



DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE TRANSFORMAÇÃO DE *Jatropha curcas* L. E VERIFICAÇÃO DE SUA EFICIÊNCIA UTILIZANDO A PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE-GFP

GARCIA, Cíntia Silveira¹; MASIERO, Daniele de Souza¹; CASARIN, Tatiane¹; FORMOSO, Rafaela Silva¹ SILVA, Sergio Delmar dos Anjos²; DODE, Luciana Bicca³, PINTO, Luciano da Silva³

¹ Universidade Federal de Pelotas; Graduação em Biotecnologia; ² EMBRAPA CFACT, ³ Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Biotecnologia.
cintia.s.garcia@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) pertence à família *Euphorbiaceae* e ocorre naturalmente na América do sul (ZAKIR, et al., 2010). Esta espécie oleaginosa apresenta grande potencial para a produção de óleo vegetal destinado à produção de biodiesel, devido a sua adaptação às várias condições ambientais, pela qualidade do óleo produzido e por não competir com oleaginosas comestíveis devido a sua toxicidade.

Sob uma visão do sistema de produção sustentável de biocombustíveis é previsto um aumento significativo da demanda de oleaginosas no Brasil e no mundo (MARQUES e FERRARI, 2008). Porém, esta demanda só será suprida com o desenvolvimento de novas pesquisas, utilizando-se ferramentas biotecnológicas contemporâneas, como a técnica de cultura *in vitro* de tecidos de *J. curcas*, que permite a propagação e clonagem massal de genótipos elite além de auxiliar nas técnicas de engenharia genética visando a adição de características de interesse (ZAKIR, et al., 2010).

No pinhão-mansão é possível a transferência de genes relacionados ao aumento da resistência a estresses abióticos, como o gene JcERF, o silenciamento do(s) gene(s) envolvido(s) na produção do diterpeno tóxico (forbol) resultando em cultivares atóxicos e dos genes delta-9 ou 12 desaturase, proporcionando acúmulo dos ácidos esteárico e oléico, respectivamente (MARQUES e FERRARI, 2008).

Portanto, o desenvolvimento de um sistema eficiente de transformação genética do pinhão-mansão, abre caminho para o melhoramento genético do cultivar a nível molecular, seja pela introdução de novos genes que possam corrigir falhas de cultivares elite, como a susceptibilidade a algumas doenças, ou pelo bloqueio de genes que expressam características indesejáveis, como fatores antinutricionais (GUIDOLIN, 2003). Ainda que existam alguns protocolos de organogênese, embriogênese e de regeneração disponíveis na literatura, o objetivo desta pesquisa é estabelecer um protocolo de transformação adequado para genótipos elite de um programa de melhoramento, focado principalmente no aumento do teor e qualidade do óleo e diminuição ou remoção completa da toxicidade desta planta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no laboratório de Biologia Celular e Molecular Vegetal do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas.

Para a transformação, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 contendo o plasmídeo pRS037 que codifica a proteína GFP (Green Fluorescent Protein), foi

utilizada. Para o processo de transformação o protocolo descrito por (KLAFKE, et al., 2009) foi empregado. A suspensão bacteriana foi cultivada em 15 mL de meio LB (Luria Bertani) semi-sólido contendo os antibióticos (Gentamicina 50 mg.L⁻¹ e Rifampicina 100 mg.L⁻¹), overnight, em estufa a 28°C.

Posteriormente foi realizado um pré-inóculo em tubos de ensaio contendo, 50 mL de meio LB líquido. Para controle, em um dos tubos falcon, foi adicionado o antibiótico Rifampicina 100 mg.L⁻¹ e a *A. tumefaciens* não-transformada. Em outro tubo foram adicionados os antibióticos (Gentamicina 50mg.L⁻¹ e Rifampicina 100mg.L⁻¹) e a *A. tumefaciens* contendo o vetor pRS037. Ambos os cultivos foram mantidos 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 0,8 quando então foi iniciado o processo de transformação dos explantes.

Os explantes utilizados para a transformação, foram cotilédones e hipocótilos de pinhão-manso, previamente escarificados, e subdivididos em três grupos de tratamento, o testemunha (T1), o controle contendo a *A. tumefaciens* não-transformada (T2) e o *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo pRS037 (T3).

Os explantes do T1 não tiveram contato com meio de cultivo; os explantes do T2 permaneceram 15 minutos em contato com a suspensão contendo a *A. tumefaciens* não-transformada, e tratamento T3 permaneceram 15 minutos em contato com a suspensão contendo a *A. tumefaciens* com o pRS037. Em seguida, os explantes foram secos com auxílio de papel filtro esterilizado e colocados quatro em cada placa de petri contendo meio nutritivo MS (Murashige e Skoog, 1962) semi-sólido, suplementados com os reguladores de crescimento 5 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,2 mg.L⁻¹ ANA (ácido naftalenoacético) responsáveis pela indução de calos, totalizando 144 cotilédones, e 136 hipocótilos. Após este procedimento todas as placas contendo os explantes foram transferidos para sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas, a uma temperatura de 25±2°C.

Aos sete dias os explantes foram lavados em H₂O destilada e secos em papel filtro esterilizado, após realizou-se a primeira repicagem para o meio MS 3% de sacarose contendo os reguladores de crescimento BAP e ANA e o antibiótico bacteriostático cefotaxima (250 µg.mL⁻¹). Aos 14 dias de experimento, os explantes foram repicados para o mesmo meio contendo os antibióticos cefotaxima (250 µg.mL⁻¹) e canamicina (200 µg.mL⁻¹) para seleção dos transformantes. Aos 21 dias, os explantes de cotilédones foram excisados e repicados para o mesmo meio inicial contendo canamicina (200 µg.mL⁻¹). Aos 22 dias, o procedimento foi realizado com os explantes de hipocótilos. Após 10 dias da repicagem em canamicina (200 µg.mL⁻¹), os explantes foram novamente repicados para o meio MS 3% de sacarose contendo os reguladores de crescimento BAP e ANA acrescido do antibiótico canamicina (100 µg.mL⁻¹).

Por fim, aos 50 dias de experimento os explantes foram observados em estereomicroscópio de fluorescência para a visualização dos explantes putativamente transformados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se após sete dias de experimento que a técnica utilizada foi inicialmente eficiente, pois considerando-se os aspectos de integridade estrutural, e

resposta morfogênica *in vitro*, os explantes tanto de cotilédones quanto de hipocótilos em ambos os tratamentos, permaneceram íntegros com pequenos pontos iniciais de calogênese. Calos induzidos pelos reguladores de crescimento presentes no meio de cultivo, apresentavam crescimento rápido e visualmente pouca oxidação necessitando repicagens periódicas (Tab.1).

Tabela 1. Total de calos possivelmente transformados e brotos regenerados de cotilédones e hipocótilos após transformação com o vetor pRS037 via *A. tumefaciens*.

Explantes	Cotilédones	Hipocótilos
Transformados	144	136
Repicados	451	391
Calos putativamente transformados	28	59
Brotos regenerados putativamente transformados	03	0

Aos 32 dias de experimento, houve o surgimento de três brotos em uma placa contendo cotilédones, do tratamento T3, os quais estavam putativamente transformados com vetor pRS037 (Fig. 1). 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 1. Brotos regenerados a partir de cotilédones putativamente transformados com o vetor pRS037 via *Agrobacterium tumefaciens*.

Após 50 dias de experimento, boa parte dos calos apresentava um bom desenvolvimento, sendo que alguns, pela ação do antibiótico de seleção, tornaram-se senescentes neste período. Os explantes em boas condições foram examinados ao microscópio de fluorescência e a expressão do gene GFP foi observada (Fig.2).

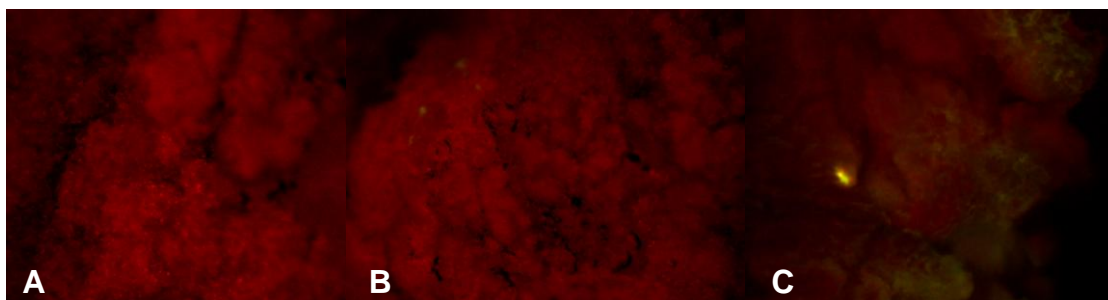


Figura 2 – Calos de hipocótilos observados em estereomicroscópio de fluorescência apresentando tecido não transformado nos tratamentos A- testemunha (T1); B- controle contendo a *A. tumefaciens* não-transformada (T2); e C- tecido putativamente transformados com vetor pRS037 (T3).

A transformação genética de plantas de diferentes espécies utilizando *A. tumefaciens* por ser uma técnica muito difundida, possui protocolos de simples execução. No caso do pinhão-manso, a adaptação de um protocolo específico para cultivar, mostrou resultados satisfatórios, podendo este ser utilizado para integração de genes de interesse com baixo custo quando comparada com outras técnicas, como a biobalística.

4 CONCLUSÃO

Embora haja a necessidade de se fazer um teste confirmatório para detecção do gene introduzido na transformação genética dos explantes de pinhão-manso, foi possível observar que o protocolo de transformação utilizado apresentou êxito. Este estudo contribuirá para pesquisas futuras no processo de transformação genética dessa espécie.

APOIO: FINEP e EMBRAPA CPACT.

5 REFERÊNCIAS

GUIDOLIN, F.A. **Regeneração de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via agrobacterium.** 2003. Tese de doutorado em ciências – Universidade de São Paulo, Piracicaba - São Paulo, 2003.

KLAFKE, G.B.; AMARAL, M.N.; CASTRO, R.I.; RAISKI, S.; NORA, F.R. Transformação genética de *Agrobacterium tumefaciens* e *Escherichia coli* com o vetor binário pRS037 contendo o gene GFP. In. **XVIII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/XI ENPÓS/ MOSTRA CIENTÍFICA.** Pelotas, 2009.

MARQUES, D.A.; FERRARI, R.A. O papel das novas biotecnologias no Melhoramento genético do pinhão-manso. In. **21ª REUNIÃO ATUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO,** Campinas – São Paulo, 2008.

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

PINTO, L.S. **Expressão heteróloga de lectina de *Bauhinia variegata* L e suas aplicações biotecnológicas.** 2008. Tese de doutorado em ciências – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

ZAKIR-PEREIRA, A.C.V.; ROGALSKI, M.; TANAKA, S.M.; CHADDAD, M.M.; CARRER, H. Organogênese e transformação genética de Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). In. **56º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA,** Guarujá - São Paulo, 2010.