas ao longo de séculos de seleção artificial. A utilização de espécies selvagens de *Hordeum* em cruzamentos, além de apresentar os mesmos problemas, é impedida pela existência de barreiras reprodutivas interespecíficas (Bothmer e cols., 1995). Desta forma, devido às limitações técnicas e genéticas do melhoramento convencional, a utilização da transformação genética justifica-se como um método

importante para o aumento de produtividade e qualidade da cultura de cevada no País.

Os principais objetivos no melhoramento genético das cultivares brasileiras de cevada concentram-se em adquirir alto rendimento, qualidade adequada e estabilidade do desempenho (produtividade/qualidade - Minella, 1999). Em vista das condições de clima, solo e sistemas de produção das regiões, as seguintes características têm sido utilizadas como critério de seleção no melhoramento genético da cultura de cevada no Brasil: ciclo curto, boa capacidade de afilhamento, baixa estatura, alta densidade de espigas, grãos curtos, arredondados e de casca fina, teor de proteína inferior a 12%, alta atividade enzimática (poder diastásico), tolerância à acidez e/ou ao alumínio tóxico no solo, resistência ao acamamento, resistência a doenças causadas por vírus, bactérias e fungos, e resistência a pragas como pulgões, lagartas, formigas e pássaros (Minella, 1999; Minella, 2000).

As doenças causadas por microrganismos são consideradas um dos mais sérios problemas que afetam as culturas de cevada, principalmente aquelas de origem fúngica. As cultivares de cevada são especialmente suscetíveis a uma série de moléstias fúngicas, tais como a mancha-em-rede, ferrugem-da-folha, oídio e giberela, causadas, respectivamente, pelos fungos *Pyrenophora teres*, *Puccinia hordei*, *Blumeria graminis tritici* e *Fusarium* sp. (Forcelini e Reis, 1997; Minella, 1999). Além destas, uma das doenças mais prevalentes de cevada é a causada pelo fungo *Bipolaris sorokiniana*, caracterizada pela mancha-marrom-das-folhas, ponta-preta-dos-grãos e podridão radicular, (Forcelini e Reis, 1997; Minella, 1999; Wordell e cols., 2000).

O fungo *B. sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker pertence à família Dematiaceae e é também denominado de *Helminthosporium sativum*, *H. sorokiniana* e *Drechslera sorokiniana*, e, na forma teleomórfica, recebe ainda a denominação de *Cochliobolus sativus*. Este fungo é caracterizado por ter as gramíneas como hospedeiros preferenciais e por ocorrer em

áreas quentes (25°C a 30°C) e úmidas (Matsumura, 1991; Forcelini e Reis, 1997). Como no trigo, esta moléstia em cevada apresenta duas fases distintas, caracterizadas pelo ataque aos órgãos aéreos (mancha marrom) e ao sistema radicular (podridão comum da raiz - Forcelini e Reis, 1997). Em condições quentes e úmidas, *B. sorokiniana* ataca especialmente as folhas e os grãos, enquanto que, em condições secas, as raízes são mais propensas à doença (Harrabi, 1996). *B. sorokiniana* caracteriza-se também por poder sobreviver no solo e nas sementes infectadas. Segundo Harrabi (1996), a mancha-marrom apresenta uma ampla distribuição, ocorrendo em plantações de cevada da Europa, Estados Unidos, norte da África e Austrália. Nos Estados Unidos, este fungo é considerado o principal patógeno da cevada. No Brasil, *B. sorokiniana* é considerado um dos fungos mais danosos à cultura, especialmente no Estado do Rio Grande do Sul (Minella, 2000).

A patogenicidade do fungo *B. sorokiniana* é controlada por resistência genética associada à rotação de culturas e ao uso de tratamento químico das sementes e da parte aérea (Forcelini e Reis, 1997; Wordell e cols., 2000). Todavia, os fungicidas, embora eficientes, contribuem para aumentar o custo de produção da cultura (Wordell e cols., 2000), além de causarem danos ambientais e à saúde humana. Quanto à resistência genética, nenhum dos 59 genótipos de cevada testados por Wordell e cols. (2000) apresentou alta resistência a *B. sorokiniana*. Por este motivo, é de grande interesse identificar, caracterizar e isolar genes que, potencialmente, possam conferir resistência genética a esse fungo para introdução no genoma de cevada.

De acordo com o que foi exposto, esta Tese de Doutorado, desenvolvida dentro da linha de pesquisa implantada no Departamento de Genética, Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e intitulada "Genética, Cultura de Tecidos e Transferência de DNA em Plantas: Gênero *Hordeum*", apresenta os seguintes **objetivos**:

1. Definir um método eficiente de transformação genética, por bombardeamento de partículas, para a obtenção de plantas transgênicas de cultivares brasileiras de cevada;

2. Identificar gene(s) codificante(s) de quitinase(s) potencialmente capaz(es) de conferir resistência ao fungo patogênico de cevada *B. sorokiniana*.



## **CAPÍTULO 2**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **Transformação genética vegetal**

---

A transformação genética vegetal é caracterizada pela introdução de fragmentos de DNA ou plasmídeos em células de plantas, utilizando-se os métodos de engenharia genética. Este procedimento de manipulação genética visa a expressão de genes heterólogos ou também a superexpressão ou supressão de genes endógenos em plantas. As plantas que têm seus genomas modificados por transformação genética são denominadas de transgênicas ou geneticamente modificadas.

A transformação genética vegetal constitui uma forte opção para complementar os métodos tradicionais de melhoramento genético, notadamente por permitir o acesso e a transferência de genes entre quaisquer espécies de interesse, independentemente de suas relações taxonômicas e evolutivas (Vasil, 1994). Nos métodos tradicionais de melhoramento genético, os genes disponíveis são restritos pela incompatibilidade sexual de muitos cruzamentos interespecíficos e intergenéricos (Christou, 1995). De acordo com Fraken e cols. (1997), juntamente com o desenvolvimento das técnicas de engenharia genética e análise genética vegetal, a produção de plantas transgênicas tem adquirido importâncias científica e econômica elevadas.

Os principais objetivos na geração de plantas geneticamente transformadas consistem em aumentar a resistência vegetal a herbicidas e patógenos, aumentar a tolerância a estresses abióticos, melhorar a qualidade nutricional do produto vegetal e produzir proteínas e biopolímeros de interesse técnico e farmacêutico (Yuan e Knauf, 1997; Herbers e Sonnewald, 1999; Grover e cols., 1999). Entre inúmeras publicações, exemplos são os trabalhos de De Block e cols. (1997), Bohorova e cols. (1999), Torres e cols. (1999), Carneiro e cols. (2000) e Sivamani e cols. (2000).

As plantas oferecem numerosos sistemas de expressão de proteínas recombinantes, controlados espacial e temporalmente, que apresentam diferentes aplicações *in situ* e *ex situ*. No melhoramento genético, a expressão de proteínas recombinantes confere às plantas proteção a herbicidas, insetos e microrganismos, e a produção de enzimas e anticorpos são exemplos da utilização de plantas e culturas de células e tecidos vegetais como “fábricas moleculares” (Fraken e cols., 1997). Adicionalmente, a transformação genética é uma importante forma de estudo da função e regulação de genes e da fisiologia e do desenvolvimento vegetal (Hansen e Wright, 1999).

Segundo Herbers e Sonnenwald (1999) a produção de proteínas exógenas em plantas tem se tornado uma alternativa interessante em comparação aos sistemas de produção de proteínas em fungos e bactérias. Estes autores citam como proteínas de interesse farmacêutico produzidas em plantas fatores de crescimento e interferon, entre outras, enfatizando que a produção em plantas de antígenos derivados de diversos vírus patogênicos a humanos e animais tem permitido o uso medicinal destes como vacinas utilizadas inclusive para a imunização oral. Herbers e Sonnenwald (1999) destacam que o uso de plantas como biorreatores é de especial interesse por permitir a produção de proteínas recombinantes estáveis, em grandes quantidades e a custos relativamente baixos. Além disto, vacinas e anticorpos produzidos em plantas são especialmente atrativos pelo fato dos vegetais não serem vetores ou hospedeiros de patógenos causadores de doenças humanas, reduzindo os custos de eliminação de toxinas virais e bacterianas.

Todos os avanços da utilização da transgênese vegetal têm sido relatados em um grande número de espécies de plantas utilizando-se diferentes métodos de transformação genética. Estes métodos incluem a transformação genética mediada por polietilenoglicol (PEG) e lipossomos (métodos químicos), a microinjeção, a eletroporação e o bombardeamento de partículas (métodos físicos), o uso de vetores virais e/ou bacterianos, como a agroinfecção e o sistema *Agrobacterium*,

respectivamente (métodos biológicos). Gelvin (1998) classificou os métodos químicos e físicos como métodos de transformação *in vitro* ou não naturais e os biológicos como *in vivo* ou naturais.

Os métodos de transformação genética mediados por PEG, lipossomos, microinjeção e eletroporação estão associados, na maioria dos casos, à utilização de protoplastos como células-alvo para introdução de DNA. Os protoplastos são células vegetais desprovidas da parede celular, por remoção mecânica ou enzimática, não apresentando, portanto, a principal barreira para a entrada de fragmentos de DNA. Entretanto, enquanto a transformação genética de protoplastos *per se* apresenta poucos problemas, a grande dificuldade reside na regeneração de plantas transgênicas a partir destas. Apesar disto, a eletroporação e a transformação genética mediada por PEG têm permitido a obtenção de plantas geneticamente transformadas de muitas espécies. Estes métodos de transformação envolvem a permeabilização da membrana celular por pulsos elétricos de alta voltagem e pelo tratamento com o composto químico PEG em alta concentração, que possibilita a entrada de DNA nas células por um choque osmótico (Fisk e Dandekar, 1993; Walden e Wingender, 1995). Os lipossomos e a microinjeção são pouco utilizados na transformação genética vegetal, sendo que o último método é considerado difícil, oneroso e bastante complexo de ser executado (Fisk e Dandekar, 1993).

O método *Agrobacterium* de transformação genética baseia-se na habilidade natural deste patógeno de transferir DNA para células vegetais, sendo a espécie *A. tumefaciens* a mais comumente utilizada. Na natureza, o segmento de DNA transferido pela *A. tumefaciens* contém genes controlados por seqüências regulatórias de plantas, os quais codificam proteínas envolvidas na biossíntese de fatores de crescimento vegetais (oncogenes) e nutrientes bacterianos (opinas – Tinland, 1996). O DNA de transferência (T-DNA) está localizado em um grande plasmídeo denominado de plasmídeo indutor de tumor (pTi), delimitado por seqüências de 25 pb repetidas diretamente. Parte dos genes

responsáveis pelo processo de transferência, os genes de virulência (*vir*), estão localizados em outra região do plasmídeo Ti e parte estão localizados no cromossomo bacteriano (Tinland, 1996). No processo de transformação genética de plantas mediado por agrobactérias, os genes de interesse são primeiro integrados no T-DNA do plasmídeo Ti, em substituição aos genes codificadores de opinas e oncogenes e, posteriormente, as células vegetais são infectadas com a bactéria recombinante (Tinland, 1996; Hansen e Wright, 1999). Diversas linhagens de agrobactérias contendo versões "desarmadas" de plasmídeos Ti, isto é, desprovidos do T-DNA, estão hoje disponíveis comercialmente. Em associação a estes, um segundo plasmídeo (plasmídeo binário ou cointegrativo) contém o T-DNA contendo diferentes genes marcadores e inúmeros sítios endonucleolíticos para a inserção de seqüências de DNA de interesse (Walden e Wingender, 1995). O T-DNA do plasmídeo binário é normalmente transferido às células vegetais graças à capacidade das proteínas codificadas pelas regiões *vir* operarem em *trans* (Tinland, 1996).

A transformação genética mediada por *Agrobacterium* permite altas freqüências de transformação para muitas espécies vegetais, principalmente dicotiledôneas. Freqüentemente, um número reduzido de transgenes é integrado no genoma vegetal de forma intacta e não rearranjados. Os transgenes inseridos por este método de transformação parecem estar menos sujeitos a metilações e, conseqüentemente, ao silenciamento gênico (Vasil, 1994; Gelvin, 1998). Komari e cols. (1998) destacam, também, a alta qualidade e fertilidade das plantas transgênicas resultantes. A primeira planta transgênica de que se tem notícia, tabaco, foi obtida em 1984 por meio da transformação genética por *Agrobacterium*.

A associação de *Agrobacterium* com o uso de vetores virais e o bombardeamento de partículas resultou nos métodos conhecidos como agroinfecção e agrolística, respectivamente. A agroinfecção é caracterizada pela transferência de um vetor viral presente no T-DNA de

*Agrobacterium* e a agrolística combina características da transformação por *Agrobacterium* com as do bombardeamento de partículas, onde ferimentos nos tecidos causados pelo bombardeamento favorecem a infecção bacteriana e a introdução do T-DNA nas células vegetais (Walden e Wingender, 1995). Este último método foi descrito para a transformação genética de espécies como tabaco e girassol (Bidney e cols., 1992), feijão (Brasileiro e cols., 1996) e soja (Droste e cols., 2000). No uso de vetores virais, ressalta-se que os mesmos são facilmente manipuláveis, podendo ser transferidos com uma simples inoculação das agrobactérias carreadoras e permitindo altos níveis de expressão do gene introduzido nas células infectadas, embora não sejam muito utilizados por carregarem pequenos e instáveis insertos de DNA exógeno (Walden e Wingender, 1995).

O uso de agrobactérias era considerado pouco eficiente na transformação genética de cereais, uma vez que depende da suscetibilidade da espécie vegetal a *Agrobacterium*. A cevada é uma espécie bastante resistente à infecção por *Agrobacterium*, mesmo utilizando acetoseringona, especialmente quando comparada com dicotiledôneas (Assmann, 1993). Entretanto, atualmente, graças à geração de plasmídeos "superbinários" e do uso de cepas supervirulentas, praticamente todos os vegetais podem ser transformados por este método (Hiei e cols., 1994; Hansen e Wright, 1999). Apesar disso, a resistência natural de monocotiledôneas as agrobactérias, juntamente com as dificuldades de regeneração de plantas a partir de protoplastos, caracterizam o bombardeamento de partículas de tecidos intactos como o método mais utilizado e que fornece melhores resultados na transformação genética de cereais.

## **Bombardeamento de partículas**

---

O bombardeamento de (micro)partículas ou (micro)projéteis, também denominado de aceleração de partículas ou projéteis, biolística ou biobalística (balística biológica), foi desenvolvido por Klein e cols. em 1987. Este método de transformação genética é caracterizado pela introdução de moléculas de DNA em células e tecidos intactos por meio de microprojéteis com alta velocidade, capazes de atravessarem a parede e as membranas celular e nuclear, liberando no núcleo os fragmentos de DNA. Nesta organela, por processos de recombinação ilegítima ou homóloga, e dependentes exclusivamente de componentes celulares, o DNA exógeno eventualmente integra-se ao DNA cromossômico (Sanford, 1990). Embora o bombardeamento de partículas seja especialmente usado na transformação genética de genomas nucleares de plantas, este método também tem sido descrito na introdução de DNA nos genomas de microrganismos e animais e de mitocôndrias e cloroplastos (ver Sanford e cols., 1993 e Hagio, 1998).

O bombardeamento de partículas permite a introdução de DNA nas células vegetais usualmente utilizando-se plasmídeos. Estes são aderidos às partículas de metais, como ouro ou tungstênio, referidas como microcarreadoras. Outros metais também podem ser utilizados como, por exemplo, paládio, platina e irídio. Entretanto, partículas constituídas destes metais fornecem resultados inferiores, talvez devido aos seus diâmetros ou por não serem capazes de aderir DNA tão eficientemente quanto ouro e tungstênio. Os metais devem ser quimicamente inertes, para evitar reações com o DNA ou com componentes celulares. Propriedades adicionais importantes incluem forma, tamanho e densidade, bem como as propriedades de aglomeração e dispersão. No processo de revestimento das partículas metálicas com DNA, certos aditivos, como espermidina e cloreto de cálcio, são utilizados. Em virtude das cargas positivas destes aditivos, possivelmente ocorra uma imantação das partículas metálicas que, então, adsorvem nas suas superfícies as moléculas negativas de DNA (revisado em Sanford e cols., 1993 e Christou, 1995).

Na biobalística, o complexo DNA-partículas é acelerado em direção às células utilizando-se vários aparatos e propelentes baseados em vários mecanismos de aceleração. Entre os aparatos de biobalística utilizados estão o equipamento original desenvolvido por Sanford e cols. (1987) e denominado "*Gunpowder Device*", cuja força propulsora é baseada na ignição por pólvora, o aparelho de descarga elétrica, o aparato denominado de "*Microtargeting*", instrumentos pneumáticos e aceleradores de partículas baseados na aceleração por gases hélio, nitrogênio e dióxido de carbono (Christou, 1995; Hagio, 1998). Atualmente, o aparelho de bombardeamento de partículas mais utilizado é o *Biolistic*<sup>®</sup> da Bio-Rad, embora o equipamento *Accell*<sup>®</sup> da Agracetus seja também utilizado na transformação genética de algumas espécies de plantas. O primeiro utiliza gás hélio sob alta pressão para promover a aceleração das micropartículas, enquanto o segundo depende do vapor d'água sob pressão para exercer a mesma função (Christou, 1995). Finer e cols. (1992) desenvolveram um acelerador de partículas denominado "Particle Inflow Gun" (PIG). Este aparelho tem sido utilizado com sucesso pelo fato de empregar baixas pressões de gás hélio, resultando em danos menores aos tecidos bombardeados. Entre as publicações que relataram o uso do acelerador de partículas PIG estão as de Koprek e cols. (1996) e Droste e cols. (no prelo).

As principais vantagens do bombardeamento de micropartículas são marcadas pelos fatos deste método de transformação genética não apresentar limitação de hospedeiro como o método *Agrobacterium* e, por sua aplicação não estar restrita a células e tecidos específicos como protoplastos, não estar associado a problemas de regeneração de plantas (Hunold e cols., 1994; Hagio, 1998). Entretanto, o bombardeamento de partículas está sujeito a fatores limitantes como determinados aspectos técnicos, incluindo o tipo de aparelho e partícula, o aparato experimental e o fato de que alguns tecidos podem ser resistentes à penetração das partículas devido a cutículas espessas e compactas, paredes celulares lignificadas e superfícies pilosas (Hunold e cols., 1994).



Quanto ao tipo de partícula, as de tungstênio e ouro são as mais comumente utilizadas, como já referido, sendo que ambas apresentam vantagens e desvantagens, que devem ser consideradas na utilização deste método de transformação genética. As partículas de tungstênio apresentam forma irregular, tamanho heterogêneo, são potencialmente tóxicas para alguns tipos de células e sujeitas à oxidação após um certo período. As vantagens destas partículas é que são mais baratas e facilmente envolvidas por DNA. Por outro lado, as partículas de ouro são mais arredondadas e uniformes, não apresentam toxicidade para qualquer tipo de célula (aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA como agente terapêutico humano) e não atacam cataliticamente o DNA aderido, embora sejam relativamente caras e preferencialmente devam ser preparadas imediatamente antes do uso, por se aglomerarem irreversivelmente (Sanford e cols., 1993).

Segundo os autores Sanford e cols. (1993), as características básicas que devem ser consideradas na utilização do método de biobalística são os parâmetros do acelerador de partículas, dos microprojéteis e os parâmetros biológicos e o delineamento experimental. Estes pesquisadores ressaltam que existe uma série de parâmetros biológicos importantes para o sucesso da transformação por biobalística. Primeiro, deve-se ter uma construção gênica apropriada, apresentando promotor suficientemente forte e capaz de direcionar a expressão para o tecido desejado. Segundo, as células-alvo devem estar em estado receptivo para a transformação, e finalmente, devem ser altas as taxas de penetração das partículas nas células, a sobrevivência e o crescimento celular após o bombardeamento.

Hunold e cols. (1994) destacam que mesmo nos melhores sistemas experimentais somente uma pequena fração das células do tecido-alvo irá ser penetrada pelas partículas, e entre estas, nem todas irão expressar o gene introduzido. Possíveis explicações podem incluir a baixa eficiência de integração do DNA introduzido ou a baixa sobrevivência das células impactadas. A morte celular pode ser

provocada pela toxicidade da partícula de metal utilizada e também devido ao dano mecânico causado pela penetração das partículas na parede celular, plasmalema e estruturas internas.

Dessa forma, é importante salientar que existe uma série de condições, inerentes ao equipamento e ao material biológico, essencial para a eficiência da utilização do bombardeamento de partículas. Entre estas condições estão a concentração de partículas e plasmídeos, transgenes e regiões reguladoras como promotores e terminadores, poliaminas como espermidina e sais como cloreto de cálcio, pressões dos gases que determinam a velocidade das partículas, distância de bombardeamento, número de disparos e tratamento osmótico dos tecidos-alvo. Segundo diversos autores, como Sanford e cols. (1993), Christou (1995), Hagio (1998), estes parâmetros devem ser otimizados para cada espécie a ser transformada e para cada tipo de tecido-alvo utilizado.

## Genes repórteres, seletores e de interesse

---

Para a definição das melhores condições de transformação genética vegetal, primeiramente são utilizados genes denominados de marcadores de seleção e genes repórteres. Os genes marcadores de seleção são aqueles capazes de conferir resistência ou tolerância a antibióticos e a herbicidas, permitindo a seleção do material transgênico. Os genes repórteres, por sua vez, codificam proteínas cuja presença ou atividade enzimática são facilmente percebidas e mensuráveis, denotando a condição transgênica de células, tecidos e organismos (Walden e Wingender, 1995; Brasileiro e Carneiro, 1998; Brasileiro e Dusi, 1999).

O gene repórter mais utilizado na avaliação da condição transgênica de células e tecidos é o *uidA* ou *gusA*, isolado da bactéria *Escherichia coli* e que codifica a enzima  $\beta$ -glicuronidase (GUS). As células transformadas com este gene podem ser visualizadas por meio da coloração azul decorrente da conversão do substrato ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glicurônico em um precipitado indólico azul na presença de oxigênio. Vários outros substratos estão comercialmente disponíveis para ensaios da atividade da enzima GUS (X-Gluc - Jefferson e cols., 1987).

Outros genes repórteres utilizados são o gene *luc* ou *lux* e o gene *gfp*. O gene repórter *lux* ou *luc*, isolado de bactérias marinhas e *Photinus pyralis* (vaga-lume), codifica a enzima luciferase que cataliza a descarboxilação oxidativa da luciferina em oxyluciferina, sendo utilizada como um indicador bioluminescente em ensaios metabólicos (Koncz e cols., 1990). O gene *gfp* foi isolado de medusas (*Aequorea victoria* e *Renilla reniformis*) e caracteriza-se por codificar a proteína de fluorescência verde (GFP), que apresenta também a propriedade de luminescer quando excitada por luz azul ou ultravioleta (Niedz e cols.,

1995). A utilização destes genes como indicadores de transformação genética vegetal apresenta a vantagem dos tecidos serem ensaiados *in vivo*, embora altos níveis de GFP podem interferir na regeneração de plantas (Metz e Nap, 1997).

Entre os genes capazes de conferir resistência a antibióticos, e freqüentemente utilizados em plantas estão o gene da neomicina-fosfotransferase (*nptII*) ou aminoglicosídeo-fosfotransferase 3'II (*atp3'*) e o gene da higromicina-fosfotransferase (*hpt*). O gene *nptII* foi originalmente isolado do transposon Tn5 de *E. coli* e é capaz de conferir resistência a neomicina e aos seus análogos estruturais como canamicina, gentamicina (G418) e paromomicina (Herrera-Estrella e cols., 1988). O gene *hpt*, isolado de *E. coli*, codifica a enzima higromicina-fosfotransferase (HPT) que inativa, por fosforilação de um grupo hidroxila, e confere resistência ao antibiótico higromicina (van den Elzen e cols., 1985).

Os principais genes de resistência a herbicidas incluem o gene da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (*aroA* ou *epsps*) e o gene da fosfinotricina-acetiltransferase (*ppt*, *pat* ou *bar*). O gene *aroA* ou *epsps*, inicialmente isolado de *Petunia hybrida* e *Arabidopsis thaliana*, codifica uma forma da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS) não inibida por glifosinato de sódio, base de herbicidas como o Round-Up<sup>®</sup>, produzido pela Monsanto. A inibição da enzima EPSPS resulta no acúmulo de chiquimato, que interrompe a síntese de aminoácidos aromáticos e metabólitos secundários, levando a morte celular (Comai e cols., 1985). O gene *bar* ou *pat*, isolado de *Streptomyces hygrosopicus* e *S. viridochromogenes*, tem sido utilizado com sucesso em cereais, sendo capaz de conferir a resistência a herbicidas derivados da fosfinotricina (PPT) ou glifosinato de amônio, um inibidor da glutamina-sintase (De Block e cols., 1987). Este gene codifica a enzima fosfinotricina-acetiltransferase (PAT), que acetila o grupo amino livre do herbicida PPT, impedindo sua ligação com a enzima glutamina-sintase. A inibição desta enzima, por exposição da planta ao PPT, resulta no acúmulo de amônia e,

conseqüentemente, na morte das células. Diferentes agentes de seleção baseados em PPT podem ser usados na seleção de tecidos transformados com o gene *bar*, como os herbicidas de amplo espectro Basta® e Finale® (Hoechst), formulações comerciais de glifosinato de amônio e o herbicida Herbiace® (Meiji Seika Kaisha Ltd., Japão), com o ingrediente ativo "bialafos", um tripeptídeo consistindo de PPT e dois resíduos de alanina removidos das células vegetais por peptidases (revisado em De Block e cols., 1987; Walden e Wingender, 1995; Hänsch e cols., 1998).

Recentemente, o gene *manA*, que codifica a enzima manose-6-fosfato-isomerase (MPI), vem sendo utilizado como gene marcador de seleção de tecidos transgênicos. A enzima MPI converte o carboidrato manose-6P em frutose-6-P, permitindo o crescimento de tecidos transformados em meios de cultura contendo manose, que não é usualmente utilizada como fonte de carbono em plantas. O gene *manA* mostrou-se efetivo para a seleção de tecidos transformados de milho e trigo (ver Hansen e Wright, 1999).

Métodos de seleção eficientes são importantes parâmetros para se isolar células estavelmente transformadas, especialmente quando são utilizados tecidos multicelulares como embriões imaturos ou suspensões celulares. A pressão de seleção aplicada (concentração do agente seletivo e tempo de exposição) deve ser determinada, a fim de evitar o desenvolvimento de "escapes", ou seja, tecidos não transformados geneticamente mas capazes de sobreviver na presença dos agentes seletivos, ou a interferência nos processos de cultura de tecidos e regeneração das plantas (Hänsch e cols., 1998).

Posteriormente ao estabelecimento e otimização das condições de transformação com genes repórteres e/ou seletores para a espécie vegetal que se está trabalhando, passa-se, então, para a transferência de genes de interesse, ressaltando-se que os genes de seleção a herbicidas também conferem características de interesse às plantas transgênicas produzidas. A aquisição de resistência a herbicidas, insetos e microrganismos é considerada um dos principais e mais experimentado

propósito no melhoramento genético de plantas. No caso de aquisição de resistência a insetos, plantas inseticidas têm sido produzidas pela expressão de genes como os codificadores de  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*, inibidores de proteinases,  $\alpha$ -amilases, lectinas, polifenol-oxidases e quitinases (ver Estruch e cols., 1997).

Nas patogenicidades devidas a microrganismos, as plantas naturalmente respondem às infecções causadas pelos mesmos induzindo um conjunto de mecanismos de defesa potencialmente capazes de limitar a invasão a outros tecidos do vegetal (Baker e cols., 1997). Estes mecanismos de defesa incluem a indução da morte das células no local da infecção, referida como resposta hipersensível (HR), o reforço da parede celular, a produção de proteínas, metabólitos secundários e proteínas relacionadas à patogênese (PRs).

As estratégias que têm sido desenvolvidas para aumentar a resistência a patógenos, incluindo fungos fitopatogênicos, estão relacionadas com a obtenção de plantas que constitutivamente produzam altos níveis de proteínas ou compostos capazes de limitar o desenvolvimento dos microrganismos (Bushnell e cols., 1998). Entre estes compostos e proteínas estão as proteínas que inativam ribossomos (enzimas RIPs), capazes de clivar a ligação N-glicosídica em purinas específicas do rRNA 28S de fontes heterólogas, inibindo a síntese protéica (Leah e cols., 1991; Lodge e cols., 1993; Jach e cols., 1995); peptídeos líticos vegetais, tais como defensinas (Terras e cols., 1995) e tioninas (Epple e cols., 1997); proteínas relacionadas com a patogênese (PRs), como taumatinas (Datta e cols., 1999), glicanases (Leah e cols., 1991; Jach e cols., 1995) e quitinases (Leah e cols., 1991; Jach e cols., 1995; Grisson e cols., 1996; Bliffeld e cols., 1999); enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas, compostos estruturalmente diversos como fenilpropanóides e flavonóides produzidos em respostas a patógenos (Hain e cols., 1993; Stark-Lorezen e cols., 1997; Leckband e Lörz, 1998); e proteínas raça-específicas (Rommens e cols., 1995).

Entre as proteínas antifúngicas mais exploradas para a geração de plantas transgênicas resistentes estão as enzimas hidrolíticas quitinases e  $\beta$ -1,3-glicanases, capazes de degradar os maiores componentes da parede celular de fungos, as quitinas e glicanos, respectivamente (Fritig e cols., 1998; Salmeron e Vernooij, 1998).

## **Estratégias de aquisição de resistência a fungos: enzimas quitinolíticas e microrganismos antagonistas**

---

As quitinases são enzimas hidrolíticas que catalisam a clivagem do polissacarídeo  $\beta$ -(1,4)-*N*-acetilglicosamina (GlcNAc), a quitina. A reação de clivagem ocorre entre os carbonos 1 e 4 de duas consecutivas *N*-acetilglicosaminas de quitina (Flach e cols., 1992). A quitina é um polímero fibroso, insolúvel em água, constitui-se no maior componente estrutural das paredes celulares de fungos, insetos, algas e invertebrados marinhos e, conseqüentemente, representa um dos mais abundantes polímeros ocorrentes na natureza juntamente com a celulose e as ligninas (Collinge e cols., 1993; Brameld e Goddard, 1998; Cohen-Kupiec e Chet, 1998). Todos os organismos que possuem quitina nas suas paredes celulares necessariamente produzem as enzimas quitina-sintase e quitinases como parte dos seus processos de crescimento e desenvolvimento. Além destes, as quitinases são também sintetizadas por organismos que não são constituídos de quitina como plantas, vertebrados e procariotos (Cohen-Kupiec e Chet, 1998).

De acordo com suas seqüências de aminoácidos, as quitinases são agrupadas em duas famílias de glicosil-hidrolases, denominadas de 18 e 19, diferindo entre si em estrutura e mecanismo de ação (Herissat e Bairoch, 1993; Bramel e Goddard, 1998). A família 19 é caracterizada por quitinases vacuolares e as secretadas pelas plantas, enquanto que a família 18 inclui as quitinases extracelulares de plantas superiores,

bactérias, leveduras e fungos (Holm e Sander, 1994). Brameld e Goddard (1998) citam que Ohno e cols. (1996) isolaram, a partir de *Streptomyces griseus*, a primeira quitinase procariótica classificada na família 19.

As quitinases são também classificadas em endo e exoquitinases, de acordo com a forma como clivam a quitina. As endoquitinases clivam aleatoriamente as ligações internas  $\beta$ -1,4, gerando oligossacarídeos de quitina solúveis em água e de baixa massa molecular como a quitotetraose, a quitotriose e dímeros de di-acetilquitobiose. As exoquitinases são subdivididas em 2 categorias, as quitobiosidases, as quais catalisam a liberação progressiva de di-acetilquitobiose a partir da extremidade não reduzida da quitina, e 1-4- $\beta$ -N-acetilglicosaminidases, capazes de clivar produtos oligoméricos de endoquitinases e quitobiosidases, gerando monômeros de quitina (Cohen-Kupiec e Chet, 1998).

As quitinases apresentam diferentes funções biológicas de acordo com o organismo que a produz. As bactérias produzem quitinases para necessidades nutricionais e parasitismo, para assimilar a quitina de outros organismos como fonte de carbono e/ou nitrogênio, enquanto que nos fungos, protozoários e invertebrados, as quitinases estão também envolvidas na morfogênese (McCreath e cols., 1995; Cohen-Kupiec e Chet, 1998; Patil e cols., 2000). Patil e cols. (2000) citam que baculovírus também sintetizam quitinases que lhes permite invadir e lisar células de insetos, sendo utilizados em controle biológico de insetos graças a estas propriedades, e que a atividade quitinolítica em soro humano foi recentemente descrita, possivelmente relacionada à defesa contra patógenos fúngicos.

As plantas e vertebrados produzem quitinases como parte do seu repertório de proteínas de defesa contra organismos que possuem quitina. No caso das plantas, as quitinases estão classificadas entre as proteínas PR (McCreath e cols., 1995; Cohen-Kupiec e Chet, 1998; Patil e cols., 2000). Algumas vezes, as quitinases e outras enzimas são produzidas pelas plantas com a função de gerar associações com fungos



simbiontes (micorrizas), salientando-se que parece ser necessária a inativação de "elicitores" derivados da quitina de fungos para permitir esta interação compatível (Dassi e cols., 1996; Cohen-Kupiec e Chet, 1998). Além disto, em plantas superiores, aparentemente, estas hidrolases não são simplesmente proteínas PRs antifúngicas induzidas de forma não-específica sob condições de estresse. Algumas quitinases são expressas em raízes, folhas e órgãos florais saudáveis e em culturas *in vitro*, provavelmente estando relacionadas com funções endógenas do processo de desenvolvimento normal das plantas (Kragh e cols., 1993).

A expressão dos genes codificadores das quitinases vegetais é dirigida por promotores tecido-específicos, regulados por estímulos ambientais como o ataque de patógenos, ferimentos, reguladores de crescimento, pressão osmótica e metais pesados, ou por estágios do desenvolvimento como o amadurecimento dos frutos, processo induzido pelo etileno (Cohen-Kupiec e Chet, 1998; Patil e cols., 2000). A expressão de quitinases é freqüentemente associada com a indução de outras PRs como as  $\beta$ -1,3-glicanases (Collinge e cols., 1993). A maioria das quitinases vegetais é expressa em órgãos vegetativos, embora algumas estejam também presentes em sementes (Patil e cols., 2000). Estas enzimas clivam preferencialmente substratos acetilados, com nível de atividade relacionado ao grau de acetilação. O aumento do nível de desacetilação na superfície das hifas parece ser útil na resistência de fungos às quitinases vegetais, sendo que a presença de atividade da enzima quitina-desacetilase durante a formação de estruturas de infecção sustenta esta hipótese (Patil e cols., 2000).

As quitinases vegetais são divididas em 6 classes (I-VI), sendo estas classes agrupadas nas famílias 18 e 19 de glicosil-hidrolases, como descrito anteriormente. As características que determinam estas classes incluem a seqüência N-terminal, a localização da enzima, o pH isoeletrico, a presença de peptídeo-sinal e indutores (Patil e cols., 2000). As quitinases de classe I, II e IV são de origem vegetal, pertencem à família 19 e apresentam domínio catalítico e peptídeo-sinal homólogos.

As quitinases de classe I apresentam um peptídeo-sinal que as direciona para os vacúolos e são subdivididas em 1a (básicas) e 1b (ácidas). As quitinases de classe II são secretadas no apoplasto e as de classe IV são enzimas extracelulares, bastante semelhantes as quitinases de classe I, embora sejam bem menores em tamanho. As quitinases de classe III e V estão agrupadas na família 18, sendo as de classe III de origem vegetal e fúngica. As quitinase de classe V e VI incluem exemplos únicos, sendo que as da classe V são endoquitinases de origem bacteriana (Cohen-Kupiec e Chet, 1998; Patil e cols., 2000). Collinge e cols. (1993) fazem referência a uma associação entre a localização e o papel das quitinases na reação de defesa em vegetais. Foi proposto por esses autores que as quitinases extracelulares agem no início do processo, direta e indiretamente, por meio do bloqueio de fungos invasores do espaço intercelular e liberando "elicitores" que induzem a expressão de quitinases adicionais e outras reações de defesa do hospedeiro. As quitinases presentes nos vacúolos agem mais tarde no processo infeccioso, quando as células colapsam e liberam o conteúdo vacuolar no meio extracelular.

As quitinases fúngicas pertencem à família 18 e podem ser divididas em duas subclasses com base nas suas estruturas primárias. As quitinases do tipo fúngico ou vegetal apresentam alta homologia de aminoácidos com a classe III de quitinases vegetais, e as quitinases do tipo bacteriano apresentam similaridade de seqüência com quitinases bacterianas (Takaya e cols., 1997). Em fungos, a produção de quitinases é destinada para múltiplas funções como nutrição e processos de germinação dos esporos, crescimento, ramificação e autólise das hifas (Takaya e cols., 1997; Cohen-Kupiec e Chet, 1998). Adicionalmente, as quitinases apresentam função importante nas atividades de fungos antagonistas micoparasitas (Cohen-Kupiec e Chet, 1998).

Microrganismos antagonistas são caracterizados por apresentarem potencial para interferir no crescimento e/ou sobrevivência de outros organismos, em especial fitopatógenos. Desta forma, estes

organismos têm sido estudados para o desenvolvimento de alternativas biológicas ou complementares a pesticidas químicos, contribuindo, portanto, para o controle biológico de patógenos fúngicos. Para tal propósito, os antagonistas devem proliferar e se estabelecer em um nicho ecológico apropriado para se tornarem ativos contra os fungos patogênicos (Inbar e Chet, 1997). As interações de antagonismo entre os microrganismos na natureza incluem o parasitismo ou lise, quando o fungo antagonista ataca o fungo patogênico diretamente em seu sistema biológico, a antibiose, caracterizada pela inibição ou destruição de um organismo pela produção metabólica de outro, e a competição por nutrientes, principalmente carbono, nitrogênio e ferro, resultando na depleção de nutrientes ao fitopatógeno. Os micoparasitas rompem o micélio de patógenos fúngicos degradando enzimaticamente as suas paredes celulares pela ação de enzimas hidrolíticas como as quitinases,  $\beta$ -1,3-glicanase, celulasas e proteases (Inbar e Chet, 1997; Herrera-Estrela e Chet, 1998).

O mais conhecido e utilizado mecanismo de biocontrole antifúngico envolve espécies fúngicas do gênero *Trichoderma*. *Trichoderma* é um gênero de fungos filamentosos deuteromicetos, caracterizado por espécies que vivem geralmente em solos, ocorrendo raramente em plantas vivas e nunca relatados como endofitas das mesmas. A maioria dos isolados de *Trichoderma* não é encontrada em associação com estágios sexuais, sendo estritamente considerados como fungos mitóticos, clonais. Formas teleomorfas são reconhecidas pertencendo a *Hypocrea* ou gêneros relacionados (revisado em Samuels e cols., 1996).

*T. harzianum* e *T. virens* (*Gliocladium virens*) são as espécies mais comumente utilizadas no controle biológico de moléstias vegetais causadas por fungos, incluindo o controle de *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* e *Fusarium* (Samuels, 1996). O parasitismo de *Trichoderma* sp. é necrotrófico, resultando na morte do fungo hospedeiro (Cortes e cols., 1998; Omero e cols., 1999). Certas espécies de *Trichoderma* atacam as

hifas dos hospedeiros, enrolando-as, emitindo estruturas semelhantes a ganchos e apresório, e penetrando através da parede celular dos hospedeiros por secreção de enzimas hidrolíticas. A interação entre os fungos é específica e não meramente uma resposta ao contato, sendo que sinais do fungo hospedeiro, especialmente lectinas, são reconhecidos pelo *Trichoderma*, induzindo uma cascata de reações que resulta no micoparasitismo (Inbar e Chet, 1997; Herrera-Estrela e Chet, 1998; Cortes e cols., 1998; Omero e cols., 1999).

As quitinases, devido às suas várias funções, apresentam uma série de aplicações industriais e na agricultura. Estas enzimas podem ser utilizadas no controle biológico de patógenos fúngicos e insetos e na produção de oligossacarídeos de quitina com atividade antitumoral e anti-inflamatória (ver Patil e cols., 2000). A produção de plantas geneticamente modificadas exibindo resistência a patógenos fúngicos é considerada de grande interesse para a agricultura. Com este propósito, entre as estratégias para a aquisição da resistência a patógenos em plantas transgênicas estão a superexpressão, a alteração da localização tissular de quitinases endógenas e também a introdução e expressão de quitinases heterólogas, especialmente quitinases do fungo *Trichoderma*. Lorito e cols. (1998) salientam que, em termos de atividade antifúngica, as quitinases do fungo *Trichoderma* fornecem melhores resultados que as quitinases vegetais, uma vez que parecem não existir patógenos que apresentem quitinas resistentes às quitinases deste gênero de fungos.

## **Integração, expressão e herança de transgenes**

---

No processo de transformação genética vegetal, independentemente do gene introduzido, diferentes aspectos, relacionados aos processos de integração e expressão dos transgenes e da forma de suas heranças, são importantes para estabelecer a eficiência

do método de transformação, a estabilidade das plantas transgênicas e a biossegurança de seus empregos na agricultura e na alimentação.

O processo de incorporação dos transgenes no genoma de células vegetais envolve, para a maioria das construções gênicas, as suas integrações em posição aleatória do genoma e em número indefinido de cópias, freqüentemente na forma de repetições (Kumar e Fladung, 2001). As repetições em *tandem* ocorrem especialmente nos processos diretos de transformação genética (biobalística, eletroporação, microinjeção). Estas características, associadas à integridade estrutural dos genes introduzidos, apresentam grande influência na expressão dos mesmos (Fu e cols., 2000; Kumar e Fladung, 2001).

A expressão de transgenes em plantas pode ser inibida por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais de silenciamento (Grant, 1999; Meyer, 1999). No silenciamento gênico transcricional, a transcrição dos transgenes é inibida devido à estrutura da cromatina associada e a metilações de citosinas nas regiões promotoras das seqüências de DNA introduzidas. Estes processos estão envolvidos na regulação da expressão de genes em geral (Grant, 1999; Meyer, 1999; Kumar e Fladung, 2001). No silenciamento gênico pós-transcricional, as regiões codificadoras estão sujeitas a metilações e este processo está associado à degradação de RNAs produzidos de forma aberrante (revisado em Grant, 1999).

No silenciamento gênico, freqüentemente, seqüências homólogas aos transgenes estão envolvidas, caracterizando o mecanismo denominado de co-supressão. Essas seqüências homólogas podem corresponder a genes endógenos e, especialmente, a múltiplas cópias de genes introduzidos. Os métodos de transformação genética, como descrito anteriormente, tendem a gerar plantas transformadas contendo um alto número de cópias de transgenes, freqüentemente rearranjados ou concatenados, que podem justamente levar ao silenciamento dos transgenes por supressão homóloga dependente (Gelvin, 1998). Além disto, a orientação das diferentes cópias integradas também influenciam

a expressão dos transgenes, uma vez que a introdução de seqüências de DNA inversamente repetidas resulta em silenciamento por orientação complementar de cadeias ou silenciamento "antisense" (revisado em Senior, 1998). Tem sido descrita na literatura a existência de forte associação entre o número de cópias e o silenciamento de transgenes e pequena correlação entre o número de cópias e o nível de expressão de transgenes. Adicionalmente, a associação entre o local de inserção e a expressão de transgenes é chamada efeito de posição (Gelvin, 1998).

O silenciamento de genes representa um mecanismo de defesa para detecção e inativação de DNAs invasivos como transgenes, transposons e vírus, com evidências de que este mecanismo corresponde a um processo geneticamente controlado (Mattzke e Mattzke, 1998; Fu e cols., 2000). Fu e cols. (2000) afirmam que o silenciamento pode ocorrer *de novo* em qualquer geração, mesmo numa linhagem de plantas expressando ativamente o transgene, e que efeitos de silenciamentos alternativos podem ocorrer independentemente em transgenes heterólogos adjacentes.

Diferentes alternativas têm sido relatadas para aumentar ou garantir a estabilidade de expressão de transgenes. A reativação de transgenes silenciados tem sido obtida pelo uso de 5-azacitidina (Komari e cols., 1998). Por outro lado, transgenes flanqueados por regiões de ligação à matriz (MARs), ou seja, seqüências de alta homologia a regiões transcricionalmente ativas do genoma, apresentam maior probabilidade de serem incluídos em turnos independentes da cromatina e/ou de serem inseridos em regiões eucromáticas, resultando no aumento, com redução na variação, dos níveis de expressão e estabilidade (Holmes-Davis e Comai, 1998).

Quanto à herança de transgenes, Pawlowski e Somers (1996) definem "lócus transgênico" como a unidade herdável detectada pelo fenótipo transgênico, e "padrão de integração de transgenes" como a descrição molecular do lócus transgênico. Estes autores recomendam que a primeira geração de plantas transgênicas deve ser referida como T<sub>0</sub> e a

subseqüente autopolinização de plantas  $T_0$  dará origem às gerações  $T_{n-1}$ , sendo que freqüentemente, a geração  $T_0$  é hemizigota para o locus transgênico e a segregação dos fenótipos transgênico e não transgênico é observado na geração  $T_1$ . A maioria dos trabalhos, como os de Brettschneider e cols. (1997, milho), Gless e cols. (1998, aveia), Tang e cols. (1999, arroz) e Trifonova e cols. (2001, cevada), relata que os transgenes são herdados de forma mendeliana.

## **CAPÍTULO 3**

**ARTIGO DE REVISÃO**

### **TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM CEVADA (*Hordeum vulgare ssp. vulgare*)**

(Trabalho a ser submetido para publicação no periódico Ciência Rural)



## **TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM CEVADA**

*(Hordeum vulgare ssp. vulgare)*

## **GENETIC TRANSFORMATION OF BARLEY**

*(Hordeum vulgare ssp. vulgare)*

Juliana Schmitt de Nonohay<sup>1</sup>, Giancarlo Pasquali<sup>2</sup> e Helga Winge<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia

<sup>3</sup>Departamento de Genética

Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.  
CEP 91501-970, Porto Alegre, RS.

<sup>3</sup>Autor para correspondência (e-mail: [winge@ufrgs.br](mailto:winge@ufrgs.br))



## RESUMO

O presente trabalho compreende uma revisão bibliográfica sobre a transformação genética em cevada (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*). Este artigo aborda os primeiros estudos sobre a transformação genética transiente e estável, as primeiras plantas transgênicas produzidas, além dos métodos, tecidos e transgenes utilizados nos diversos trabalhos sobre transformação genética em cevada.

**PALAVRAS-CHAVE:** transformação genética vegetal, plantas transgênicas, cevada, *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*.

## SUMMARY

The present work is a bibliographic review on genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*). This article describes the first transient and stable studies, the first transgenic plants produced, besides the methods, explant source and transgenes used in published works on genetic transformation of barley.

**KEY-WORDS:** plant genetic transformation, transgenic plants, barley, *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*.

## INTRODUÇÃO

A cevada (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) é uma das mais importantes culturas agrícolas, classificando-se como a quinta mundial e a quarta entre os cereais, cultivada em todas as regiões temperadas do mundo, especialmente no hemisfério Norte. Em ordem de importância, em termos mundiais, este cereal é utilizado na alimentação animal, na produção de malte, na alimentação humana e na produção de álcool (Minella, 1999). No Brasil, a cevada é cultivada na região Sul e, desde 1999, de forma irrigada no cerrado, sendo predominantemente utilizada na produção de malte para a fabricação de cerveja (Minella, 2000).

A cevada, bem como a maioria das espécies vegetais cultivadas, apresenta variabilidade genética restrita, uma vez que suas cultivares são geneticamente relacionadas (Peeters, 1988; Luizzi e Castro 1991; Maris, 1992). Esta característica reduz muito a possibilidade de obtenção de novas combinações genéticas favoráveis nos trabalhos de melhoramento genético pelos métodos convencionais de cruzamentos. O uso da subespécie selvagem *H. v. spontaneum*, com grande variabilidade genética, como fonte de genes para a cultivada, exigiria um grande número de retrocruzamentos a fim de recuperar as combinações genéticas obtidas ao longo de séculos de seleção artificial. A utilização de espécies selvagens de *Hordeum* em cruzamentos, além de apresentar os mesmos problemas, é impedida pela existência de isolamento reprodutivo interespecífico (Bothmer *et al.*, 1995).

Devido às limitações na introdução de novas características de importância agrícola e industrial por métodos tradicionais, a moderna tecnologia de transformação genética vegetal, ou transgênese, vem cada vez mais se destacando no melhoramento genético de plantas por superar as dificuldades técnicas e genéticas dos cruzamentos intra e interespecíficos. Esta tecnologia é caracterizada pela introdução de genes isolados e caracterizados diretamente no genoma celular por procedimentos de engenharia genética, regenerando-se vegetais

transgênicos completos a partir das células transformadas. O aspecto mais importante a se ressaltar é que a transformação genética supera as barreiras reprodutivas entre espécies, disponibilizando genes de plantas não relacionadas e mesmo de organismos como bactérias, fungos e animais, sem prejudicar as combinações genéticas favoráveis da cultivar utilizada como receptora do transgene.

A transformação genética vegetal pode ser efetuada por diferentes métodos tal como a microinjeção, a eletroporação, o bombardeamento de micropartículas, o choque osmótico mediado por polietilenoglicol (PEG), lipossomos e por meio do uso de vetores virais e bacterianos, como *Agrobacterium*. A maioria das plantas transgênicas tem sido obtida utilizando-se o sistema natural *Agrobacterium*, os métodos mediados por eletroporação e polietilenoglicol (PEG) e o bombardeamento de partículas. Este último método, também denominado aceleração de projéteis, biolística ou biobalística, tem sido o mais utilizado na transformação genética de cereais (Lörz *et al.*, 2000).

## **TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM CEVADA: PRIMEIROS TRABALHOS**

Os primeiros trabalhos de transformação genética de cevada foram publicados em 1989 por Mendel *et al.*, Kartha *et al.*, Teeri *et al.* e Ahokas. Mendel *et al.* (1989) relataram a transformação de protoplastos derivados de suspensões celulares de cevada utilizando dois plasmídeos (co-transformação), um contendo o gene repórter codificador da  $\beta$ -glicuronidase (*gusA* ou *uidA*) e o outro contendo o gene neomicina-fosfotransferase (*nptII*), que confere resistência ao antibiótico canamicina e seus análogos. Kartha *et al.* (1989) realizaram a transformação de embriões imaturos em cultura e suspensões celulares com um plasmídeo contendo o gene repórter da cloranfenicol-acetiltransferase (*cat*). Ambos os trabalhos utilizaram o bombardeamento de partículas como método de transformação. Outras abordagens foram realizadas por Teeri *et al.*

(1989), que eletroporaram protoplastos derivados de folhas na intenção de expressar o gene *gusA* em cloroplastos, e por Ahokas (1989), que introduziu o gene *gusA* eletroforeticamente em sementes de cevada. Lee *et al.* (1989, 1991), por sua vez, obtiveram a expressão dos genes *gusA* e *cat* em células de endosperma e protoplastos derivados destas por bombardeamento de partículas e pela transformação mediada por PEG.

Todos esses trabalhos pioneiros descreveram a obtenção de tecidos transformados de cevada com expressão transiente dos genes introduzidos. A expressão transiente ou transitória é caracterizada pela introdução do transgene no tecido vegetal, com expressão temporária do mesmo, sem, necessariamente, envolver a integração no genoma das células. Nesse mesmo período, Creissen *et al.* (1990) introduziram, por biobalística, plasmídeos contendo seqüências do vírus do mosaico do trigo (WMV) em embriões de cevada derivados de micrósporos, detectando a replicação viral nas culturas bombardeadas e Knudsen e Muller, em 1991, realizaram uma análise histológica de células do endosperma de grãos transformados por bombardeamento de partículas.

Os primeiros experimentos de transformação genética estável, ou seja, com a integração comprovada do transgene no genoma de células e tecidos, foram realizados por Lazzeri *et al.* (1991) e Ritala *et al.* (1993). Estes grupos introduziram os genes *gusA* e *nptII*, respectivamente, em culturas de protoplastos e de suspensões celulares, embora não tenham sido regeneradas plantas transgênicas a partir das células bombardeadas.

Somente em 1994, Ritala *et al.*, Jähne *et al.* e Wan e Lemaux relataram a obtenção das primeiras plantas transgênicas de cevada, todas transformadas por biobalística. Ritala *et al.* (1994) obtiveram a expressão do gene *nptII* em uma de 227 plantas regeneradas. Desta única planta transgênica foram originadas 25 outras, sendo que em 15 plantas comprovou-se a integração do transgene e em 14 delas a expressão de *nptII* foi demonstrada. Estes autores observaram que houve integração de várias cópias do transgene e que as plantas apresentavam uma herança monogênica para o mesmo. Jähne *et al.*

(1994) desenvolveram um sistema para transformar micrósporos de cevada, introduzindo o gene *gusA* e o gene codificador da fosfinotricina-acetiltransferase (*bar*) nestas células. Estes autores observaram a expressão dos transgenes em 4 de 12 plantas regeneradas, com a integração de 1 a 5 cópias dos mesmos.

Entre todos os artigos publicados até 1994, o trabalho de Wan e Lemaux (1994) é considerado um marco na transformação genética estável de cevada devido ao grande número de plantas transgênicas férteis obtidas. Estes autores descreveram a integração dos genes *gusA*, *bar* e o gene da proteína da capa do vírus do mosaico amarelo da cevada (BYDVcp) por bombardeamento de micropartículas em embriões imaturos, calos jovens e embriões derivados de micrósporos. Wan e Lemaux (1994) obtiveram a regeneração de mais de 500 plantas transgênicas verdes e férteis, a partir de 36 linhagens de calos transformados, em meios de cultura contendo o herbicida Bialaphos<sup>TM</sup>. Subseqüentemente ao trabalho de Wan e Lemaux uma série de trabalhos de transformação genética de cevada foi realizada, utilizando-se diferentes métodos, tecidos-alvo e transgenes introduzidos.

## **TECIDOS-ALVO E MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM CEVADA**

Na transformação genética vegetal existe uma estreita associação entre os métodos e os tecidos vegetais utilizados como alvo. Escutelos de embriões imaturos, suspensões celulares, micrósporos e calos derivados destes tecidos são os mais freqüentemente utilizados no bombardeamento de partículas. Protoplastos são geralmente utilizados na transformação mediada por PEG e eletroporação. Estes métodos e tecidos-alvo são os rotineiramente utilizados na transformação genética de cereais. Em cevada, a transformação genética foi obtida pelos

métodos de bombardeamento de partículas, eletroporação, PEG e, mais recentemente, por *Agrobacterium*.

O bombardeamento de partículas em tecidos intactos de cevada foi avaliado como método de transformação por muitos trabalhos a partir de 1994. A introdução de genes por biobalística foi realizada em embriões imaturos (King e Kasha, 1994; Hagio *et al.*, 1995; Ritala *et al.*, 1995; Koprek *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 1998; Brinch-Pedersen *et al.*, 1999), suspensões celulares (Aspegren *et al.*, 1995; Stiff *et al.*, 1995) e micrósporos (Yao *et al.*, 1997; Yao e Kasha, 1997; Leckband e Lörz, 1998; Carlson *et al.*, 2001). Entre estes trabalhos, King e Kasha (1994), Aspegren *et al.* (1995) e Stiff *et al.* (1995) não obtiveram a regeneração de plantas transgênicas e Ritala *et al.* (1995) relataram a regeneração de apenas uma planta transformada quimérica. Em quase todos trabalhos foi utilizado o aparelho de bombardeamento PDS-1000/He Biolistic, em que altas pressões de gás hélio são empregadas na aceleração das partículas. Exceção é o o trabalho de Koprek *et al.* (1996) que utilizou o bombardeador de baixa pressão de gás hélio "Particle Inflow Gun" (PIG - Finer *et al.*, 1992), obtendo a transformação genética de cultivares recalcitrantes à introdução de genes pelo aparelho PDS-1000/He, devido aos menores danos causados nos tecidos com o uso de baixas pressões de hélio. Por outro lado, Harwood *et al.* (2000) testaram três diferentes bombardeadores, PDS-1000/He (Biorad), de descarga elétrica Accell™ e Helios™ (Biorad), observando o aparelho PDS-1000/He como o mais efetivo na obtenção de plantas transformadas de cevada. Além destes trabalhos, Ahlandsberg *et al.* (1999) e Jarl (1999) também relataram a transformação genética de cevada utilizando a biobalística.

O emprego de protoplastos na transformação genética mediada por PEG e eletroporação apresenta uma grande limitação aos métodos devido à dificuldade de regeneração de plantas a partir destas células. Mesmo assim, em cevada, Funatsuki *et al.* (1995) e Salmenkallio-Martilla *et al.* (1995) foram os primeiros autores que descreveram a geração de



plantas transgênicas pela transformação de protoplastos mediada por PEG e eletroporação, respectivamente, embora já tivessem sido obtidas plantas férteis de cevada regeneradas a partir de cultura de protoplastos e linhagens celulares derivadas de protoplastos estavelmente transformadas por PEG (ver Funatsuki *et al.*, 1995). Jensen *et al.* (1996), Kihara *et al.* (1998), Nobre *et al.* (2000) e Tiwari *et al.* (2001) também transformaram geneticamente culturas de protoplastos de cevada utilizando estes métodos, sendo que, com exceção do último, os demais relataram a regeneração de plantas.

O uso de *Agrobacterium* para a transformação genética de cevada foi descrito somente em 1997, por Tingay *et al.* Estes autores observaram uma eficiência de transformação de 4,2%, considerando o número inicial de explantes e o número final de plantas transgênicas obtidas. A integração do transgene variou de 1 a 10 cópias, com segregação Mendeliana na maioria dos casos e a regeneração de 18 plantas transgênicas, sendo 17 férteis. Em 1998, McCormac *et al.*, Guo *et al.* e Wu *et al.* publicaram suas pesquisas com a transformação genética de cevada por *Agrobacterium*, embora em nenhum destes trabalhos plantas transgênicas tenham sido regeneradas. Já, em 2000, Patel *et al.* e Horvath *et al.*, e, em 2001, Wang *et al.* e Trifonova *et al.* descreveram a obtenção de plantas transgênicas transformadas por *Agrobacterium* expressando genes de interesse para a cultura de cevada. Os avanços na transformação genética de cevada por *Agrobacterium* foram obtidos principalmente devido à utilização de cepas supervirulentas (McCormac *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998), plasmídeos superbinários (Wu *et al.*, 1998) e do método de biobalística anteriormente ao co-cultivo com as agrobactérias (Tingay *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 2000; Horvath *et al.*, 2000).

Outras abordagens de transformação genética foram também relatadas para cevada tal como os trabalhos de Zhang *et al.* (1999), que bombardearam culturas de meristemas apicais derivadas de plântulas germinadas; Holm *et al.* (2000), com microinjeção e protoplastos; e

Gurel e Gozukirmizi (2000), que utilizaram eletroporação e embriões maduros. Todos estes autores obtiveram a regeneração de plantas transgênicas, embora em pequeno número.

O uso de transposons para a introdução de genes em cevada foi realizado por McElroy *et al.* (1997) e Koprek *et al.* (2001). McElroy *et al.* (1997) utilizaram o transposon ativador (*Ac*) de milho visando estudar a transposição por meio de ensaios de expressão transiente e Koprek *et al.* (2001) utilizaram os elementos de transposição *Ac* e *Dc* (dissociador) de milho em uma cultivar de cevada para desenvolver um método para introduzir uma única cópia de transgenes via biobalística.

## TRANSGENES INTRODUZIDOS

Quase a totalidade dos trabalhos citados relatou o uso do gene repórter *gusA* e dos genes de seleção *nptII* e *bar* para a definição das melhores condições de transformação genética de cevada. Adicionalmente, outros genes repórteres e seletores foram utilizados na transformação genética de cevada tal como os genes ativadores de genes endógenos envolvidos na síntese de antocianinas (King e Kasha, 1994; Nelson e Bushnell, 1997; McCormac *et al.*, 1998), o gene repórter codificador da proteína de fluorescência verde (*gfp* - McCormac *et al.*, 1998; Alandsberg *et al.*, 1999; Carlson *et al.*, 2001; Roussy *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001), o gene codificador da enzima aspartato-quinase (*lysC* - Brinch-Pedersen *et al.*, 1999) e o gene da higromicina-fosfotransferase, que confere resistência ao antibiótico higromicina (*hpt* - Hagio *et al.*, 1995; Tiwari *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001).

O primeiro relato da introdução de genes de interesse em células de cevada foi realizado por Aspegren *et al.* (1995) que obtiveram a secreção da proteína  $\beta$ -glicanase termo-estável, codificada por um gene isolado de *Trichoderma reesei*, em suspensões celulares de cevada. Jensen *et al.* (1996; 1998) obtiveram plantas transgênicas de cevada expressando a proteína recombinante (1,3-1,4)- $\beta$ -glicanase derivada de *Bacillus*. Wettstein *et al.* (2000) descreveram o uso, com sucesso, do

malte destas plantas transgênicas na alimentação de galinhas. Outros trabalhos relacionados com a introdução de transgenes capazes de conferir maior eficiência no processo de malteação da cevada foram realizados por Patel *et al.* (2000) que relataram a expressão do gene codificador de xilanase fúngica no endosperma de plantas de cevada, e Horvath *et al.* (2001), com a produção de (1,3-1,4)- $\beta$ -glicanase bacteriana termo-estável em grãos de plantas transgênicas de cevada.

Na obtenção de plantas transgênicas de cevada com resistência a doenças, o trabalho de Wan e Lemaux (1994), já citado, e o de Bregitzer *et al.* (1998) relataram a introdução de um gene de proteína de capsídeo de BYDV visando a resistência ao vírus. Wang *et al.* (2001) obtiveram plantas transgênicas de cevada contendo os transgenes derivados do BYDV e do vírus do mosaico amarelo de cereais (CYDV), que apresentaram sintomas de infecção e taxa de replicações virais reduzidas. Leckband e Lörz (1998) transformaram micrósporos por bombardeamento de partículas, induzindo a expressão de uma fitoalexina de *Vitis vinifera*, o resveratrol. Estes autores observaram um aumento da resistência das plantas transgênicas regeneradas ao fungo *Botrytis cinerea*, utilizado como modelo experimental. Além destas publicações, um estudo visando a detecção do papel de genes de resposta a doenças em hospedeiros, por meio de um ensaio transiente de expressão de genes de síntese de antocianinas, foi realizado por Nelson e Bushnell (1997).

## **TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CULTIVARES BRASILEIRAS**

No Brasil, a transformação genética de cultivares brasileiras de cevada por biobalística foi realizada somente por Nonohay *et al.* (2001). A obtenção da transformação genética de cultivares brasileiras de cevada representa um importante avanço no auxílio do melhoramento genético desta cultura no Brasil, uma vez que, genes de interesse não disponíveis

no melhoramento tradicional poderão ser transferidos para as cultivares brasileiras por meio da Biotecnologia (Minella, 1999).

Na obtenção de plantas transgênicas destaca-se a importância e a necessidade do uso de cultivares selecionadas e, portanto, eficientes, para a região de cultivo. As dificuldades na utilização de uma cultivar transgênica de outra região geográfica devem-se ao fato de que numerosos retrocruzamentos são necessários para se transferir apenas o transgene de interesse aos genótipos da cultivar adequada àquela região. Desta forma, o desenvolvimento deste importante método para cultivares brasileiras certamente contribuirá muito com o melhoramento genético da cevada, aumentando a qualidade e a produtividade desta cultura no Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLANDSBERG, S., SATHISH, P., SUN, C.X., JASSON, C. Green fluorescent protein as a reporter system in transformation of barley cultivars. **Physiologia Plantarum**, v.107, n.2, p.194-200, 1999.
- AHOKAS, H. Transfection of germinating barley seed eletrophoretically with exogenous DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, v.77, p.469-472, 1989.
- ASPEGREN, K., MANNONEN, L., RITALA, A., PUUPPONEN-PIMIÄ, R., KURTÉN, U., SALMENKALLIO-MARTTILA, M., KAUPPINEN, V., TEERI, T.H. Secretion of heat-stable fungal  $\beta$ -glucanase from transgenic, suspension-cultured barley cells. **Molecular Breeding**, v.1, p.91-99, 1995.
- BOTHMER, R. von, JACOBSEN, N., BADEN, C., JORGENSEN, R.B., LINDELAURSEN, I. **An Ecogeographical Study of Genus *Hordeum***. Sistematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools. 7. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 1995.
- BREGITZER, P., HALBERT, S.E., LEMAUX, P.G. Somaclonal variation in the progeny of transgenic barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, n.3-4, p.421-425, 1998.
- BRINCH-PEDERSEN, H., OLSEN, O., KNUDSEN, S., HOLM, P.B. An evaluation of feed-back insensitive aspartate kinase as a selectable marker for barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation. **Hereditas**, v.131, n.3, p.239-245, 1999.
- CARLSON, A.R., LETARTE, J., CHEN, J., KASHA, K.J. Visual screening of microspore-derived transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) with green-fluorescent protein. **Plant Cell Reports**, v.20, n.4, p.331-337, 2001.
- CHO, M.J., JIANG, W., LEMAUX, P.G. Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. **Plant Science**, v.138, p.229-244, 1998.
- CREISSEN, G., SMITH, C., FRANCIS, R., REYNOLDS, H., MULLINEAUX, P. *Agrobacterium*- and microprojectile-mediated viral DNA delivery into barley microspore-derived cultures. **Plant Cell Reports**, v.8, p.680-683, 1990.

- FINER, J.J., VAIN, P., JONES, M.W., Mc MULLEN, M.D. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. **Plant Cell Reports**, v.11, p.323-328, 1992.
- FUNATSUKI, H., KURODA, H., KIHARA, M., LAZZERI, P.A., MÜLLER, E., LÖRZ, H., KISHINAMI, I. Fertile transgenic barley generated by direct DNA transfer to protoplasts. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.707-712, 1995.
- GUO, G.Q., MAIWALD, F., LORENZEN, P., STEINBISS, H.H. Factors influencing T-DNA transfer into wheat and barley cells by *Agrobacterium tumefaciens*. **Cereal Research Communications**, v.26, n.1, p.15-22, 1998.
- GUREL, F., GOZUKIRMIZI, N. Optimization of gene transfer into barley (*Hordeum vulgare* L.) mature embryos by tissue electroporation. **Plant Cell Reports**, v.19, n.8, p.787-791, 2000.
- HAGIO, T., HIRABAYASHI, T., MACHII, H., TOMOTSUNE, H. Production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plant using the hygromycin-resistance marker. **Plant Cell Reports**, v.14, p.329-334, 1995.
- HARWOOD, W.A., ROSS, S.M., CILENTO, P., SNAPE, J.W. The effect of DNA/gold particle preparation technique, and particle bombardment device, on the transformation of barley (*Hordeum vulgare*). **Euphytica**, v.111, n.1, p.67-76, 2000.
- HOLM, P.B., OLSEN O., SCHNORF, M., BRINCH-PEDERSEN, H., KNUDSEN, S. Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. **Transgenic Research**, v.9, n.1, p.21-32, 2000.
- HORVATH, H., HUANG, J., WONG, O.T., KOHL, E., OKITA, T., KANNANGARA, C.G., VON WETTSTEIN, D. The production of recombinant proteins in transgenic barley grains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, n.4, p.1914-1919, 2000.
- HORVATH, H., JENSEN, L.G., WONG, O.T., KOHL, E., ULLRICH, S.E., COCHRAN, J., KANNANGARA, C.G., VON WETTSTEIN, D. Stability of transgene expression, field performance and recombination breeding of transformed barley lines. **Theoretical and Applied Biology**, v.102, n.1, p.1-11, 2001.
- JÄHNE, A., BECKER, D., BRETTSCHEIDER, R., LÖRZ, H. Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.525-533, 1994.

- JARL, C.I. Plant regeneration and transient expression after particle bombardment of different barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes. *HEREDITAS*, v.130, n.1, p.83-87, 1999.
- JENSEN, L.G., OLSEN, O. , KOPS, O. , WOLF, N., THOMSEN, K.K., VON WETTSTEIN, D. Transgenic barley expressing a protein-engineered, thermostable (1,3-1,4)-beta-glucanase during germination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.93, p.3487-91, 1996.
- JENSEN, L.G., POLITZ, O., OLSEN, O., THOMSEN, K.K., von WETTSTEIN, D. Inheritance of a codon-optimized transgene expressing heat stable (1,3-1,4)- $\beta$ -glucanase in scutellum and aleurone of germinating barley. **Hereditas**, v.129, p.215-225, 1998.
- KARTHA, K.K., CHIBBAR, R.N., GEORGES, F., LEUNG, N., CASWELL, K., KENDALL, E., QURESHI, J. Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports**, v.8, p.429-432, 1989.
- KIHARA, M., SAEKI, K., ITO, K. Rapid production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) by direct gene transfer to primary callus-derived protoplasts. **Plant Cell Reports**, v.17, n.12, p.937-940, 1998.
- KING, S.P., KASHA, K.J. Optimizing somatic embryogenesis and particle bombardment of barley (*Hordeum vulgare* L.) immature embryos. **In Vitro Cell and Development Biology**, v.30, p.117-123, 1994.
- KNUDSEN, S., MÜLLER, M. Transformation of the developing barley endosperm by particle bombardment. **Planta**, v.185, p.330-336, 1991.
- KOPREK, T., HÄNSCH, R., NERLICH, A., MENDEL, R., SCHULZE, J. Fertile transgenic barley of different cultivars obtained by adjustment of bombardment conditions to tissue response. **Plant Science**, v.119, p.79-91, 1996.
- KOPREK, T., RANGEL, S., McELROY, D., LOUWERSE, J.D., WILLIAMS-CARRIER R.E., LEMAUX, P.G. Transposon-mediated single-copy gene delivery leads to increased transgene expression stability in barley. **Plant Physiology**, v.125, n.3, p.1354-1362, 2001.

- LAZZERI, P.A., BRETTSCHEIDER, R., LÜHRS, R., LÖRZ, H. Stable transformation of barley via PEG-induced direct DNA uptake into protoplasts. **Theoretical and Applied Genetics**, v.81, p.437-444, 1991.
- LECKBAND, G., LÖRZ, H. Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, n.8, p.1004-112, 1998.
- LEE, B., MURDOCH, K., TOPPING, J., JONES, M.G.K. , KREIS, M. Transient expression of foreign genes introduced into barley endosperm protoplasts by PEG-mediated transfer on into intact endosperm tissue by microprojectile bombardment. **Plant Science**, v.78, p.237-246, 1991.
- LEE, B., MURDOCH, K., TOPPING, J., KREIS, M., JONES, M.G.K. Transient gene expression in aleurone protoplasts isolated from developing caryopses of barley and wheat. **Plant Molecular Biology**, v.13, p.21-29, 1989.
- LÖRZ, H.; SERAZETDINOVA, L.; LECKBAND, G.; LÜTTICKE, S. Transgenic barley – a journey with obstacles and milestones. In: LOGUE, S. (Ed.). **Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Barley Genetics Symposium**. 2000. p. 189-193.
- LUZZI, D.V., CASTRO, A.J. Variabilidade genética, su aporte al desarrollo del cultivo de cebada en el Uruguay. Trabajo presentado a la **Segunda Reunión Nacional de Investigadores en Cebada Cervecera**, 21-23/05/1991, La Estanzuela, Colonia, Uruguay (Publicação avulsa).
- MARIS, A.F. **Caracterização isoenzimática de cultivares brasileiras de cevada (*Hordeum vulgare* L.)**. Porto Alegre: UFRGS. 1992. 107 p. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas - ênfase Genética) Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1992.
- MCCORMAC, A.C., WU, H., BAO, M., WANG, Y., XU, R., ELLIOTT, M.C., CHEN, D.F. The use of visual marker genes as cell-specific reporters of *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery to wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). **Euphytica**, v.99, p.17-25, 1998.
- McELROY, D., LOUWERSE, J.D., MCELROY, S.M., LEMAUX, P.G. Development of a simple transient assay for Ac/Ds activity in cells of intact barley tissue. **Plant Journal**, v.11, n.11, p.157-165, 1997.



- MENDEL, R.R., MÜLLER, B., SCHULZE, J., KOLESNIKOV, V., ZELENIN, A. Delivery of foreign genes to intact barley cells by high-velocity microprojectiles. **Theoretical and Applied Genetics**, v.78, p.31-34, 1989.
- MINELLA, E. Melhoramento da cevada. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. 1999. p.252-272.
- MINELLA, E. Safra brasileira de cevada de 1999. **XX Reunião de Pesquisa da Cevada**. Passo Fundo/RS, 25-26.04.2000. (Relatório Técnico).
- NELSON, A., BUSHNELL, W.R. Transient expression of anthocyanin genes in barley epidermal cells: potential for use in evaluation of disease response genes. **Transgenic Research**, v.6, p.233-244, 1997.
- NOBRE, J., DAVEY, M.R., LAZZERI, P.A., CANNEL, M.E. Transformation of barley scutellum protoplasts: regeneration of fertile transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v.19, n.10, p.1000-1005, 2000.
- NONOHAY, J.S., PASQUALI, G., WINGE, H. Determinação das melhores condições de transformação genética por bombardeamento de partículas em cevada. In: **47º Congresso Nacional de Genética**. Águas de Lindóia, SP, 2001.
- PATEL, M., JOHNSON, J.S., BRETTELL, R.I.S., JACOBSEN, J., XUE, G.P. Transgenic barley expressing a fungal xylanase gene in the endosperm of developing grains. **Molecular Breeding**, v.6, n.1, p.113-123, 2000.
- PEETERS, J.P. The emergence of new centers of diversity: evidence from barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v.76, p.327-378, 1988.
- RITALA, A., AIKASALO, R., ASPEGREN, K., SALMENKALLIO-MARTTILA, M., AKERMAN, S., MANNONEN, L., KURTÉN, U., PUUPPONEN-PIMIÄ, R., TEERI, T.H., KAUPPINEN, V. Transgenic barley by particle bombardment. Inheritance of the transferred gene and characteristics of transgenic barley plants. **Euphytica**, v.85, p.81-88, 1995.
- 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, p.317-325, 1994.

- RITALA, A., MANNONEN, L., ASPEGREN, K., SALMENKALLIO-MARTTILA, M., KURTÉN, U., HANNUS, R., MENDEZ LOZANO, J., TEERI, T.H., KAUPPINEN, V. Stable transformation of barley tissue culture by particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v.12, p.435-440, 1993.
- ROUSSY, I., AHLANDSBERG, S., JANSSON, C. Transformation and regeneration capacities for five Nordic barley elite cultivars-evaluation of tissue culture response and transient expression. **Hereditas**, v.134, n.2, p.97-101, 2001.
- SALMENKALLIO-MARTILLA, M., ASPEGREN, K., AKERMAN, S., KURTÉN, U., MANNONEN, L., HANNUS, R., TERRI, T.H., KAUPPINEN, V. Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) by electroporation of protoplasts. **Plant Cell Reports**, v.15, p.301-305, 1995.
- STIFF, C.M., KILIAN, A., ZHOU, H., KUDRNA, D.A., KLEINHOF, A. Stable transformation of barley callus using biolistic particle bombardment and the phosphinothricin acetyltransferase (*bar*) gene. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.40, p.243-248, 1995.
- TEERI, T.H., PATEL, G.K., ASPEGREN, K., KAUPPINEN, V. Chloroplast targeting of *neomycin phosphotransferase II* with a pea transit peptide in electroporated barley mesophyll protoplasts. **Plant Cell Reports**, v.8, p.187-190, 1989.
- TINGAY, S., McELROY, D., KALLA, R., FIEG, S., WANG, M.B., THORNTON, S., BRETTELL, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. **Plant Journal**, v.11, n.6, p.1369-1376, 1997.
- TIWARI, V.K., ZHANG, J., GOLDS, T.J., COCKING, E.C., DAVEY, M.R., POWER, J.B. Effect of heat shock treatment on *Hordeum vulgare* protoplast transformation mediated by polyethylene glycol. **Biologia Plantarum**, v.44, n.1, p.25-31, 2001.
- TRIFONOVA, A., MADSEN, S., OLESEN, A. *Agrobacterium*-mediated transgene delivery and integration into barley under a range of *in vitro* culture conditions. **Plant Science**, v.161, n.5, p.871-880, 2001.
- WAN, Y., LEMAUX, P. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. **Plant Physiology**, v.104, p.37-48, 1994.

- WANG, M.B., ABBOTT, D.C., UPADHYAYA, N.M., JACOBSEN, J.V., WATERHOUSE, P.M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an elite Australian barley cultivar with virus resistance and reporter genes. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, n.2, p.149-156, 2001.
- WETTSTEIN, D. von, MIKHAYLENKO, G., FROSETH, J.A., KANNANGARA, C.G. Improved barley broiler feed with transgenic malt containing heat-stable (1,3-1,4)-B-glucanase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, n.25, p.13512-13517, 2000.
- WU, H.X., McCORMAC, A.C., ELLIOTT, M.C., CHEN, D.F. *Agrobacterium*-mediated stable transformation of cell suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.54, n.3, p.161-171, 1998.
- YAO, Q.A., KASHA, K.J. Potential of biolistic transformation of barley microspores based on viability and transient beta-glucuronidase activity. **Genome**, v.40, n.5, p.639-643, 1997.
- YAO, Q.A., SIMION, E., WILLIAM, M., KROCHKO, J., KASHA, K.J. Biolistic transformation of haploid isolated microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Genome**, v.40, n.4, p.570-581, 1997.
- ZHANG, S., CHO, M.J., KOPREK, T., YUN, R., BREGITZER, P., LEMAUX, P.G. Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using in vitro shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. **Plant Cell Reports**, v.18, n.12, p.959-966, 1999.

## CAPÍTULO 4

### **ANALYSIS OF PARTICLE BOMBARDMENT CONDITIONS FOR GENETIC TRANSFORMATION OF BRAZILIAN BARLEY CULTIVARS**

(Trabalho a ser submetido para publicação no periódico  
*Plant Molecular Biology Reporter*)

**ANALYSIS OF PARTICLE BOMBARDMENT  
CONDITIONS FOR GENETIC TRANSFORMATION  
OF BRAZILIAN BARLEY CULTIVARS**

Juliana Schmitt de Nonohay<sup>1</sup>, Giancarlo Pasquali<sup>1,2</sup> and Helga  
Winge<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia

<sup>3</sup>Departamento de Genética

Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul. CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup>Author for correspondence (e -mail: winge@ufrgs.br)

**ABSTRACT**

The transient genetic transformation of immature embryos from Brazilian barley cultivars MN-599 and MN-698 is here reported for the first time. Different bombardment conditions to transiently transform barley embryos and express the *gusA* reporter gene were analyzed, including two promoter regions regulating the reporter gene, different particle bombardment devices, helium pressures, distances between target tissues and the initial position of particles, the number of shots and the use of osmotic pre- and post-treatment of tissues. It was determined that the highest frequencies of *gusA* gene transient expression after bombardments were obtained with the employment of the *Adh* promoter and its first intron, PIG device, 14.8 cm of distance, 2 shots per plate and the osmotic treatment of tissues with 0.2 M mannitol and 0.2 M sorbitol 4-5 hours prior to and 17-19 hours after bombardments. These optimized conditions could be used to obtain stable transformed plants of Brazilian barley cultivars.

**KEY WORDS:** plant genetic transformation, particle bombardment, biolistic, barley, *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*, *gusA* reporter gene, particle inflow gun.

## INTRODUCTION

Genetic transformation of plants aims at the introduction of isolated and characterized genes into plant genomes either by indirect methods as *Agrobacterium*, or direct methods as particle bombardment or biolistic. This new biotechnology has become an important tool for the genetic improvement of plants due to the possible use of genes that are not available for conventional methods of breeding. Genetic transformation allows the transfer of genes, independently of sexual compatibility, between species, genera, families and even kingdoms. Hence, genes from bacteria or fungi, able to confer plant resistance to microbial diseases or insect pests, can now be transferred to crop plants in order to minimize serious agricultural losses.

Genetic transformation is considered a promising useful method to improve the Brazilian barley culture (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) mainly due to the limitations of the conventional breeding methods. The germplasm variability of barley is restricted since cultivars are genetically very similar (Peeters, 1988; Luizzi and Castro, 1991; Maris, 1992); besides there are interspecific reproductive isolation between the cultivated barley and the native South American species of *Hordeum* (Bothmer *et al.*, 1995). On the other hand, the only restrictions imposed to transgeny, as compared to intra and interspecific crossbreeding, are the alleged safety aspects of the transgenic methods.

Barley genetic transformation has been reported using different explant sources and methods. Salmenkallio-Marttila *et al.* (1995) and Nobre *et al.* (2000) are examples of works using electroporation and polyethylene glycol (PEG) methods to transform barley protoplasts. The production of transgenic barley plants by *Agrobacterium* infection was reported by Tingay *et al.* (1997) and Wang *et al.* (2001). However, particle bombardment of scutellar tissues, cell suspensions, microspores and calli derived from these cells and tissues was the mostly used method to transform barley due to the best results obtained for cereals

related to barley (King and Kasha, 1994; Wan and Lemaux, 1994; Stiff *et al.*, 1995; Koprek *et al.*, 1996).

No studies concerning genetic transformation of Brazilian barley cultivars have been reported. In the present study we performed a series of experiments aiming at the determination of the best conditions for particle bombardment to genetic transform Brazilian barley cultivars. The analyzed conditions included the effect of promoter sequences of the reporter gene, two particle bombardment devices, different distances between particles and target tissues, number of shots and osmotic treatment of target tissues. Results were expressed and analyzed as the transient expression of the reporter *gusA* gene as an indication of the best conditions for future stable genetic transformation of barley.



## **MATERIAL AND METHODS**

### **Plant Material**

Two Brazilian barley cultivars, MN-599 and MN-698, were used in this work. Both cultivars were obtained from the brewery company AmBev (American Beverage Company). MN-599 used to be one of the most important cultivars planted in Brazil. MN-698 is a new, high quality cultivar, used as a control in regional and national field tests for new cultivars, the best of which are recommended for planting. Plants were germinated and cultivated in a screened house, at the Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil. Immature seeds were collected and the scutella from the embryos excised and cultured *in vitro*.

### ***In Vitro Culture***

Immature seeds were immersed in 70% ethanol for 1 minute followed by 6% sodium hypochlorite for 30 minutes and rinsed 5 times in sterile distilled water. Immature embryos (1.0-2.5 mm in length) were then excised aseptically and the embryonic axis removed. The scutella (explants) were plated on induction medium to promote the development of calli. The induction medium used was based on the formulation of King and Kasha (1994) and consisted of B5 long basal medium (Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC, USA) supplemented with 5 mg/L 2,4-D, 60 g/L maltose and 2.5 g/L phytigel (pH 6.4 before autoclaving). To the induction medium, 0.2 M mannitol and/or 0.2 M sorbitol was included (or not) 4-5 hours before and 17-19 hr after particle bombardments in order to evaluate the effect of osmotic treatment on target tissues. The explants were cultured at 22°C in dark.

## Genetic Transformation

Bombardments of immature scutellum-derived calli were done 2-6 days after the initiation of cultures using tungsten particles (M17 or M10, Sylvania). A low pressure helium-based device named "Particle Inflow Gun" (PIG) and a high pressure helium-based particle accelerator (Biolistic) were employed in the experiments with protocols respectively described by Finer *et al.* (1992) and Rech and Aragão (1998). Pressures employed in the bombardments were 60 psi (PIG) and 800, 1,000, 1,200 and 1,500 psi (Biolistic). Evaluated distances between target tissues and the initial position of particles were 11.4, 14.8, 18.2 and 21.4 cm in PIG (60 psi) and 6, 9, 12 and 15 cm in Biolistic (1,200 psi). Plasmids used to test different promoter sequences included pGusKan (Vom Endt and Pasquali, 1996), containing the cauliflower mosaic virus (*CaMV*) 35S promoter driving the expression of  $\beta$ -glucuronidase (*gusA*) and neomycin phosphotransferase (*nptII*) genes, and pNGI (Dave A. Somers, University of Minnesota, USA), containing the *gusA* gene under the control of maize alcohol dehydrogenase (*Adh*) promoter and its first intron and the *nptII* gene under the control of *CaMV* 35S promoter. The distances of 11.4 and 14.8 cm between particles and samples, shot numbers of 1, 2 and 3 shots and the osmotic treatment of tissues (without and with 0.2 M mannitol and/or 0.2 M sorbitol) were tested in experiments using PIG and the pNGI plasmid. Three Petri dishes per treatment containing 10 explants each were bombarded in all experiments and one non-bombarded dish was kept as control.

## Histochemical GUS assay

Transient expression of *gusA* reporter gene was assayed 2 days after bombardments, soaking the calli in a solution containing the 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide substrate (X-Gluc – Jefferson, 1987). Calli were submersed in X-Gluc solution for 24 hours in dark at 37°C, in a shaker and then transferred to 70% ethanol. For the

evaluation of plasmid promoter sequences and gun devices, blue spots were counted using a stereomicroscope. For the evaluation of distances, shot numbers and osmotic treatment effects using PIG and the pNGI plasmid, blue foci scores and calli area estimations were done using a stereomicroscope and the Kontrom Elektronik Imaging System KS-100 v.2.0 Computer Program.

### **Statistical Analysis**

Results of distance, shot numbers and osmotic experiments were statistically analyzed by Analysis of Variance (ANOVA) and Student-Newman-Keuls (SNK) Multiple-Comparison Test using the Number Cruncher Statistical Systems program (NCS 6.0.21 - Jerry Hintze, 1996). Five of ten calli bombarded per plate were analyzed, in a total of 15 calli analyzed per treatment. The statistically analyzed response was the number of blue spots per callus area (square millimeter). Square root transformation was performed to adjust the data to a normal distribution. The values were submitted to Kolmogorov-Smirnov Normality Test and Modified-Levene Equal-Variance Test (NCS 6.0.21).

## RESULTS AND DISCUSSION

The present study determined the best conditions to genetically transform calli cultures from immature scutella of Brazilian barley cultivars by particle bombardment. The analyses were based on the transient expression of *gusA* reporter gene two days after the bombardment. Results were obtained when evaluating the following conditions of bombardment: promoter sequences controlling *gusA* gene expression, biolistic devices that employ different helium pressures, distances between target tissues and the initial position of particles, number of shots and osmotic treatments of target tissues.

### Promoter regions of reporter genes

The first variable analyzed in this work was the type of promoter sequence controlling the reporter gene expression. The pGusKan plasmid contains the *CaMV* 35S promoter driving the expression of both *gusA* and *nptII* genes. Two days-old scutellum-derived calli of cv. MN-599 were bombarded with pGusKan using both particle devices, PIG (60 psi) and Biolistic (1,200 psi), with 1, 2 and 3 shots delivered per plate. A low number of blue spots per callus was observed, independently of the helium pressure and number of shots employed. The best result obtained with this plasmid was 7 blue spots in a callus bombarded twice with the PIG device. This number of blue foci representing GUS transient expression is considered an inefficient result when stable integration and expression of transgenes is desired.

The employment of plasmid pNGI, containing the *gusA* gene under the control of maize *Adh* promoter and first intron with the same conditions of bombardment, improved considerably the transient GUS expression. A much higher number of blue spots were obtained per callus as presented in Figures 1b-e and in Tables 1 and 2.

Many works showed that the *CaMV* 35S promoter provides lower expression of introduced genes into monocotyledonous plants when compared to maize *Adh* promoter and its first intron, or the maize ubiquitin promoter (*Ubi*). Ortiz *et al.* (1997), for instance, tested different plasmid vectors and showed that the employment of the *Ubi* promoter from maize produced the highest levels of transient GUS expression, followed by maize *Adh* promoter and its first intron, and sunflower *Ubi* promoter. According to that work, *CaMV* 35S was the least effective promoter in scutellar tissues of wheat immature embryos. Vain *et al.* (1998), Kohli *et al.* (1998) and Bassie *et al.* (2000) also reported that maize *Ubi* promoter confers higher levels of expression when compared to *CaMV* 35S promoter in rice. In barley genetic transformation, Brinch-Pedersen *et al.* (1999) only obtained transgenic regenerants when the *Ubi* promoter directed the expression of the introduced transgenes. All these works, including the present study, do not corroborate the experiments of Stiff *et al.* (1995) who observed higher levels of *bar* gene expression when this gene was under the control of *CaMV* 35S promoter with the *Adh* first intron, in barley calli bombarded with the PDS-1000/He Biolistic device. In conclusion, pNGI plasmid containing *gusA* gene under the control of maize *Adh* promoter and first intron is the best vector to transform the Brazilian barley cultivars tested.

### **Particle bombardment devices and helium pressures**

Particle bombardment devices and helium pressures were tested in a second set of experiments. Helium pressure of 60 psi was assayed with the PIG device and pressures of 800, 1,000, 1,200 and 1,500 psi were employed in a Biolistic apparatus. With the bombardment of scutellum-derived calli from cv. MN-599, we observed that the employment of lower pressures (60 and 800 psi) resulted in higher levels of GUS transient expression than pressures of 1,000, 1,200 and 1,500 psi. As shown in Table 1 and in Figures 1b-c, the best results were obtained with the PIG

apparatus under 60 psi of pressure ( $59\pm 35.5$  blue spots) or with the Biolistic gun under 800 psi of pressure ( $60\pm 38.2$  blue spots).

The PIG device was developed by Finer *et al.* (1992) and it has proved to be an efficient bombardment apparatus to genetically transform maize (Vain *et al.*, 1993) and soybean tissues (Droste *et al.*). For barley tissues, PIG bombardment was used by Koprek *et al.* (1996) who obtained stable genetic transformation of cultivars that exhibited low tissue culture responses when high helium pressures were applied. These authors also performed a scanning electron microscopy analysis of bombarded barley scutella showing that PIG causes less injuries in tissues than the PDS-Biolistic apparatus. Previously, Stiff *et al.* (1995) reported that the use of less severe bombardment conditions, as lower helium pressure, could help to increase transformation frequencies in plant tissues. Besides higher tissue damages, the Biolistic device is more complex to operate and therefore a time consuming apparatus. Due to similar results and easier operation, we decided to continue using only with the PIG apparatus for barley genetic transformation.

### **Distances between the initial position of particles and explants**

Evaluation of the distances between the initial position of the particles and the target tissues showed that short distance resulted in calli with higher GUS activity. As can be observed in Table 1, the use of shorter distance in PIG (11.4 cm, 60 psi) and Biolistic (6 cm, 1,200 psi) resulted in calli expressing higher numbers of blue foci. However, in a second experiment when distances of 11.4 and 14.8 cm were assayed using the PIG device, the pNGI plasmid and cv. MN-698, GUS activity was higher in bombarded calli positioned at 14.8 cm than those positioned at 11.4 cm (Table 2). The performance estimated by the statistical analysis, based on the number of blue spots obtained per area of callus, using different distances, shot numbers and osmotic treatments, showed no significant differences in means obtained using

11.4 and 14.8 cm of distance ( $F=0.73$ ,  $P=0.40$ , Table 3). According to this, it is preferable to use 14.8 cm of distance between particles and samples with the PIG device since longer distances may reduce the damages of the tissues.

### **Number of shots**

The influence of the number of shots per plate was analyzed in an experiment in which the cv. MN-698, pNGI plasmid, PIG device and 11.4 cm of target distance were employed. One, two or three shots per plate were evaluated in this experiment. We observed that 2 and 3 shots resulted in a higher number of blue foci than 1, as shown in Table 2. The total number of blue foci in 15 calli bombarded 1, 2 and 3 times were respectively 676, 2,286 and 2,049. The statistical analysis showed that the employment of 2 and 3 shots gives better results than 1 shot per plate ( $F=9.87$ ,  $P=0.00$ , Table 3). Again, in order to reduce tissue damage as well as costs and manipulation, we chose 2 shots per Petri dish (Figure 1d) as the best condition to transform barley explants.

King and Kasha (1994) obtained similar results with immature embryos of barley. They reported that double and triple bombardments resulted in higher numbers of anthocyanin-expressing cells than a single bombardment, since multiple bombardments allowed better coverage of the target area. These authors observed that double and triple bombardments improved the results, respectively, by 86% and 72%, when compared to a single shot. Parveez *et al.* (1997), on the other hand, reported that there was no significant differences between 1 or 2 shots when bombarding oil palm embryogenic calli cultures.

### **Osmotic treatment of tissues**

The effect of osmotic treatment on transient *gusA* expression was evaluated by pre- and post-culture of cv. MN-698 explants in a medium

containing (or not) 0.2 M mannitol and/or 0.2 M sorbitol. In this experiment, calli were bombarded with the pNGI vector with the PIG device (60 psi) using 11.4 cm of target distance. Results are shown in Table 2. We observed that the osmotic treatment of tissues improved considerably the number of GUS blue foci on calli surface. Higher numbers of blue spots were obtained when mannitol, sorbitol or both were employed in comparison with calli cultivated in medium without the osmotic agents (Tables 2 and 3). The number of blue spots in the 15 calli under these different treatments was 676 (without osmotic agents), 1,369 (with mannitol), 1,706 (with sorbitol) and 2,727 (with both mannitol and sorbitol). The statistical analyses indicated that the application of osmotic treatment to the tissues was indeed beneficial to obtain higher transient GUS activity ( $F=9.52$ ,  $P=0.00$ ). The best results were obtained using 0.2 M mannitol and 0.2 M sorbitol prior and after to tissue bombardment (Table 3 and Figure 1e)

King and Kasha (1994) and Biswas *et al.* (1994) also obtained significantly higher transient transgene expression when maltose was added to media for barley and rice tissue cultures, respectively, due to its osmotic effect. Vain *et al.* (1993) observed that the culture of cells on a medium containing 0.2 M sorbitol and 0.2 M mannitol 4 hours prior and 16 hours after bombardment resulted in a statistically significant 2.7 fold increase in transient *gusA* expression. Bec *et al.* (1998), Sudhakar *et al.* (1998) and Tang *et al.* (1999) also used similar osmotic conditions to genetically transform rice. Brettschneider *et al.* (1997) reported that the number of transient signals increased from 63 to 294 signals per maize embryo with the increase of osmotic values of sucrose from 250 to 500 mOsm/kg. The best results obtained with the application of a 0.4 M mannitol and sorbitol instead of 0.2 M mannitol or 0.2 M sorbitol was probably due to the higher osmotic concentration. Vain *et al.* (1993) observed that the employment of a 0.4 M mannitol/sorbitol mixture was equivalent to the use of 0.4 M mannitol or 0.4 M sorbitol in the media.



In conclusion, transient genetic transformation of immature scutellum-derived calli from Brazilian barley cultivars MN-599 and MN-698 was obtained in the present work. This study disclosed that (i) the *Adh* promoter and its first intron is a better combination to promote transgene expression in barley tissues than the *CaMV* 35S promoter, (ii) the PIG device employing a very low helium pressure (60 psi) with (iii) 14.8 cm of distance between the initial position of particles and target tissues, (iv) 2 shots per plate and (v) the use of 0.2 M mannitol and 0.2 M sorbitol in the tissue culture medium provide the highest frequencies of *gusA* gene transient expression for Brazilian barley cultivars. The optimized conditions determined in the present study will be used in stable genetic transformation experiments attempting to produce transgenic plants of Brazilian cultivars of barley.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Prof. Dr. Vera L. S. Valente Gaiesky and Dr. Luciano Basso da Silva for their assistance in using the Kontrom Elektronik Imaging System KS-100 Computer Program and Mrs. Silvia Nair Cordeiro Richter for her assistance in plant tissue culture. The pNGI plasmid was kindly donated by Dr. Dave Somers, University of Minnesota, St. Paul, USA. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Ministry of Science and Technology), Cia. Cervejaria Brahma-Maltaria Navegantes, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Ministry of Education).

**Table 1.** Results of 4-5 days-old scutellum-derived calli from cv. MN-599 bombarded with pNGI plasmid using different gun devices, helium pressures and distances between particles and explants. The results are expressed in number of blue spots per callus. A total of 10 calli of each of the three bombarded plates were analyzed. SD, standard deviation; Min-Max, minimum and maximum values.

Gun device	Pressure (psi)	Distance (cm)	Blue spots per callus		
			Mean	SD	Min-max values
PIG	60	11.4	59	35.5	12-109
	60	14.8	20	17.7	4-59
	60	18.2	17	8.8	0-31
	60	21.4	11	6.3	4-20
Biolistic	800	12	60	38.2	18-146
	1000	12	17	13.1	0-39
	1200	6	29	4.9	6-60
	1200	9	24	16.6	9-61
	1200	12	21	17.6	3-48
	1200	15	10	6.3	1-21
	1500	12	7	5.9	1-17

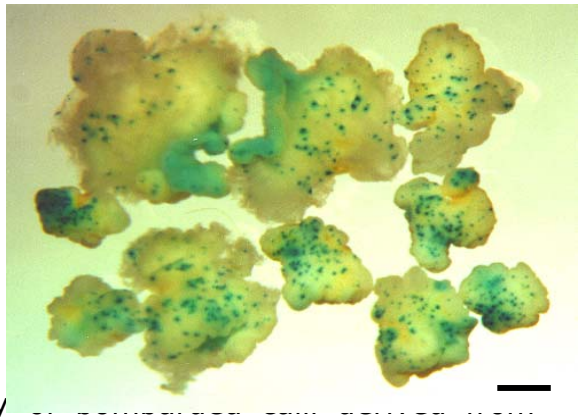
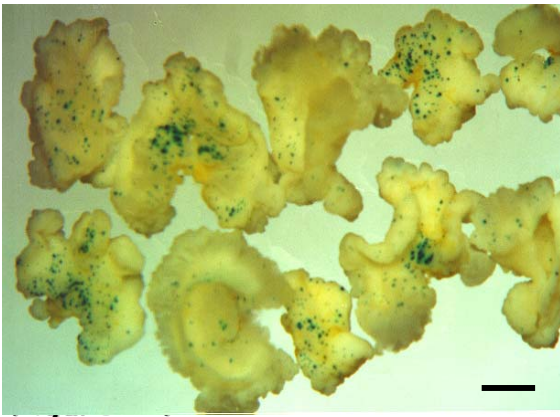
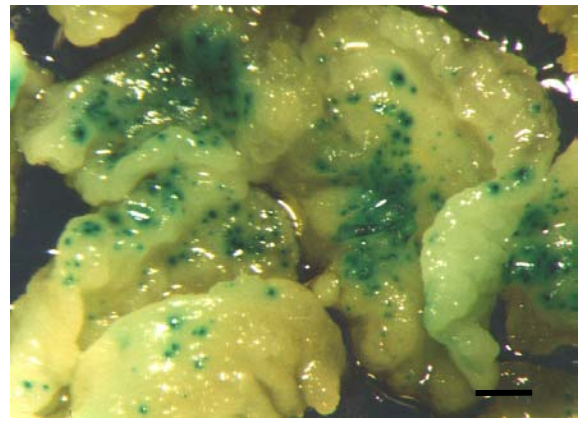
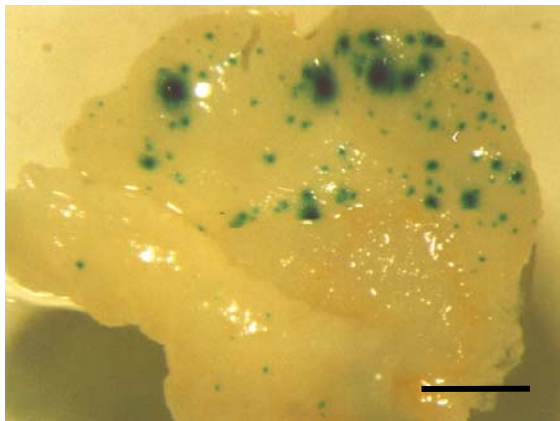
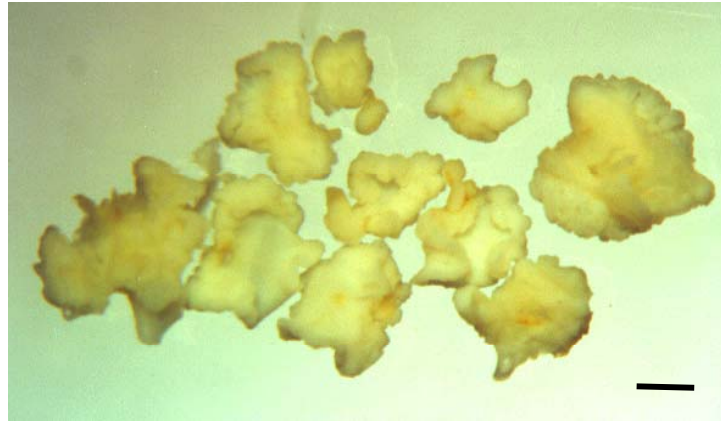
**Table 2.** Particle bombardment of 6 days-old scutellum-derived calli from cv. MN-698 using PIG device and pNGI plasmid. Different distances, shot numbers and the use or not of osmotic treatment were tested. The results are expressed in number of blue spots per callus and number of blue spots per callus area ( $\text{mm}^2$ ). A total number of 15 calli were analyzed (5 calli out of 3 bombarded plates). Dist, distance; Shots, number of shots/plate; Osm treat, osmotic treatment; M, mannitol; S, sorbitol;  $\text{mm}^2$ , square millimeter; SD, standard deviation; Min-max, minimum and maximum values .

Dist (cm)	Shots	Osm treat	Blue spots per callus/Blue spots per callus area ( $\text{mm}^2$ )		
			Mean	SD	Min-max values
14.8	1x	-	75/13.3	43.5/12.0	24-151/2.8-48.0
11.4	1x	-	45/10.0	25.5/8.4	15-99/2.1-34.2
11.4	2x	-	152/25.3	74.2/13.3	36-276/9.6-48.5
11.4	3x	-	137/25.3	53.4/16.0	68-278/9.3-56.5
11.4	1x	M	91/24.4	63.0/21.8	5-166/1.1-77.8
11.4	1x	S	114/25.9	74.6/16.4	43-255/7.3-60.0
11.4	1x	M+S	182/39.2	76.4/14.2	84-373/17.1-66.5

**Table 3.** Results of distance, shot number and osmotic treatment variables employed in the different bombardment experiments to transiently transform Brazilian barley cultivar MN-698. The means are expressed in number of blue spots per callus area (mm<sup>2</sup>). N, number of analyzed calli; M, mannitol; S, sorbitol.

Distance (cm)	Number of shots	Osmotic treatment	N	Mean*
11.4	1	No	15	10.00 a
14.8	1	No	15	13.32 a
11.4	1	No	15	10.00 b
11.4	2	No	15	25.34 a
11.4	3	No	15	25.26 a
11.4	1	No	15	10.00 c
11.4	1	M	15	24.42 b
11.4	1	S	15	25.92 b
11.4	1	M+S	15	39.23 a

\*Means followed by the same letter in each division of the table are not significantly different according to SNK Test of square-root transformation values.



immature scutella of Brazilian barley cultivars: (a) calli not bombarded (control plate, bar=1.17 mm); (b) callus bombarded with pNGI, Biolistic, 800 psi, 1 shot and 12 cm of distance (bar=0.92 mm); (c) callus bombarded with pNGI, FIG, 60 psi, 1 shot and 11.4 cm of distance (bar=0.95 mm); (d) calli bombarded with pNGI, FIG, 60 psi, 2 shots and 11.4 cm of distance (bar=1.75 mm); (e) calli bombarded with pNGI, FIG, 60 psi, 1 shot, 11.4 cm of distance and osmotic treatment of tissues with mannitol and sorbitol (bar=1.75 mm).

## REFERENCES

- BASSIE L, NOURY M, LEPRI O, LAHAYE T, CHRISTOU P, CAPELL T (2000) Promoter strength influences polyamine metabolism and morphogenic capacity in transgenic rice tissues expressing the oat *adc* cDNA constitutively. *Transgenic Research* 9: 33-42.
- BEC S, CHEN L, FERRIÈRE NM, LEGAVRE T, FAUQUET C, GUIDERDONI E (1998) Comparative histology of microprojectile-mediated gene transfer to embryogenic calli in japonica rice (*Oryza sativa* L.): influence of the structural organization of target tissues on genotype transformation ability. *Plant Science* 138: 177-190.
- BISWAS GCG, BURKHARDT PK, WUNN J, KLOTI A, POTRYKUS I (1994) Fertile indica rice plants regenerated from protoplasts isolated from scutellar tissue of immature embryos. *Plant Cell Reports* 13 (9): 528-532.
- BOTHMER R von, JACOBSEN N, BADEN C, JORGENSEN RB, LINDE-LAURSEN I (1995) An ecogeographical study of genus *Hordeum*. *Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools*. 7. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.
- BRETTSCHNEIDER R, BECKER D, LÖRZ H (1997) Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 737-748.
- BRINCH-PEDERSEN H, OLSEN O, KNUDSEN S, HOLM PB (1999) An evaluation of feed-back insensitive aspartate kinase as a selectable marker for barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation. *Hereditas* 131 (3): 239-245.
- DROSTE A, PASQUALI G, BODANESE-ZANETTINI MH (in press) Transgenic fertile plants of soybean cultivars (*Glycine max* (L.) Merrill) obtained from bombarded embryogenic tissue. *Euphytica*.
- FINER JJ, VAIN P, JONES MW, McMULLEN MD (1992) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Reports* 11: 323-328.
- JEFFERSON RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reports* 5: 387-405.
- KING SP, KASHA KJ (1994) Optimizing somatic embryogenesis and particle bombardment of barley (*Hordeum vulgare* L.) immature embryos. *In Vitro Cell and Development Biology* 30P: 117-123.

- KOHLI A, LEECH M, VAIN P, LAURIE DA, CHRISTOU P (1998) Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot-spots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 7203-7208.
- KOPREK T, HÄNSCH R, NERLICH A, MENDEL R, SCHULZE J (1996) Fertile transgenic barley of different cultivars obtained by adjustment of bombardment conditions to tissue response. *Plant Science* 119: 79-91.
- LUIZZI DV, CASTRO AJ (1991) Variabilidad genetica, su aporte al desarrollo del cultivo de cebada en el Uruguay. Trabajo presentado a la Segunda Reunión Nacional de Investigadores en Cebada Cervecera, 21-23/05/1991, La Estanzuela, Colonia, Uruguay.
- MARIS AF (1992) Caracterização isoenzimática de cultivares brasileiras de cevada (*Hordeum vulgare* L.). Porto Alegre: UFRGS. 107 p. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas - Ênfase Genética), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- NOBRE J, DAVEY MR, LAZZERI PA, CANNEL ME (2000) Transformation of barley scutellum protoplasts: regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell Reports* 19 (10): 1000-1005.
- ORTIZ JP, RAVIZZINI RA, MORATA MM, VALLEJOS RH (1997) A rapid system for studying foreign gene expression in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Applied Genetics* 38 (2): 123-130.
- PARVEEZ GK, CHOWDHURY MKU, SALEH NM (1997) Physical parameters affecting GUS gene expression in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using the biolistic device. *Industrial Crops and Products* 6: 41-50.
- PEETERS JP (1988) The emergence of new centers of diversity: evidence from barley. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 327-378.
- RECH EL, ARAGÃO JLC (1998) Biobalística. In: BRASILEIRO ACM, CARNEIRO VTC (Eds.). *Manual de transformação de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargem, 309 p.
- SALMENKALLIO-MARTILLA M, ASPEGREN K, AKERMAN S, KURTÉN U, MANNONEN L, HANNUS R, TERRI TH, KAUPPINEN V (1995) Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) by electroporation of protoplasts. *Plant Cell Reports* 15: 301-305.

- STIFF CM, KILIAN A, ZHOU H, KUDRNA DA, KLEINHOF S A (1995) Stable transformation of barley callus using biolistic particle bombardment and the phosphinothricin acetyltransferase (*bar*) gene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40: 243-248.
- SUDHAKAR D, DUC LT, BONG BB, TINJUANGJUN P, MAQBOOL SB, VALDEZ M, JEFFERSON R, CHRISTOU P (1998) An efficient rice transformation system utilizing mature seed-derived explants and a portable, inexpensive particle bombardment device. *Transgenic Research* 7: 289-294.
- TANG K, TINJUANGJUN P, XU Y, SUN X, GATEHOUSE JA, RONALD PC, QI H, LU X, CHRISTOU P, KOHLI (1999) A Particle-bombardment-mediated co-transformation of elite Chinese rice cultivars with genes conferring resistance to bacterial blight and sap-sucking insect pests. *Planta*, 208: 552-563.
- TINGAY S, McELROY D, KALLA R, FIEG S, WANG MB, THORNTON S, BRETTELL R (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *The Plant Journal* 11 (6): 1369-1376.
- VAIN P, McMULLEN MD, FINER JJ (1993) Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports* 12 (2): 84-88.
- VAIN P, WORLAND B, CLARKE MC, RICHARD G, BEAVIS M, LIU H, KOHLI A, LEECH M, SNAPE J, CHRISTOU P, ATKINSON H (1998) Expression of engineered cysteine proteinase inhibitor (*Oryzacystatin-1-Δ-86*) for nematode resistance in transgenic rice plants. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 266-271.
- VOM ENDT D, PASQUALI G (1996) Design and construction of plasmid vectors for plant transformation. *Brazilian Journal of Genetics* 19 (3): 317.
- WAN Y, LEMAUX P (1994) Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology* 104: 37-48.
- WANG MB, ABBOTT DC, UPADHYAYA NM, JACOBSEN JV, WATERHOUSE PM (2001) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an elite Australian barley cultivar with virus resistance and reporter genes. *Australian Journal of Plant Physiology* 28 (2): 149-156.



# **CAPÍTULO 5**

## **GENETIC TRANSFORMATION OF BRAZILIAN BARLEY CULTIVAR BY LOW HELIUM PRESSURE BIOLISTIC**

(Trabalho a ser submetido para publicação no periódico  
*Plant Cell Reports*)

**GENETIC TRANSFORMATION OF BRAZILIAN  
BARLEY CULTIVAR BY LOW HELIUM PRESSURE  
BIOLISTIC**

Juliana Schmitt de Nonohay<sup>1</sup>, Giancarlo Pasquali<sup>1,2</sup> and Helga Winge<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia

<sup>3</sup>Departamento de Genética

Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.  
CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Author for correspondence (e-mail: [winge@ufrgs.br](mailto:winge@ufrgs.br))

## ABSTRACT

In the present work, physical and biological conditions for gene introduction through a low helium pressure particle bombardment device in calli cultures derived from immature scutella of the Brazilian barley cultivar MN-698 were successfully determined. Considering the transient expression of *gusA* reporter gene, distance between target tissue and initial position of particles, number of shots and use of osmotic treatment of target tissues were defined. Somatic embryogenesis responses of cultivar MN-698 submitted to PIG was also evaluated in relation to these parameters. Best conditions to achieve maximum *gusA* expression and high frequencies of somatic embryogenesis responses included the use of 14.8 cm of target tissue distance, 2 shots per plate and culture of tissues in a medium containing 0.2 M mannitol and 0.2 M sorbitol 4-5 hours prior to and 17-19 hours after the bombardments. Several barley plants were regenerated after PIG bombardment and analyzed. Leaves from only 3 out of 43 regenerated plants showed positive GUS activity in histochemical assays.

**KEY WORDS:** plant genetic transformation, particle bombardment, biolistic, Particle Inflow Gun, immature embryos, somatic embryogenesis, barley, *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*

## INTRODUCTION

In Brazil, barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) is cultivated mainly for malt production for breweries. Up to now, genetic improvement of Brazilian barley cultivars uses only traditional methods of crossbreeding and selection (Minella, 1999). However, there are important limitations to the improvement of barley by conventional methods; one of them being the restriction of germplasm variability due to the high genetic relationship among Brazilian cultivars (Maris, 1992). On the other hand, the strong reproductive isolation between *Hordeum vulgare* and the native South American species of *Hordeum*, prevents gene transfer by crosses (Bothmer *et al.*, 1995). Therefore the adjustment of genetic transformation techniques to these cultivars is highly desirable to help the improvement of this important culture in our country.

Genetic transformation of barley has been reported by different researchers with the employment of different methods like biolistic (King and Kasha, 1994; Ritala *et al.*, 1994; Koprek *et al.*, 1996; Yao *et al.*, 1997), *Agrobacterium* (Tingay *et al.*, 1997; Trifonova *et al.*, 2001), electroporation (Salmenkallio-Marttila *et al.*, 1995) and polyethyleneglycol (PEG - Funatsuki *et al.*, 1995; Tiwari *et al.*, 2001). Particle bombardment has been referred as the most widely used procedure for direct gene transfer to cereals due to the advantage of introducing DNA directly into intact regenerable plant cells (Lörz *et al.*, 2000).

Important aspects inherent to the physical and biological material used in transformation mediated by particle bombardment (and by other methods) should be considered and optimized in order to obtain efficient results. These conditions include helium gas pressure, size and amount of particles, concentrations of DNA, plasmids, calcium chloride and spermidine, intensity of vacuum in the sample chamber, target distance,

number of shots, osmotic treatment of tissues and regulatory regions of introduced genes (Sanford *et al.*, 1993; Christou, 1995; Hagi, 1998).

In a previous study we determined the best conditions to transiently transform Brazilian barley cultivars. We have also shown how to recover barley plants from *in vitro* cultured of immature scutella with high regeneration frequencies (Nonohay, 1996). In this work, we aimed the regeneration of stably transformed barley plants after particle bombardment, determining the effects of distance between samples and initial position of particles, number of shots and use of osmotic treatment of target tissues on plant regeneration. Bombarded tissues were not submitted to antibiotic selection after bombardment being directly transferred to regeneration media. Bombarded explants and regenerated plants were analyzed for *gusA* reporter gene expression and tissue culture response. A Particle Inflow Gun (PIG) device (Finer *et al.*, 1992) and calli derived from immature scutella of the Brazilian barley cultivar MN-698 were used in the assays. The use of PIG to genetically transform barley was reported by few works like Koprek *et al.* (1996), and this is the first report of plant regeneration from tissues of South American barley cultivars submitted to microprojectile bombardment.

## MATERIAL AND METHODS

### Somatic Embryogenesis Tissue Culture

Immature seeds from the Brazilian barley cultivar MN-698, obtained from the brewery company (AmBev, American Beverage Company), were immersed in 70% ethanol for 1 minute, followed by immersion in 6% sodium hypochlorite solution for 30 minutes and rinsed five times with sterile distilled water. Scutella of immature embryos (1.0-2.5 mm in length) were then aseptically excised under a stereomicroscope and 10 scutella plated, upside down, per Petri dish. Calli growth was allowed at 22°C in dark. The first induction medium used was based on King and Kasha (1994), and consisted of B5 long basal medium (Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC, USA) supplemented with 5 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 60 g/L maltose, 2.5 g/L Phytigel. Osmotic treatments included (or not) 0.2 M mannitol and 0.2 M sorbitol in medium for 4-5 hours before and 17-19 hours after bombardments. The explants were maintained on this medium for 21 days and due a low tissue culture response observed, a second growth period of 21 days on a new induction medium was allowed, totalizing 42 days of culture. This second induction medium was that of Lürhs and Lörz (1987) and consisted of the MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962) containing 100 mg/L thiamin, 250 mg/L *myo*-inositol, 1 g/L casein hydrolysate, 2.0 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose and 2.5 g/L Phytigel. After 42 days of culture, the explants were submitted to particle bombardments and then transferred to the regeneration I medium, ie, MS basal medium containing 1 mg/L indoleacetic acid (IAA), 0.05 mg/L zeatin, 30 g/L sucrose and 2.5 g/L Phytigel. Regenerating tissues were maintained at 22°C with a 16 hours light photoperiod, with two subcultures performed monthly. Regenerated plants were transferred to glass tubes containing the regeneration II medium that consisted of ½ MS basal medium, 10 g/L

sucrose and 2.5 g/L Phytigel. Growing plants were also maintained at 22°C with a 16 hours light photoperiod. Plantlets with good development were transferred to pots containing vermiculite and a gramineous nutritional solution. The pots were covered with a PVC film for two weeks to keep the humidity. Holes were made in the film at different times and plants maintained in a culture chamber, at 25°C, with a 16 hours light photoperiod. After the acclimatization period, plants were transplanted to soil and grown to maturity in a screened nursery.

## **PIG BOMBARDMENT**

Seven days-old scutellum-derived calli were bombarded with the pNGI plasmid (Dave Somers, University of Minnesota, USA) adhered to tungsten particles (M10, Sylvania) with a PIG device and methodology described by Finer *et al.* (1992). The pNGI plasmid contains the promoter and first intron of maize alcohol dehydrogenase (*Adh*) gene, controlling the expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene (*gusA*) and 35S promoter of the cauliflower mosaic virus (*CaMV*) driving the expression of the neomycin phosphotransferase gene (*nptII*). Tested bombardment conditions included different distances between target tissues and the initial position of particles (11.4 or 14.8 cm), different number of shots per plate (1 or 2) and osmotic pre- and post-treatment of tissues (without and with 0.2 M mannitol plus 0.2 M sorbitol in the induction medium). Control dishes included explants that were not bombarded (2 dishes) or bombarded with DNA-free tungsten particles (1 dish). Dishes bombarded with pNGI included 3 replicates of each treatment (see Table 1). Ten calli per Petri dish were bombarded and the callus situated in the central position of the plate was removed for transient histochemical GUS assay two days after the bombardment. The remaining nine calli, positioned around the "death zone" (Brettschneider *et al.*, 1997) were maintained in culture to produce embryogenic structures and to

regenerate plants, except one that was GUS assayed, 21 days after the bombardments.

### **Transgene Analysis**

The activity of GUS enzyme, encoded by *gusA* transgene, was analyzed histochemically incubating calli, collected 2 and 21 days after bombardments, and leaves of regenerated plants in a solution containing the substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide (X-Gluc – Jefferson, 1987). Samples submersed in X-Gluc solution were maintained in dark at 37°C, in a shaker for 24 hours and then stored in 70% ethanol. Estimations of blue spot number and calli area, in square millimeter (mm<sup>2</sup>), were performed using a Kontrom Elektronik System KS-100 Computer Program.

### **Statistical Analysis**

Statistical analyses were performed using the Number Cruncher Statistical Systems program (NCSS 6.0.21 - Jerry Hintze, 1996). Analysis of Variance (ANOVA) three-way was performed to determine the effects of target tissue distance, number of shots and osmotic treatment of tissues and the possible interactions among these conditions. Means were differentiated using Student-Newman-Keuls (SNK) Multiple-Comparison Test and the normal distribution of data and equality of variance were tested using Kolmogorov-Smirnov Normality and Bartlett-Box Homogeneity Tests. Transient GUS expression response consisted of the number of blue spots per callus area (mm<sup>2</sup>) of the centrally positioned callus. Somatic embryogenesis responses included the percentage of explants developing embryogenic structures and plants per plate.



## RESULTS AND DISCUSSION

In the present work we report the genetic transformation of a Brazilian cultivar of barley, MN-698, through a low helium pressure particle bombardment method. Present experiments involved the transient expression and stable integration of *gusA* reporter gene. Tissue culture responses of barley explants after particle bombardment were also analyzed, including the determination of percentage of embryogenic structures, formation of embryogenic calli and somatic embryos, as well as the percentage of regenerated plants. Three-way ANOVA and SNK Test were carried out in order to estimate the effect of each of the different conditions analyzed, ie, target-tissue distance, number of shots and osmotic treatment of explants, and the possible interactions among them for the transient expression of *gusA* transgene (number of blue foci per callus area) and for the induction of embryogenic structures and plant regeneration.

Although the pNGI plasmid employed in present transformation experiments contained the 35S-*nptII*-3'*nos* cassette, antibiotic selection of transformed tissues was not conducted due to two reasons: (i) direct regeneration of transformed barley plants without antibiotic selection would point out to an easier way of obtaining marker-free transgenic plants in future, an alleged public stricture for the future acceptance of transgenic crops (Sugita *et al.*, 2000; Hohn *et al.*, 2001); (ii) the 35S regulatory sequence promotes very low level of transgene expression in bombarded barley tissues (unpublished data) and, therefore, the expression of *nptII* gene in tissues transformed with pNGI would be compromised.

The conditions analyzed in this work were also studied in previous optimization experiments that evaluated the transient expression of the *gusA* reporter gene two days after bombardment. In the present work, we aimed to confirm those parameters also in relation to the stable integration of the *gusA* reporter gene, to somatic embryogenesis and

regeneration of cultivar MN-698. Former experiments showed that maize *Adh* promoter and first intron is significantly more efficient than the *CaMV* 35S promoter to control the transgene expression in calli cultures of Brazilian barley cultivars. Another important aspect observed in this study was that the PIG device, which applies low helium pressures to accelerate particles, presented similar or better effectiveness when compared to the high pressure Biolistic device; for that reason the first was chosen, due to its lower cell impact (less cell injuries) than the high helium pressure device. The employment of a helium pressure of 60 psi, a distance of 14.8 cm between the initial position of particles and target tissues, 2 shots per dish and the use of 0.2 M mannitol and 0.2 M sorbitol in tissue culture medium provided the highest frequencies of *gusA* gene transient expression for the two tested Brazilian barley cultivars.

The histochemical GUS assays of barley calli 2 days after the bombardments performed in present work resulted in high transient *gusA* expression, as shown in Table 1. The means of blue foci per callus, obtained in the different treatments, ranged between 100 to 234 (Table 1), which may be considered a very high score for transient transgenic assays. These values are close to those obtained previously under the same conditions.

King and Kasha (1994), Ritala *et al.* (1994), Koprek *et al.* (1996) were examples of works that reported the regeneration of transgenic barley plants and the initial number of spots obtained per immature embryos after bombardment. Ritala *et al.* (1994) obtained an average of 30 blue spots per embryo using also a plasmid that contained the maize *Adh* promoter and first intron driving the expression of *gusA* (pAT13), although the PDS-1000/He Biolistic was the gun device used. The best results were obtained by Koprek *et al.* (1996) who reported the attainment of about 31 blue spots per scutellum of the barley cultivar Salome bombarded with the PIG device (90 psi and 6 cm), and about 36 blue foci per scutellum of the cultivar Golden Promise with the PDS 1000/He device (1,200 psi and 8.5 cm). King and Kasha (1994), using

optimized bombardment parameters for the PDS-1000/He apparatus, reported transient expression level averaging 200 anthocyanin spots per immature embryo (range 0 to 1,000). Working with other cereals, Ortiz et al. (1997) observed an average of  $344.3 \pm 60$  blue spots per 25 wheat embryos (14 spots/embryo) bombarded with a high helium pressure (1,700 psi) and the plasmid pCGU containing *gusA* under the sunflower polyubiquitin promoter. Brettschneider *et al.* (1997) obtained more than 280 *gusA* expression signals per maize immature embryo bombarded by PDS 1000/He with optimized conditions. Hence, the number of blue spots of transient GUS assays in barley scutellum-derived calli obtained in the present work is very promising for the regeneration of transgenic plants.

We observed that the most efficient conditions to obtain the highest transient genetic transformation of cultivar MN-698 included the use of 11.4 cm of distance, 2 shots per plate and the osmotic treatment of tissues (Figure 1a, Tables 1 and 2). These conditions were also the best ones obtained in our former experiments (unpublished data). The statistical analysis of blue foci number per callus area showed the effects of shot number ( $F=11.06$ ,  $P=0.004$ ), osmotic treatment of tissues ( $F=13.49$ ,  $P=0.002$ ) and the interaction between these factors ( $F=5.12$ ,  $P=0.038$ ). According to the SNK Test (Table 3), the best conditions included 2 shots per plate and osmotic treatment of tissues. Although 11.4 cm showed higher values of blue foci than 14.8 cm, the difference between the means is not statistically significant. Koprek *et al.* (1996) also obtained highest transient *gusA* expression using shorter distances using either PIG or Biolistic devices.

The results of the present work showed that the expression of *gusA* gene in bombarded calli decreased considerably after 21 days of culture (Figure 1c). Under the different tested conditions, the means of blue spots per callus in different treatments ranged from 1 to 23 (Table 1). Although the high decrease of GUS activity in calli with culture time, the observation of *gusA* expression in calli after 21 days is an indicative of the stable transformation of tissues.

During the induction stage, we observed the formation of embryogenic calli and somatic embryos (Figure 2a) with a frequency of 58.3% in pNGI-bombarded calli, 44.4% in DNA-free particle bombarded calli and 52.6% in calli that were not bombarded and not treated with osmotic agents (Table 1). The differences between calli in the induction of somatic embryogenesis were also due to their ability for embryogenic responses. The ANOVA clearly showed that target tissue distance ( $F=5.23$ ,  $P=0.04$ ), osmotic treatment ( $F=8.40$ ,  $P=0.01$ ) and the interaction between these conditions ( $F=6.72$ ,  $P=0.02$ ) influence the induction of embryogenic structures. Hence, the worst condition of particle bombardment to somatic embryos induction showed be the use of 11.4 cm without osmotic treatment of tissues (Table 3).

The statistical analysis also showed that the single effect of distance between target tissues and the initial position of particles influenced only the somatic embryogenesis induction responses. No significant difference was observed in transient GUS activity when employing distances either of 11.4 or 14.8 cm ( $F=1.20$ ,  $P=0.29$ ). Therefore, the use of 14.8 cm of distance should be preferred since wider distances may reduce cell injuries and, possibly, allow a higher number of cells to commit with somatic embryogenesis. Besides this possible explanation, the use of the distance of 14.8 cm did not present any difference in transient gene expression in relation to shorter distances.

On the other hand, the delivery of 2 shots per dish, instead of a single one, showed to be more efficient when considering the transient expression of *gusA* (Table 3). The employment of 2 shots is probably better due the higher number of cells that receive and express the transgene. An important aspect to consider is that although a higher damage of cells would be expected with the increased number of shots, no differences were observed in somatic embryogenesis responses of tissues bombarded either once or twice (Table 3). King and Kasha (1994) have also reported that the use of 2 and 3 shots yielded better results with barley embryos than 1 shot in transient expression of an

anthocyanin-biosynthesis regulatory gene. Other biolistic works that used more than 1 shot per plate include those published by Hagio (1998) and Valdez *et al.* (1998).

The culture of calli in medium containing osmotic agents before and after the bombardments determined significantly higher responses in transient *gusA* expression and somatic embryogenesis induction (Tables 1, 2 and 3). The osmotic treatment of target tissues results in partial plasmolysis of cells, reducing the turgor pressure that minimizes injuries caused by particle bombardments. Therefore, less damage in tissues is expected to result in an increased number of cells expressing the *gusA* gene and following embryogenic development. The beneficial effect of osmotic treatment was also demonstrated by Vain *et al.* (1993), Brettschneider *et al.* (1997), Ortiz *et al.* (1997) and Gless *et al.* (1998) for maize, wheat, oat and rice transgenic cultures and by King and Kasha (1994) and Yao *et al.* (1997) in barley genetic transformation. An important aspect observed in the present work was that the osmotic treatment of tissues did not negatively affect the induction of somatic embryogenesis as well as the regeneration of plants. On the contrary, more plants from calli submitted to osmotic treatment were obtained than from those tissues not submitted to osmotic treatment (Table 1).

During the regeneration stage, a total number of 60 plants were produced (Figure 2b-d, Table 1). A total of 17 plants were obtained from the control dishes, 9 plants being produced from unbombarded calli and 8 from calli bombarded with DNA-free particles. The somatic embryos induced from pNGI-bombarded calli resulted in 43 plants. The highest number of regenerated plants was obtained from calli bombarded with 14.8 cm of target distance, 2 shots per plate and the employment of osmotic treatment. Statistical analyses of regeneration responses showed that none of the conditions assayed was significantly better, probably due to the low number of plants produced under some conditions.

Leaves from only 3 plants out of the 43 regenerated, presented GUS activity (Figure 1d). All 3 GUS-positive plants regenerated from the same

callus bombarded once using 14.8 cm of distance and not submitted to osmotic treatment. Molecular analysis should be carried out to determine which plants are stably transformed and to test if they were derived from independently transformed cells.

In conclusion, in the present work we determined the best low helium pressure biolistic conditions to transform scutellum-derived calli of the Brazilian barley cultivar MN-698, evaluating target tissue distances, shot numbers and osmotic treatment of bombarded tissues. The achievements of good transient *gusA* expression and high frequencies of somatic embryogenesis responses was obtained when using 14.8 cm of target distance, 2 shots delivered per target dish and culture of tissues in medium containing 0.2 M mannitol and 0.2 M sorbitol 4-5 hours before and 17-19 hours after the bombardments (Figure 1b). In this work, several barley plants were regenerated after PIG bombardments, although only 3 out of 43 plants presented GUS activity.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Authors are grateful to Prof. Dr. Vera L. S. Valente Gaiesky and Dr. Luciano Basso da Silva for their assistance in using the Kontrom Elektronik Imaging System KS-100 Computer Program and Mrs. Silvia N.C. Richter for her assistance in plant tissue culture. We would like to thank Dr. Dave Somers (University of Minnesota, St. Paul, USA) for supplying the pNGI plasmid. The present work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Ministry of Science and Technology), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Ministry of Education), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and American Beverage Company (AmBev).

**Table 1.** Results of particle bombardments of barley scutellum-derived calli using different target distances, number of shots and osmotic treatment. Dist, distance between samples and the initial position of particles; Osm Treat, osmotic treatment of target tissues; M, mannitol; S, sorbitol; N, number of analyzed calli; 2d, 2 days; 21d, 21 days; Embr, embryogenic structures formed; Npl, number of regenerated plants.

DNA	Dist		Osm		Blue spots*		Embr	Npl		
	(cm)	Shots	Treat	N	2d	21d			N (%)	
No	No	No	No	2	-	-	19	52.6	0	
			M+S	2	-	-	19	21.1	9	
No	11.4	1x	No	1	-	-	9	33.3	3	
			M+S	1	-	-	9	11.1	0	
		2x	No	1	-	-	9	33.3	0	
			M+S	1	-	-	9	11.1	0	
	14.8	1x	No	1	-	-	9	44.4	0	
			M+S	1	-	-	9	44.4	5	
		2x	No	1	-	-	9	22.2	0	
			M+S	1	-	-	9	11.1	0	
pNGI	11.4	1x	No	3	111 ( $\pm$ 69.7)	11 ( $\pm$ 10.3)	24	20.8	3	
			M+S	3	100 ( $\pm$ 74.3)	4 ( $\pm$ 7.5)	24	58.3	3	
		2x	No	3	169 ( $\pm$ 86.8)	11 ( $\pm$ 14.0)	24	4.2	0	
			M+S	3	234 ( $\pm$ 38.0)	2 ( $\pm$ 1.2)	24	41.7	6	
		14.8	1x	No	3	133 ( $\pm$ 17.9)	1 ( $\pm$ 1.0)	24	33.3	7
				M+S	3	102 ( $\pm$ 52.9)	13 ( $\pm$ 19.2)	24	50.0	9
	2x		No	3	159 ( $\pm$ 71.6)	11 ( $\pm$ 16.5)	24	58.3	2	

M+S	3	189 ( $\pm$ 34.4)	23 ( $\pm$ 25.3)	24	45.8	13
-----	---	-------------------	------------------	----	------	----

---

\* Mean per callus ( $\pm$  standard deviation).



**Table 2.** Mean number of blue spots of GUS activity per callus area (square-millimeter) obtained after barley calli bombardment using different target distances, number of shots and osmotic conditions. Dist, distance between sample and particles; Osm Treat, osmotic treatment of tissues; M, mannitol; S, sorbitol; N, number of calli analyzed; SD, standard deviation.

Dist (cm)	Shots	Osm Treat	N	Mean	SD
11.4	1x	No	3	27.1	22.0
		M+S	3	42.4	33.1
	2x	No	3	41.1	20.8
		M+S	3	89.9	11.3
14.8	1x	No	3	28.9	5.4
		M+S	3	35.0	19.3
	2x	No	3	31.0	6.5
		M+S	3	72.4	13.7

**Table 3.** Results of three-way ANOVA and SNK Test using different PIG bombardment conditions on barley scutellum-derived calli. Dist., distances between samples and the initial position of particle (cm); Osm., osmotic treatment of target tissues; M, mannitol; S, sorbitol; N, number of analyzed calli; mm<sup>2</sup>, square millimeter; embr., embryogenic structures (%).

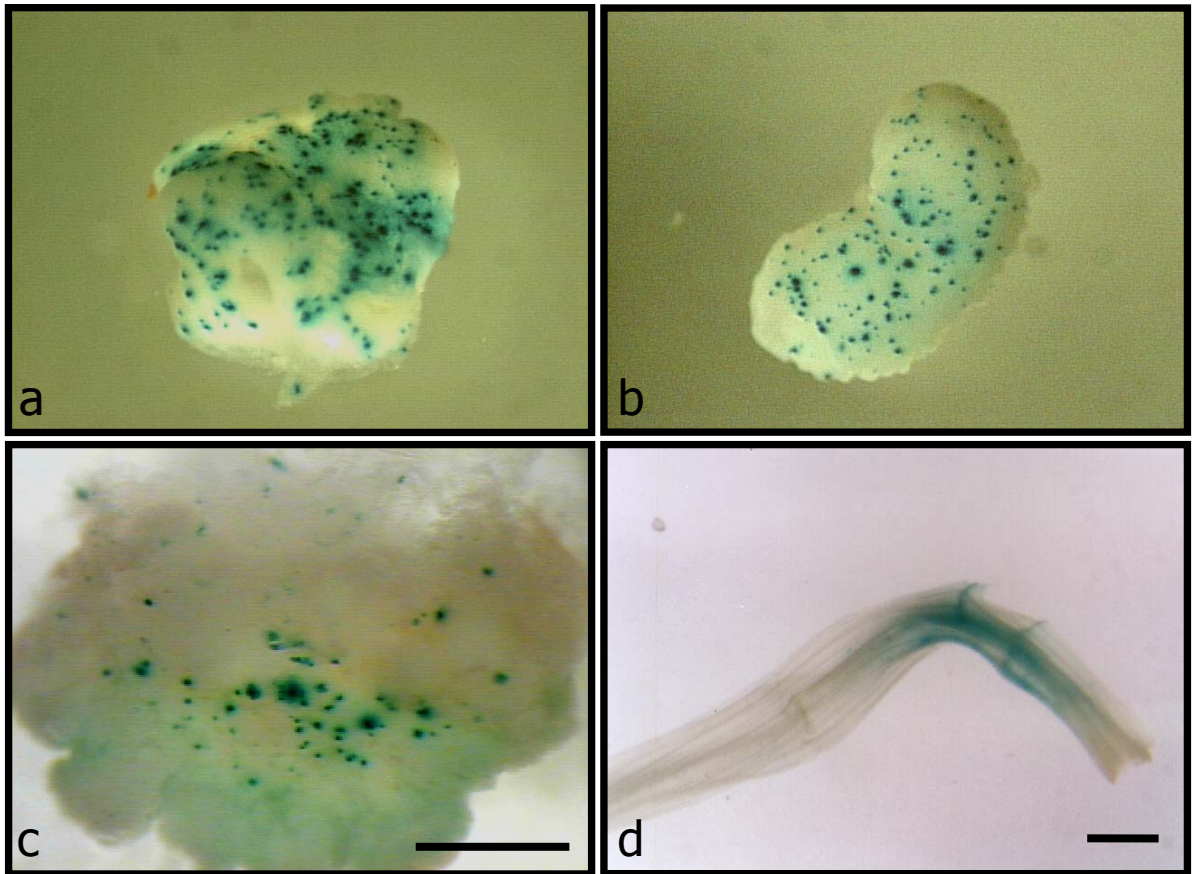
Parameters	Conditions	N	Mean* of blue spots per callus area (mm <sup>2</sup> )	Mean* of embr.
Dist.	11.4	12	50.14 a	0.31 b
	14.8	12	41.83 a	0.47 a
Shots	1x	12	33.36 b	0.41 a
	2x	12	58.61 a	0.38 a
Osm.	No	12	32.04 b	0.29 b
	M+S	12	59.93 a	0.49 a
Dist., Shots	11.4, 1x	6	34.75 a	0.40 a
	11.4, 2x	6	65.53 a	0.23 a
	14.8, 1x	6	31.97 a	0.42 a
	14.8, 2x	6	51.69 a	0.52 a
Dist., Osm.	11.4, No	6	34.10 a	0.13 b
	11.4, M+S	6	66.18 a	0.50 a
	14.8, No	6	29.97 a	0.46 a
	14.8, M+S	6	53.69 a	0.48 a
Shots, Osm.	1x, No	6	28.00 b	0.27 a

---

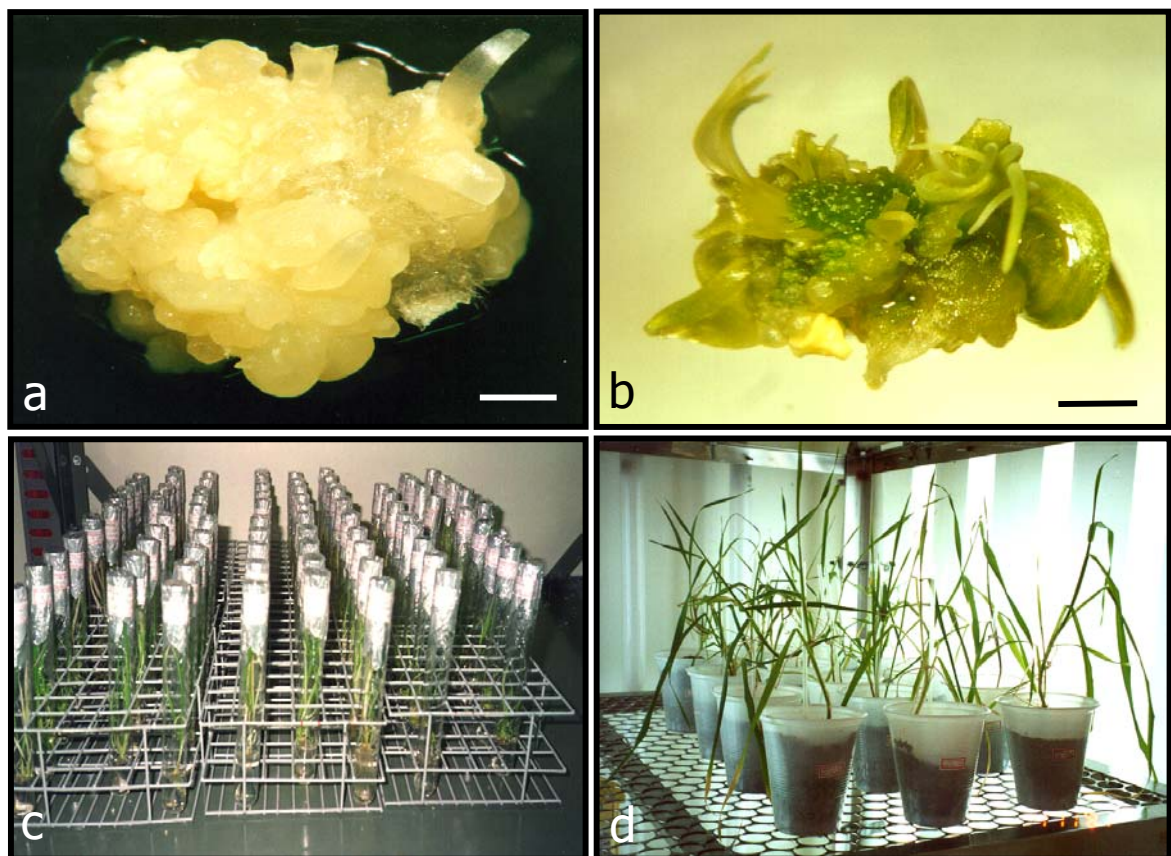
1x, M+S	6	38.72 b	0.54 a
2x, No	6	36.07 b	0.31 a
2x, M+S	6	81.15 a	0.44 a

---

\*Means followed by the same letter in each table division are not significantly different according to SNK Tests ( $\alpha=0.05$ ).



**Figure 1.** Histochemical GUS assay of: (a) callus (2,52 mm<sup>2</sup>) 2 days after bombardments (11.4 cm of distance, 2 shots with osmotic treatment), (b) callus (1,91 mm<sup>2</sup>) 2 days after bombardments (14.8 cm of distance, 2 shots with osmotic treatment), (c) callus 21 days after bombardments (14.8 cm of distance, 2 shots and with osmotic treatment, bar=1 mm), and (d) plantlet regenerated from bombarded callus (14.8 cm of distance, 1 shot and not submitted to osmotic treatment, bar=1.16 mm).



**Figure 2.** Somatic embryogenesis responses: (a) embryogenic callus with somatic embryos at induction stage (bar=1.4 mm); (b) callus with developed plantlets at regeneration I stage (bar=1.75 mm); (c) regenerated plantlets at regeneration II stage; (d) regenerated plants at acclimatization stage.

## REFERENCES

- BOTHMER R von, JACOBSEN N, BADEN C, JORGENSEN RB, LINDE-LAURSEN I (1995) An Ecogeographical Study of Genus *Hordeum*. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools. 7. International Board for Plant Genetic Resources, Rome
- BRETTSCHEIDER R, BECKER D, LÖRZ H (1997) Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 737-748
- CHRISTOU P (1995) Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. *Euphytica* 85: 13-27
- FINER JJ, VAIN P, JONES MW, McMULLEN MD (1992) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Reports* 11: 323-328
- FUNATSUKI H, KURODA H, KIHARA M, LAZZERI PA, MÜLLER E, LÖRZ H, KISHINAMI I (1995) Fertile transgenic barley generated by direct DNA transfer to protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 707-712
- GLESS C, LÖRZ H, JÄHNE-GÄRTNER A (1998) Transgenic oat plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of leaf base segments. *Journal of Plant Physiology* 152: 151-157
- HAGIO T (1998) Optimizing the particle bombardment method for efficient genetic transformation. *JARQ* 32: 239-247
- HOHN B, LEVY AA, PUCHTA H (2001) Elimination of selection markers from transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 139-143
- JEFFERSON RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reports* 5: 387-405
- KING SP, KASHA KJ (1994) Optimizing somatic embryogenesis and particle bombardment of barley (*Hordeum vulgare* L.) immature embryos. *In Vitro Cell and Development Biology* 30P: 117-123
- KOPREK T, HÄNSCH R, NERLICH A, MENDEL R, SCHULZE J (1996) Fertile transgenic barley of different cultivars obtained by adjustment of bombardment conditions to tissue response. *Plant Science* 119: 79-91

- LÖRZ H, SERAZETDINOVA L, LECKBAND G, LÜTTICKE S (2000) Transgenic barley – a journey with obstacles and milestones. In: LOGUE, S. (Ed.). Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Barley Genetics Symposium p. 189-193
- LÜHRS R, LÖRZ H (1987) Plant regeneration *in vitro* from embryogenic cultures of spring- and winter-type barley (*Hordeum vulgare* L.) Theoretical and Applied Genetics 75: 16-25
- MARIS AF (1992) Caracterização isoenzimática de cultivares brasileiras de cevada (*Hordeum vulgare* L.). Dissertação Bacharelado em Ciências Biológicas - Ênfase Genética. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
- MINELLA E (1999) Melhoramento da cevada. In: Borém, A. (Ed.) Melhoramento de espécies cultivadas. p. 252-272
- NONOHAY JS de (1996) Embriogênese somática e regeneração de plantas férteis em cultivares brasileiras de cevada, *Hordeum vulgare vulgare*, Poaceae. Porto Alegre: UFRGS. 87 p. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- ORTIZ JPA, RAVIZZINI RA, MORATA MM, VALLEJOS RH (1997) A rapid system for studying foreign gene expression in wheat (*Triticum aestivum* L.) Journal Applied Genetics 38 (2): 123-130
- PARVEEZ GK, CHOWDHURY MKU, SALEH NM (1997) Physical parameters affecting GUS gene expression in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using the biolistic device. Industrial Crops and Products 6: 41-50
- RITALA A, ASPEGREN K, KURTÉN U, SALMENKALLIO-MARTTILA M, MANNONEN L, HANNUS R, KAUPPINEN V, TEERI TH, ENARI TM (1994) Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. Plant Molecular Biology 24: 317-325
- SALMENKALLIO-MARTILLA M, ASPEGREN K, AKERMAN S, KURTÉN U, MANNONEN L, HANNUS R, TERRI TH, KAUPPINEN V (1995) Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) by electroporation of protoplasts. Plant Cell Reports 15: 301-305
- SANFORD JC, SMITH FD, RUSSELL JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. Methods in Enzymology 217: 483-509

- SUGITA K, KASAHARA T, MATSUNAGA E, EBINUMA H (2000) A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. *The Plant Journal* 22 (5): 461-469
- TINGAY S, McELROY D, KALLA R, FIEG S, WANG MB, THORNTON S, BRETTELL R (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant Journal* 11 (6): 1369-1376
- TIWARI VK, ZHANG J, GOLDS TJ, COCKING EC, DAVEY MR, POWER JB (2001) Effect of heat shock treatment on *Hordeum vulgare* protoplast transformation mediated by polyethylene glycol. *Biologia Plantarum* 44 (1): 25-31
- TRIFONOVA A, MADSEN S, OLESEN A (2001) *Agrobacterium*-mediated transgene delivery and integration into barley under a range of *in vitro* culture conditions. *Plant Science* 161 (5): 871-880
- VAIN P, MCMULLEN MD, FINER JJ (1993) Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports* 12: 84-88
- VALDEZ M, CABRERA PONCE JL, SUDHAKAR D, HERRERA ESTRELLA I, CHRISTOU P (1998) Transgenic central American, West African and Asian elite rice varieties resulting from particle bombardment of foreign DNA in mature seed-derived explants utilizing three different bombardment devices. *Ann Bot* 82: 795-801
- YAO QA, SIMION E, WILLIAM M, KROCHKO J, KASHA KJ (1997) Biolistic transformation of haploid isolated microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Genome* 40 (4): 570-581



## **CAPÍTULO 6**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE QUITINASES  
POTENCIALMENTE CAPAZES DE CONFERIR  
RESISTÊNCIA VEGETAL AO FUNGO *BIPOLARIS*  
*SOROKINIANA***

(Trabalho a ser complementado para ser submetido à publicação)

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE QUITINASES  
POTENCIALMENTE CAPAZES DE CONFERIR  
RESISTÊNCIA VEGETAL AO  
FUNGO *BIPOLARIS SOROKINIANA***

Juliana Schmitt de Nonohay<sup>1,2</sup>, Adriana Turqueti Neves<sup>2</sup>, Aida Terezinha  
Matsumura<sup>3</sup>, Giancarlo Pasquali<sup>1,4</sup> e Helga Winge<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM)

<sup>2</sup> Departamento de Genética, Instituto de Biociências (IB)

<sup>3</sup> Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia

<sup>4</sup> Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, IB

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

## INTRODUÇÃO

As enzimas quitinases foram classificadas entre as proteínas relacionadas à patogênese (PRs) por estarem envolvidas nos mecanismos de defesa vegetal (Collinge e cols., 1993; Patil e cols., 2000). As quitinases catalizam a hidrólise da quitina, principal componente da parede celular de fungos, inibindo a germinação dos esporos e crescimento de micélios nestes organismos. Além disto, os fragmentos glicosídicos, resultantes da degradação da quitina, atuam como desencadeadores ou estimuladores ("elicitors") dos mecanismos de defesa vegetal. A obtenção de plantas transgênicas com maior resistência a patógenos por meio da introdução nestas de genes exógenos codificadores de quitinases (genes *chit*) e de outras PRs, ou pela indução da expressão constitutiva de genes endógenos, consiste em um dos propósitos da transformação genética vegetal.

A introdução de genes codificadores de quitinases em plantas pela transformação genética foi descrita em trabalhos como os de Linthorst e cols. (1990), Jach e cols. (1995), Grison e cols. (1996), Bliffeld e cols. (1999), Takatsu e cols. (1999) e Datta e cols. (2001). Os trabalhos de Grison e cols. (1996) e Datta e cols. (2001) objetivaram a expressão constitutiva de genes endógenos de quitinases. Por outro lado, Jach e cols. (1995) introduziram genes codificadores de quitinases, glicanases e proteínas inativadoras de ribossomos (RIP) originários de cevada em tabaco. Bliffeld e cols. (1999) introduziram genes de quitinases de cevada em trigo e Takatsu e cols. (1999) obtiveram a expressão de um gene de quitinase de arroz em crisântemo. Esses trabalhos relataram um aumento da resistência vegetal a fungos patogênicos como *Rhizoctonia solani*, *Erysiphe graminis* e *Botrytis cinerea*.

Uma outra estratégia para conferir a resistência a moléstias fúngicas em plantas, pela transgênese, consiste na introdução de genes codificadores de quitinases do fungo *Trichoderma*, largamente utilizado

no controle biológico de fitopatógenos. Lorito e cols. (1998) afirmam que, em termos de atividade antifúngica, os genes de quitinases de *Trichoderma* são considerados mais eficientes do que os genes de quitinases de plantas. Segundo estes autores, testes extensivos *in vitro* mostraram não existir, virtualmente, patógenos fúngicos resistentes às enzimas quitinases do fungo *Trichoderma*.

O presente estudo tem por objetivo a identificação de genes codificadores de quitinases em cultivares brasileiras de cevada (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) e em isolados do fungo micopatogênico *Trichoderma* sp. A identificação, isolamento e posterior caracterização destes genes são de grande interesse para a obtenção de plantas geneticamente modificadas de cultivares de cevada, capazes de exibir resistência ao fungo *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok.) Shoem., agente causador da mancha-marrom-das-folhas, podridão-das-raízes e ponta-preta-dos-grãos. Esta moléstia é considerada uma das mais sérias doenças em culturas de cevada, sendo controlada por aplicação de fungicidas sistêmicos e pela realização de rotações de culturas (Wordell e cols., 2000). Salienta-se que praticamente não existem cultivares de cevada resistentes a *B. sorokiniana*, caracterizando o uso da engenharia genética como potencial método de aquisição desta característica para a cultura da cevada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Plantas de cevada e isolados de *Trichoderma* sp.**

No presente trabalho, foram utilizadas as cultivares brasileiras de cevada MN-599 e MN-698, desenvolvidas pela Cia. de Bebidas das Américas (AmBev), e isolados do fungo micopatogênico *Trichoderma* sp., antagonista do fungo fitopatogênico *B. sorokiniana*. Os isolados de *Trichoderma* sp. e *B. sorokiniana* (Figuras 1 e 2) foram obtidos e caracterizados por Turqueti e cols. (2000).

### **Extração e quantificação de DNA de cevada e de *Trichoderma* sp.**

Para a extração de DNA de plantas de cevada, sementes maduras das cultivares MN-599 e MN-698 foram lavadas com água destilada e desinfectadas superficialmente pela imersão em etanol 70% por 1 minuto e, logo após, pela imersão, em uma solução de hipoclorito de sódio 4% contendo uma gota de Tween 20, por 30 minutos, em capela de fluxo laminar horizontal. Posteriormente, as sementes foram lavadas 5 vezes com água destilada estéril. As sementes desinfectadas foram colocadas para germinar em placas de Petri, previamente autoclavadas, contendo meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g/L sacarose e 3 g/L de Phytigel® (pH 6,2, ajustado antes da autoclavagem). Após 10 dias de cultura a 25°C e fotoperíodo de 16 horas/luz, as folhas das plantas germinadas foram coletadas e submetidas à extração de DNA, segundo o método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987). O protocolo descrito foi modificado pelo acréscimo de proteinase K (0,1 mg/mL) e RNase (10 µg/mL) respectivamente no tampão de extração CTAB e no tampão TE (Tris-HCl, EDTA) e adaptado para a extração de DNA a partir de 100 mg de tecido pulverizado em tubos de microcentrífuga de 2 mL

(Gauer, 1999). As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro a 260 nm de absorvância, conforme descrito por Ausubel e cols. (1994).

Para a extração de DNA de isolados do fungo *Trichoderma* sp., esporos dos isolados A4b e A4c (Turqueti e cols., 2000) foram inoculados em meio líquido BD (batata, dextrose), sob agitação, a 25°C. O isolado A4c foi escolhido aleatoriamente entre os 12 isolados obtidos por Turqueti e cols. (2000) e posteriormente o isolado A4b foi escolhido por ter se mostrado o mais eficiente, em média, nos testes de antagonismo *in vitro* contra os 21 isolados de *B. sorokiniana*, de acordo com os resultados de Turqueti e cols. (2001). O DNA desses isolados foi extraído segundo o método de Reader e Broda (1985). As amostras de DNA foram quantificadas comparando-se a intensidade das bandas com diferentes concentrações de DNA do fago lambda, por eletroforese em gel de agarose (0,8-1%) contendo 0,1 mg/L de brometo de etídeo e tampão TBE 1X (Tris.HCl, ácido bórico, EDTA), sob corrente elétrica contínua de 40 mA (Ausubel e cols., 1994).

### **REAÇÕES DA DNA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)**

Na determinação dos *primers* para a amplificação de fragmentos de genes de quitinases, foram realizados alinhamentos de seqüências codificadoras de quitinases de cevada e de *Trichoderma* sp. disponíveis no EMBL/GenBank. Estes procedimentos foram realizados em programas (StringSearch, Fetch, PileUp) do Genetics Computer Group Software (GCG, 1995). As seqüências dos *primers* utilizados no presente trabalho estão representadas no Quadro 1. Para as PCRs, foram utilizados reagentes nas seguintes quantidades: 50-100 ng de DNA-molde, 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Gibco), 200 µM de solução de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTPs, Amersham Biosciences), 300 ng de *primers*, 10 mM de Tris.HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e água ultrapura (Milli-Q) para 50 µL de reação.

As condições de termociclagem das PCRs para DNA-molde de cevada foram de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 53°C, 2 minutos a 72°C (35 ciclos), 10 minutos a 72°C (1 ciclo). As condições de PCR para DNA-molde do isolado A4c de *Trichoderma* sp. foram de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a

47°C, 2 minutos a 72°C (35 ciclos), 10 minutos a 72°C (1 ciclo). Tentativas de amplificação de fragmentos de genes *chit* dos isolados A4b e A4c de *Trichoderma* sp. foram realizadas com pares de *primers* representando seqüências conservadas do gene *chit1* do fungo *Metarhizium anisopliae* (Quadro 1), sob condições definidas por Bogo e cols. (1998). Os produtos de PCR foram visualizados, após eletroforese, em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo a 0,1 mg/L, sobre transiluminador com luz ultravioleta.

**Quadro 1.** *Primers* utilizados na amplificação de fragmentos de genes *chit* de *Trichoderma* e de cevada. Tm, temperatura média de desnaturação.

<i>Primers</i>	Seqüência	Tm (°C)
CHIT5'HOR	5'-TGG GGC TAC TGC TTC A-3'	50
CHIT3'HOR	5'-TGT AGC AGT CGA GGT TG-3'	52
CHIT5'TRICH	5'-CTT GGA ATG ATG TCG GCA-3'	54
CHIT3'TRICH	5'-GGA GTT GGG GTA GCT CAG C-3'	62
MACHITREV	5'-GGA GGG TGG ACG TGG TCA AC-3'	53
MACHITFOR	5'-GCT GCC CCC TAA TCC CTT G-3'	50

## **Purificação de fragmentos de DNA amplificados**

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR do genoma das cultivares de cevada MN-599 e MN-698 e do isolado A4c de *Trichoderma* sp. foram purificados dos géis de agarose, utilizando-se o *kit* para purificações de DNA e produtos de PCR GFX™ (Amersham Biosciences), segundo orientações do fabricante. Alguns produtos de amplificação foram novamente submetidos a PCR. A purificação dos fragmentos amplificados do genoma do isolado A4b foi realizada pela remoção de bandas correspondentes a estes produtos nos géis de agarose e incubação por 12 horas (O/N) a 4°C em tampão TE (Tris.HCl 10 mM/ EDTA 1 mM). Os fragmentos de gel foram previamente esmagados com ponteira de micropipeta. Após este período de incubação, as amostras foram centrifugadas rapidamente e uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi utilizada nas reamplificações sob as mesmas condições de PCR anteriormente descritas.

## **Seqüenciamento de fragmentos de DNA**

Os fragmentos de DNA purificados de géis de agarose foram seqüenciados de forma manual ou automática. No seqüenciamento manual, as amostras de DNA-molde foram marcadas com o emprego do *T7 Sequenase PCR Product Sequencing Kit™* ou o *Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit™* (Amersham Biosciences) e didesoxirrinucleotídeos marcados radioativamente. O seqüenciamento de forma automática foi realizado em ciclos usando, como terminadores de cadeia, didesoxirribonucleotídeos marcados com fluorescência pelo *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit™* e *DNA Polymerase AmpliTaq FS™* (Perkin Elmer). O excesso de terminadores marcados foi eliminado por precipitação com etanol, conforme instruções do fabricante. Os produtos da extensão foram analisados por eletroforese capilar em um seqüenciador automático *ABI Prism 310 Genetic Analyser™* (Perkin Elmer) e as seqüências analisadas pelo *software ABI Sequencing*



*Analysis*<sup>TM</sup> (Perkin Elmer). Previamente aos procedimentos de seqüenciamento, 5 µL das PCRs foram tratados com 1 µL de exonuclease, por 15 minutos a 37°C, seguido de 15 minutos a 80°C para a degradação de *primers* e seqüências de DNA fita simples. Finalmente, 1 µL de fosfatase alcalina foi adicionado à reação para desfosforilação dos dNTPs remanescentes. A identidade dos fragmentos seqüenciados foi determinada por alinhamentos utilizando o programa BLAST (Altschul e cols., 1997) disponível na *homepage* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Buscando-se definir *primers* para a direta amplificação de seqüências de genes codificadores de quitinases de cevada e *Trichoderma* sp. por PCR, foram selecionadas as seguintes seqüências ortólogas de cevada disponíveis no EMBL/GenBank: L34210 (gene, 3.169 pb), L34211 (gene, 1.779 pb), M62904 (mRNA, 998 pb), U02287 (gene, 1.684 pb), X15349 (mRNA, 556 pb), X78671 (mRNA, 1.028 pb) e X78672 (mRNA, 1.013 pb). De forma semelhante, foram selecionadas as seguintes seqüências de *Trichoderma* sp.: AF050098 (gene, 1.935 pb), L14614 (mRNA, 1.554 pb), U49455 (mRNA, 1.473 pb), U88560 (gene, 4.024 pb) e Z71415 (gene, 1.485 pb). Entre as seqüências selecionadas, realizou-se o alinhamento das seqüências de cevada X78671, X78672, M62904, U02287 e L34211 e de *Trichoderma* sp. L14614, U49455, AF050098 e Z7141. A partir destes alinhamentos, regiões de alta homologia entre as seqüências foram identificadas e os *primers* definidos estão representados no Quadro 1.

O uso dos *primers* CHIT5'HOR e CHIT3'HOR em PCRs resultou na amplificação de dois fragmentos de aproximadamente 700 e 500 pb a partir de DNA total das cultivares MN-599 e MN-698 de cevada (Figura 3). Um único fragmento, com aproximadamente 500 pb, foi amplificado a partir do DNA total do isolado A4c de *Trichoderma* sp. utilizando-se os *primers* CHIT5'TRICH e CHIT3'TRICH (Figura 4). Os tamanhos esperados dos produtos das PCRs eram de 468 pb para cevada, e de 980 pb para *Trichoderma* sp. Portanto, um fragmento de tamanho esperado foi amplificado somente a partir do genoma de cevada (Figura 3).

Os dois fragmentos de DNA amplificados do genoma da cultivar MN-599 de cevada foram purificados dos géis de agarose e diretamente seqüenciados de forma manual e automática. No seqüenciamento manual, foi possível a leitura de 38 pb para ambos os fragmentos e no seqüenciamento automatizado foram obtidos 181 e 246 pb dos

fragmentos de aproximadamente 500 e 700 pb, respectivamente (Figura 5a-b). Do fragmento de 500 pb, amplificado do genoma do isolado A4c de *Trichoderma* sp., foram seqüenciados 207 pb de forma manual (Figura 5c). A identidade molecular das seqüências relativas aos fragmentos amplificados foi obtida a partir da busca de seqüências homólogas por meio do programa BLAST do NCBI.

Os fragmentos de 700 pb e 500 pb amplificados do genoma da cultivar MN-599 foram identificados como genes de quitinases de cevada, conforme demonstram os resultados ilustrados pelas Figuras 6 e 7. Portanto, embora o fragmento de 700 pb não tenha exibido o tamanho esperado após a PCR, o fato de representar seqüências de quitinases atesta a especificidade dos *primers* CHIT5'HOR e CHIT3'HOR.

O fragmento de 500 pb de cevada apresentou um alinhamento significativo, incluindo 174 de 181 nucleotídeos submetidos (96%), com o gene e mRNA da quitinase CHI26 de cevada (Figura 6). Estas seqüências, expressas especificamente em grãos de aleurona das sementes, foram identificadas e caracterizadas bioquímica e molecularmente por Leah e cols. (1991 e 1994), que indicaram que as quitinases de cevada são codificadas por uma família gênica contendo de 6 a 8 genes. Bliffeld e cols. (1999) introduziram a seqüência CHI26 em trigo e observaram um aumento de resistência das plantas transgênicas obtidas ao fungo *Erysiphe graminis*.

O fragmento de 700 pb de cevada apresentou alinhamento significativo com mRNAs das quitinases II, 2a e 2b de cevada (Figura 7). A seqüência do mRNA de quitinases II (*cht2*) foi identificada e caracterizada por Green (1991, Thesis: University of Cambridge) e Green e Bevan (EMBL/GenBank, resultados não publicados) em plantas de cevada infectadas com *Erysiphe graminis*. As seqüências 2a e 2b foram também isoladas de plantas infectadas com *Erysiphe graminis* por Bryngelsson e cols. (EMBL/GenBank, resultados não publicados).

Todas essas seqüências, CHI26, *chit2*, 2a e 2b, são classificadas como quitinases do tipo II, pertencentes à família 18, com representantes presentes também em fungos e bactérias (Capítulo 2), e produzidas em plantas após a infecção por patógenos (Rothe e cols., 1998). Outros estudos com quitinases e PRs de cevada foram relatados por Hejgaard e cols. (1992), Swegle e cols. (1992), Grenier e cols. (1992), Kragh e cols. (1993), Muradov e cols. (1993), Ignatius e cols. (1994), Mouradov e cols. (1994), Hollis e cols. (1997).

Diferentemente, o fragmento de 500 pb do isolado A4c de *Trichoderma* sp. não apresentou homologia com seqüências conhecidas de quitinases depositadas no EMBL/GenBank e, portanto, as definições de *primers* para a amplificação de genes *chit* de *Trichoderma* deverão ser revistas, pelo menos para a amplificação de genes sob as condições testadas. Dos 207 nucleotídeos seqüenciados e submetidos ao alinhamento BLAST (Figura 5), os resultados mais significativos incluíram o alinhamento de 42 nucleotídeos com uma seqüência de cDNA de *Botrytis cinerea* e 23 nucleotídeos com uma seqüência do clone RP11-504H3 de DNA humano. Ambas as seqüências não foram ainda identificadas quanto às suas funções.

Novas tentativas de amplificação de fragmentos de genes de quitinases de *Trichoderma* foram então realizadas. Para tanto, novos pares de *primers*, representando seqüências conservadas de quitinases do fungo *M. anisopliae*, foram utilizados (Quadro 1), resultando na amplificação de 3 fragmentos a partir do DNA total do isolado A4b de *Trichoderma* sp. (Figura 8). Estes fragmentos estão sendo purificados e reamplificados para futura realização de seqüenciamento.

Do sistema quitinolítico de *Trichoderma* sp. foram isoladas oito enzimas: uma exoquitinase, cinco endoquitinases (CHIT52, CHIT42, CHIT33, CHIT31) e duas N-acetil-quitinases (CHIT102, CHIT73), sendo que entre essas, foram clonados os respectivos genes das seqüências CHIT33, CHIT42 (ECH42) e CHIT73 (NAG1, Zellinger e cols., 1999). Outros estudos sobre quitinases de *Trichoderma* sp. incluem os de

Schirmböck e cols. (1994), Margolles-Clark e cols. (1996), Grondona e cols. (1997) e Cortes e

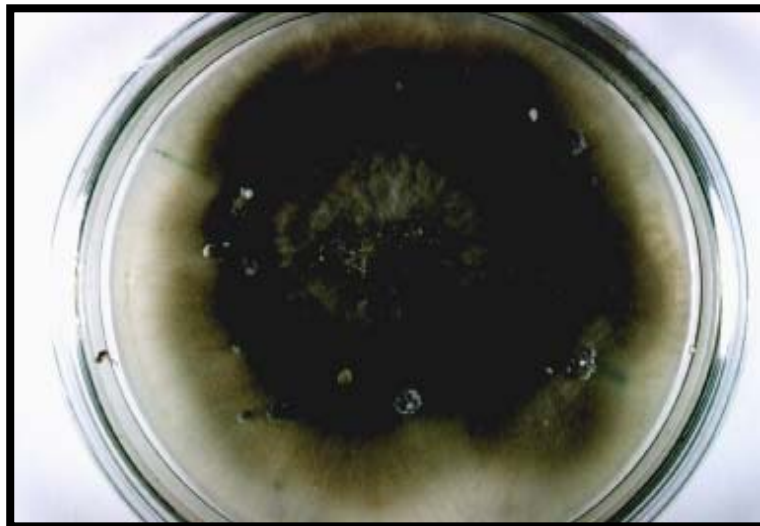
cols. (1998). Além dessas publicações, um importante trabalho é o de Lorito e cols. (1998) que introduziram o gene CHIT42 de *Trichoderma harzianum* em tabaco e batata, observando um aumento de resistência das plantas transgênicas regeneradas aos fitopatógenos fúngicos *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani*. Estes autores salientam que obtiveram espectro e nível de resistência muito superior pela expressão transgênica de um único gene de quitinase de *Trichoderma* do que de genes de quitinases de plantas e bactérias.

## **AGRADECIMENTOS**

À M.Sc. Alessandra Selbach e ao M.Sc. Marcelo Kemel Zago pelo auxílio nos seqüenciamentos manuais de DNA e ao Dr. Daniel Simon e Dr. Newton Portilho Carneiro pelo auxílio nos seqüenciamentos automatizados de DNA.



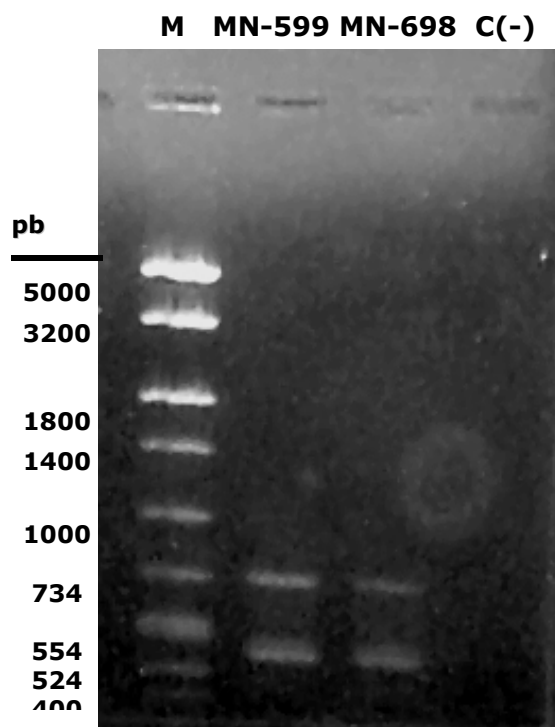
**Figura 1.** Fungo micopatogênico *Trichoderma* sp. isolado de folhas de cevada não infectadas com *B. sorokiniana* e caracterizado por Turqueti e cols. (2000). Placa de Petri de 10 cm de diâmetro.



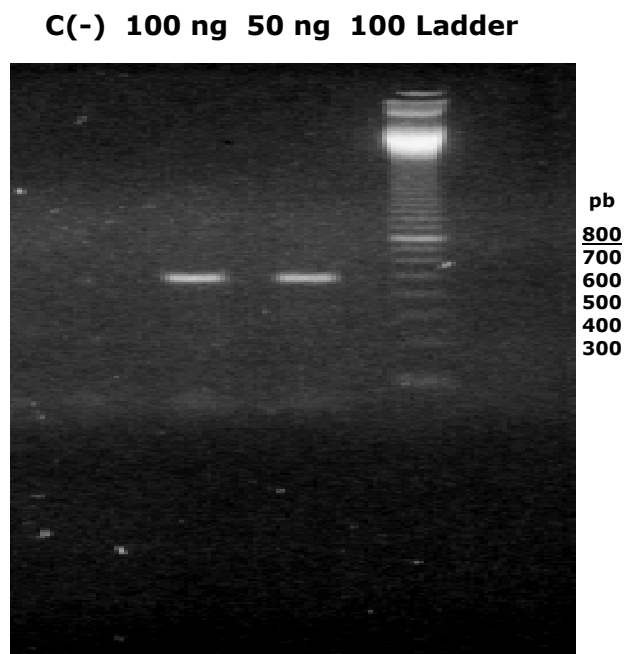
**Figura 2.** Fungo fitopatogênico *B. sorokiniana* isolado de folhas de cevada e caracterizado por

Turqueti e cols. (2000). Placa de Petri de 10 cm de diâmetro.





**Figura 3.** Amplificação de fragmentos relativos a genes *chit* de cevada. A imagem representa um gel de agarose 1% submetido à eletroforese após a aplicação dos produtos de PCR. DNA total de cevada MN-599 e MN-698 e os *primers* CHIT5'HOR e CHIT3'HOR foram utilizados nas reações. Fragmentos de aproximadamente 700 pb e 500 pb amplificados do genoma de cevada são visíveis no gel. C(-) = controle negativo (reação sem DNA-molde), M = marcador MM de tamanhos de fragmentos de DNA. Os tamanhos dos fragmentos estão representados à esquerda da imagem.



**Figura 4.** Amplificação de fragmento relativa a genes *chit* de *Trichoderma* sp. A imagem representa um gel de agarose 1% submetido à eletroforese após a aplicação dos produtos de PCR. DNA total (50 ng e 100 ng/50  $\mu$ L PCR) do isolado A4c e os primers CHIT5'TRICH e CHIT3'TRICH foram utilizados nas reações. Fragmento de aproximadamente 500 pb amplificado do genoma do isolado A4c de *Trichoderma* sp. é visível no gel. C(-) = controle negativo (reação sem DNA-molde), 100 Ladder = marcador de tamanhos de fragmentos DNA 100 Base-Pair Ladder (Amersham Biosciences).

(a)

1 ctcgatccca ccnttgatga tgttggtgat cacaccaaac ccgggcaccc  
 50  
 51 gccctgcggc ccggtcagcc cctgacgggc tccactggcc ggcgatcaca  
 100  
 101 gcatggctcg acggcttggg cggctgcgcc gtcatccaga accanatggc  
 150  
 151 cgtcttaaac gccacagtgg cgtccgtggc c

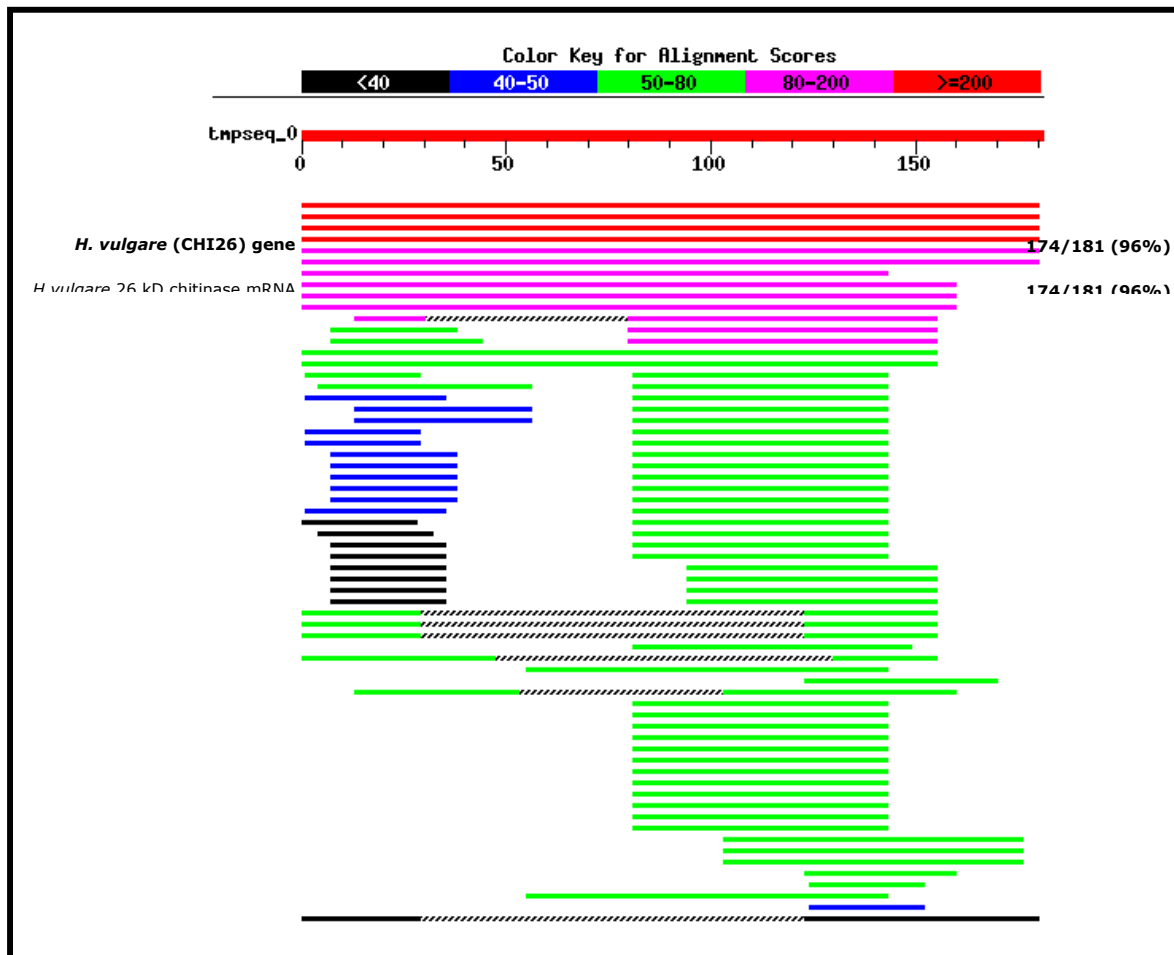
(b)

1 gtgtagtagc cgtgcgatcg acgttggcgt cgttctggcc catgccgcac  
 50  
 51 tcgagcccgc cgttgatgat attggtgatt acaccgtatc cnggaacccg  
 100  
 101 acctgcagct gtntcggcag gccgtcggcg tccagcggcc tagggcgacg  
 150  
 151 ttgtggctcg acggcttggt gccttgcgcc gtcatccaga accanatggc  
 200  
 201 ccgttctgaa ggacaccacc gcgtcngtgg acaccaggtc cggggt

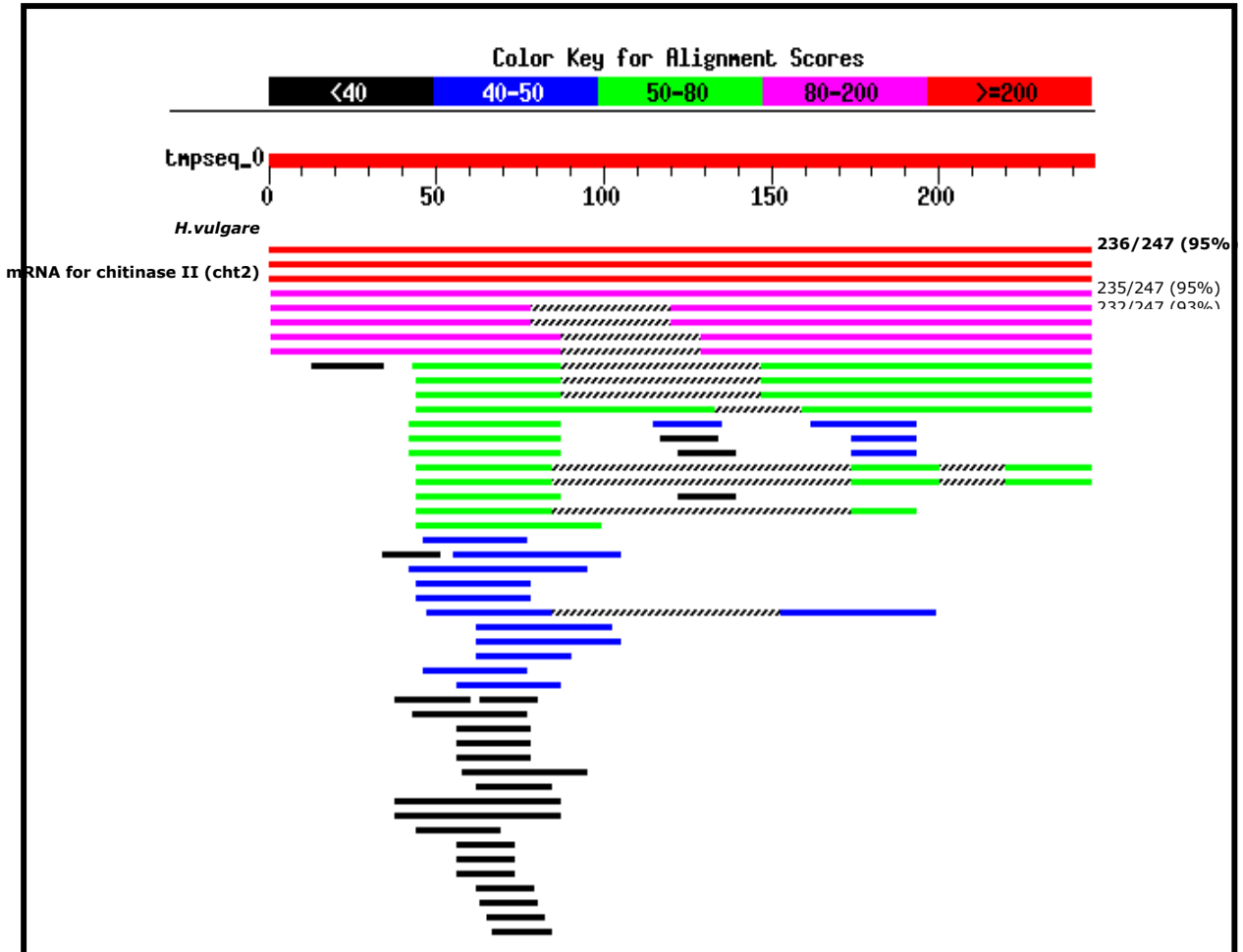
(c)

1 **ccgcggctcc gggggaagc tggtaacatcg gcggtcagga aaggaagggg**  
 50  
 51 **agagcggctg cgtctcggaa gggtcogtac agacagccag agaacttggc**  
 100  
 101 **agagtacgac atgagcaggg tcttgtgagc aattccctcc togatcaact**  
 150  
 151 **tgagcttgat agcacggata cggccatcat tcatgtcaga aggcgcaacg**  
 200  
 201 **cagtgtg**

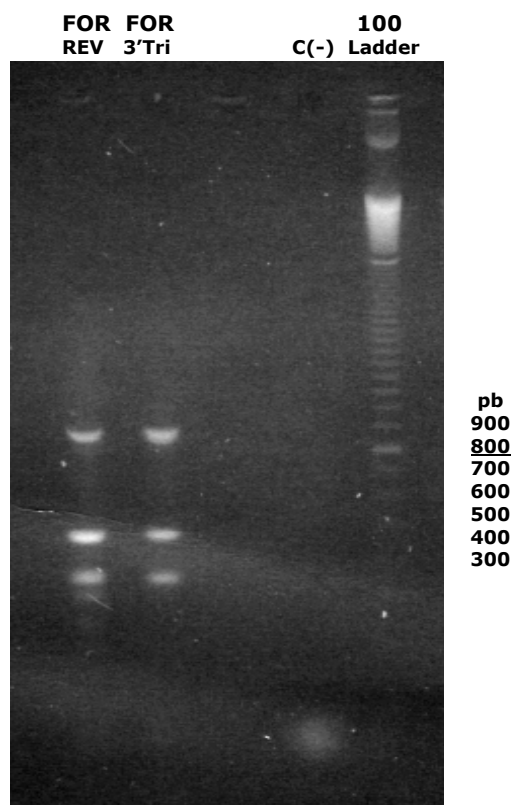
**Figura 5.** Resultado dos seqüenciamentos de nucleotídeos dos fragmentos de aproximadamente 500 pb (a) e 700 pb (b) amplificados por PCR do genoma da cultivar MN-599 de cevada e do fragmento de aproximadamente 500 pb (c)



**Figura 6.** Resultado da busca de seqüências ortólogas ao fragmento de 500 pb amplificado por PCR do genoma da cultivar MN-599 de cevada e alinhamento de seqüências do banco de dados do EMBL/GenBank utilizando o programa BLAST. O resultado confirma a identidade do fragmento como pertencente a gene de quitinase de cevada. Os valores representam o número de nucleotídeos comparados e a similaridade (>90%) das 2 seqüências que produziram os alinhamentos mais significativos.



**Figura 7.** Resultado da busca de seqüências ortólogas ao fragmento de 700 pb amplificado por PCR do genoma da cultivar MN-599 de cevada e alinhamento de seqüências do banco de dados do EMBL/GenBank utilizando o programa BLAST. O resultado confirma a identidade do fragmento como pertencente a gene de quitinase de cevada. Os valores representam o número de nucleotídeos comparados e a similaridade (>90%) das 3 seqüências que produziram os alinhamentos mais significativos.



**Figura 8.** Amplificação de fragmentos relativos a genes *chit* de *Trichoderma* sp. A imagem representa um gel de agarose 1% submetido à eletroforese após a aplicação dos produtos de PCR. DNA total do isolado A4b e os primers MACHITREV/MACHITFOR e MACHITREV/CHIT3TRICH foram utilizados nas reações. Fragmentos de aproximadamente 900 pb, 500 pb e 300 pb amplificados do genoma do isolado A4b de *Trichoderma* sp. são visíveis no gel. C(-) = controle negativo (reação sem DNA-molde), 100 Ladder=marcador de tamanhos de fragmentos DNA 100 Base-Pair Ladder (Amersham Biosciences).

## BIBLIOGRAFIA

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST e PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**, 25: 3389-3402, 1997.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRHUL, K. **Short Protocols in Molecular Biology**, John Wiley & Sons Inc., New York, 1994.
- BLIFFELD, M.; MUNDY, J.; POTRYKUS, I.; FÜTTERER, J. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. **Theoretical and Applied Genetics**, 98: 1079-1086, 1999.
- BOGO, M.R.; ROTA, C.A.; PINTO JR., H.; OCAMPOS, M.; CORREA, C.T.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full length cDNA. **Current Microbiology**, 37: 221-225, 1998.
- COLLINGE, D.B.; KRAGH, K.M.; MIKKELSEN, J.D.; NIELSEN, K.K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases (Mini-review). **The Plant Journal**, 3 (1): 31-40, 1993.
- CORTES, C.; GUTIERREZ, A.; OLMEDO, V.; INBAR, J.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by diffusible factor. **Mol. Gen. Genet.**, 260: 218-225, 1998.
- DATTA, K.; TU, J.; OLIVA, N.; ONA, I.; VELAZHAHAN, R.; MEW, T.W.; MUTHUKRISHNAN, S.; DATTA, S.K. Enhanced resistance to sheat blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. **Plant Science**, 160: 405-414, 2001.
- DOYLE, J.D.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 9 (1): 11-15, 1987.

- GAUER, L. **Variabilidade genética em populações naturais de erva-mate usando marcadores RAPD**. Porto Alegre: UFRGS. 1999. 80 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- GENETICS COMPUTER GROUP. Program manual for the GCG package, Version 8.11, August 1995, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin 53711, USA.
- GRENIER, J.; POTVIN, C.; ASSELIN, A. Barley pathogenesis-related proteins with fungal cell wall lytic activity inhibit the growth of yeasts. **Plant Physiology**, 103: 1277-1283, 1993.
- GRISSON, R.; GREZES-BESSET, B.; SCHNEIDER, M.; LUCANTE, N.; OLSEN, L.; LEGUAY, J.J.; TOPPAN, A. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. **Nature Biotechnology**, 14: 643-646, 1996.
- GRONDONA, I.; HERMOSA, R.; TEJADA, M.; GOMIS, M.D.; MATEOS, P.F.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E.; GARCIA-ACHA, I. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, 63 (8): 3189-3198, 1997.
- HEJGAARD, J.; JACOBSEN, S.; BJORN, S.E.; KRAGH, K.M. Antifungal activity of chitin-binding PR-4 type proteins from barley grain and stressed leaf. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS)**, 307 (3): 389-392, 1992.
- HOLLIS, T.; HONDA, Y.; FUKAMIZO, T.; MARCOTTE, E.; DAY, P.J.; ROBERTUS, J.D. Kinetic analysis of barley chitinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 344 (2): 335-342, 1997.
- IGNATIUS, S.M.J.; CHOPRA, R.K.; MUTHUKRISHNAN, S. Effects of fungal infection and wounding on the expression of chitinases and beta-1,3 glucanases in near-isogenic lines of barley. **Physiologia Plantarum**, 90 (3): 584-592, 1994.
- JACH, G.; GORNHARDT, B.; MUNDY, J.; LOGEMANN, J.; PINSORF, P.; LEAH, R.; SCHELL, J.; MAAS, C. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. **Plant Journal**, 8 (1): 97-109, 1995.



- KRAGH, K.M.; JACOBSEN, S.; MIKKELSEN, J.D.; NIELEN, K.A. Tissue specificity and induction of class I, II and III chitinases in barley (*Hordeum vulgare*). **Physiologia Plantarum**, 89: 490-498, 1993.
- LEAH, R.; SKRIVER, K.; KNUDSEN, S.; RUUDHANSEN, J.; RAIKHEL, N.V.; MUNDY, J. Identification of an enhancer silencer sequence directing the aleurone-specific expression of a barley chitinase gene. **Plant Journal**, 6 (4): 579-589, 1994.
- LEAH, R.; TOMMERUP, H.; SVENDSEN, I.; MUNDY, J. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. **The Journal of Biological Chemistry**, 266 (3): 1564-1573, 1991.
- LINTHORST, H.J.M.; van LOON, L.C.; van ROSSUM, C.M.A.; MAYER, A.; BOL, J.F.; van ROEKEL, J.S.C.; MEULENHOF, E.J.S.; CORNELISSEN, B.J.C. Analysis of acidic and basic chitinases from tobacco and petunia and their constitutive expression in transgenic tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 3 (4): 252-258, 1990.
- LORITO, M.; WOO, S.L.; FERNANDEZ, I.G.; COLUCCI, G.; HARMAN, G.E.; PINTOR-TORO, E.; MUCCIFORA, S.; LAWRENCE, C.B.; ZOINA, A.; TUZUN, S.; SCALA, F. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 95: 7860-7865, 1998.
- MARGOLLES-CLARK, E.; HAYES, C.K.; HARMAN, G.E.; PENTTILÄ, M. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**, 62 (6): 2145-2151, 1996.
- MOURADOV, A.; MOURADOVA, E.; SCOTT, K.J. Gene family encoding basic pathogenesis-related 1 proteins in barley. **Plant Molecular Biology**, 26: 503-507, 1994.
- MURADOV, A.; PETRASOVITS, L.; DAVIDSON, A.; SCOTT, K.J. A cDNA clone for pathogenesis-related protein 1 from barley. **Plant Molecular Biology**, 23: 439-442, 1993.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.

- PATIL, R.S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M.V. Chitinolytic enzymes: an exploration (review). **Enzyme and Microbial Technology**, 26: 473-483, 2000.
- READER, H.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Lett Applied Microbiology**, 1: 17-20, 1985.
- ROTHER, G.M.; WELSCHBILLING, N.; REISS, E. Molecular size and net charge of pathogenesis-related enzyme from barley (*Hordeum vulgare* L., v. Karat) infected with *Drechslera teres* f. *teres* (Sacch.) Shoem. **Electrophoresis**, 19 (5): 745-751, 1998.
- SCHIRMBÖCK, M.; LORITO, M.; WANG, Y-L.; HAYES, C.K.; ARISAN-ATAC, I.; SCALA, F.; HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**,
- SWEGLE, M.; KRAMER, K.J.; MUTHUKRISHNAN, S. Properties of barley seed chitinases and release of embryo-associated isoforms during early stages of imbibition. **Plant Physiology**, 99: 1009-1014, 1992.
- TAKATSU, Y.; NISHIZAWA, Y.; HIBI, T.; AKUTSU, K. Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). **Scientia Horticulturae**, 82 (1-2): 113-123, 1999.
- TURQUETI, A.A.; NONOHAY, J.S.; MATSUMURA, A.; WINGE, H. Detecção de antagonistas de *Bipolaris sorokiniana* da cevada como fonte de genes de resistência. **Anais da XX Reunião Anual de Pesquisa de Cevada**. Passo Fundo/RS: Embrapa Trigo, 2000.
- TURQUETI, A.A.; NONOHAY, J.S.; MATSUMURA, A.; WINGE, H. Testes *in vitro* de antagonismo entre *Trichoderma* sp. e *Bipolaris sorokiniana* da cevada. **Anais da XXI Reunião Anual de Pesquisa de Cevada**. Passo Fundo/RS: Embrapa Trigo, 2001.
- WORDELL F<sup>o</sup>, J.A.; PRESTES, A.M.; VALE, F.X.R. do; ARENDT, P.F. Reações de genótipos de cevada a *Bipolaris sorokiniana*. **Anais da XX Reunião Anual de Pesquisa de Cevada**. Passo Fundo/RS: Embrapa Trigo, 2000.

ZELLINGER, S.; GALHAUP, C.; PAYER, K.; WOO, S.L.; MACH, R.L.; FEKETE, C.; LORITO, M.; KUBICEK, C.P. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. **Fungal Genetics and Biology**, 26: 131-140, 1999.

## **CAPÍTULO 7**

### **DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

## Discussão geral

---

A transformação genética de cevada tem sido relatada em inúmeros trabalhos, inclusive com a produção de plantas transgênicas e introdução de transgenes de interesse (ver Capítulo 3). No entanto, estudos visando a transformação genética de cultivares sul-americanas de cevada não foram descritos até o momento. Desta forma, o presente trabalho visou realizar a transformação genética de cultivares brasileiras de cevada, utilizando o bombardeamento de partículas em culturas de calos derivados de escutelos imaturos das cultivares MN-599 e MN-698 (Cia. de Bebidas das Américas, AMBEV), além de identificar genes que potencialmente possam conferir resistência ao fungo patogênico da cevada *Bipolaris sorokiniana*. Autores como Wan e Lemaux (1994), Komari e cols. (1997) e Lörz e cols. (2000) descreveram que o uso da biobalística e de embriões imaturos como método e fonte de explantes constituem a combinação mais eficiente em experimentos de transformação genética de cereais, incluindo a cevada.

No desenvolvimento de protocolos de transformação genética, Birch (1997) cita como requerimentos essenciais para a obtenção de plantas transgênicas a viabilidade do tecido-alvo, incluindo células competentes para a transformação e regeneração de plantas, um método para introduzir DNA nestas células e um protocolo para selecionar e regenerar plantas transformadas em uma frequência satisfatória. Hunold (1994) destaca que a baixa eficiência de transformação genética requer um grande número de experimentos ou um protocolo de seleção e regeneração extremamente eficiente. Nesse sentido, os métodos de transformação genética geralmente envolvem o uso de procedimentos eficientes de cultura de tecidos, descritos na maioria dos trabalhos correntes, embora Birch (1997) e Hansen e Wright (1999), destaquem, também, que a cultura de tecidos não é um pré-requisito teórico para a transformação genética de plantas. Exemplos são os estudos de Chang e

cols. (1994) e Rohini e Sankara-Rao (2000) que relataram, respectivamente, a transformação genética das espécies *Arabidopsis thaliana* e *Arachis hypogaea* utilizando o método denominado transformação genética *in planta*. Este método é caracterizado pelo uso de agrobactérias infectando plantas antes do florescimento e a seleção de transformantes nas sementes resultantes, sem a necessidade de realização de cultura de tecidos.

O presente trabalho utilizou o protocolo de embriogênese somática para a regeneração de plantas dos tecidos bombardeados ajustado às cultivares brasileiras de cevada, também desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (Nonohay, 1996). Este protocolo apresentou bons resultados de indução de calos embriogênicos, embriões somáticos e regeneração de plantas a partir de escutelos imaturos de cultivares brasileiras de cevada. A frequência de calos com embriões somáticos e regeneração de plantas foi respectivamente de 71,9% e 60,9% para a cultivar BR-2 (EMBRAPA-CNPT) e 94,7% e 71,7% para a cultivar MN-599 (C.C. Brahma-Filial Maltaria Navegantes) nos melhores meios de cultura para cada cultivar (Nonohay e Winge, 1998).

Seguindo essa linha de pesquisa, as condições de transformação genética avaliadas nesta Tese de Doutorado incluíram a região promotora controlando a expressão do gene repórter *gusA*, dois aparelhos de bombardeamento empregando diferentes pressões de gás hélio, distâncias de migração das partículas, número de tiros disparados e realização de tratamento osmótico dos tecidos-alvo. As demais condições, como o tipo de partícula (tungstênio), as concentrações de espermidina, cloreto de cálcio e DNA e os valores de vácuo empregados (27-28 cm de mercúrio), foram utilizadas de forma constante, seguindo os protocolos de Finer e cols. (1992) e Rech e Aragão (1998), respectivamente, para os aceleradores de partículas "Particle Inflow Gun" (PIG) e "Biolistic".

Os experimentos de transformação genética foram primeiramente conduzidos na forma de análise da expressão transitória do gene repórter

*gusA*, por meio de ensaios histoquímicos de atividade da enzima GUS, realizados dois dias após os bombardeamentos. É importante lembrar que uma alta atividade transiente de transgenes não resulta, necessariamente, em integração dos mesmos no genoma vegetal. Além disto, Hunold e cols. (1994) observaram, por intermédio de análises histológicas, que as células injuriadas podem expressar transitoriamente o gene introduzido, embora não sejam mais capazes de crescer e dividir. Apesar destes fatores, a análise da expressão transitória é geralmente utilizada em trabalhos de transformação genética onde, inicialmente, são determinadas as condições mais eficientes de introdução e expressão transiente de transgenes para, depois, aplicá-las em estudos de transformação genética estável, especialmente por fornecer respostas de forma rápida e menos onerosa.

Os primeiros experimentos realizados apontaram como melhores condições para a transformação dos calos embriogênicos de cevada o uso do plasmídeo pNGI (Dave Somers, Universidade de Minnesota, EUA) e do acelerador de partículas PIG (Finer e cols., 1992), que emprega baixas pressões de gás hélio (60 psi, Capítulo 4). O plasmídeo pNGI, que apresenta o promotor e o primeiro íntron da álcool desidrogenase (*Adh*) de milho controlando a expressão do gene repórter *gusA*, promoveu níveis de atividade de GUS muito bons, diferentemente dos apresentados pelo plasmídeo pGusKan (Vom Endt e Pasquali, 1996), que apresenta o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (*CaMV*) direcionando a expressão de *gusA*.

O vetor utilizado para a introdução da seqüência de DNA nas células vegetais é um dos primeiros aspectos a ser considerado em trabalhos de transformação genética, independentemente do método empregado. As plantas são usualmente transformadas com construções relativamente simples que incluem um promotor, uma seqüência codificadora e um sinal de terminação. Estudos indicam que os promotores clonados geralmente retêm o nível de expressão dos genes nativos em tecidos transgênicos, embora a atividade dos mesmos possa

ser diferente de planta para planta, tornando a escolha das seqüências controladoras da expressão de transgenes de grande importância nos experimentos de transformação genética (Komari e cols., 1997).

O promotor *CaMV* 35S é um dos mais utilizados na transformação genética vegetal por direcionar altos níveis de expressão na maioria dos tecidos vegetais, especialmente de plantas dicotiledôneas. No nosso grupo de pesquisa, este promotor foi utilizado com bons resultados em soja (Droste, 2000) e arroz (Irala, 2002). Em cevada, o mesmo foi utilizado com sucesso ao ser associado ao primeiro íntron do gene *Adh* de milho, por Stiff e cols. (1995). Em concordância com o presente trabalho, diversos autores como Ortiz e cols. (1997), Brinch-Pedersen e cols. (1999) e Bassie e cols. (2000) relataram os promotores *Adh* e da ubiquitina (*Ubi*) de milho como mais eficientes do que o promotor *CaMV* 35S para expressão de transgenes em cereais. O promotor *Ubi*, associado ao primeiro íntron de *Adh* (plasmídeo pAHC25 - Christensen e Quail, 1996), também promoveu níveis elevados de expressão transiente de *gusA* em calos da cultivar MN-698 quando estes foram submetidos a dois bombardeamentos no aparelho PIG, a 14,8 cm de distância e submetidos a tratamento osmótico com manitol e sorbitol (dados não apresentados).

No uso dos aceleradores de projéteis PIG e Biolistic, valores semelhantes foram observados para os melhores resultados obtidos com ambos os bombardeadores (Tabela 1, Capítulo 4). Sendo assim, o aparelho de baixa pressão de gás hélio, PIG, foi o escolhido pelo fato deste equipamento causar danos menores aos tecidos bombardeados (Koprek e cols., 1996) e apresentar protocolo de execução mais simplificado. Em cevada, o uso de PIG foi somente relatado no presente trabalho e por Koprek e cols. (1996). Esses autores referidos utilizaram o aparelho PIG para transformar cultivares de cevada mais recalcitrantes à cultura de tecidos, sendo que para as cultivares responsivas, tal como o nosso estudo, foram observados valores semelhantes em PIG e PDS/1000-He Biolistic. Harwood e cols. (2000) avaliaram o efeito de diferentes aceleradores de partículas em estudos de transformação



genética em cevada. Os resultados desse trabalho indicaram o bombardeador de partículas PDS/1000-He (BioRad) como o mais adequado para transformar geneticamente embriões imaturos de cevada do que aparelhos de descarga elétrica do tipo Accell™ e um protótipo do aparelho Helios™ (BioRad). O bombardeador PDS/1000-He é o aparelho utilizado na maioria dos trabalhos de transformação genética de cevada, empregando-se geralmente 1.100 psi de pressão de gás hélio (Capítulo 3).

As condições de distância de migração das partículas, número de tiros disparados e tratamento osmótico dos tecidos-alvo foram, então, avaliadas utilizando-se culturas de calos derivados de escutelos imaturos da cultivar MN-698 bombardeadas com o plasmídeo pNGI no aparelho FIG. Essas condições foram analisadas quanto à expressão transiente de *gusA* e quanto aos seus efeitos na embriogênese somática. Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram não existir diferenças estatisticamente significativas na expressão transitória de *gusA* quanto às distâncias empregadas. Entretanto, essas análises mostraram efeito significativo do número de tiros disparados, onde 2 e 3 tiros resultaram em uma maior atividade transiente de GUS, sendo 2 tiros preferível a 3 tiros por causar menores danos aos tecidos e ser experimentalmente menos trabalhoso. Diferentemente, na indução de estruturas embriogênicas, foi observado efeito significativo da distância de migração das partículas e resultados estatisticamente semelhantes utilizando-se 1 ou 2 tiros. Estas observações indicaram que a condição aparentemente menos danosa aos tecidos, isto é, o uso de uma distância de 14,8 cm em FIG, não resulta em diferenças significativas na expressão transiente de *gusA*, e que a condição aparentemente mais danosa aos tecidos, isto é, o uso de 2 disparos, não influencia significativamente na embriogênese somática.

Um ponto crítico no uso da biobalística é o dano causado nos tecidos pelos bombardeamentos. Este efeito tem sido minimizado com a realização de plasmólise das células por tratamento osmótico. Segundo

Hunold e cols. (1994), o tratamento dos tecidos-alvo em meios de cultura com valores osmóticos altos pode aumentar a sobrevivência celular por reduzir a pressão de turgor, evitando o rompimento das células e liberação do citoplasma. Neste trabalho, essa condição foi analisada adicionando-se aos meios de cultura, ou não, 0,2 M de manitol e/ou 0,2 M de sorbitol. Os explantes foram mantidos nestes meios de cultura durante 4-5 horas antes e 17-19 horas depois dos bombardeamentos. Em concordância com vários trabalhos de transformação genética, tanto de monocotiledôneas como de dicotiledôneas, as observações deste trabalho indicaram que a realização de tratamento osmótico dos tecidos-alvo fornece melhores resultados nos experimentos de transformação genética, tanto em relação à expressão transiente quanto à cultura de tecidos (Capítulos 4 e 5). Em concordância com Vain e cols. (1993), o uso de 0,4 M de manitol e sorbitol determinou resultados significativamente melhores do que a utilização de 0,2 M de manitol ou sorbitol, provavelmente devido à maior concentração de agentes osmóticos nos meios de cultura.

Destaca-se que a análise estatística dos resultados do Capítulo 5 detectou interação significativa entre tratamento osmótico e número de tiros na expressão transiente de *gusA* e entre tratamento osmótico e distância de migração das partículas na indução de calos embriogênicos e embriões somáticos. Na atividade transitória de GUS os melhores resultados foram obtidos pela associação do disparo de dois tiros em tecidos submetidos a tratamento osmótico. Por outro lado, a indução de estruturas embriogênicas foi significativamente menor em explantes não submetidos a tratamento osmótico e bombardeados a 11,4 cm de distância.

Um aspecto muito importante na análise dos resultados obtidos nos experimentos de avaliação das condições de transformação foi a utilização do programa de análise de imagens Kontrom Elektronik Imaging System KS-100 v.2.0. Este programa permitiu a contagem de pontos azuis de atividade de GUS após ensaios histoquímicos nos

explantes de forma mais precisa, além de proporcionar a avaliação do número de pontos azuis por área dos calos ( $\text{mm}^2$ ). Esta análise forneceu resultados mais precisos, também, por corrigir a influência do tamanho dos calos nas respostas dos diferentes tratamentos.

Quanto ao uso de um protocolo para selecionar e regenerar plantas transformadas em uma freqüência satisfatória como descreveu Birch (1997), este trabalho obteve 51 plantas a partir de 264 calos bombardeados, resultando em uma eficiência de regeneração de plantas de 19,3% (Tabela 1, Capítulo 5). Destas plantas, 8 foram produzidas a partir de 72 calos bombardeados sem a utilização do plasmídeo pNGI, eficiência de 11,1%, e 43 plantas foram obtidas a partir de 192 calos bombardeados com pNGI, com eficiência de 22,4%. A partir de calos não bombardeados, foram obtidas 9 plantas, o que determina uma eficiência de regeneração de 23,7%, somente um pouco superior ao índice de regeneração dos calos bombardeados com pNGI.

A distância de migração das partículas, o número de tiros e a utilização de tratamento dos explantes com agentes osmóticos não apresentaram efeito significativo na regeneração de plantas, provavelmente devido aos pequenos valores observados em alguns tratamentos. Entretanto, em concordância com os resultados de atividade transiente de GUS e indução de estruturas embriogênicas, as condições de 14,8 cm de distância, dois disparos e a realização de tratamento osmótico resultaram no tratamento com maior número de plantas regeneradas (Tabela 1, Capítulo 5).

A seleção dos tecidos transformados, pela combinação de genes marcadores e agentes antibióticos, não foi realizada no presente trabalho. Diversos autores, como Fu e cols. (2000), Kuvshinov e cols. (2000), Sugita e cols. (2000), Hohn e cols. (2001) e Hileman (2002), têm discutido as vantagens da geração de plantas transgênicas livres de genes marcadores. Segundo estes autores, a aceitação pública das plantas transgênicas será maior quando estas apresentarem exclusivamente o gene de interesse como transgene integrado. Entre as

metodologias de geração de plantas transgênicas livres de genes marcadores está a direta regeneração de plantas após a transformação, limitando-se àqueles tecidos que exibem altos índices de regeneração.

Quanto à obtenção de transformantes estáveis de cevada, observamos um número bastante reduzido de setores azuis em amostras de calos submetidos a ensaios histoquímicos de GUS após 21 dias dos bombardeamentos (Tabela 1, Capítulo 5). Na análise das 43 plantas regeneradas a partir de calos bombardeados, somente 3 apresentaram atividade de GUS, determinando, a princípio, uma eficiência de 7%. Estas três plantas foram produzidas a partir do mesmo calo, bombardeado uma única vez, a 14,8 cm de distância sob uma pressão de gás de 60 psi (PIG). Diferentes aspectos como o silenciamento de transgenes (ver Capítulo 2) e reações de falso positivo tornam as análises moleculares necessárias para a determinação precisa de quais plantas apresentam transgenes integrados em seus genomas, e se as plantas obtidas tratam-se de transformantes independentes ou derivadas de uma mesma célula.

As atividades desenvolvidas em relação ao outro objetivo deste trabalho, isto é, a identificação de genes de quitinases visando a resistência ao fungo *B. sorokiniana*, apresentaram resultados ainda preliminares. Com o uso da reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR) e conjuntos de *primers* especificamente definidos para este grupo de genes, identificamos fragmentos de genes de quitinases a partir de DNA total de plantas de cevada da cultivar MN-599 e estamos buscando a identificação destes genes no genoma de isolados do fungo *Trichoderma* sp. No primeiro caso, visamos a aquisição de resistência por superexpressão de genes endógenos de cevada e, no segundo caso, pela introdução, em plantas de cevada, de genes do fungo micopatogênico *Trichoderma* sp., antagonista de *B. sorokiniana*.

O isolamento, caracterização e realização de testes de antagonismo entre os fungos fitopatogênico *B. sorokiniana* e micopatogênico *Trichoderma* sp. foram realizados pela aluna Adriana Turqueti Neves, em seu trabalho de Bacharelado em Ciências Biológicas,

Ênfase em Biologia Molecular, Celular e Funcional (UFRGS), sob a orientação das professoras Dra. Helga Winge e Dra. Aida Matsumura. Este trabalho foi desenvolvido juntamente ao presente estudo, sendo por este motivo que o primeiro isolado de *Trichoderma* sp. estudado, A4c, foi escolhido aleatoriamente entre os 12 isolados obtidos e posteriormente o isolado A4b foi escolhido por ter se mostrado o mais eficiente, em média, nos testes de antagonismo *in vitro* contra os 21 isolados de *B. sorokiniana*, de acordo com os resultados de Turqueti-Neves (2002). Adicionalmente, estudos de microscopia óptica e eletrônica estão sendo realizados pela aluna Adriana Turqueti Neves visando à identificação da espécie de *Trichoderma* dos isolados obtidos.

## Conclusões e Perspectivas

---

Apesar dos grandes avanços obtidos no melhoramento genético da cevada, as cultivares brasileiras são ainda deficientes em determinadas características almejadas no tipo ideal para as regiões de cultivo no País (Minella, 1999; Minella, 2001). Entre essas, uma característica especialmente desejada é a resistência aos fungos *B. sorokiniana* e *Blumeria graminis tritici*, causadores, respectivamente, das moléstias mancha-marrom e oídio em cevada. A aquisição de resistência a estes patógenos tem se mostrado de difícil alcance uma vez que não existem fontes de genes disponíveis para o melhoramento genético convencional. Neste sentido, o desenvolvimento da transformação genética de cultivares brasileiras de cevada apresenta-se como um importante método de melhoramento genético, por superar a incompatibilidade sexual entre as espécies e poder dispor e introduzir genes de organismos não relacionados. Além disso, a transferência direta de um ou poucos genes, especialmente quando se trata de um alelo mais eficiente do que os encontrados na espécie, dificilmente causariam desequilíbrio ou perturbação no genótipo dessa espécie.

Os avanços obtidos pelo nosso grupo de pesquisa incluem a determinação de protocolos eficientes de regeneração de plantas por embriogênese somática e de transformação genética por bombardeamento de partículas. Adicionalmente, o isolamento e a caracterização do fungo fitopatogênico *B. sorokiniana* e micopatogênico *Trichoderma* sp. foram obtidos visando o isolamento de gene(s) de resistência ao primeiro.

A combinação dos resultados descritos na presente Tese de Doutorado determina as condições de 14,8 cm de distância de migração das partículas, 2 disparos por placa e a realização de tratamento osmótico dos explantes com 0,2 M de manitol e 0,2 M de sorbitol 4-5 horas antes e 17-19 horas após os bombardeamentos, como as melhores

na transformação genética de culturas de calos de escutelos imaturos de cultivar brasileira de cevada por PIG.

As perspectivas desta linha de pesquisa residem na obtenção de plantas transgênicas de cevada a partir de tecidos transformados, na identificação, caracterização e isolamento de gene(s) de quitinase(s) que potencialmente possa(m) conferir resistência à mancha-marrom da cevada, além do estudo do padrão de integração, expressão e segregação dos transgenes introduzidos. A partir de então, será possível a realização de experimentos na tentativa de introduzir o mais interessante desses genes de resistência a *B. sorokiniana* em cultivares brasileiras de cevada e contribuir, desta forma, para o melhoramento genético desta importante cultura.

**BIBLIOGRAFIA**  
**dos capítulos 1, 2 e 7**



- ASSMANN, E.M. **Sucetibilidade de plântulas e plantas adultas de cevada (*Hordeum vulgare* L.) à *Agrobacterium tumefaciens***. Porto Alegre: UFRGS. 1993. 60 p. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas – Ênfase Genética) Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S.P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, 276: 726-733, 1997.
- BASSIE, L.; NOURY, M.; LEPRI, O.; LAHAYE, T.; CHRISTOU, P.; CAPELL, T. Promoter strength influences polyamine metabolism and morphogenic capacity in transgenic rice tissues expressing the oat *adc* cDNA constitutively. **Transgenic Research**, 9: 33-42, 2000.
- 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**, 18: 301-313, 1992.
- BIRCH, R.G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Reviews: Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 48: 297-326, 1997.
- BLIFFELD, M.; MUNDY, J.; POTRYKUS, I.; FÜTTERER, J. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. **Theoretical and Applied Genetics**, 98: 1079-1086, 1999.
- BOHOROVA, N.; ZHANG, W.; JULSTRUM, P.; McLEAN, S.; LUNA, B.; BRITO, R.M.; DIAZ, L.; RAMOS, M.E.; ESTANOL, P.; PACHECO, M.; SALGADO, M.; HOISINGTON, D. Production of transgenic tropical maize with *cryIAb* and *cryIAc* genes via microprojectile bombardment of immature embryos. **Theoretical and Applied Genetics**, 99: 437-444, 1999.
- BOTHMER, R. von; JACOBSEN, N.; BADEN, C.; JORGENSEN, R.B.; LINDELAURSEN, I. **An ecogeographical study of genus *Hordeum***. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools. 7. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 1995.
- BRAMELD, K.A.; GODDARD III, W.A. The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 95: 4276-4281, 1998.

- BRASILEIRO, A.C.M.; ARAGÃO, F.J.L.; ROSSI, M.S.; DUSI, D.M.A; BARROS, L.M.G.; RECH, E.L. Suceptibility of common and terapy beans to *Agrobacterium* spp. atrais and improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation using microprojete bombardment. **Journal of American Society for Horticultural Science**, 121: 810-815, 1996.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Eds.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. p. 75-92.
- BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1999. 2v., 510, 354p.
- BRETTSCHEIDER, R.; BECKER, D.; LÖRZ, H. Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. **Theoretical and Applied Genetics**, 94: 737-748, 1997.
- BRINCH-PEDERSEN, H.; OLSEN, O.; KNUDSEN, S.; HOLM, P.B. An evaluation of feed-back insensitive aspartate kinase as a selectable marker for barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation. **Hereditas**, 131 (3): 239-245, 1999.
- BUSHNELL, W.R.; SOMERS, D.A.; GIROUX, R.W.; SZABO, L.J.; ZEYEN, R.J. Genetic engineering of disease resistance in cereals. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 20 (2): 137-220, 1998.
- CARNEIRO, A.A.; CARNEIRO, N.P.; CARVALHO, C.H.S.; VASCONSELOS, M.J.V.; PAIVA, E.; LOPES, M.A. Milho transgênico: melhoria da qualidade nutricional do grão. **Biotecnologia**, ano III, n. 15, p. 42-46, julho/agosto, 2000.
- CHANG, S.S.; PARK, S.K.; KIM, B.C.; KANG, B.J.; KIM, D.U. Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation *in planta*. **The Plant Journal**, 5: 551-558, 1994.
- CHRISTENSEN, A.H.; QUAIL, P.H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. **Transgenic Research**, 5: 213-218, 1996.
- CHRISTOU, P. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. **Euphytica**, 85: 13-27, 1995.

- COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion in Biotechnology**, 9: 270-277, 1998.
- COLLINGE, D.B.; KRAGH, K.M.; MIKKELSEN, J.D.; NIELSEN, K.K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases (mini-review). **The Plant Journal**, 3 (1): 31-40, 1993.
- COMAI, L.; FACCIOTTI, D.; HIATT, W.R.; THOMPSON, G.; ROSE, R.E.; STALKER, D.M. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. **Nature**, 317: 741-744, 1985.
- CORTES, C.; GUTIERREZ, A.; OLMEDO, V.; INBAR, J.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by diffusible factor. **Mol. Gen. Genet.**, 260: 218-225, 1998.
- DASSI, B.; DUMAS-GAUDOT, E.; ASSELIN, A.; RICHARD, C.; GIANINAZZI, S. Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase isoforms expressed in pea roots inoculated with arbuscular mycorrhizal or pathogenic fungi (short communication). **European Journal of Plant Pathology**, 102: 105-108, 1996.
- DATTA, K.; TU, J.; OLIVA, N.; ONA, I.; VELAZHAHAN, R.; MEW, T.W.; MUTHUKRISHNAN, S.; DATTA, S.K. Enhanced resistance to sheat blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. **Plant Science**, 160: 405-414, 2001.
- DE BLOCK, M.; BOTTERMAN, J.; VANDEWIELE, M.; DOCKX, J.; THOEN, C.; GOSSELÉ, V.; MOVVA, N.R.; THOMPSON, C.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. **EMBO Journal**, 6 (9): 2513-2518, 1987.
- 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**, 95: 125-131, 1997.
- DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Integrated bombardment and Agrobacterium transformation system: an alternative method for soybean transformation. **Plant Molecular Biology Reporter**, 18: 51-59, 2000.

- DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Transgenic fertile plants of soybean cultivars (*Glycine max* (L.) Merrill) obtained from bombarded embryogenic tissue. **Euphytica**, no prelo.
- EL RABEY, H. ; SALAMINI, F. Domestication history of barley (*H. vulgare*) and phylogenetic relationships in the genus *Hordeum*. In: LOGUE, S. (Ed.). **Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Barley Genetics Symposium**. 2000. p. 32-35.
- EPPLER, P.; APEL, K.; BOHLMANN, H. Over-expression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. **Plant Cell**, 9: 509-520, 1997.
- ESTRUCH, J.J.; CAROZZI, N.B.; DESAI, N.; DUCK, N.B.; WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, 15: 137-141, 1997.
- FINER, J.J.; VAIN, P.; JONES, M.W.; Mc MULLEN, M.D. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. **Plant Cell Reports**, 11: 323-328, 1992.
- FISK, H.J.; DANDEKAR, A.M. The introduction and expression of transgenes in plants. **Scientia Horticulturae**, 55: 5-36, 1993.
- FLACH, J.; PILET, P.E.; JOLLÈS, P. What's new in chitinase research? (review). **Experimentia**, 48: 701-715, 1992.
- FORCELINI, C.A.; REIS, E.M. Doenças da cevada. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM F<sup>o</sup>, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.). **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. Ceres, 1997. 3<sup>a</sup> Ed., 2v., p. 251-256.
- FRANKEN, E.; TEUSCHEL, U.; HAIN, R. Recombinant proteins from transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology**, 8: 411-416, 1997.
- FRIEDT, W.; WERNER, K.; ORDON, F. Genetic progress as reflected in highly successful and productive modern barley cultivars. In: LOGUE, S. (Ed.). **Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Barley Genetics Symposium**. 2000. p. 271-279.
- FRITIG, B.; HEITZ, T.; LEGRAND, M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Current Opinion in Immunology**, 10: 16-22, 1998.

- 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**, 9: 11-19, 2000.
- FU, X.; KOHLI, A.; TWYMAN, R.M.; CHRISTOU, P. Alternative silencing effects involve distinct types of non-spreading cytosine methylation at a three-gene, single-copy transgenic locus in rice. **Mol. Gen. Genet.**, 263: 106-118, 2000.
- GELVIN, S.B. The introduction and expression of transgenes in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, 9: 227-232, 1998.
- 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**, 152: 151-157, 1998.
- GRANT, S.R. Dissecting the mechanisms of posttranscriptional gene silencing: divide and conquer. **Cell**, 96: 303-306, 1999.
- GRISSON, R.; GREZES-BESSET, B.; SCHNEIDER, M.; LUCANTE, N.; OLSEN, L.; LEGUAY, J.J.; TOPPAN, A. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. **Nature Biotechnology**, 14: 643-646, 1996.
- GROVER, A.; SAHI, C.; SANAN, N.; GROVER, A. Taming abiotic stresses in plants through genetic engineering: current strategies and perspective. **Plant Science**, 143: 101-111, 1999.
- HAGIO, T. Optimizing the particle bombardment method for efficient genetic transformation. **JARQ**, 32: 239-247, 1998.
- HAIN, R.; REIF, H-J.; KRAUSE, E.; LANGEBARTELS, R.; KINDL, H.; VORNAM, B.; WIESE, W.; SCHMELZER, E.; SCHREIER, P.H.; STÖCKER, R.H.; STENZEL, K. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. **Nature**, 361: 153-156, 1993.
- HANCOCK, J.K. **Plant evolution and the origin of crop species**. New Jersey: Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, 1992. 305p.

- HÄNSCH, R.; MENDEL, R.R.; SCHULZE, J. A rapid and sensitive method to evaluate genotype specific tolerance to phosphinothricin-based selective agents in cereal transformation. **Journal of Plant Physiology**, 152: 145-150, 1998.
- HANSEN, G.; WRIGHT, M.S. Recent advances in the transformation of plants. **Plant Science**, 4 (6): 226-231, 1999.
- HARLAN, J.R. On the origin of barley. In: **Barley: origin, botany, culture, winterhardiness, genetics, utilization and pests**. USDA-ARS Agricultural Handbook, n. 338, 1979.
- HARRABI, M. Breeding for resistance to the major fungal leaf pathogens of barley. In: SLINKARD, A.; SCOLES, G.; ROOSSNAGEL, B. (Eds.). **V International Oat Conference & VII International Barley Genetics Symposium**. 1996. p. 438-439.
- HARWOOD, W.A.; ROSS, S.M.; CILENTO, P.; SNAPE, J.W. The effect of DNA/gold particle preparation technique, and particle bombardment device, on the transformation of barley (*Hordeum vulgare*). **Euphytica**, 111: 67-76, 2000.
- HERBERS, K.; SONNEWALD, U. Production of new/modified proteins in transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology**, 10: 163-168, 1999.
- HERRERA-ESTRELA, A.; CHET, I. Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. In: ALTMAN, A. (Ed.). **Agricultural Biotechnology**. 1998. p. 263-282.
- HERRERA-ESTRELLA, L.; TEERI, T.H.; SIMPSON, J. Use of reporter genes to study gene expression in plant cells. **Plant Molecular Biology Manual**. 1998. v. B1, p. 1-22.
- HERRISAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosil hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, 293: 781-788, 1993.
- HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium*. Int. Patent WO 94/00977, 1994.
- HILEMAN, B. What's hiding in transgenic foods? **Chemical & Engineering News**, january 7, p. 20-22, 2002.

- HOLM, L.; SANDER, C. Structural similarity of plant chitinase and lysozymes from animals and phage. **FEBS Letters**, 340: 129-132, 1994.
- HOLMES-DAVIS, R.; COMAI, L. Nuclear matrix attachment regions and plant gene expression. **Trends in Plant Sciences**, 3 (3): 91-96, 1998.
- HOHN, B.; LEVY, A.A.; PUCHTA, H. Elimination of selection markers from transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology**, 12: 139-143, 2001.
- HUNOLD, R.; BRONNER, R.; HAHNE, G. Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. **The Plant Journal**, 5 (4): 593-604, 1994.
- INBAR, J.; CHET, I. Lectins and biocontrol. **Critical Reviews in Biotechnology**, 17 (1): 1-20, 1997.
- IRALA, P. B. **Transformação genética de *Oryza sativa* subespécie indica cultivar BR-IRGA 409**. Porto Alegre: UFRGS. 2002. 107 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- JACH, G.; GORNHARDT, B.; MUNDY, J.; LOGEMANN, J.; PINSORF, P.; LEAH, R.; SCHELL, J.; MAAS, C. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. **The Plant Journal**, 8 (1): 97-109, 1995.
- JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.W. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, 6 (13): 3901-3907, 1987.
- KOMARI, T.; HIEI, Y.; ISHIDA, Y.; KUMASHIRO, T.; KUBO, T. Advances in cereal gene transfer. **Current Opinion in Plant Biology**, 1: 161-165, 1998.
- KONCZ, C.; LANGRIDGE, W.H.R.; OLSSON, O.; SCHELL, J.; SZALAY, A.A. Bacterial and firefly luciferase genes in transgenic plants: advantages and disadvantages of a reporter gene. **Developmental Genetics**, 11: 224-232, 1990.
- KOPREK, T., HÄNSCH, R., NERLICH, A., MENDEL, R., SCHULZE, J. Fertile transgenic barley of different cultivars obtained by adjustment of bombardment conditions to tissue response. **Plant Science**, 119: 79-91, 1996.

- KRAGH, K.M.; JACOBSEN, S.; MIKKELSEN, J.D.; NIELSEN, K.A. Tissue specificity and induction of class I, II and III chitinases in barley (*Hordeum vulgare*). **Physiologia Plantarum**, 89: 490- 498, 1993.
- KUMAR, S.; FLADUNG, M. Controlling transgene integration in plants. **Trends in Plant Sciences**, 6 (4): 155-159, 2001.
- KUVSHINOV, V.; KOIVU, K.; KANERVA, A.; PEHU, E. Molecular control of transgene escape from genetically modified plants. **Plant Science**, 160: 517-522, 2001.
- LEAH, R.; TOMMERUP, H.; SVENDSEN, I.; MUNDY, J. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. **J. Biol. Chem.**, 266: 1564-1573, 1991.
- LECKBAND, G., LÖRZ, H. Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, 96 (8): 1004-112, 1998.
- LODGE, J.K.; KANIEWSKI, W.K.; TUMER, N.E. Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 90: 7089-7093, 1993.
- LORITO, M.; WOO, S.L.; FERNANDEZ, I.G.; COLUCCI, G.; HARMAN, G.E.; PINTOR-TORO, E.; MUCCIFORA, S.; LAWRENCE, C.B.; ZOINA, A.; TUZUN, S.; SCALA, F. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 95: 7860-7865, 1998.
- LÖRZ, H.; SERAZETDINOVA, L.; LECKBAND, G.; LÜTTICKE, S. Transgenic barley – a journey with obstacles and milestones. In: LOGUE, S. (Ed.). **Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Barley Genetics Symposium**. 2000. p. 189-193.
- LUIZZI, D.V.; CASTRO, A.J. Variabilidade genética, su aporte al desarrollo del cultivo de cebada en el Uruguay. Trabajo presentado a la Segunda Reunión Nacional de Investigadores en Cebada Cervecera, 21-23/05/1991, La Estanzuela, Colonia, Uruguay (Publicação avulsa).
- MARIS, A.F. **Caracterização isoenzimática de cultivares brasileiras de cevada (*Hordeum vulgare* L.)**. Porto Alegre: UFRGS. 1992. 107 p. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas - ênfase Genética) Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



- MATSUMURA, A.T.S. **Variabilidade intraespecífica quanto a patogenicidade, características de cultura e padrão isoesterásico em populações naturais de *Bipolaris sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*)**. Porto Alegre: UFRGS. 1991. 262 p. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- MATZKE, A.J.M.; MATZKE, M.A. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. **Current Opinion in Plant Biology**, 1: 142-148, 1998.
- McCREATH, K.J.; SPECHT, C.A.; ROBBINS, P.W. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 92: 2544-2548, 1995.
- METZ, P.L.J.; NAP, J.P. A transgene-centred approach to the biosafety of transgenic plants: overview of selection and reporter genes. **Acta Botanica Neerl**, 46: 25-50, 1997.
- MEYER, P. The role of chromatin remodeling in transgene silencing and plant development. **In Vitro Cell and Development Biology/Plant**, 35:29-36, 1999.
- MINELLA, E. Melhoramento da cevada. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 252-272.
- MINELLA, E. Safra brasileira de cevada de 1999. **Anais da XX Reunião Anual de Pesquisa de Cevada**. Passo Fundo/RS: Embrapa Trigo, 2000. 420p.
- MINELLA, E. **Cevada cervejeira**: características e desempenho agrônômico das cultivares indicadas para a Região Sul. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 8 p. html. 11 tab. (Embrapa Trigo. Circular Técnica Online; 4). Disponível: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_ci04.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_ci04.htm).
- NIEDZ, R.P.; SUSSMAN, M.R.; SATTERLEE, J.S. Green fluorescent protein: an *in vivo* reporter of plant gene expression. **Plant Cell Reports**, 14: 403-406, 1995.
- NONOHAY, J.S. de **Embriogênese somática e regeneração de plantas férteis em cultivares brasileiras de cevada, *Hordeum vulgare vulgare*, Poaceae**. Porto Alegre: UFRGS. 1996. 87 p. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- NONOHAY, J.S.; WINGE, H. Análise de componentes críticos de meios de cultura para embriogênese somática em cevada. *Genetics and Molecular Biology*, 21 (3), supplement, p. 221, 1998.
- OMERO, C.; INBAR, J.; ROCHA-RAMIREZ, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; CHET, I.; HORWITZ, B.A. G protein activators and cAMP promote mycoparasitic behaviour in *Trichoderma harzianum*. ***Mycol. Res.***, 103 (12): 1637-1642, 1999.
- ORTIZ, J.P.; RAVIZZINI, R.A.; MORATA, M.M.; VALLEJOS, R.H. A rapid system for studying foreign gene expression in wheat (*Triticum aestivum* L.). ***Journal of Applied Genetics***, 38 (2): 123-130, 1997.
- PATIL, R.S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M.V. Chitinolytic enzymes: an exploration (review). ***Enzyme and Microbial Technology***, 26: 473-483, 2000.
- PAWLOWSKI, W.P.; SOMERS, D.A. Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. ***Molecular Biotechnology***, 6 (1): 17-30, 1996.
- PEETERS, J.P. The emergence of new centers of diversity: evidence from barley. ***Theoretical and Applied Genetics***, 76: 327-378, 1988.
- RECH, E.L.; ARAGÃO, J.L.C. **Biobalística**. In: Manual de transformação de plantas. BRASILEIRO ACM, CARNEIRO VTC. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargem, 309 p., 1998.
- ROHINI, V.K; SANKARA RAO, K. Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.): a non-tissue culture based approach for generating transgenic plants. ***Plant Science***, 150: 41-49, 2000.
- ROMMENS, C.M.T.; SALMERON, J.M.; OLDROYD, G.E.D.; STASKAWICZ, B.J. Intergeneric transfer and functional expression of the tomato disease resistance gene *Pto*. ***Plant Cell***, 7: 1537-1544, 1995.
- SALMERON, J.M.; VERNOOIJ, B. Transgenic approaches to microbial disease resistance in crop plants. ***Current Opinion in Plant Biology***, 1: 347-352, 1998.
- SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. ***Mycology Research***, 100 (8): 923-935, 1996.

- SANFORD, J.C. Biolistic plant transformation. **Physiologia Plantarum**, 79: 206-209, 1990.
- SANFORD, J.C.; KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; ALLEN, N. delivery of substances into cells and tissues using particle bombardment process. **J. Part. Sci. Tech.**, 5: 27-31, 1987.
- SANFORD, J.C.; SMITH, F.D.; RUSSELL, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzymology**, 217: 483-509, 1993.
- SENIOR, I.J. Uses of plant gene silencing. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 15: 79-119, 1998.
- SIVAMANI, E.; BAHIELDIN, A.; WRAITH, J.M.; AL-NIEMI, T.; DYER, W.E.; HO, T-H. D.; QU, R. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. **Plant Science**, 155: 1-9, 2000.
- STARK-LORENZEN, P.; NELKE, B.; HÄNSSLER, G.; MÜHLBACH, H.P.; THOMZIK, J.E. Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Reports**, 16: 668-673, 1997.
- SUGITA, K.; KASAHARA, T.; MATSUNAGA, E.; EBINUMA, H. A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. **The Plant Journal**, 22 (5): 461-469, 2000.
- TAKAYA, N.; YAMAZAKI, D.; HORIUCHI, H.; OHTA, A.; TAKAGI, M. Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. **Bioscience Biotechnology Biochemical**, 62 (1): 60-65, 1997.
- TANG, K.; TINJUANGJUN, P.; XU, Y.; SUN, X.; GATEHOUSE, J.A.; RONALD, P.C.; QI, H.; LU, X.; CHRISTOU, P.; KOHLI, A. Particle-bombardment-mediated co-transformation of elite Chinese rice cultivars with genes conferring resistance to bacterial blight and sap-sucking insect pests. **Planta**, 208: 552-563, 1999.

- TERRAS, F.R.G.; EGGERMONT, K.; KOVALEVA, V.; RAIKHEL, N.V.; OSBORN, R.W.; KESTER, A.; REES, S.B.; TORREKENS, S.; VAN LEUVEN, F.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B.P.A.; BROEKAERT, W.F. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. **Plant Cell**, 7: 573-588, 1995.
- TINLAND, B. The integration of T-DNA into plant genomes. **Trends in Plant Sciences**, 1: 179-184, 1996.
- TORRES, E.; VAQUERO, C.; NICHOLSON, L.; SACK, M.; STÖGER, E.; DROSSARD, J.; CHRISTOU, P.; FISCHER, R.; PERRIN, Y. Rice cell culture as an alternative production system for functional diagnostic and therapeutic antibodies. **Transgenic Research**, 8: 441-449, 1999.
- TRIFONOVA, A.; MADSEN, S.; OLESEN, A. *Agrobacterium*-mediated transgene delivery and integration into barley under a range of *in vitro* culture conditions. **Plant Science**, 161 (5): 871-880, 2001.
- TURQUETI-NEVES, A. **Isolamento e caracterização dos fungos *Bopolaris sorokiniana* e *Trichoderma* sp., patógeno da cevada e antagonista, e sua interação negativa.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de Bacharelado em Ciências Biológicas, Ênfase Molecular, Celular e Funcional. 2002.
- VAIN, P.; MCMULLEN, M.D.; FINER, J.J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cell Reports**, 12: 84-88, 1993.
- VAN DEN ELZEN, P.J.M.; TOWNSEND, J.; LEE, K.Y.; BEDBROOK, J.R.A. Chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. **Plant Molecular Biology**, 5: 299-305, 1985.
- VASIL, I.K. Molecular improvement of cereals. **Plant Molecular Biology**, 25: 925-937, 1994.
- VOM ENDT, D.; PASQUALI, G. Design and construction of plasmid vectors for plant transformation. **Brazilian Journal of Genetics**, 19 (3): 317, 1996.
- WALDEN, R.; WINGENDER, R. Gene-transfer and plant regeneration techniques. **Tibtech**, 13: 324-331, 1995.
- WAN, Y.; LEMAUX, P. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. **Plant Physiology**, 104: 37-48, 1994.

WORDELL F<sup>o</sup>, J.A.; PRESTES, A.M.; VALE, F.X.R. do; ARENDT, P.F. Reações de genótipos de cevada a *Bipolaris sorokiniana*. **Anais da XX Reunião Anual de Pesquisa de Cevada**. Passo Fundo/RS: Embrapa Trigo, 2000. 420p.

YUAN, L.; KNAUF, V.C. Modification of plants components. **Current Opinion in Biotechnology**, 8: 227-233, 1997.

## RESUMO

A presente Tese de Doutorado objetivou: (1) definir um método eficiente de transformação genética, por bombardeamento de partículas, para a obtenção de plantas transgênicas de cultivares brasileiras de cevada e (2) identificar gene(s) codificante(s) de quitinase(s) potencialmente capaz(es) de conferir resistência ao fungo patogênico de cevada *Bipolaris sorokiniana*. Culturas de calos obtidos a partir de escutelos imaturos das cultivares Brasileiras de cevada MN-599 e MN-698 (Cia. de Bebidas das Américas, AMBEV) foram bombardeadas com partículas de tungstênio e avaliadas quanto à expressão do gene repórter *gusA* através de ensaios histoquímicos de GUS e quanto ao efeito dos bombardeamentos na indução estruturas embriogênicas e regeneração de plantas. As condições de biobalística analisadas incluíram a região promotora regulando a expressão de *gusA*, tipo e pressão de gás hélio de dois aparelhos de bombardeamento, distância de migração das partículas, número de tiros e a realização de pré e pós-tratamento osmótico dos tecidos-alvo. No presente trabalho foram obtidos um número bastante alto de pontos azuis por calo, a indução de calos embriogênicos e embriões somáticos em uma frequência de até 58,3% e a regeneração de 60 plantas, sendo 43 de calos bombardeados. As melhores condições observadas foram o promotor e primeiro íntron do gene *Adh* de milho (plasmídeo pNGI), o aparelho de bombardeamento "Particle Inflow Gun" (PIG) utilizando-se a distância de migração de partículas de 14,8 cm, dois tiros disparados por placa e a realização de tratamento osmótico dos explantes com 0,2 M de manitol e 0,2 M de sorbitol 4-5 horas antes e 17-19 horas depois dos bombardeamentos. Das 43 plantas obtidas de calos bombardeadas, 3 apresentaram atividade de GUS na base das suas folhas. A utilização de *primers* sintéticos definidos a partir de genes de quitinases descritos na literatura em PCRs

resultou na amplificação de dois fragmentos de aproximadamente 700 e 500 pb a partir de DNA total das cvs. MN-599 e MN-698 de cevada e um fragmento, com aproximadamente 500 pb, a partir do DNA total do isolado A4c de *Trichoderma* sp. Estes fragmentos foram purificados dos géis de agarose e diretamente seqüenciados de forma manual e automática. Os fragmentos de 700 e 500 pb amplificados do genoma da cultivar MN-599 foram identificados como genes de quitinases de cevada e o fragmento de 500 pb do isolado A4c de *Trichoderma* sp. não apresentou homologia com seqüências conhecidas de quitinases depositadas no EMBL/GenBank. A utilização de novos pares de *primers*, representando seqüências conservadas de quitinases do fungo *Metarhizium anisopliae*, resultou na amplificação de 3 fragmentos a partir do DNA total do isolado A4b de *Trichoderma* sp., que estão sendo purificados para realização de seqüenciamento.

## ABSTRACT

The present Tesis aimed: (1) to determine an efficient method of genetic transformation by particle bombardment to obtain transgenic plants of Brazilian barley cultivars and (2) to identify a gene coding for chitinase that could confer resistance to barley against the pathogen *Bipolaris sorokiniana*. Calli cultures derived from immature scutella of Brazilian barley cultivars MN-599 e MN-698 (American Beverage Company, AMBEV) were bombarded with tungsten particles and analyzed for *gusA* reporter gene expression by GUS histochemical assay, embryogenic structures induction and plant regeneration. Physical and biological biolistic conditions analyzed included two promoter regions regulating the *gusA* gene, two particle bombardment devices, different helium pressures, distances between target tissues and the initial position of particles, number of shots and use of osmotic pre- and post-treatment of tissues. In the present work there were observed high numbers of blue spots per callus, embryogenic calli and somatic embryos induction with a frequency until 58.3% and the regeneration of 60 plants, being 43 from bombarded calli. The best conditions were obtained with the employment of the *Adh* promoter and its first intron (pNGI plasmid), Particle Inflow Gun (PIG) device, 14.8 cm of distance, 2 shots per plate and osmotic treatment of tissues with 0.2 M mannitol and 0.2 M sorbitol during 4-5 hours prior to and 17-19 hours after bombardments. Leaves from 3 out of 43 regenerated plants showed positive GUS activity in histochemical assays. The use of primers defined from chitinase genes described in literature resulted in the amplification of two fragments with approximately 700 and 500 bp from genomic DNA of MN-599 e MN-698 barley cultivars and one fragment, with approximately 500 bp, from *Trichoderma* sp. strain A4c genomic DNA. These fragments were purified from agarose gel and manual and automatically sequenced. Fragments of



700 and 500 bp from cv. MN-599 were identified as chitinase genes of barley and fragment of 500 bp *Trichoderma* sp. A4c presented no homology with chitinase sequences deposited in the EMBL/GenBank. The use of new primers representing conserved chitinase sequences of *Metarhizium anisopliae* resulted in the amplification of three fragments from genomic DNA of *Trichoderma* sp. strain A4b. These fragments should be purified and sequenced.