

UTILIZAÇÃO DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* PARA TRANSFORMAÇÃO DE ALFACE VISANDO A EXPRESSÃO DA LECTINA *Bvl-I*

AMANDA MUNARI GUIMARÃES¹; TATIANE CASARIN²; LUCINA BICCA DODE²; ANDRÉ ALEX GRASSMANN²; LUCIANO DA SILVA PINTO³

¹Universidade Federal de Pelotas – amanda_munari@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – casarintatiane@gmail.com

²Univrsidade Federal de Pelotas – lucianabicca@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – grassmann.aa@gmail.com

³BioProt Lab Universidade Federal de Pelotas – ls_pinto@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A transformação genética de plantas é uma importante ferramenta e alternativa para o melhoramento vegetal, possibilitando a otimização do metabolismo, maior variabilidade, expressão e regulação de genes (ANDRADE, 2003). Uma característica de destaque relacionada à transgenia é a possibilidade de inserção de genes que conferem resistência a diferentes fitopatógenos, o que pode reduzir a necessidade de aplicação de agrotóxicos visando à redução dos custos de produção (SALA, 2006).

Além disso, a utilização de plantas como sistema de expressão de proteínas heterólogas torna-se vantajosa uma vez que podem apresentar baixa razão custo/benefício, têm potencial para produção agrícola em larga escala, capacidade de integrar o DNA exógeno de forma estável no genoma da planta, além da possibilidade da expressão direcionada a sementes ou outros órgãos facilitando a estocagem e purificação (MEDEIROS et al. 2008).

A alface (*Lactuca sativa* L.), uma hortaliça da família Asteraceae, é largamente utilizada na alimentação por ser de fácil preparo, estar disponível durante todo o ano e possuir características nutricionais importantes, como a presença de fibras, vitamina A e potássio (OLIVEIRA, 2015). Além disso, ela é de fácil manejo e tem a capacidade de realizar modificações pós traducionais em proteínas, o que lhe confere um ótimo modelo experimental para a inserção de genes exógenos (CURTIS et al. 1994; LOVATO et al. 1998).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas encontradas em diversos organismos, capazes de ligar carboidratos diversos reversivelmente. *Bauhinia variegata*, comumente conhecida como “pata-de-vaca”, expressa lectinas de cadeia simples ligadoras de D-galactose chamadas BVL-I e BVL-II, codificadas pelos genes *bvl-I* e *bvl-II*, respectivamente (PINTO, et al., 2008). Possuem uma importante atividade biológica, a qual permite a interação entre as plantas e os micro-organismos como forma de defesa contra ataques de fungos, bactérias, vírus e insetos (COSTA, 2011).

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo transformar geneticamente a alface (*Lactuca sativa*) a partir de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 transformada com vetor pK7WG2D/*Bvl-I* para expressão do gene *Bvl* e obtenção futura de *Bvl* recombinante expressa em alface.

2. METODOLOGIA

As sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) utilizadas nesse experimento foram adquiridas comercialmente da empresa Tecnoseed, e o procedimento foi

realizado em tréplica. Estas sementes foram desinfestadas pelo método de imersão dos grãos em solução de Hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 5 minutos com agitação manual constante. Foram realizados quatro enxágues com água destilada previamente autoclavada. A partir deste ponto, todos os demais procedimentos envolvendo plantas e bactéria foram realizadas em condições assépticas. A semeadura foi realizada em placas de Petri contendo meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) 3% de sacarose e incubadas em estufa BOD à 25 ± 2 °C com foto período de 16 horas.

O vetor binário de expressão em plantas pK7WG2D contendo o gene *Bvl-I* foi construído previamente e inserido em *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 por eletroporação (SILVEIRA, 2013). A confirmação da introdução do vetor recombinante em *A. tumefaciens* foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando o DNA plasmidial isolado dessa cepa e *primers* específicos para o gene *Bvl*. Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em transiluminador com luz ultravioleta (UV).

Após confirmação da presença de pK7WG2D/*Bvl-I* em *A. tumefaciens*, esta foi utilizada para a transformação de alface. Inicialmente foi realizado um pré-inóculo de *A. tumefaciens* recombinante em tubo de ensaio, com 10 mL de LB líquido suplementado com rifampicina 100 mg.L^{-1} , estreptomicina 50 mg.L^{-1} e espectinomicina 50 mg.L^{-1} mantido overnight, sob agitação de 68 rpm à 28°C. No dia seguinte, 1 ml do cultivo *overnight* foi inoculado em 20 ml de LB líquido suplementado com os mesmos antibióticos mais 125 mg.L^{-1} de acetoseringona e incubado à 28°C sob agitação de 68 rpm até atingir a DO_{600} de 0,6 quando então foi iniciado o processo de transformação dos explantes..

Os cotilédones de alface utilizados foram previamente excisados, totalizando 160 explantes, subdivididos em dois grupos: 40 foram utilizados para o grupo controle (T1), os quais não tiveram contato com a suspensão bacteriana; e os 120 explantes restantes para o grupo tratamento (T2), os quais permaneceram 15 minutos em contato com a suspensão bacteriana.

Em seguida, todos os cotilédones foram transferidos, 40 explantes por placa, para o meio de co-cultivo, contendo meio nutritivo MS 3% semi-sólido, suplementado com os reguladores de crescimento $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP (6-benzilaminopurina) e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB (ácido indol butírico). Posteriormente, todas as placas de co-cultivo foram incubadas à 25 ± 2 °C, onde permaneceram por 3 dias.

Após três dias de co-cultivo os explantes foram transferidos para meio de seleção dos transformantes. O grupo de tratamento (T1) foi dividido em duas placas, uma contendo MS 3% , reguladores de crescimento BAP, AIB e antibióticos cefotaxima (200 mg.L^{-1}) e canamicina (150 mg.L^{-1}), outra somente com meio MS 3% com reguladores de crescimento BAP e AIB. Os tratamentos (T2) foram transferidos para o meio MS 3% de sacarose contendo os reguladores de crescimento BAP e AIB acrescido do antibiótico bacteriostático cefotaxima (200 mg.L^{-1}) e canamicina (150 mg.L^{-1}).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A separação dos produtos do PCR por eletroforese em gel de agarose (Fig.1) confirmou a presença de bandas do tamanho esperado de 876 pb, correspondente ao gene *Bvl-I* evidenciando a presença do vetor recombinante pK7WG2D/*Bvl-I* em *A. tumefaciens*.

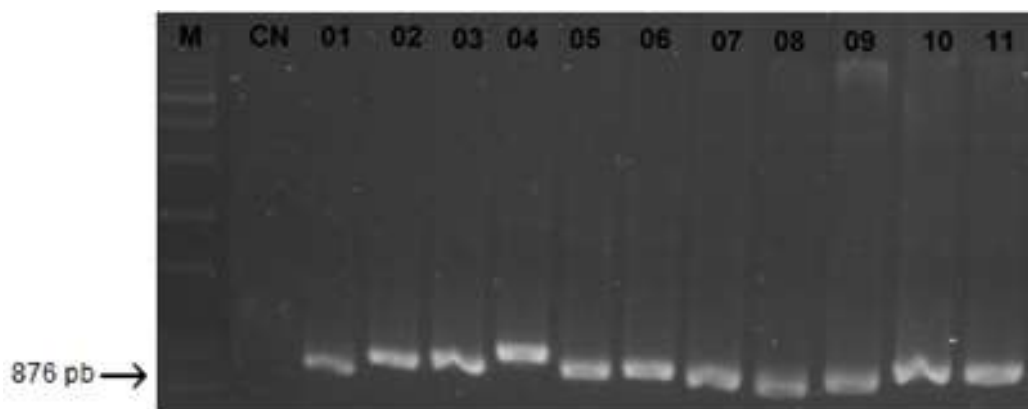


Figura 1- Eletroforese em gel de agarose 0.8% com o produto de PCR utilizando *primers* específicos para *Bvl-I* e DNA plasmidial purificado de *A. tumefaciens* previamente transformado com pK7WG2D/*Bvl-I*. (M)-Marcador de tamanho de molécula 1Kb. (CN) Controle negativo da reação (sem DNA molde). (01-11) Produto do PCR do vetor binário pK7WG2D/*Bvl-I* amplificado a partir do DNA plasmidial extraído de *A. tumefaciens* recombinantes.

Uma colônia positiva para *Bvl-I* de *A. tumefaciens* recombinante foi utilizada nas etapas seguintes de transformação de alface. Após sete dias do processo de transformação dos cotilédones, foram identificados aspectos morfológicos e estruturais que indicam integridade.

Quinze dias após a transformação, foram observados sinais claros de cotilédones transformados (Fig.2), os quais possuíram coloração verde, e aqueles não possuidores do vetor pK7WG2D/*Bvl-I* apresentaram aspecto oxidado. O grupo controle apresentou características estruturais que confirmam a ausência de transformação genética. Porém essa hipótese será confirmada após avaliação por meio da técnica de PCR.

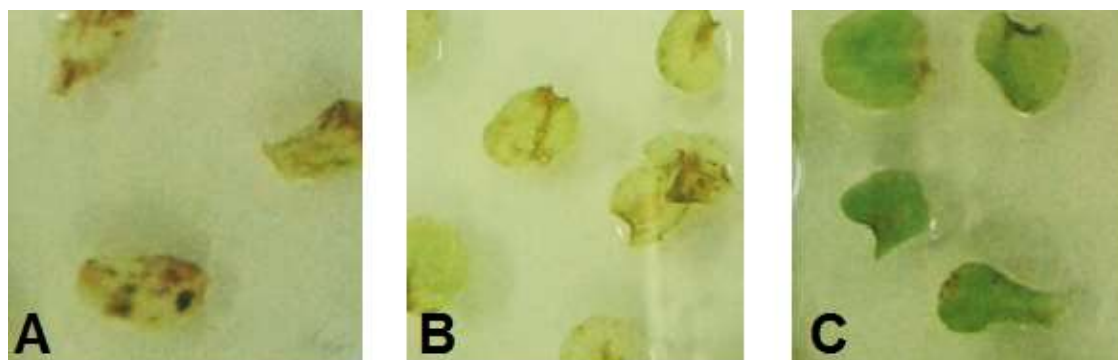


Figura 2- A) Cotilédones do grupo T1 (controle negativo); B) Cotilédones do grupo T2 não transformados; C) Cotilédones do grupo T2 possivelmente transformados.

Também aos quinze dias após a técnica de transformação cada experimento foi avaliado quantitativamente, comparando a relação dos explantes transformados em relação aos 120 explantes de cada repetição submetidos ao processo de inserção de gene exógeno. A primeira repetição teve a eficiência de 35,8%. A segunda repetição foi 53,3% eficaz. A terceira, por sua vez, teve como resultado 71,6% de eficiência do processo de transformação genética.

4. CONCLUSÕES

A estratégia adotada para transformação de alface utilizando *A. tumefaciens* pK7WG2D/Bvl-I parece ser efetiva.

É necessária a confirmação, pela técnica de PCR, da transformação dos explantes e utilizar a técnica de regeneração *in vitro* de tecidos vegetais para a expressão em larga escala da proteína recombinante *Bvl-I*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, S.R.M. **Documentos 102**: Transformação de Plantas. 1ª ed. EMBRAPA Cerrados (2003).
- SALA, F.C. **Reação de alface (*Lactuca sativa* L.) a *Thielaviopsis basicola* (Berk e Broome) Ferraris** (2006). Dissertação (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo.
- CURTIS, I. S.; POWER J. B.; BLACKHALL, N. W.; LAAT, A. M. M.; DAVEY, M. R. **Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens***. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, UK, v. 45, p.1441–1449, (1994).
- LOVATO, F. A.; BEZERRA I. C.; RESENDE, R. O.; FERREIRA, A. T.; TORRES, A. C. Genetic transformation of lettuce cv. Veronica by *Agrobacterium tumefaciens*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 10, p. 219-224, (1998).
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497, (1962).
- OLIVEIRA, C.L. **Gene Expression and Bioavailability of Carotenoids in Lettuce (*Lactuca sativa*)** (2015). Dissertação (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Lavras.
- COSTA, R.R. **Transformação genética em macieira como gene *bvlI***, (2011). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas.
- PINTO, L. P. et. al. Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds, **J. Biosci.**, v.33, n.3, p.355-363, (2008).
- SILVEIRA, C.F. **Transformação genética de plantas visando à tolerância a pragas e doenças** (2013). Relatório de Exame de Qualificação (Doutorado) Universidade Federal de Pelotas.
- MEDEIROS, M.G.F et al. **Documento 180**: Plantas como potenciais biorreatores na produção de vacinas e fármacos. EMBRAPA Meio-Norte (2008).