

TRANSFORMAÇÃO DE *Phaseolus vulgaris* VIA SAAT ("SONICATION-ASSISTED *Agrobacterium*-MEDIATED 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

Phaseolus vulgaris, bem como várias outras espécies de leguminosas, apresenta inúmeras dificuldades para a transformação genética via *Agrobacterium*. Trabalhos recentes demonstram que alterações do meio de cultivo e das condições de co-cultivo, associadas ao uso de indutores dos genes *vir* e a modificações dos vetores de transformação possibilitam a transformação espécies consideradas recalcitrantes. O avanço dessas técnicas tem permitido a transformação transitória do feijoeiro mediada por *Agrobacterium*, entretanto até o presente momento, nenhuma planta transgênica de feijoeiro foi obtida por meio deste método.

Em 1997, Trick & Finer descreveram um método de transformação genética, utilizando *Agrobacterium* associado com

sonicação - SAAT ("Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation"). Nesse sistema, o explante é sonicado por curto período de tempo na presença de *Agrobacterium*. A sonicação produz uma série de microferimentos que variam de 1 mm até 1 mm, e permitem a colonização dos tecidos internos e, conseqüentemente, aumentando a eficiência do processo de transformação (Santarém et al., 1998). Esse sistema tem o potencial de transformar o tecido meristemático encontrado sob várias camadas de células. Através de SAAT foi possível aumentar a eficiência de transformação transitória de diferentes tecidos vegetais, como folhas, cotilédones imaturos, embriões somáticos e zigóticos, ápices caulinares, entre outros. Também já foram obtidas plantas transgênicas de soja (Trick & Finer, 1998; Santarém et al.,

1998). Essa técnica pode ser utilizada para obter transformação genética de outras espécies consideradas recalcitrantes a transformação por *Agrobacterium* como por exemplo *Phaseolus vulgaris*.

A técnica SAAT foi otimizada para a transformação de feijoeiro. Os parâmetros tempo de sonicação, co-cultivo, efeito da acetoceringona e análises da expressão transitória e estável foram estudados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do uso da técnica SAAT para transformação de feijoeiro, utilizando os parâmetros otimizados.

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 mM BAP) por 12 dias, e, então, inoculados com *Agrobacterium tumefaciens*.

Utilizou-se a linhagem LBA4404:pTOK 233. Essa linhagem contém o gene *uidA*, interrompido por uma seqüência INTRON (GUS-INTRON) e os genes *nptII* e *hpt* (Figura 1). O gene *uidA* expressa para a proteína b-glucuronidase que, na presença do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indol glucoronico (X-Gluc), produz uma dimerização oxidativa, e forma um precipitado de intensa cor

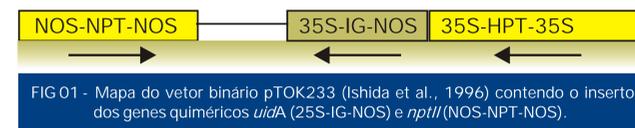
azul e insolúvel. O gene *nptII* induz a resistência ao antibiótico canamicina e geneticina, enquanto o *hpt* resistência à higromicina.

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.

Utilizou-se o sonicador ULTRA-SON, Modelo T14, 40 kHz (Thornton INPEC Eletrônica, Piracicaba/SP).

50 explantes foram submetidos a SAAT por 30 segundos e os outros 50, por 60 segundos. Após co-cultivo de 24 horas em 25 ml de meio de multibrotação líquido, seguido de 48 horas em meio de multibrotação sólido, ambos contendo acetoceringona (20 mg/L), os explantes foram lavados em 25 ml de meio de multibrotação

líquido contendo 500mg/L de cefotaxima e transferidos para meio de regeneração contendo, agente seletivo (geneticina 20 mg/L). Os explantes permaneceram nesse meio por quatro semanas e foram, então, submetidos ao ensaio histoquímico para determinar a atividade da b-glucuronidase.



RESULTADOS

Embora, 77,5% dos explantes submetidos a SAAT por 30 segundos tenham apresentado uma expressão estável em primórdios foliares, nenhum broto transgênico foi obtido. Apenas as folhas externas apresentavam regiões de coloração azul (Figura 2). Já com SAAT por 60 segundos, 70% dos explantes inoculados apresentaram expressão estável da b-glucuronidase. Desses, observaram-se seis brotos completamente transgênicos depois de 30 dias em meio contendo 20 mg/L de geneticina, provenientes de dois explantes diferentes (Figuras 3 e 4). Segundo Aragão & Rech (2001), a região meristemática apical do feijoeiro é composta pelo meristema apical, o primórdio foliar e as folhas primárias. O meristema apical apresenta três camadas de células distintas (L1, L2 e L3). Os brotos recém-formados originam-se das camadas sub-epidérmicas (L2 e L3), e a camada L1 pode participar de sua formação. É possível que 60 segundos de duração SAAT permita que o *Agrobacterium* alcance as camadas L2 e L3 do meristema apical, o que não ocorreria em tempos SAAT inferiores.



FIG2- Explante de feijão cv. Olathe Pinto, submetido à SAAT por 30 segundos, mantidos por 30 dias em meio seletivo, contendo 20 mg/L de geneticina.



FIG 3 - Explante de feijão cv. Olathe Pinto, submetido à SAAT por 60 segundos, mantidos por 30 dias em meio seletivo, contendo 20 mg/L de geneticina.



FIG 4 - Explante de feijão cv. Olathe Pinto, submetido à SAAT por 60 segundos, mantidos por 30 dias em meio seletivo, contendo 20 mg/L de geneticina.

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.

ARAGÃO, F.J.L.; RECH, E.L. (2001). Transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In:BAJAS, Y.P.S. (Ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic Crops II*. Berlin: Springer-Verlag, v. 47, p. 269-283.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology*, 14: 754-750.

SANTARÉM, E.R.; TRICK, H.N.; ESSI, J.S.; FINER, J.J. (1998). Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Reports*, 17: 752-759.

TRICK, H.N.; FINER, J.J. (1997). SAAT: Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Research*, 6: 329-326.

TRICK, H.N.; FINER, J.J. (1998). Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Reports*, 17: 482-488.

CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que 60 segundos é o tempo recomendado para transformação via SAAT de embriões de feijão pré-tratados em meio de multibrotação.

2002

TRANSFORMAÇÃO DE *Phaseolus vulgaris* VIA SAAT ("SONICATION-ASSISTED
Agrobacterium-MEDIATED TRANSFORMATION")



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento
BR 020, km 18, Rodovia Brasília/Fortaleza, Planaltina, DF
Telefone: (61) 388- 9898 Fax: (61) 388- 9879*

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

