

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) COM O VETOR BINÁRIO pK7WG2D CONTENDO O GENE *BVL*

CÍNTIA SILVEIRA GARCIA¹; CARLA FERREIRA SILVEIRA²; DANIELE DE SOUZA MASIERO²; FABIANA ROOS NORA²; LUCIANA BICCA DODE²; LUCIANO DA SILVA PINTO³

¹Universidade Federal de Pelotas; Graduação em Biotecnologia – cintia.s.garcia@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas; Centro de desenvolvimento Tecnológico (CDTec)

³Universidade Federal de Pelotas; CDTec/Biotecnologia – ls_pinto@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça pertencente à ordem *Asterales*, família *Asteraceae*, gênero *Lactuca*, espécie *Lactuca sativa* L. (MABBERLEY, 1997). Devido à importância e ao fácil manejo, as plantas de alface podem ser utilizadas como modelo para trabalhos de transformação genética que é uma ferramenta importante dentro de programas de melhoramento genético, possibilitando introdução e modificação de genes, aumentando e diversificando o germoplasma da cultura através da introdução de características específicas como, por exemplo, a introdução de genes que conferem resistência e/ou tolerância a doenças, pragas e herbicidas (CURTIS et al. 1994; LOVATO et al. 1998).

Vários trabalhos relacionados à introdução de genes exógenos em plantas cultivadas sugerem o uso de proteínas relacionadas à patogênese de origem vegetal, produzidas em resposta ao ataque de diferentes agentes fitopatogênicos (POVINELI, 2002).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas com um ou mais sítios de ligação a açúcar por subunidade. Estas moléculas se ligam seletiva e reversivelmente a carboidratos e precipitam polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos, agem como reconhecedoras de células (SINGH et al. 1999). Pesquisas sobre a utilização dessas proteínas como proteção de plantas ao ataque de insetos e fungos patogênicos tem sido comuns (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). O gene *bvl* expressa uma lectina de sementes de *Bauhinia variegata*, essas lectinas de (BVL-I e BVL-II) são proteínas de cadeia simples que se ligam ao monossacarídeo D-galactose (PINTO et al. 2008).

O presente estudo, tem por objetivo a transformação genética de alface (*Lactuca sativa* L.) a partir de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 transformada com o vetor binário pK7WG2D::BVL para expressão do gene *bvl*.

2. METODOLOGIA

O estudo foi realizado no laboratório de Biotecnologia Vegetal e Proteômica, pertencente ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas (UFPe), RS.

O vetor binário pK7WG2D contendo o gene *bvl* foi previamente obtido e inserido em *A. tumefaciens* por eletroporação. A confirmação da introdução do vetor nas cepas possivelmente clonadas foi realizada pela técnica de PCR, utilizando-se os *primers* específicos para o gene *bvl*. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados em transiluminador com luz UV. Logo em seguida, foi realizada a transformação genética via *A. tumefaciens* dos cotilédones de alface da cultivar Grand Rapids.

Para a transformação, foi realizado um pré-inóculo em tubo de ensaio, com 10 mL de LB líquido contendo os antibióticos (Rifampicina 200 mg.L⁻¹ e Espectinomicina 100 mg.L⁻¹) e a *A. tumefaciens* transformada com vetor binário pK7WG2D::BVL. O cultivo foi mantido overnight, sob agitação de 150 rpm a 28°C. Após este período os cultivos foram transferidos para frascos de erlenmeyer de 250 mL contendo o mesmo meio de pré-inoculação, incubados sob agitação nas condições anteriormente descritas até atingir a DO₆₀₀ de 0,6 quando então foi iniciado o processo de transformação dos explantes.

Os cotilédones de alface (cv. Grand Rapids) utilizados foram previamente excisados, totalizando 1100 explantes, os mesmos foram subdivididos em dois grupos: 50 foram utilizados para o grupo controle (T1), os quais não tiveram contato com a suspensão bacteriana; e os 1050 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, 10 explantes por placa, para o meio de co-cultivo, contendo meio nutritivo MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) semi-sólido, suplementado com os reguladores de crescimento 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,1 mg.L⁻¹ ANA (ácido naftalenoacético). Posteriormente, todas as placas de co-cultivo foram transferidos para o escuro a uma temperatura de 25±2°C, onde permaneceram por 3 dias.

Após os 3 dias de co-cultivo os explantes do grupo de tratamento (T2) foram transferidos para o meio MS 3% de sacarose contendo os reguladores de crescimento BAP e ANA acrescido do antibiótico bacteriostático cefotaxima (100 µg.mL⁻¹) e canamicina (50 µg.mL⁻¹) para seleção dos transformantes, onde permaneceram até que se obtivesse a formação de brotos com repicagens periódicas a cada 15 dias para a renovação do meio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As colônias de *A. tumefaciens* possivelmente transformadas, foram visualizadas em placa de Petri após dois dias de cultivo em meio seletivo.

Colônias de *A. tumefaciens* foram submetidas à amplificação por PCR com primers para o gene *bvl*. A separação dos produtos do PCR por eletroforese em gel de agarose (Fig.1) mostrou a presença de bandas de tamanho esperado (~876pb), evidenciando a transformação da cepa com pK7WG2D::BVL.

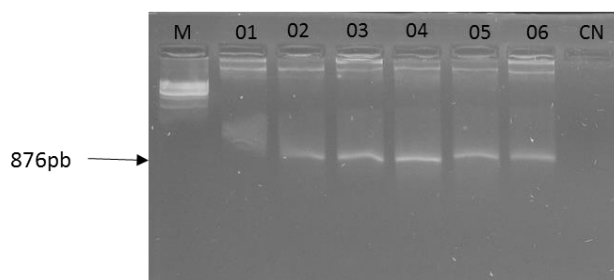


Figura 1 – Gel de agarose com produtos de PCR. (M) – Marcador 1kb plus (01 – 06) – Produto do PCR do vetor binário pK7WG2D::BVL amplificado a partir de DNA plasmideal extraído de colônias de *A. tumefaciens* cepa LBA4404. (CN) – Controle negativo da reação.

Uma colônia positiva da cepa de *A. tumefaciens* foi utilizada nas etapas seguintes de transformação de células vegetais. Após sete dias da transformação dos cotilédones de alface (cv. Grand Rapids), observou-se que a técnica utilizada

foi inicialmente eficiente, pois se considerando os aspectos de integridade estrutural, e resposta morfogênica *in vitro*, os cotilédones em ambos os tratamentos, permaneceram íntegros com pequenos pontos iniciais de calogênese. Aos quinze dias após a transformação os cotilédones do grupo controle (T1) e do grupo de tratamento (T2) apresentavam em sua grande parte algumas brotações (Tab.1).

Tabela 1. Total de brotos regenerados de cotilédones dos grupos controle (não Transformados) e de tratamento via *A. tumefaciens*. pK7WG2D::BVL (possivelmente transformados).

	Possivelmente Transformados	Não transformados
Brotos	10,95%	100%

Aos 15 dias, após o processo de transformação, observou-se a presença de brotos nas placas do grupo T1 (Fig.2a) inclusive nas placas do tratamento T2, os quais estavam possivelmente transformados com o vetor pK7WG2D::BVL (Fig.2b). Porém essa hipótese será confirmada após avaliação da integração estável do DNA no genoma das plantas regeneradas através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

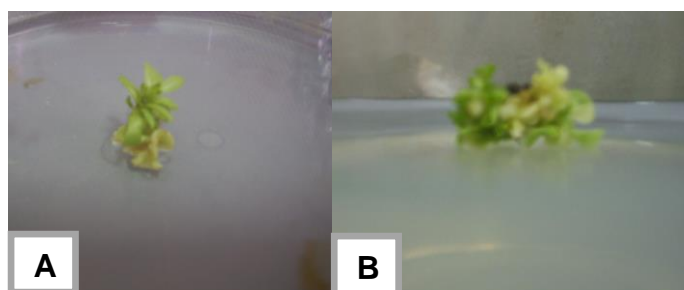


Figura 2 – a) Broto em fase de regeneração do grupo T1 (Controle positivo); b) Broto em fase de regeneração, a partir de cotilédone possivelmente transformado.

4. CONCLUSÕES

Embora haja a necessidade de confirmação da transformação dos cotilédones de alface através da técnica de PCR, o protocolo utilizado inicialmente tanto para a inserção do vetor binário pK7WG2D::BVL na bactéria quanto na planta, obtiveram resultados satisfatórios, o que poderá futuramente ser uma ferramenta de grande utilidade nos programas de melhoramento que visam incorporar cada vez mais características de interesse agrônomo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

MABBERLEY, D.J. (1997). The plant book: A portable dictionary of the vascular plants. 2ª ed. Cambridge University Press, Cambridge.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.

PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v.109, p.347-352, 1995.

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.

POVINELI, K. L.; FINARDI FILHO, F. As multiplas funções das lectinas vegetais. Nutrire; rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. **J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP., v.24, p.135-156, dez., 2002

SINGH R. S et al. Lectins: sources, activities, and applications **Critical Reviews in Biotechnology**, v.19, n.2, p.145-178, 1999.