

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA, VIA *Agrobacterium tumefaciens*, DE EXPLANTES FOLIARES DE MACIEIRA CV. GALA

COSTA, Raquel¹; DANIELOWSKI, Rodrigo²; SILVA, Luciano Pinto³, PETERS, José Antonio⁴

¹Mestranda do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas, email:raqrcosta@gmail.com; ²Graduando em Agronomia, Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas; ³Professor Adjunto em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas; ⁴Professor Adjunto do Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas

1 INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) está entre as principais frutíferas de clima temperado no Brasil, e encontra-se entre as culturas agrícolas mais importantes para o Estado de Santa Catarina, com destaque para a cultivar Gala. Contudo, a Mancha Foliar da Gala (MFG), que é causada principalmente pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* tornou-se um fator limitante para o sucesso de sua produção, visto é capaz de provocar até 75% de desfolhamento das plantas, comprometendo significativamente o cultivo e a produtividade da macieira.

A cultura de tecidos *in vitro* representa uma importante estratégia para a superação deste problema, pois possibilita a multiplicação e regeneração de explantes, tornando-se uma ferramenta essencial para a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. Através da transformação genética é possível a inserção de genes de interesse no genoma de uma planta, sem modificar sua estrutura genética global (STUDART-GUIMARÃES et al., 2003). Assim, a transformação genética, abre novas perspectivas aos programas de melhoramento, ampliando e disponibilizando novos genes, superando as limitações da incompatibilidade sexual ou incrementando a variabilidade genética.

O presente trabalho objetivou a obtenção de um protocolo eficiente de transformação genética, via *A. tumefaciens*, através de explantes foliares de macieira cv. Gala.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas, RS. Utilizou-se folhas novas de brotações da cv. Gala, cultivadas em meio de multiplicação (Tabela1) por quatro semanas. O pH dos meios foram ajustados para 5,7 e posteriormente autoclavados a 120°C e 1,5 atm por 20min..

Para a realização dos experimentos de transformação genética preparou-se meio LB (Tripton 10 g/L, Extrato de Levedura 5 g/L, e NaCl 10 g/L) pH 7,5 ao qual inoculou-se *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo pGA643/bv1 I conforme (Figura1). Foi realizado um cultivo e um subcultivo, no cultivo colocou-se 5 mL de meio LB em um erlenmeyer com capacidade para 10 mL, uma colônia

de *A. tumefaciens* e 5 µL dos antibióticos (Rifampicina 50 mg/mL, kanamicina 50 mg/mL e Estreptomycina 300 mg/mL). O erlenmeyer contendo *A. tumefaciens* foi colocado em um shaker overnight, com velocidade de 150 rpm e temperatura de 28°C. No subcultivo foi retirado 10% do meio do primeiro cultivo e colocado em um novo erlenmeyer com capacidade para 250 mL, contendo 100 mL de meio LB com 100 µL de cada antibiótico. Os frascos permaneceram por mais 1 hora sob agitação nas mesmas condições especificadas acima e então determinou-se a densidade optica (D.O.) em um espectrofotômetro com λ 600nm. Utilizou-se a suspensão com D.O. entre 0,5 a 0,7.

Enquanto a bactéria permanecia no segundo subcultivo foram selecionados os explantes foliares. Os explantes foram colocados no meio com *A. tumefaciens* durante 10 min, sob agitação. Após, retirou-se o excesso de meio líquido das folhas com auxílio de papel filtro esterilizado e os explantes foram colocados em meio de co-cultivo (Tabela1), com o lado adaxial em contato com o meio de cultura por três dias, no escuro. Posteriormente os explantes foram lavados, duas vezes, com água destilada. Após a ultima lavagem retirou-se o excesso de água com papel filtro e os explantes foram colocados em meio de regeneração com os antibióticos (Kanamicina 50 mg/mL e Cefotaxima 100 mg/L), onde permaneceram por quatro semanas (três semanas no escuro). O meio de cultura foi renovado em 15 dias. Quatro semanas após, os explantes que formaram calos e não necrosaram foram colocados em meio de regeneração contendo somente Kanamicina (50mg/mL) e 2ip na concentração de 2 mg/L. As brotações regeneradas e resistentes ao antibiótico foram transferidas, para meio de multiplicação contendo Kanamicina e incubadas durante quatro semanas.

Como controle utilizou-se cinquenta explantes que foram colocados em meio de regeneração normal e meio de regeneração com antibiótico, sem haver infecção por *A. tumefaciens*.

Foram realizados seis experimentos de transformações e, cada evento constituído por dez placas de petri contendo seis explantes cada.

As brotações que sobreviveram e cresceram no meio de multiplicação contendo o antibiótico, foram utilizadas na extração de DNA, conforme de (Bianchi, Valmor et. al 2002) e posterior realização de PCR, onde os resultados foram visualizados através de eletroforese por gel de agarose a 1%.

Tabela1. Meios de Cultura Utilizados nos Processos de Transformações

Reagentes	Meio Multiplicação	*Meio Co-Cultivo	Meio Regeneração	Meio de Indução
MS c/ vitaminas (g/L)	4,4	4,4	4,4	4,4
Mio-inositol (mg/L)	100	100	100	100
Sacarose (g/L)	30	-	-	-
Sorbitol (g/L)	-	40	40	40
TDZ (mg/L)	-	5	5	-
ANA (mg/L)	-	0,5	0,5	-
BAP (mg/L)	0,8	-	-	-
2ip (mg/L)	-	-	-	2
Ágar (g/L)	7	-	-	-
Gelrite (g/L)	-	2,5	2,5	2,5

(*) Meio sem antibióticos.

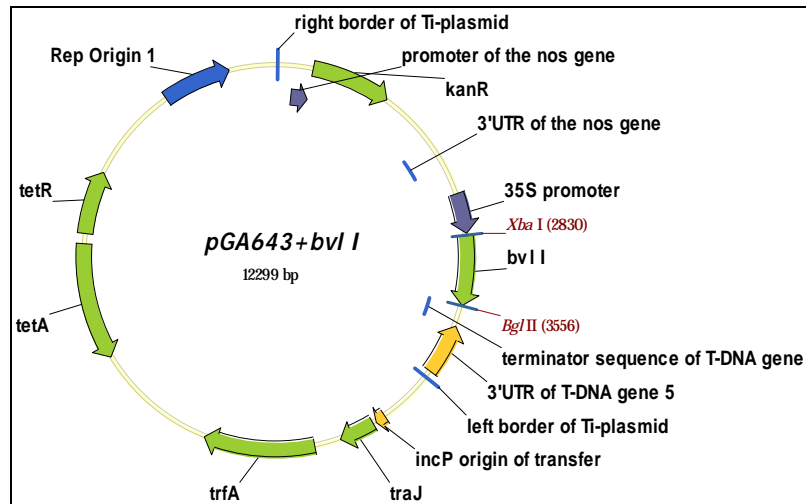


Figura1. Plasmídeo pGA643/bvI I

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nas primeiras quatro semanas os explantes infectados com *A. tumefaciens*, apresentaram muito pouco desenvolvimento de calos e observou-se necrose em alguns explantes. Com seis semanas pode ser notado o desenvolvimento dos calos próximos ao pedúnculo.

As folhas utilizadas no controle, com antibiótico adicionado ao meio de regeneração apresentaram necrose nas quatro primeiras semanas, enquanto que, os explantes que estavam em meio de regeneração sem antibióticos produziram brotações na quarta semana. Verificou-se uma alta percentagem de explantes necrosados nos eventos de transformação, (Figura 2). A regeneração entre os explantes que foram infectados com *A. tumefaciens* foi menor, quando comparados com o controle que não tinha adição de antibióticos.

Após a transferência dos explantes para meio com 2ip ocorreu uma maior indução de calos e brotações. A estimulação da divisão celular causada por reguladores sugerem que a eficiência da transformação genética pode ocorrer em um estágio particular do ciclo celular de cada célula (CHATEAU et al., 2000).

Quando as brotações foram transferidas para meio de multiplicação com antibióticos, muitos brotos que estavam com desenvolvimento satisfatório no meio de indução começaram a necrosar. A visualização do gel de agarose mostrou que todas as brotações, embora verdes, não apresentaram a banda correspondente ao gene a ser inserido.

O estabelecimento de uma estratégia eficiente para a transferência de genes usando o sistema *A. tumefaciens* é dependente do sucesso da interação entre o patógeno e a planta, bem como do protocolo de transformação utilizado. De acordo com Tzfira e Citovsky (2000), a primeira etapa é o reconhecimento e a fixação da bactéria no tecido vegetal. Na segunda, ocorre o processo de transferência do T-DNA e, finalmente, a integração do T-DNA no genoma da célula vegetal (GELVIN, 2000; ANDRADE et al., 2003). Dessa forma, o sucesso de todas essas etapas é necessária para a obtenção *in vitro* de uma planta transgênica.

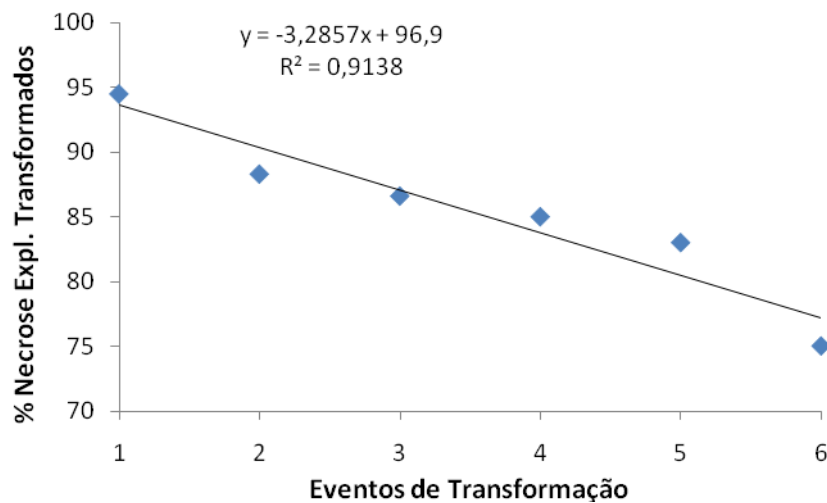


Figura 2. Percentagem de explantes necrosados nos eventos de transformação.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através da técnica de PCR demonstram que não houve integração do gene de bvl I, embora as brotações se mostraram tolerantes ao antibiótico Kanamicina.

5 REFERÊNCIAS

ANDRADE, G.M. et al. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium spp.* **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.5, p.465-476, 2003.

BIANCHI, V.J.; VENTURI, S.; FACHINELLO, J.C.; TARTARINI, S.; SANSAVINI, S. I marcatori AFLP e SSR, risolutivi nella identificazione genetica delle varietà di susino. *Frutticoltura*, Bologna, n.4, p.83-87, 2002.

Chateau S, Sangwan RS. Competence of *Arabidopsis thaliana* genotypes and mutants for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer: role of phytohormones. **Journal of Experimental Botany** v.51, p.1961-1968, 2000.

GELVIN, S.B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.51, p.223-256, 2000.

STUDART-GUIMARÃES, C. et al. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, v.13, n.1, p.167-178, 2003.

Tzfira T, Rhee Y, Chen M-H, Citovsky V. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. **Annu Rev. Microbiological**, v.54, p.187-219, 2000.