

TRANSFORMAÇÃO DE *A. tumefaciens* e *E. coli* COM O VETOR BINÁRIO pH7WG2D CONTENDO O GENE BVL

Carla Ferreira Silveira¹; Tatiane Casarin²; Fabiana Roos Nora³; Luciana Bicca Dode⁴; Luciano da Silva Pinto⁴

Palavras-chave: gateway, *Oryza sativa* L., *Bauhinia variegata*, lectina..

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura de grande importância socioeconômica, devido ao fato de ser componente essencial da dieta básica de mais da metade da população mundial, sendo necessária a constante busca de novas tecnologias que possibilitem acréscimos de produção e expansão dos setores produtivos (ROTILLI et al., 2010).

A transformação genética em plantas 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. Assim o produtor poderá obter vantagens como uma redução nos custos com agrotóxicos, menor risco de intoxicação e impacto ambiental negativo, produtos com valor agregado, entre outros. As plantas geneticamente modificadas têm sido uma ferramenta essencial para estudo de biologia vegetal e para o desenvolvimento de novas variedades (HERRERA-ESTRELLA et al., 2005).

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. Neste caso podemos citar as quitinases e também as lectinas. As lectinas têm sido investigadas em relação ao seu possível papel na defesa de plantas contra mamíferos, insetos e fitopatógenos (VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004; CHEN et al., 2009).

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas com um ou mais sítios de ligação a glicídios por subunidade. Estas moléculas se ligam seletiva e reversivelmente a glicídios precipitam polissacarídeos, glicoproteínas e glicolípídeos, 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 (KAUR et al, 2006). A atividade tóxica das lectinas é baseada na ligação específica aos glicídios presentes no trato digestório de insetos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). O gene *bvl* codifica 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).

Nesse sentido, programas de melhoramento genético vêm trabalhando na introdução de novas características, como resistência/tolerância a pragas, doenças e herbicidas, possibilitando assim maior produtividade para a cultura. É estudado ainda o desenvolvimento de diferentes cultivares adaptadas às diferentes regiões e condições climáticas.

O presente estudo representa uma das etapas do processo de otimização da transformação de plantas de *Oryza sativa*, para a expressão do gene *bvl* e tem por objetivo a obtenção de *Agrobacterium tumefaciens* transformada com o vetor binário pH7WG2D preparado para integrar no genoma de células vegetais o cassete p ROLD-GFP-t35S-BVL-t35S para expressão do gene *bvl* junto com o marcador visível GFP.

¹ Estudante de Doutorado em Biotecnologia, CDTec/UFPEl, carla.quimica@gmail.com.

² Estudante de Graduação em Biotecnologia, CDTec/UFPEl.

³ Bolsista PNPd, CDTec/UFPEl.

⁴ Professor pesquisador, CDTec/UFPEl.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pertencente ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), RS.

O vetor binário pH7WG2D-GFP-BVL foi introduzido em células eletrocompetentes de *Escherichia coli* por eletroporação conforme descrito por Sambrook (2001), com algumas modificações, para a sua multiplicação. A seguir, as células transformadas foram cultivadas em meio LB acrescido de 25 μ g·L⁻¹ Espectinomicina. Após o cultivo, o vetor foi isolado e utilizado para transformação da cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* pelo mesmo método.

Para obtenção de células eletrocompetentes da linhagem DH5-alfa de *E. coli* e *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 foi utilizado o protocolo descrito por Sambrook (2001). Logo após, uma alíquota de células competentes (50 μ L) foi adicionado a 1 μ L de plasmídeo pH7WG2D-GFP-BVL para a realização da transformação das células (Sambrook, 2001). A extração do vetor binário das colônias de *A. tumefaciens* e *E. coli* das cepas LBA4404 e DH5-alfa respectivamente, crescidas nas placas contendo antibiótico de seleção foi realizada utilizando-se o *Kit Plasmid Mini KitPrep* (RBC-Real Genomics).

A confirmação da introdução do vetor binário (pH7WG2D-GFP-BVL) nas cepas potencialmente clonadas foi realizada pela técnica de PCR, utilizando-se os *primers* específicos para o gene *bvl*.

Quadro 1. *Primers* específicos para o gene *BVL* utilizados nas reações de amplificação.

<i>Primer</i>	Sequência 3'-5'
BaulR	CATATGATGCTTCTCTACCAAC
BaulF	GCATCCTTACATACTGGAATAA
BVLpplantaF	ATGCTTCTCTACAACTCAAATC

A reação de PCR foi realizada em termociclador *PTC-100 Peltier Thermal Cycler* (MJ Research) e as condições de amplificação consistiram de uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com *Blue green loading dye I* (LGC) e visualizados em transiluminador com luz UV.

Logo em seguida, foi realizada a transformação genética, via *Agrobacterium*, dos explantes de arroz com o vetor pH7WG2D-GFP-BVL conforme o protocolo Hiei e Komari, (2008), com algumas modificações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. tumefaciens, potencialmente transformadas, foram visualizadas em placa de Petri após dois dias de cultivo em meio seletivo. Após o cultivo em meio líquido de colônias isoladas das referidas placas de Petri, o DNA plasmidial extraído das colônias de LBA4404 e DH5 foi observado e analisado por eletroforese em gel de agarose (Figura 1). A presença de sinais de aproximadamente 14kb sugerem a presença do vetor binário pH7WG2D-GFP-BVL em todas as colônias de *A. tumefaciens* e *E. coli*.

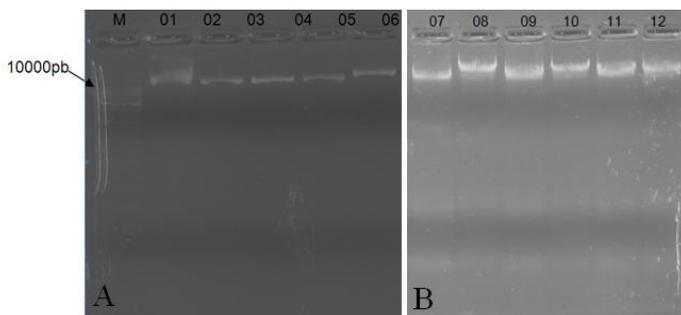


Figura 1 – (A) Separação de bandas em gel de agarose a 1%. (M) - Marcador 1Kb plus. (01) - Vetor pH7WG2D-GFP-BVL, controle positivo. (02-06) - Produtos de extração do plasmídeo pH7WG2D-GFP-BVL a partir de colônias de *E. coli* linhagem DH5 α . (B) Separação de bandas em gel de agarose a 1%. (07 - 12) - Produtos de extração do plasmídeo pH7WG2D-GFP-BVL a partir de colônias de *A. tumefaciens* cepa LBA4404.

As colônias de *A. tumefaciens* e *E. coli* foram submetidas à amplificação por PCR com *primers* para o gene *bvl*. A separação dos produtos do PCR por eletroforese em gel de agarose, mostrou a presença de sinais de tamanho esperado (~876pb) evidenciando a transformação de ambas as cepas com pH7WG2D-GFP-BVL. Uma colônia da cepa de *A. tumefaciens* foi utilizada nas etapas seguintes de transformação de células vegetais. A seguir, a transformação genética com o pH7WG2D-GFP-BVL foi realizada de acordo com o protocolo de Brasileiro (1999), com modificações.

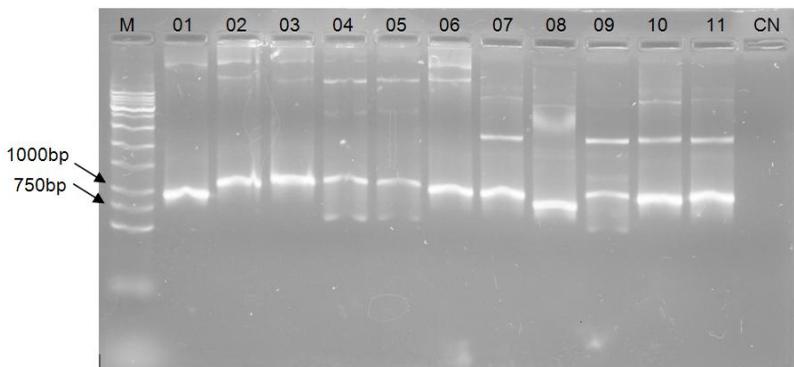


Figura 2 – Gel de agarose 1% com resultado da amplificação com primers específicos para o gene *bvl* (M) – Marcador 1Kb plus. (01-06) – Resultado da amplificação do vetor binário pH7WG2D-GFP-BVL amplificado a partir de DNA plasmidial extraído de colônias de *E. coli* cepa DH5-alfa. (07-11) Resultado da amplificação do vetor binário pH7WG2D-GFP-BVL LBA4404. (CN) – controle negativo da reação.

CONCLUSÃO

O protocolo descrito por Brasileiro (1999), com algumas modificações foi eficaz para a inserção do vetor binário pH7WG2D-GFP-BVL em cepas de *Agrobacterium tumefaciens* e *E.coli*. A utilização do vetor pH7WG2D contendo o gene *gfp*, é uma importante ferramenta que poderá ser utilizada nos processos de estabelecimento da transformação genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ROTILI, E. A. **Eficiência e resposta quanto ao uso de nitrogênio e fósforo de cultivares de arroz** em solos de várzea irrigada e terras altas no sul do estado de Tocantins. 2009. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Tocantins - UFT, Campus de Gurupi, 2009.

BRASILEIRO, A.C.M. & DUSI, D.M.A. (1999). In: Torres, A.C., Caldas, L.S. & Buso, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas 2**, 679-735.

CHEN, J. et al. A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. **Phytomedicine**. v.16, p.352–360, 2009.

HERRERA-ESTRELLA, L. et al. An Historic Perspective (Transgenic Plants). **Methods in Molecular Biology**, v.286, p.3-32, 2005.

HIEI, Y. & KOMARI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. **Nature Protocols**, v.3, n.5, p.824-834.

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.

SAMBROOK, J., & D. W. Russel. 2001. **Molecular cloning**. p. 9.16-9.17. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

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

VASCONCELOS, I. M. & OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**. v.44, p.385–403, 2004.