

TRANSFORMAÇÃO DE FEIJOEIRO COM O GENE *Lhcb1*2* POR MEIO DO MÉTODO SAAT ("SONICATION-ASSISTED-AGROBACTERIUM TRANSFORMATION")

Solange R. M. de Andrade¹, Danielle G. Gomes², Mônica T. V. Labate², Carlos A. Labate²

¹Embrapa Cerrados, Cx. postal 08223, CEP 73301-970, Planaltina, DF

²Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Laboratório de Genética Fisiológica

E-mail: solange@cpac.embrapa.br.

INTRODUÇÃO

A cultura do feijão, no Brasil, é principalmente desenvolvida em consórcio com outras culturas. É utilizada em associação com algodão, mandioca, cana-de-açúcar, mamona, café, e outros. Em todo País, no entanto, a associação do milho com feijão é a mais comum. O consórcio possibilita o uso mais eficiente da terra, porém tem-se observado que em sistemas de cultivo consorciado não se afeta significativamente a cultura dominante, mas a cultura dominada é bastante afetada, sugerindo a necessidade de adaptações genéticas que melhorem seu potencial produtivo nessas condições, sobretudo, no que se refere ao aproveitamento da luz (Vieira, 1985). Este projeto de pesquisa tem por objetivo

superexpressar o gene quimérico *Lhcb1*2* em plantas de feijão, por meio de transformação genética mediada por *Agrobacterium*. O gene *Lhcb1*2* codifica para a proteína CAB, principal componente do sistema coletor do fotossistema II. A proposta baseia-se nos resultados obtidos com a superexpressão desse gene em plantas de tabaco que levou a um aumento da capacidade fotossintética em condições limitantes de luz (Ko et al., 1992). O aumento na quantidade dessa proteína, em cerca de 50% vezes o nível endógeno das plantas selvagens de tabaco, permitiu aumento na capacidade de captação de luz em condições de baixa luminosidade.

Como consequência, as plantas transgênicas de tabaco detêm maior taxa fotossintética, aumento da síntese de carboidratos e crescem mais vigorosas nessas condições. Além dessas características, a superprodução da proteína CAB levou a uma série de efeitos pleiotrópicos como aumento nos espaços intercelulares, maior número de cloroplastos por célula, atraso no florescimento e germinação mais rápida de sementes das plantas transgênicas. A obtenção de feijoeiro transgênico que superexpressam a proteína CAB poderá representar importante contribuição para aumentar a eficiência de sistemas de cultivo consorciado.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de feijoeiro, cultivar Olathe Pinto, foram lavadas em álcool 70%, seguida de imersão em hipoclorito de sódio 1% e enxague abundante em água deionizada estéril. Após 12 a 18 horas incubadas, em água estéril, as sementes foram abertas, os embriões excisados, e os meristemas expostos conforme descrito por Aragão et al., 1996. Os meristemas foram cultivados em meio de multibrotação (MS3% acrescido de 44,3 µM BAP) por 12 dias, e, então, inoculados com *Agrobacterium tumefaciens*.

A *Agrobacterium* foi cultivada em meio AB acrescido de 50 mg/L de canamicina e 100 mg/L de higromicina, a 28 °C até atingir densidade óptica a 600 nm (OD600) entre 0,7-0,8. A seguir, foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos e ressuspensa em meio de multibrotação líquido, sempre em volume igual ao do cultivo.

O gene quimérico *Lhcb1*2* (Figura 1) utilizado é composto por uma fusão entre a sequência do gene *ss3.6* de ervilha que codifica para o peptídeo trânsito da subunidade menor da RUBISCO (*rbcS*), e a sequência do gene *Lhcb1*2* que codifica para a proteína cab madura tipo I do LHClIb. Ambos os genes estão sob o controle do promotor 35S do vírus-do-mosaico da couve-flor (CaMV) e o sinal de terminação da transcrição é do gene *Lhcb1*2* tipo I da ervilha. A seleção dos transformantes foi realizada pelo gene *nptII*, também sob o controle do promotor 35S do CaMV. Esse marcador (*nptII*) permite selecionar plantas transgênicas resistentes à canamicina e geneticina. O vetor binário pEND4K contendo o gene quimérico *Lhcb1*2* foi introduzido na linhagem LBA4404 da *Agrobacterium tumefaciens* por eletroporação de acordo com o protocolo de Lilley (1993).

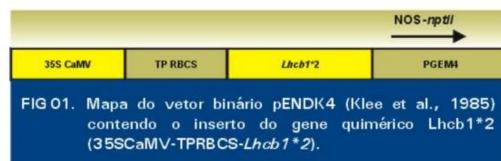


FIG 01. Mapa do vetor binário pENDK4 (Klee et al., 1985) contendo o inserto do gene quimérico *Lhcb1*2* (35SCaMV-TPRBSC-*Lhcb1*2*).

150 explantes foram submetidos à SAAT por 30 segundos, em suspensão de *Agrobacterium tumefaciens*, linhagem LBA4404: *Lhcb1*2*, e 50 explantes não inoculados foram utilizados como controle. Os explantes inoculados foram co-cultivados por duas horas em 25 ml de suspensão de *Agrobacterium*, seguido de 48 horas em meio de multibrotação. O material controle foi co-cultivado pelo mesmo período, porém utilizando para co-cultivo líquido o meio de multibrotação. Após o período de co-cultivo, os explantes foram lavados com 25 ml de meio MS3% líquido, contendo 500mg/L de cefotaxima e transferidos para meio de seleção (MS 3% + geneticina 10 mg/L + cefotaxima 100 mg/L) onde permaneceram por quatro semanas antes de serem transferidos para meio de regeneração, contendo cefotaxima (100 mg/L), mas sem o agente seletivo. Após o período de mais quatro semanas, os brotos que sobreviveram foram isolados e transferidos para meio de enraizamento (MS 1%). Uma amostra de cada material foi coletada para análise por PCR.

As plantas selecionadas em meio contendo geneticina foram submetidas à técnica de amplificação por PCR ("Polymerase Chain

Reaction") para confirmação da transformação. A extração do DNA genômico foi realizada pelo método de Edwards (1996), sendo o DNA quantificado em gel de agarose 1%. As reações de amplificação foram conduzidas, utilizando-se os primers descritos na tabela 1. A mistura de reação foi coberta com 20 µl de óleo mineral estéril e desnaturada por 3 minutos a 94 °C, sofrendo, em seguida, 35 ciclos de amplificação (45 segundos a 92 °C, 1 minuto a 58 °C, 2 minutos a 72 °C). O volume de 8 µl de cada reação foi aplicado no gel de agarose 1%, e submetido a 80 v por três horas. O produto da amplificação com os primers específicos para o transgene *Lhcb1*2* está descrito na Figura 2.

TABELA 01 - Conjunto de primers utilizados para amplificação por PCR.

Conjunto	Seqüência (de 5' para 3')	Produto da Amplificação
rtc1	CCT TGA ACC ACA CAG CTT CG	500 pb
35S-1	CCA CTA TGC TTG GGA AGA CC	



FIG 02. Posição de hibridização dos primers com o gene quimérico *Lhcb1*2*, para amplificação por PCR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 150 explantes submetidos a SAAT por 30 segundos, regeneraram-se 28 plântulas resistentes à geneticina (10 mg/L). Amostras de folhas dessas plântulas foram coletadas para extração do DNA e análise por PCR, imediatamente antes de serem transferidas para vasos. Do total de plântulas analisadas, 20 apresentaram resultado positivo, ou seja: o produto da amplificação com primers específicos para o transgene (Figura 3). Após três semanas de aclimação, em câmara de crescimento, as plantas foram transferidas para casa de vegetação. Novos discos foliares foram coletados para nova extração de DNA e análise confirmativa por PCR, entretanto, após esse período, não se observou

amplificação do transgene *Lhcb1*2*. Este experimento foi realizado antes de serem estudados todos os parâmetros que poderiam afetar a eficiência da transformação do feijoeiro via SAAT. Assim, com base em todos os estudos realizados pode-se inferir que a não obtenção de plantas transgênicas de feijoeiro contendo o gene *Lhcb1*2*, deve-se: à utilização do tempo de 30 segundos de sonicação, pois conforme observado no experimento de transformação com gene *uidA* (Painel 19), atinge apenas as folhas superficiais, não havendo formação de brotos transgênicos; a não utilização de acetoceringona nos meios de co-cultivo; à seleção realizada com geneticina na concentração de 10 mg/L.

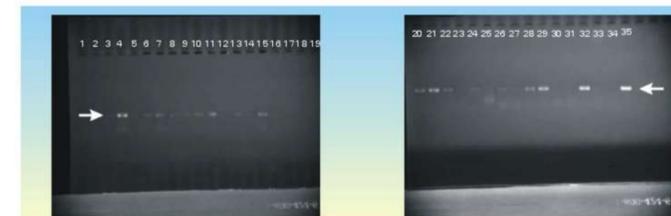


FIG 3. Transformação de Feijão cv. Olathe Pinto via SAAT. Análise de PCR para o gene *Lhcb1*2*. Amostra 1 = controle dos componentes de reação, sem DNA; 2 = Controle negativo (Feijão selvagem); 3 a 34 = transformantes putativos; 35 = controle positivo (tabaco cab). Setas apontam região de amplificação do gene por PCR, na altura de 500pb.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

KLEE, H.; YANOFSKY, M.F.; NESTER, E.W. (1985) Vectors for transformation of higher-plants. *Biotechnology*, 3: 637-642.

KO, K.; KO, Z.W.; TURPIN, D.H.; LABATE, C.A.; MOHANTY, N.; GRANNEL, A. (1992). Overproduction of chlorophyll a/b binding protein enhances photosynthetic activity in transgenic tobacco. In: MURATA, N. (Ed.) *Research in Photosynthesis*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. V.2, p. 445-448.

LILLEY, G. (1993). Survey Number 007. In: *BioRad. Methods in Electroporation. Gene Pulser Electroprotocols*.

VIEIRA, C. (1985). O feijão em cultivos consorciados. Viçosa: Editora UFV. 134p.