



Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

**EXPRESSÃO DE GENES DE CARACTERÍSTICAS
AGRONÔMICAS EM FEIJÃO-CAUPI**

Cristiane Teresinha Citadin

Brasília
Dezembro, 2011



Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

EXPRESSÃO DE GENES DE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM FEIJÃO-CAUPI

Cristiane Teresinha Citadin

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Molecular, curso de pós-graduação em Biologia Molecular como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão

Brasília
Dezembro, 2011



Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

EXPRESSÃO DE GENES DE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM FEIJÃO-CAUPI

Cristiane Teresinha Citadin

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Molecular, curso de pós-graduação em Biologia Molecular como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Biologia Molecular.

Banca examinadora

Dr. Francisco José Lima Aragão

Dra. Diva Maria de Alencar Dusi

Dr. Francisco Rodrigues Freire Filho

Dr. Giovanni Rodrigues Vianna

Dr. Luciano Paulino da Silva

Dra. Maria Laine Penha Tinoco (Suplente)

Pense sempre pelo lado positivo, pois é para lá que o DNA corre.

Cristiane Teresinha Citadin

Aos meus pais, Lauro e Nelice.

Agradecimentos

Embora tenha empregado muito do meu esforço pessoal em tudo que tenho obtido, especialmente, nessa tese, nada disso seria possível sem os anjos que Deus colocou no meu caminho, cada um com um papel único e essencial, que eu tenho o prazer de chamar de amigos. Por isso agradeço:

A Deus, em primeiro lugar, pelo presente da minha vida.

A minha família, pai, mãe, irmão, sobrinhas e especialmente a minha irmã que não mediu esforços para me apoiar quando mais precisei.

Aos amigos do LTG que não encontro palavras para agradecer a presença marcante em minha vida nesses anos em que se mostraram minha família. A Elsa Nogueira, uma amiga e mãezonha, que sempre me ajudou em tudo que precisei. A Maria Laine Tinoco, um estímulo constante. A Cristiana Andrade e Nayhanne Tizzo pela ajuda nos experimentos. A Mirela Pupo, por me ajudar a corrigir aberrações do texto. Ao Abdulrazak Ibrahim, a Cristina Pimentel, a Estela Andrade e a Juliana. A Andréa Rachel, por ceder suas plantas. A tantos que passaram e ainda estão no laboratório, por sua agradável companhia e troca de ideias.

A todos os colegas da Embrapa que me acompanharam todos esses anos e com os quais pude contar, ainda que por uma divertida conversa de corredor.

A minhas amigas e quase psicólogas Norma Paes, Silane Pedrollo e Viviane Fragoso. Aos tantos amigos queridos que estiveram comigo.

A Rosimeri Veronez e Pauline Lopes, pela companhia e apoio.

Ao meu orientador Dr. Francisco José Lima Aragão, que estimula, ensina e dá exemplo do que é ser pesquisador.

A Dra. Diva Maria de Alencar Dusi, por me auxiliar nos experimentos de microscopia. Também agradeço a Rosana e Ana Cristina do laboratório de microscopia, sem a ajuda delas seria impossível realizar esses experimentos.

Ao Dr. Gustavo Mendonça, por me auxiliar nos experimentos de western blot.

Ao Dr. Higgins, por ceder anticorpo contra zeína.

Ao Dr. Giovanni Rodrigues Vianna, por me ajudar em experimentos de Southern blot e discutir intermináveis construções de vetores.

Ao Dr. Luciano Paulino Silva, por me ajudar discutir e estimular questões científicas, além de me auxiliar nos experimentos de espectrometria de massa.

Ao Dr. Francisco Rodrigues Freire Filho, por ceder as sementes de feijão-caupi que utilizei para transformar.

Ao Dr. Francisco Campos, pela parceria.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo suporte técnico e financeiro à pesquisa.

Ao Departamento de Biologia Celular da UnB e secretaria, na pessoa da Ana.

Sumário

Lista de figuras e tabelas	viii
Resumo	ix
Abstract.....	xi
Apresentação	1
Capítulo I	3
Introdução	4
Revisão de literatura	7
Transformação genética de feijão- caupi.....	7
Problemas agronômicos do feijão-caupi como alvo para engenharia genética...15	
Introdução de características agronômicas desejadas em feijão-caupi.....	17
Perspectivas na transformação de feijão-caupi.....	18
Conclusão	22
Referências bliográficas	23
Capítulo II	32
Introdução	33
Objetivo geral	38
Objetivos específicos	38
Materiais e métodos	39
Vetor de expressão plasmidial.....	39
Transformação de feijão-caupi.....	40
Triagem das plantas transgênicas por PCR.....	40
Análises de Southern blot.....	41
Teste de progenies quanto à tolerância ao herbicida imazapyr.....	42
Resultados e discussão	43
Conclusão e perspectivas	51
Referencias bibliográficas	52
Capítulo III	56
Introdução	57
Objetivo geral	60
Objetivos específicos	60
Materiais e métodos	61
Construção de vetor de expressão semente específico contendo o gene de uma δ -zeína.....	61
Transformação do feijão-caupi.....	61

Triagem das plantas transgênicas por PCR.....	62
Análises de Southern blot.....	62
Extração de DNA e PCR de sementes.....	62
Extração das proteínas álcool-solúveis.....	62
Espectrometria de massa.....	63
Western blot.....	63
Resultados e discussão.....	64
Conclusão e perspectivas.....	72
Referências bibliográficas.....	73
Capítulo IV.....	80
Introdução.....	81
Objetivo geral.....	85
Objetivos específicos.....	85
Materiais e métodos.....	86
Material biológico.....	86
Análises de Southern blot.....	86
Análise de alterações morfológicas.....	86
Clarificação das anteras e dos ovários para análise de microscopia em DIC.....	86
Análise de transcritos de δ -zeína em folhas das plantas inférteis.....	87
Confecção de bibliotecas de Genome Walking.....	88
Resultados e discussão.....	89
Conclusão e perspectivas.....	97
Referências bibliográficas.....	99
Apêndice.....	102

Lista de figuras e Tabelas

Capítulo I

Figura 1: Distribuição em porcentagem de sistemas de introdução de genes em feijão-caupi transgênico de 1987 até 2010.....	8
Tabela I: A trajetória histórica do desenvolvimento de feijão-caupi transgênico (<i>Vigna unguiculata</i>)	9

Capítulo II

Figura IIa. Região consenso de vetores de expressão contendo o cassete de expressão do gene <i>ahas</i> e de resistência ampicilina (gene <i>bla</i>).....	39
Figura IIb. Plantas transgênicas e folhas de plantas transgênicas de feijão-caupi após 2 semanas de aplicação do herbicida imazapyr.....	45
Tabela IIa. Relação do número de plantas e a reação dentro das 15 linhagens transgênicas de feijão-caupi após um mês de pulverização com 100g/ha do herbicida imazapyr.....	46
Tabela IIb. Relação do número de plantas e a reação dentro das 15 linhagens transgênicas de feijão-caupi após um mês de pulverização com 200g/ha do herbicida imazapyr.....	46
Figura IIc. Planta transgênica 59 testada em 4 diferentes concentrações do herbicida imazapyr.....	48
Figura IId. <i>Southern blot</i> de 10 plantas transgênicas tolerantes ao herbicida imazapyr.....	49

Capítulo III

Figura IIIa. Alinhamento da sequência de nucleotídeos e sequência de aminoácidos preditos da zeína amplificada a partir da biblioteca de cDNA de endosperma de milho.....	65
Figura IIIb. Vetor plasmidial para expressão semente específica do gene da δ -zeína de 18 kDa do milho.....	66
Figura IIIc. <i>Southern blot</i> das linhagens transgênicas contendo o cassete de expressão para a δ -zeína.....	66
Figura IIId. <i>Southern blot</i> de plantas progênie de Z153.....	68
Figura IIIe. Espectro de massa das proteínas da fração álcool solúvel de feijão-caupi e milho.....	70

Capítulo IV

Figura IVa. Plantas transgênicas inférteis portando o gene de uma delta-zeína de 18 kDa do milho.....	83
Figura IVb. Estames e região superior do pistilo em fase de antese floral em flores de feijão-caupi.....	90
Figura IVc. Ovário e óvulos de feijão-caupi.....	91
Figura IVd. Flores de feijão-caupi em 5 estágios de desenvolvimento que precedem a antese, selecionados para análise de óvulos e polens.....	92
Figura IVe. Óvulos de feijão-caupi em microscopia de luz com DIC.....	93
Figura IVf. Anteras de feijão-caupi em microscopia de luz com DIC. A) Antera de uma planta não transformada.....	94
Figura IVg. Análise de transcritos em folhas de feijão-caupi amplificados por RT-PCR.....	95

Resumo

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) é uma leguminosa de grande importância na alimentação humana, e tem sido alvo de melhoramento clássico por décadas, no entanto, algumas características, como resistência a estresses bióticos e teores de aminoácidos sulfurados em sementes, ainda não puderam ser incorporados. Nas últimas três décadas, uma série de tentativas foi realizada com intuito de desenvolver protocolos reprodutíveis na geração de feijão-caupi transgênico que permitam a expressão de genes de importância agrônômica, especialmente aqueles que não foram incorporados pelo melhoramento clássico. No momento atual, vários pesquisadores têm estabelecido com sucesso procedimentos para transformação genética de feijão-caupi. Neste trabalho é relatada a obtenção de feijão-caupi transgênico resistente ao herbicida Imazapyr. Para isso, foram utilizados vetores contendo um cassete de expressão constitutivo da enzima *AtAHAS*. Estas plantas foram transformadas pela técnica de biobalística e um total de 16 linhagens transgênicas confirmadas por análises de *Southern blot*. Bioensaios para determinar a tolerância ao herbicida foram realizados usando diferentes concentrações de imazapyr. Algumas linhagens mostraram alta tolerância, sobrevivendo em até 400g/ha de imazapyr e não apresentando sintomas ao herbicida, demonstrando que o gene *Atahas* é capaz de gerar tolerância a herbicida a Imazapyr em feijão-caupi. Também é reportado neste trabalho, a introdução do gene de uma δ -zeína do milho (*Zea mays*) de 18 kDa (*dzs18*), que é rica em resíduos aminoácidos de metionina. Análises de *Southern blot* confirmaram a introdução do transgene no genoma da planta em múltiplos *loci*. No entanto, a segregação na progênie ficou próxima de uma razão de 1:1, sugerindo interferência na produção de gameta. Análises de expressão da proteína em sementes da única planta transgênica segregante foram negativas. Assim sendo, neste trabalho não foi possível analisar aumento dos níveis de metionina na semente. Não é possível concluir ainda o motivo da não expressão da δ -zeína em caupi, necessitando da geração de um número maior de eventos transgênicos segregantes. Dentre as plantas transformadas para expressar o gene *dzs18*, duas apresentaram fenótipo de esterilidade juntamente com multibrotação, multifloração e escasso número de folhas. Essas observações levaram a questionar se as mutações eram devido ao um efeito do transgene ou de mutagênese insercional, além de questionar que alterações nas flores poderiam estar levando ao fenótipo de esterilidade. Análises de *Southern blot* mostraram a presença de múltiplas cópias do transgene, aumentando as chances de que

o fenótipo observado esteja relacionado com mutagênese insercional. Análise de polens e óvulos mostrou sérias alterações, além de indeiscência das anteras, explicando o fenótipo de esterilidade, concluindo tratar-se de alterações na maturação dos gametas. RT-PCR das folhas confirmou a presença de transcritos do transgene, sugerindo que as alterações podem estar relacionadas também com a expressão da δ -zeína. Os dados gerados não são capazes de confirmar se as mutações se devem ao transgene ou a mutagênese insercional, por isso mais análises precisam ser realizadas, incluindo a geração de mais eventos para esse transgene. Para isso também, bibliotecas de *Genome walking* foram confeccionadas para futura análise e correlação entre os lócus de inserção do transgene no genoma de feijão-caupi.

Abstract

The cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) is a legume of great importance for human nutrition. Some characteristics, such as resistance to biotic stress and levels of sulfur amino acids in seeds, have not yet been incorporated by the classical breeding. In the last three decades several attempts were made in order to develop reproducible protocols for generation of transgenic cowpea plants, allowing the expression of genes of agronomic importance. At the present, several researchers have successfully established procedures for genetic transformation of cowpea, presenting evidence of stable transgene integration, which segregated in a Mendelian fashion. In this work it is reported the obtaintion of transgenic cowpea lines resistant to the imidazolinone herbicide group. For this, we used vectors containing a cassette for the *AtAHAS* enzyme constitutive expression. These lines were transformed by the biolistic system and a total of 16 transgenic lines was confirmed by Southern blot analysis. Bioassays to determine the tolerance to herbicide was carried out using different concentrations of imazapyr. Some lines showed high tolerance, surviving to 400g/ha imazapyr and presenting no herbicide symptoms. Different levels of tolerance could not be associated to the integrity of the expression cassette. It is also reported in this paper, the introduction in cowpea of an 18 kDa δ -zein gene of maize (*Zea mays*), which is rich in methionine amino acid residues. Southern blot analysis confirmed the introduction of the transgene into the plant genome at multiple loci. However, the segregation in the progeny did not occurred as expected, being closed to a segregation ration of 1:1, suggesting interference with the production of gametes. Analysis of protein expression in transgenic seeds of single plant segregating was negative. Thus, was not possible to analyze increased levels of methionine in the seed. It is not yet possible to conclude the reason for the negative expression of δ -zein in cowpea, necessitating the generation more number of segregating transgenic events. Among the plants transformed to express the δ -zein gene, two of then showed a sterility phenotype with multiple formation of both shoots and flowers. In addition, a small number of leaves was also observed. These lines had multiple copies of the transgene integrated into the genome, as observed in the Southern blot analysis, increasing the chances that the observed phenotype is related to insertional mutagenesis. Analysis of pollen and ovules showed serious change, and indehiscence anthers, explaining the phenotype of

sterility, concluding that it is changes in the gametes maturation. RT-PCR confirmed the presence of sheets of transcripts of the transgene, suggesting that the changes may also be related to the expression of δ -Zein. The data generated are not able to confirm if mutations are due to the transgene or insertional mutagenesis, so further analysis must be performed, including generation of more transgene events. Genome walking libraries were prepared for further analysis and correlation between the locus of insertion of the transgene in the genome of cowpea.

Apresentação

A tese aqui apresentada foi dividida em quatro capítulos, os quais relatam a transformação genética do feijão-caupi, tanto em forma de revisão de literatura, quanto por meio da pesquisa desenvolvida no Laboratório de Transferência de Genes (LTG) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

No primeiro capítulo é relatado um histórico da transformação do feijão-caupi, as principais técnicas e estratégias utilizadas, bem como o atual *status* no mundo e as perspectivas para essa cultura no que diz respeito ao melhoramento por meio de engenharia genética. Esta revisão se baseia em um artigo que será publicado na revista internacional *GM crops*, o qual já está aceito.

O segundo capítulo aborda a transformação de feijão-caupi para obtenção de resistência a herbicida. Neste trabalho de pesquisa foram geradas plantas com alto grau de tolerância ao herbicida imazapyr, por meio da inserção de um gene mutado de *Arabidopsis thaliana*, que codifica a enzima aceto-hidroxiácido sintase, importante catalisadora de passos iniciais na síntese de aminoácidos ramificados da planta.

A estratégia desenvolvida na tentativa de aumentar o teor do aminoácido metionina em feijão-caupi é o tema do terceiro capítulo. Ela baseou-se na utilização de um gene da delta-zeína de 18 kDa do milho, uma proteína que tem 26% do seu conteúdo de resíduos do aminoácido metionina. Com o intuito de direcionar a expressão da proteína à semente, foram utilizados o promotor da subunidade α' da β -conglucininina da soja e seu peptídeo. Embora um grande número de embriões tenham sido bombardeados, esta pesquisa continua em andamento, pois, até o momento só foi obtida uma planta segregante contendo o transgene de interesse.

O quarto capítulo é derivado do trabalho desenvolvido no terceiro capítulo, onde foram geradas linhagens de plantas inférteis e com algumas características morfológicas diferenciadas. Neste capítulo são relatadas as alterações observadas macroscópica e microscopicamente nas plantas e nas flores. Algumas análises moleculares dessas linhagens transgênicas foram e continuarão sendo realizadas para melhor correlacionar o processo de transgenia com as mutações observadas.

Capítulo I

Engenharia genética em feijão-caupi: história, estado atual e perspectivas.

Introdução

O Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) é um dos legumes mais importantes e amplamente cultivados em muitas partes do mundo, particularmente na África, Europa, América Latina e algumas partes da Ásia e Estados Unidos (faostat.fao.org/faostat; <http://old.iita.org/>).

Dados obtidos da FAO (*Food and Agriculture Organization*) mostram que aproximadamente 4 milhões de toneladas de grãos de feijão-caupi seco são produzidos anualmente em uma área cobrindo cerca de 10 milhões de hectares em todo o mundo (www.faostat.fao.org/faostat). Entretanto, esses números estão subestimados porque não incluem dados do Brasil, Índia e alguns outros países (Singh *et al.*, 2002). Na América Central, leste e sul da África, as estatísticas incluem o feijão-caupi e o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) como uma única cultura (Timko *et al.*, 2008). Mesmo o Brasil, que produz anualmente 482 mil toneladas de feijão-caupi em uma área cobrindo aproximadamente 1,25 milhões de hectares, o que é considerável para esta cultura, não tem os dados da produção disponíveis no site da FAO, pois essa estatística também está incluída nos dados de produção do feijão comum.

O feijão-caupi é uma leguminosa anual, herbácea, produz frutos do tipo vagem e, dependendo da variedade, pode apresentar variação na altura da planta. As raízes podem atingir até dois metros de profundidade no solo, o que auxilia a planta a resistir à seca. No Brasil, trata-se do único feijão capaz de sobreviver com sucesso tanto na região norte, onde a umidade é alta e o solo é argiloso, como no nordeste, onde o clima é seco, o solo é arenoso. Esta cultura desenvolve-se também em locais considerados menos estressantes e de clima temperado, como no estado de Santa Catarina e o estado norte-americano da Califórnia (Ehlers & Hall, 1997; Barreto, 1999; Freire-Filho *et al.*, 1999).

Comparado à outras leguminosas como a soja, o feijão comum, a ervilha, a lentilha, o amendoim e o grão-de-bico, o feijão-caupi apresenta características superiores para a recuperação de áreas degradadas, uma vez que em associação com rizóbio nativo torna-se eficiente fixador de nitrogênio sob as mais adversas condições (Ehlers & Hall, 1997), sendo um excelente candidato para uso em bioremediação de regiões em processo de desertificação (Benko-Iseppon, 2001).

Os grãos de feijão-caupi são uma fonte valiosa de carboidratos, lipídeos, minerais e vitaminas, incluindo folato, tiamina e riboflavina (Nielson *et al.*, 1993), sendo portanto, importante para a nutrição humana (Obatolu 2003; Phillips *et al.*, 2003). Com propriedades nutricionais superiores ao feijão comum, além de ter digestibilidade melhor que os demais feijões, possui também o maior teor de proteínas (24%) (Ehlers & Hall, 1997; Silva & Freire-Filho, 1999).

As vantagens aqui apresentadas fazem do feijão-caupi a escolha para cultivo por muitos agricultores, especialmente aqueles que não têm condições de maiores investimentos (Singh *et al.*, 2003).

Embora considerável progresso tenha sido feito no melhoramento convencional de feijão-caupi, o que levou ao desenvolvimento e introdução de algumas variedades importantes em 63 países, algumas características importantes ainda não puderam ser incorporadas. Por exemplo, o desenvolvimento de feijão-caupi resistente à lagarta da vagem (*Maruca vitrata* Fabricius) foi obtido por meio da inserção do gene *Cry1Ab* por meio de engenharia genética (Adesoye *et al.*, 2008a).

Com base nos problemas incapazes de serem resolvidos com melhoramento convencional, tecnologias baseadas em transgenia representam uma ferramenta importante para o desenvolvimento de feijão-caupi com características agrônômicas desejadas.

Neste primeiro capítulo são apresentados, na forma de revisão, os esforços realizados e o sucesso registrado na tentativa global para gerar feijão-caupi transgênico, a fim de atender à demanda desafiadora para melhorar a cultura por meio de diferentes abordagens do melhoramento genético, abrangendo um período de três décadas.

Nesta primeira parte, também é reportada a aplicação destes protocolos na geração de feijão-caupi com características agronômicas melhoradas em trabalhos de pesquisa e alguns projetos em andamento, dando o estado atual e as perspectivas para o desenvolvimento de feijão-caupi melhorado geneticamente.

Revisão de literatura

Transformação genética de feijão-caupi

Nas últimas três décadas, inúmeras tentativas foram feitas com intuito de gerar feijão-caupi transgênico (Garcia *et al.*, 1986, 1987; Penza *et al.*, 1991; Popelka *et al.*, 2006; Raveendar e Ignacimuthu, 2010)

A abordagem geral, na maioria dos casos, tem sido por meio do emprego de *Agrobacterium tumefaciens* como sistema de introdução de genes (Figura 1). Utilizando manipulação de diferentes fatores, tais como: tecidos alvo, genes repórteres, agentes seletivos, condições de cultura e sistemas para introdução de genes, pesquisadores de diferentes países têm se empenhado na geração de feijão-caupi transgênico com o objetivo maior de integrar genes de interesse agrônômico. Além de integrar os genes, é importante que os protocolos desenvolvidos gerem plantas que segreguem o transgene nas progênes resultantes segundo expectativas mendelianas (Tabela 1).

Em todas essas abordagens, um aspecto importante foi o estabelecimento de técnicas de propagação *in vitro* capazes de gerar explantes receptivos de células totipotentes com o potencial para regenerar plantas completas após a introdução do gene de interesse. Apesar de, desde a década de oitenta, terem sido realizadas várias tentativas estabelecer protocolos de regeneração *de novo* e transformação genética de feijão-caupi, nenhum avanço foi registrado até o presente (Aragão e Campos, 2007). No entanto, com o desenvolvimento de novas estratégias, que não necessariamente dependem diretamente do uso de sistemas de regeneração *de novo*, foi possível obter plantas de feijão-caupi transgênico e algumas histórias de sucesso são relatadas na sequência deste texto (Muthukumar *et al.*, 1996; Ikea *et al.*, 2003; Popelka *et al.*, 2006; Ivo *et al.*, 2008).

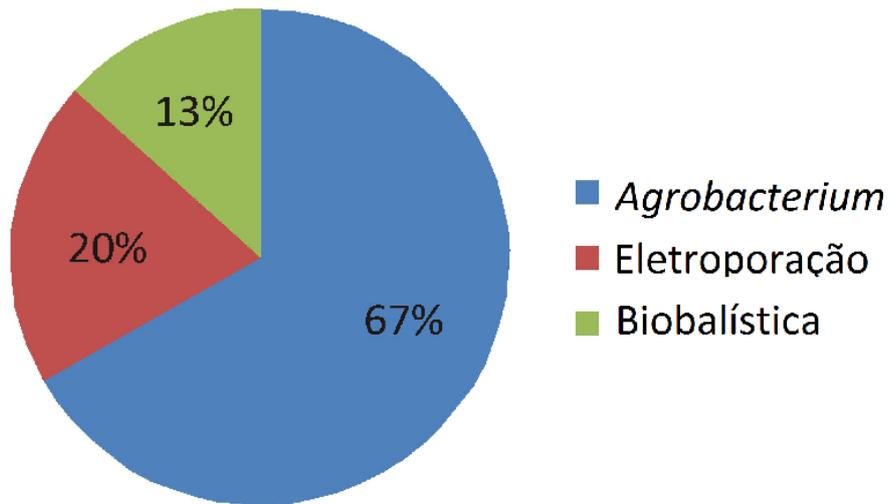


Figura I: Distribuição em porcentagem de sistemas de introdução de genes em feijão-caupi transgênico de 1987 até 2010.

Tabela I: A trajetória histórica do desenvolvimento de feijão-caupi transgênico (*Vigna unguiculata*)

Gene de interesse	Marcador de seleção	Sistema de inserção de gene	Tecido alvo	Eficiência de transformação relatada	Grau de integração do transgene	Referência
<i>nptII</i>	Canamicina	A	Discos foliares	NR	Callus Transgênicos	Garcia <i>et al.</i> , 1986
CPMV M-RNA	Canamicina	A	Discos foliares	NR	Callus Transgênicos	Garcia <i>et al.</i> , 1987
<i>gus</i>	-	A	Embriões maduros	NR	Embriões zigóticos Transgênicos	Penza <i>et al.</i> , 1991
<i>gus</i>	-	E	Embriões maduros	NR	Embriões zigóticos Transgênicos	Penza <i>et al.</i> , 1992
<i>gus</i>	-	E	Embriões maduros	NR	Embriões zigóticos Transgênicos	Akella e Lurquin, 1993
<i>hpt</i>	higromicina	A	Explantes Cotiledonares	NR	Plantas transgênicas Regeneradas	Muthukumar <i>et al.</i> , 1996
<i>gus</i>	fosfinotricina	B	Explantes meristemáticos	NR	Transmissão para progenie / segregação não Mendeliana	Ikea <i>et al.</i> , 2003
<i>gus</i>	fosfinotricina	A	Nós cotiledonares	0,15%	Plantas transgênicas com transmissão Mendeliana para progenie	Popelka <i>et al.</i> , 2006
<i>gus</i>	Canamicina	A	Nós cotiledonares	0,76%	Plantas transgênicas com transmissão Mendeliana para progenie	Chaudhury <i>et al.</i> , 2007
<i>gus</i>	Geneticina	A	Nós cotiledonares	1,64%	Plantas transgênicas com transmissão Mendeliana para progenie	Solleti <i>et al.</i> , 2008b
<i>gus</i>	imazapyr	B	Meristema apical	0,9%	Plantas transgênicas com transmissão Mendeliana	Ivo <i>et al.</i> , 2008

					para pro genie	
<i>αAI-1</i>	Geneticina	A	Nós cotiledonares	1,67%	Plantas transgênicas com transmissão Mendeliana para pro genie	Solleti <i>et al.</i> , 2008a
<i>CryIAb</i>	geneticina	E	Gemas nodais	NR	Transmission para pro genie / segregação não Mendeliana	Adesoye <i>et al.</i> , 2008
<i>gus</i>	fosfinotricina	A	Embriões	3,9%	Transmission para pro genie / segregação Mendeliana não reportada	Adesoye <i>et al.</i> , 2010
<i>gus</i>	Higromicina	A	Nós cotiledonares	1,61%	Plantas transgênicas regeneradas	Raveendar e Igancimuthu, 2010

A *Agrobacterium tumefaciens*

B Biobalística

E Eletroporação

NR Não reportado

CPMV *cowpea mosaic virus* (virus do mosaico do caupi)

αAI-1 *Alpha-amylase inhibitor-1* (inibidor da alfa-amilase-1)

O primeiro sucesso foi reportado em 1986, quando Garcia e colaboradores (Garcia *et al.*, 1986) transformaram discos de folhas primárias de feijão-caupi utilizando *Agrobacterium tumefaciens* carregando um plasmídeo Ti que abrigava dois genes quiméricos idênticos para resistência à canamicina. O grupo obteve *callus* transgênicos com o gene de uma nopalina sintase e uma amino glicosídeo fosfotransferase, que foram confirmados por análise de *Southern blot*. Em seguida, o mesmo grupo usou o protocolo estabelecido para expressar um fragmento de RNA viral (M-RNA) do vírus do mosaico do feijão-caupi (CPMV – *Cowpea Mosaic Virus*) em *callus* de feijão-caupi (Garcia *et al.*, 1987). O objetivo deste segundo experimento de transformação foi estudar o CPMV utilizando duas construções diferentes, uma contendo promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV – *Cauliflower Mosaic Virus*) e outra contendo o promotor da nopalina sintase de *A. tumefaciens*. Esta abordagem resultou em um aumento de dez vezes no número de transcritos do transgene usando o promotor 35S CaMV ao invés de nopalina sintase, levando a uma maior eficiência e demonstrando a aplicabilidade deste promotor na transformação de feijão-caupi (Garcia *et al.*, 1987). O trabalho destacou, principalmente, a possibilidade de estudar parasitas de feijão-caupi utilizando esta abordagem devido à sua aplicabilidade em diferentes tecidos da planta. Pela primeira vez, demonstrou que a *A. tumefaciens* poderia ser usada como um sistema exógeno para inserção de genes e como meio de estudar um vírus associado ao feijão-caupi.

Os trabalhos pioneiros de Garcia e colaboradores (Garcia *et al.*, 1986, 1987) e uma série de outras tentativas de desenvolver sistemas de transformação e regeneração (Penza *et al.*, 1991; Perkins *et al.*, 1987; Filipponi, 1990; Penza *et al.*, 1992; Akella e Lurquin, 1993) foram muito promissoras mas, demorou quase uma década até que as

primeiras plantas transgênicas de feijão-caupi fossem regeneradas. Isto foi possível quando Muthukumar e colaboradores (Muthukumar *et al.*, 1996) co-cultivaram explantes cotiledonares com *A. tumefaciens* para expressar o gene de resistência à higromicina. Na sequência, esses explantes foram submetidos à organogênese levando à geração de brotos transgênicos. Análise de dados a partir do trabalho mostrou que um terço dos brotos totais decorrentes da co-cultura de explantes prosperou após a aclimação em solo. Embora um bom número destas plantas tenha atingido a maturidade, não houve produção de sementes (Muthukumar *et al.*, 1996).

Embora a grande maioria dos experimentos de transformação, desde Garcia e colaboradores (1986 e 1987) até 2010, tenham utilizado o sistema mediado por *Agrobacterium* para inserção de genes, alguns autores utilizaram outros sistemas de introdução direta de genes (Figura 1).

Após quase uma década sem qualquer progresso na transformação de feijão-caupi, Ikea e colaboradores (Ikea *et al.*, 2003) reportaram a produção do primeiro feijão-caupi transgênico obtido via bombardeamento de partículas com integração molecular do gene observada nas gerações T₁, T₂ e T₃. No experimento, os tecidos meristemáticos foram pré-cultivados 24 a 48 horas em meio de regeneração e alongação antes do bombardeamento. O vetor utilizado consistiu em um plasmídeo contendo o gene repórter *gus* junto com o gene marcador de seleção *bar* sob o controle do promotor 35S de CaMV. Embora menos de 1% do total de explantes bombardeados tenham sido recuperados e a segregação baixa na progênie, este trabalho representou um marco importante na trajetória histórica da transformação de feijão-caupi, sendo o primeiro trabalho onde houve passagem do transgene de uma geração para outra em feijão-caupi, embora as progênies geradas não obedecessem às leis mendelianas de herança.

Três anos mais tarde foi relatado, pela primeira vez, transformação estável com progênies segregando o transgene segundo expectativas mendelianas (Popelka *et al.*, 2006). Em uma adoção de diferentes estratégias de sistemas de transformação de legumes usando *A. tumefaciens*, Popelka e colaboradores foram capazes de obter plantas transgênicas de feijão-caupi com uma frequência de transformação de 0,15%. Os parâmetros críticos contornados pelos autores incluíram o uso de nós cotiledonares de sementes maduras ou em desenvolvimento como explantes, a remoção de auxinas na fase inicial de proliferação dos explantes, a suplementação

de baixo nível de BAP durante a formação de brotos e alongamento, bem como adição de compostos tióis durante a transfecção e co-cultura com *Agrobacterium*.

Um protocolo ainda mais eficiente do que o descrito acima foi obtido usando *A. tumefaciens* como veículo para inserção de transgene onde uma série de modificações foi feita como: uso de diferentes cultivares, explantes, cepas de *Agrobacterium*, vetor binário, meio de co-cultura e duração, tipo e aplicação de agente seletivo e marcador, meios de indução de enraizamento e multibrotação, garantindo maior frequência de transformação (Chaudhury *et al.*, 2007).

No ano seguinte, nosso laboratório (LTG – Embrapa Cenargen) desenvolveu um protocolo de transformação eficiente de feijão-caupi, independente da variedade e com uma alta frequência relativa de transformantes seguindo um padrão de segregação mendeliana (Ivo *et al.*, 2008). O sistema consistiu em transformação de meristemas apicais de embriões excisados das sementes por biobalística utilizando o gene repórter *gus* e seleção com herbicida imazapyr. Esse tipo de seleção foi possível graças a introdução de um gene *ahas* mutante no vetor utilizado para a transformação. A viabilidade dessa abordagem, bem como o uso de imazapyr, trouxe à tona o enorme potencial desse sistema na produção de feijão-caupi transgênico que expressa características de importância agrônômica. Além da frequência de transformação relativamente mais elevada (0,9%), o trabalho demonstrou a transferência eficiente de genes e estes sendo transmitidos nas gerações T₁ e T₂ segundo expectativas das leis de Mendel.

Problemas agronômicos do feijão-caupi como alvo para engenharia genética

Devido à sua importância econômica, o feijão-caupi tem sido alvo de programas de melhoramento por muitos anos em diferentes centros de pesquisa em todo o mundo (<http://old.iita.org/>). Os programas de melhoramento clássico inicialmente buscavam aumento na produção e qualidade dos grãos, mas, devido ao grande número de pragas e doenças capazes de causar grandes perdas na produção de feijão-caupi, atualmente a preocupação é o desenvolvimento de cultivares resistentes a pragas (Timko et al., 2007).

Em quase todos os estágios de seu desenvolvimento, o feijão-caupi sofre alguma forma de estresse biológico (<http://old.iita.org/>). Isto inclui o ataque de pulgões, como *Aphis craccivora*, que infestam folhas e caules, extraíndo a seiva e podendo infectar as plantas com vírus. Durante a formação das flores, a cultura pode ser atacada por insetos trips, como *Megalurothrips sjostedti*, que impede a formação de sementes. Gorgulhos, como *Callosobruchus maculatus*, destroem as sementes na pós-colheita. Na fase adulta, o feijão-caupi é susceptível ao ataque de fungos, bactérias, vírus, algumas classes de nematóides e plantas parasitas, as quais retardam e algumas vezes impedem completamente o seu crescimento (<http://old.iita.org/>). Plantas daninhas também são capazes de reduzir significativamente o rendimento dos grãos (Freitas et al., 2009).

Esses estresses sofridos pela cultura do feijão-caupi, muitas vezes resultam em graves perdas econômicas para os agricultores e leva a baixos rendimentos, como por exemplo, na África, onde são produzidos apenas 350 kg por hectare, bem abaixo do potencial desta cultura que pode chegar até 6t/ha (Freire Filho et al., 1999; <http://old.iita.org/>). A lagarta de *M. vitrata* é capaz de causar uma perda de rendimento variando entre 17-53% em feijão-caupi (Liao e Lin, 2000), enquanto *C.*

maculatus provoca perda de grãos variando em 20 a 60% (Abrol, 1999; Tarver *et al.*, 2007).

No Brasil e vários outros países da América Latina, as causas mais comuns dessas perdas são vírus, que na grande maioria dos casos são transmitidos por insetos. Dentre eles destacam-se: o Vírus do Mosaico Severo do Caupi (CPSMV-Cowpea Severe Mosaic Virus), transmitido por *Ceotoma arcuata* (Olivier) e *Chalcodermus bimaculatus* (Boheman), Vírus do Mosaico do Caupi transmitido por pulgão (CABMV-Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus), Vírus do Mosaico do Pepino, também transmitido por pulgão (*Cucumber Mosaic Virus*) e o Vírus do Mosaico Dourado (CPGMV-Cowpea Golden Mosaic Virus), transmitido por *Bemisia tabaci* (Gennadius). Coletivamente, estes vírus causam perdas de 81% na produção (Araújo *et al.*, 1984; Freire Filho *et al.*, 2005; Umaharan *et al.*, 1997). O meio usado para controlar estes insetos é o uso de inseticidas e outros pesticidas, que, além de caros para os pequenos agricultores que dependem desta cultura, podem representar sérios riscos aos usuários e ao ecossistema, quando usados de forma inadequada. Além disso, muitas vezes, o uso destes produtos não é suficiente para reduzir a incidência de viroses.

Fontes de resistência a muitas pragas até foram identificadas e progressos foram obtidos na obtenção de resistência a *Striga gesneroides*, *Alectra vogelii*, nematóides, vírus, fungos e bactérias por meio do melhoramento convencional. No entanto, a resistência a esses patógenos se dá por um único gene que só é efetivo em uma determinada região devido à variabilidade do patógeno ou parasita, sendo ainda funcional por apenas um curto período de tempo (Timko *et al.*, 2007).

Para uma abordagem mais ampla, nas espécies de *Vigna* cultivadas, existem poucos genes de resistência a pragas e devido à incompatibilidade entre as silvestres para cruzamentos, gera-se a necessidade de outra abordagem para obtenção dessas

características (Jackai e Padulosi, 1996; Sharma e Sharma, 1998; Fatokun e Perrino, 1997). Com as limitações encontradas em programas de melhoramento, abordagens baseadas em biotecnologia oferecem importantes estratégias na resolução de problemas causados por pragas e doenças além da possibilidade de desenvolver aumento na qualidade nutricional dos grãos.

Introdução de características agronômicas desejadas em feijão-caupi

O primeiro relato sobre a regeneração e transformação estável de feijão-caupi expressando um gene de importância agronômica apareceu em 2008, quando pesquisadores geraram feijão-caupi com tolerância a insetos (Solleti *et al.*, 2008a). O estabelecimento de um protocolo de transformação mediada por *A. tumefaciens* utilizando geneticina e suplementação de meio pós-seleção com benzilaminopurina por mais de três semanas assegurou uma frequência de regeneração de 1,64% (Solleti *et al.*, 2008b). A estratégia empregada foi baseada no uso do gene da proteína inibidora alfa-amilase I (aAI-1) de *P. vulgaris* como meio de conferir resistência à diferentes insetos. A eficiência de transformação neste caso foi melhorada através de inserção de várias cópias do gene *vir* na bactéria, co-cultura de explantes na presença de compostos de tiol e pela seleção com geneticina (Solleti *et al.*, 2008a). O trabalho relatou a redução de até 82,3% na suscetibilidade ao inseto nas plantas transgênicas quando testado com a praga *Callosobruchus chinensis* (Solleti *et al.*, 2008a). Este trabalho representou um importante avanço no desenvolvimento de feijão-caupi transgênico e abriu caminho para várias tentativas de otimização dos protocolos existentes e, em alguns casos, o desenvolvimento de novas estratégias de resistência a pragas e doenças da cultura (Raveendar e Ignacimuthu, 2010).

Esta demonstração bem sucedida de resistência de feijão-caupi utilizando o gene da *αAI-1* foi seguida pelo relato de obtenção de resistência contra *M. vitrata*. O trabalho consistiu na transformação de gemas nodais com um plasmídeo carregando o gene *CryIAb*, gene que codifica uma toxina de *Bacillus thuringiensis*, usando *nptII* como marcador de seleção sob o controle de 35S de CaMV (Adesoye *et al.*, 2008). Na tentativa de melhorar este protocolo de transformação, Adesoye e colaboradores (Adesoye *et al.*, 2010) empregaram infiltração a vácuo de embriões na transformação de feijão-caupi e relataram um grau bastante elevado de frequência de transformação, avaliado na produção de sementes T₁, variando entre 2,5% e 3,9%.

Recentemente, pesquisadores relataram o uso de gene *CryIAb* de *B. thuringiensis* para produzir várias linhagens transgênicas de feijão-caupi com resistência a *Helicoverpa armigera* e *M. vitrata*. Estes feijões-caupi Bt estão sendo testados em países como a Nigéria, com bons resultados preliminares (Higgins *et al.*, 2010). Além disso, uma série de testes de campo foi realizada nos últimos dois anos usando feijão-caupi com alto grau de resistência contra *C. maculatus* em Porto Rico e Nigéria, com resultados promissores (T. J. Higgins, CSIRO comunicação pessoal/ <http://www.csiro.au/people/TJ.Higgins.html>).

Com os protocolos de transformação e regeneração de feijão-caupi transgênico já estabelecidos, surgem novos objetivos, como o emprego destas técnicas em conjunto com as abordagens tradicionais de cruzamento para a produção em larga escala de variedades elite expressando genes de importância agrônômica.

Perspectivas na transformação de feijão-caupi

Apesar de estarmos longe de resolver os problemas associados com o cultivo e utilização de feijão-caupi, o sucesso registrado usando transgenia para resolver estes

problemas são indicadores claros de que essas metas poderão ser atingidas dentro dos próximos anos.

A utilização da toxina Bt, por exemplo, em diversas culturas com sucesso registrado, incluindo o feijão-caupi, demonstra os enormes benefícios das tecnologias transgênicas para a cultura. No entanto, com o possível surgimento de insetos resistentes a toxina Bt, novas estratégias de controle que envolvem um modo de ação diferente, como o uso de RNA de interferência (RNAi), prometem ser valiosas na gestão dos problemas associados com a produção de feijão-caupi (Gordon e Waterhouse, 2007; Baum *et al.*, 2007; Price e Gatehouse, 2008; Upadhyay *et al.*, 2011).

O silenciamento gênico via RNA interferente foi desenvolvido utilizando o mecanismo natural de regulação gênica em eucariotos, e é uma ferramenta valiosa devido à sua exequibilidade e eficácia. O sistema, mediado por moléculas de siRNA (*small interfering RNA*), tem sido aplicado para silenciar a expressão de genes-alvo (Fire e Xu, 1998; Ghildiyal e Zamore, 2009). Os primeiros experimentos utilizando RNA interferente para silenciamento gênico apontaram para o elevado potencial desta abordagem em controle de insetos, bem como em outras ameaças ao feijão-caupi. Até mesmo para insetos foi demonstrado que o silenciamento de genes essenciais mediado por siRNA pode cessar a fitofagia, chegando inclusive a morte dos insetos (Gordon e Waterhouse, 2007; Bonfim *et al.*, 2007).

A utilização de moléculas de siRNA em feijão-caupi transgênico, cujas sequências poderiam desencadear sinais para silenciar genes essenciais em insetos, bactérias e vírus, parece ser atraente, visto que neste sistema não há expressão da proteína exógena, diminuindo o risco de toxicidade para a planta e para o consumidor. Na verdade, este tipo de estratégia tem sido aplicado em um número de culturas e entre

os genes candidatos para serem silenciados, no caso de insetos alvo, estão ATPase vacuolar e tubulina de insetos (Baum *et al.*, 2007; Upadhyay *et al.*, 2011; Fire *et al.*, 1998; Aguiar *et al.*, 2006).

O desenvolvimento da engenharia genética de feijão comum com resistência a vírus do mosaico dourado mediada por RNAi (Bonfim *et al.*, 2007) levou a acreditar na possibilidade de geração de feijão-caupi com resistência contra o CPSMV usando a estratégia de RNAi. Plantas transformadas com RNAi de vírus que infectam feijão-caupi já foram produzidas no LTG da Embrapa-Cenargen e apresentaram resistência aos vírus em testes de casa de vegetação (não publicado). A continuação deste trabalho é a realização de testes de campo.

Outro gene candidato de grande potencial no melhoramento do feijão-caupi é a cistatina, um inibidor de protease cisteínica com potencial para ser usado no desenvolvimento de resistência a pragas (Martinez e Diaz, 2008; Tu *et al.*, 1998). Está sendo desenvolvida uma estratégia para obtenção de feijão-caupi transgênico resistente ao *C. maculatus* por meio da expressão da cistatina de frango no LTG.

Apesar do feijão-caupi ser uma importante fonte de nutrientes, incluindo vários aminoácidos, é deficiente em aminoácidos contendo enxofre, um traço comum na maioria dos legumes. Diversas estratégias têm sido elaboradas para tentar solucionar este problema utilizando transgenia em algumas leguminosas (Marcelino *et al.*, 1996; Alexandrov *et al.*, 2009). No capítulo III é apresentada uma estratégia adotada para aumentar o conteúdo de metionina em sementes de feijão-caupi, a qual baseou-se na introdução do gene de uma delta-zeína do milho, rica em metionina (Alexandrov *et al.*, 2009).

Apesar de sua capacidade de prosperar sob condições ambientais adversas, a crescente demanda por feijão-caupi exige o desenvolvimento dessa

leguminosa tolerância a herbicidas. Em consonância com isso, é também descrito nesse trabalho, no capítulo II, a obtenção de feijão-caupi com alto grau de tolerância à herbicida.

Conclusão

Nos últimos anos, progressos significativos foram feitos para estabelecer diferentes protocolos para o desenvolvimento de feijão-caupi transgênico com algum tipo de característica de importância econômica. Com a participação de centros de pesquisa de todo o mundo, importantes barreiras foram vencidas, começando com a produção de *callus* transgênicos, passando pelo estabelecimento de protocolos com a obtenção de plantas, transmissão do transgene para sua progênie, segregação mendeliana, culminando em descobertas recentes que levaram à produção de feijão-caupi transgênico com resistência contra *C. maculatus* e *M. vitrata* como resultado da inserção de um gene de importância agronômica na planta.

Atualmente, vários grupos de pesquisa em países como Austrália, Brasil, Índia e Nigéria possuem sistemas de transformação bem estabelecidos que podem ser aproveitados para melhorar o feijão-caupi em características que até hoje não puderam ser obtidas por meio de melhoramento convencional. Obtenção de plantas com resistência à pragas e doenças poderá ser realidade com a otimização dos protocolos resultantes dos esforços das últimas três décadas.

Existem planos para testes de campo em algumas variedades de feijão-caupi resistentes a inseto e vírus já desenvolvidas. Além disso, outras estratégias vêm sendo utilizadas para melhorar geneticamente esta cultura, como inserção de genes para tolerância a herbicidas e inclusive genes de proteínas capazes de conferir um aumento na qualidade nutricional. Com isso, é possível que muitos desafios de melhoramento de feijão-caupi sejam vencidos nos próximos anos.

Referências bibliográficas

Abrol DP. Pulse susceptibility to *Callosobruchus chinensis* (L) (Bruchidae: Coleoptera) under field conditions. Trop Agric 1999, 76: 150

Adesoye A, Machuka J and Togun A. *CRY IAB* transgenic cowpea obtained by nodal electroporation. Afr J Biotechnol 2008, 7: 3200-3210.

Adesoye A, Machuka J and Togun A. Transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp.) by *Agrobacterium* infiltration. Appl Biosci 2010, 30: 1845-1860

Aguiar JM, Franco OL, Rigden DJ, Bloch JRC, Monteiro ACS, Flores VMQ, et al. Molecular modeling and inhibitory activity of cowpea cystatin against bean bruchid Pests. Proteins 2006, 63: 662-670.

Akella V, Lurquin PF. Expression in cowpea seedlings of chimeric transgenes after electroporation into seed-derived embryos. Plant Cell Rep 1993, 12:110-117.

Alexandrov NN, Brover VV, Freidin S, Troukhan ME, Tatarinova TV, Zhang H, et al. Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing Plant Mol Biol 2009, 69: 179-194.

Alvarez-Afageme F, Martinez M, Pascual-Ruiz S, Castañera P, Diaz I, Ortego F. Effects of potato plants expressing a barley cystatin on the predatory bug *Podisus maculiventris* via herbivorous prey feeding on the plant. Transgenic Res 2007, 16: 1-13.

Aragão FJL, Campos FAP. Common bean and cowpea. In: Pua EC, Davey MR, eds. Biotechnology in agriculture and forestry. Transgenic crops IV. Berlin: Springer 2007, 263–276.

Araújo JP, Rios GP, Watt EE, Neves BP, Fageria NK, Oliveira IP, Guimarães CM, Silveira-Filho A. Cultura do Caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp: descrição e recomendações técnicas de cultivo. EMBRAPA Circular Técnica 1984, 18:82p.

Barreto PD. Recursos genéticos e programa de melhoramento de feijão-de-corda no Ceará: Avanços e perspectivas. In: Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro (Queirós, M.A. de, Goedert, C.O. and Ramos, S.R.R., Eds.). 1999. EMBRAPA, CPATSA, Petrolina.

Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. Nat Biotech 2007, 25: 1322-1326.

Benko-Iseppon AM. Estudos moleculares no caupi e em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas. Embrapa Documentos 2001, 56: 327-332.

Bonfim K, Faria JC, Nogueira E, Mendes E, Aragão FJ. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). Mol Plant Microbe Interact 2007, 20: 717-726.

Chaudhury D, Madanpotra S, Jaiwal R, Saini R, Kumar AP, Jaiwal PK. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated high frequency genetic transformation of an Indian cowpea

(*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar and transmission of transgenes into progeny. *Plant Sci* 2007, 172: 692-700.

Ehlers JD, Hall AE. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research* 1997, 53: 187-204.

Fatokun CA, Perrino P, Ng NQ. Wide crossing in African *Vigna* species. In: Singh BB, Mohan Raj DR, Dashiell KE, Jackai LEN, eds. *Advances in cowpea research*. Ibadan-Nigeria: IITA 1997, 50–57.

Fatokun CA. Breeding cowpea for resistance to insect pests: attempted crosses between cowpea and *Vigna vexillata*. In: Fatokun CA, Tarawali SA, Singh BB, Kormawa PM, Tamo M, eds. *Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production*. Ibadan-Nigeria: IITA 2000, 52–61.

Filippone E. Genetic transformation of pea and cowpea by co-cultivation of tissues with *Agrobacterium tumefaciens* carrying binary vectors. In: Ng NQ, Monti LM, eds. *Cowpea genetic resources, contributions in cowpea exploration, evaluation and research from Italy and IITA*. Ibadan-Nigeria: IITA 1990, 175-181.

Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, 391: 806-11.

Freire Filho FR, Lima JÁ, Ribeira A. Feijão caupi: avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005. 519 p.

Freire-Filho FR, Ribeiro VQ, Barreto PD, Santos CAF. Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região nordeste. In: Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro (Queirós, M.A. de, Goedert, C.O. and Ramos, S.R.R., Eds.). EMBRAPA, CPATSA, Petrolina, 1999.

Freitas FCLI, Medeiros VFLP, Grangeiro LCI, Silva MGO, Nascimento PGML, Nunes GHI. Interferência de plantas daninhas na cultura do feijão-caupi. *Planta Daninha* 2009, 27: 241-247.

Garcia JA, Hille J, Goldbach R. Transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) cells with an antibiotic-resistance gene using a Ti-plasmid-derived vector. *Plant Sci* 1986, 44: 37-46.

Garcia JA, Hille J, Vos P, Goldbach R. Transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) with a full-length DNA copy of cowpea mosaic virus M-RNA. *Plant Sci* 1987, 48: 89-98.

Gatehouse JA. Biotechnological prospects for engineering insect-resistant. *Plant Physiol* 2008, 146: 881-887.

Ghildiyal ME, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 2009, 10: 94-108.

Gordon KH and Waterhouse PM. RNAi for insect-proof plants. *Nat Biotech* 2007, 25: 1231-1232.

Higgins TJV, Gollasch S, Molvig L, Moore A, Popelka C, Watkins P, et al. Genetic transformation of cowpea for protection against bruchids and caterpillars. Fifth World Cowpea Research Conference, 2010

Huvenne H, Smagghe G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *J Insect Physiol* 2010, 56: 227–235.

Ikea J, Ingelbrecht I, Uwaifo A, Thottappilly G. Stable gene transformation in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) using particle gun method. *Afr J Biotechnol* 2003, 2: 211-218.

Ivo NL Nascimento CP, Vieira LS, Campos FAP, Aragão FJL. Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. *Plant Cell Rep* 2008, 27: 1475-1483.

Jackai LEN, Padulosi S, Ng Q. Resistance to the legume pod borer, *Maruca vitrata* Fabricius and the probable modalities involved in wild *Vigna*. *Crop Prot* 1996, 15: 753-761.

Liao CT, Lin CS. Occurrence of the legume pod borer, *Maruca testulalis* Geyer (Lepidoptera: Pyralidae) on cowpea (*Vigna unguiculata* Walp) and its insecticides application trial. *Plant Protection Bulletin* 2000, 42: 213-22.

Marcelino LH, Neshich G, Sá MF, Krebbers E, Gander E. Modified 2S albumins with improved tryptophan content are correctly expressed in transgenic tobacco plants. *Febs lett* 1996, 385: 154-158.

Martinez M, Diaz I. The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. *BMC Evol Biol* 2008, 8: 198.

Muthukumar B, Mariamma M, Veluthambi K, Gnanam A. Genetic transformation of cotyledon explants of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 1996, 15: 980–985.

Nielson SS, Brandt WE, Singh BB. Genetic variability for nutritional composition and cooking time of improved cowpea lines. *Crop Sci* 1993, 33: 469-472.

Obatolu VA. Growth pattern of infants fed with a mixture of extruded malted maize and cowpea. *Nutr* 2009, 19:174-178.

Penza R, Akella V, Lurquin PF. Transient expression and histological localization of a gus chimeric gene after direct transfer to mature cowpea embryos. *Biotechniques* 1992, 13: 576-580.

Penza R, Lurquin PF, Filippone E. Gene transfer by co-cultivation of mature embryos with *Agrobacterium tumefaciens*: application to cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *J. Plant Physiol* 1991, 138: 39–43.

Perkins EJ, Stiff CM and Lurquin PF. Use of *Alcaligenes eutrophus* as a source of genes for 2-,4-D resistance in plants. *Weed Sci* 1987, 35: 12-18.

Phillips RD, Mcwatters KH, Chinnan MS, Hung Y-C, Beuchat LR, Sefa-Dedeh S, *et al.* Utilization of cowpeas for human food. *Field Crops* 2003, 82: 193-213.

Popelka JC, Gollasch S, Moore A, Molvig L, Higgins TJV. Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. *Plant Cell Rep* 2006, 25: 304–312.

Price DRG, Gatehouse JA. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends Biotechnol* 2008, 26: 393-400.

Raveendar S, Ignacimuthu S. Improved *Agrobacterium* mediated transformation in cowpea *Vigna unguiculata* L. Walp. *Asian J Plant Sci* 2010, 9: 256-263.

Sharma P, Sharma JD. Plants showing antiplasmodial activity from crude extracts to isolated compounds. *Indian J Malariol* 1998, 35:57-110.

Silva SMS, Freire-Filho FR. Proteínas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.): Caracterização e aplicação nutricional. *Embrapa Documentos* 1998, 44: 5-20.

Singh BB, Ajeigbe HA, Tarawali SA, Fernandez-Rivera S, Abubakar M. Improving the production and utilization of cowpea as food and fodder. *Field Crops Res* 2003, 84: 169-177.

Singh BB, Ehlers JD, Sharma B, Freire Filho FR Recent progress in cowpea breeding. In: Fatokun CA, Tarawali SA, Singh BB, Kormawa PM, M Tamo (eds) Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production. Intl Inst Tropical Agric 2002 , Ibadan, Nigeria, 22–40

Singh BB, Ehlers JD, Sharma B, Freire-Filho FR. Recent progress in cowpea breeding. In: Fatokun CA, Tarawali SA, Singh BB, Kormawa PM, Tamò M, eds. Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. Ibadan-Nigeria: IITA, 2000, 185-195.

Solleti SK, Bakshi S, Purkayastha J, Panda SK, Sahoo L. Transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds expressing a bean α -amylase inhibitor 1 confers resistance to storage pests, bruchid beetles. Plant Cell Rep 2008a, 27: 1841-1850.

Solleti SK, Bakshi S, Sahoo L. Additional virulence genes in conjunction with efficient selection scheme, and compatible culture regime enhance recovery of stable transgenic plants in cowpea via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. J Biotech 2008b, 135: 97–104.

Tarver MR, Shade RE, Shukle RH, Moar WJ, Muir WM, Murdock LM, Pittendrigh BR. Pyramiding of insecticidal compounds for control of the cowpea bruchid (*Callosobruchus maculatus* F.). Pest Manag Sci 2007, 63: 440-446.

Timko MP, Ehlers JD, Roberts PA. Cowpea. In: C. Kole (ed.) Pulses, Sugar and Tuber Crops, Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants 2007, Springer-Verlag 3: 49-67.

Timko MP, Singh BB. Cowpea, a Multifunctional Legume. In: Moore PH, Ming R. (eds.) Genomics of Tropical Crop Plants 2008, Springer, 227-258.

Tu HM, Godfrey LW, Sun SS. Expression of the Brazil nut methionine-rich protein and mutants with increased methionine in transgenic potato. *Plant Mol Biol* 1998, 37: 829–838.

Umaharan P, Ariyanayagan RP, Haque SQ. Resistance to cowpea severe mosaic virus, determined by three dosage dependent genes in *Vigna unguiculata* L. Walp. *Euphytica* 1997, 95: 49-55.

Upadhyay SK, Chandrashekar K, Thakur N, Verma PC, Borgio JF, Singh PK, and Tuli R. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. *J Biosci* 2011, 36: 153-161.

Capítulo II

Obtenção de plantas transgênicas de feijão-caupi resistentes ao herbicida imazapyr

Introdução

A cultura do feijão-caupi tem uma grande importância na alimentação humana, além de possuir características que o destacam acima de muitas culturas, sendo uma das plantas mais versáteis que existem, pois consegue sobreviver e produzir sementes mesmo em condições adversas de calor, seca e salinidade (Ehlers e Hall, 1997).

No Brasil, a produção de feijão-caupi tem se concentrado ao longo de anos nas regiões Nordeste e Norte, onde é cultivado principalmente por pequenos produtores, normalmente com pouca tecnologia empregada. No entanto, atualmente, com o lançamento de novas cultivares de porte ereto e semi-ereto que permitem o cultivo mecanizado do plantio a colheita, a região Centro-Oeste vem investindo na produção de feijão-caupi e conquistando espaço no país e no exterior (Freitas *et al.*, 2010).

A cultura do feijão-caupi é afetada por muitos fatores, como já discutido no capítulo I, e estes incluem as plantas daninhas, plantas que se desenvolvem indesejadamente dentro da lavoura de diferentes culturas. Os danos por elas provocados aparecem durante o crescimento e desenvolvimento da cultura, pois competem por luz, nutrientes e água. No caso do feijão-caupi, quando não controladas, as plantas daninhas podem reduzir o rendimento de grãos em até 90% (Freitas *et al.*, 2009).

Algumas espécies de plantas daninhas como a guanxuma (*Sida rhombifolia*), malva-sedosa (*Waltheria indica*), mussambê (*Cleome affinis*) e mela-bode (*Herissantia crispa*), servem ainda como hospedeiras alternativas de doenças que atacam o feijão-caupi, aumentando as perdas em campo (Fontes *et al.*, 2010).

Além da competição com plantas daninhas, existe também o problema de hemiparasitismo, causado por plantas daninhas como *Striga gesnerioides* (Willd.) e

Alectra vogelii (Benth.), que na África causam grandes danos a cultura do feijão-caupi, parasitando suas raízes e afetando seu desenvolvimento (Li *et al.*, 2009).

Para o controle das plantas daninhas em feijão-caupi, existem alguns métodos empregados, os quais incluem:

- O controle preventivo: inclui utilizar sementes e adubos de natureza orgânica (estrume, restos de cultura ou composto) livres de propágulos de plantas daninhas; realizar limpeza completa de máquinas e implementos antes de iniciar as práticas agrícolas; e promover permanentemente o controle dessas plantas daninhas próximas a canais de irrigação e margens de carreadores;
- O controle cultural: consiste no aproveitamento das características agronômicas da cultura comercial como objetivo de levar vantagem sobre as plantas daninhas;
- O controle mecânico: com a utilização de capina manual e o cultivo mecânico;
- O controle químico: que consiste no uso de herbicidas (<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/tratosculturais.htm>).

O controle químico de plantas daninhas apresenta inúmeras vantagens, como menor dependência da mão-de-obra, melhor controle de plantas daninhas na linha de plantio sem afetar o sistema radicular das culturas, e maior eficiência, mesmo em épocas chuvosas. Além disso, o controle químico permite o cultivo mínimo ou plantio direto das culturas e é eficiente no controle de plantas daninhas de propagação vegetativa (Silva *et al.*, 2007).

Os herbicidas, quanto ao tipo de aplicação, podem ser classificados como: pré-plantio incorporado (PPI), pré-emergente (PE) e pós-emergente (POS). Algumas cultivares de feijão-caupi com certo grau de tolerância a diferentes herbicidas foram identificadas para cultivo em associação com herbicidas usados na pré ou pós-emergência (Frazão e Silva, 2006; Freitas *et al.*, 2010; Fontes *et al.*, 2010).

Até o momento, embora algumas características agronômicas já tenham sido incorporadas em feijão-caupi por meio de engenharia genética (Citadin *et al.*, 2011), a obtenção de plantas tolerantes a herbicidas ainda não foi reportada, exceto pela utilização de herbicida como protocolo para seleção de transformantes (Ivo *et al.*, 2008). Neste capítulo é apresentada a obtenção de alto grau de tolerância em feijão-caupi, cultivar BRS Nova Era, ao herbicida imazapyr, por meio do uso de transgenia.

O imazapyr é uma molécula herbicida, que se concentra na região meristemática apical de plantas por meio de translocação sistêmica. Este herbicida pertence à classe das imidazolinonas, moléculas as quais inibem a atividade da enzima aceto-hidroxiácido sintase (AHAS), catalisadora do passo inicial na síntese dos aminoácidos isoleucina, leucina e valina (Aragão *et al.*, 2000).

O gene *Atahas* codifica uma enzima aceto-hidroxiácido sintase mutada de *Arabidopsis thaliana* (AHAS; acetolactate synthase, acetolactate pyruvate-lyase (carboxilating), EC 4.1.3.18), a qual não é reconhecida pelas imidazolinonas. Esta enzima contém uma mutação na posição 653 pb resultando na substituição de uma serina por uma asparagina e impedindo a ligação inibitória da molécula herbicida (Sathasivan *et al.*, 1990; Shaner *et al.*, 1984).

Plantas suscetíveis, quando pulverizadas com imazapyr apresentam características morfológicas diferenciadas: nervuras foliares avermelhadas, folhas

murchas, inibição do desenvolvimento chegando à morte da planta em aproximadamente duas semanas.

Herbicidas do grupo das imidazolinonas incluem imazapyr, imazapic, imazethapyr, imazamox, imazametabenze e imazaquin. Estes herbicidas controlam um amplo espectro de ervas daninhas. Culturas tolerantes a imidazolinonas permitem uma aplicação de herbicidas inibidores da AHAS nas fases iniciais de cultivo. Isso facilita o manejo de ervas daninhas e diminui o risco de danos à cultura subsequente em um sistema de rotação. Além disso, essas moléculas são eficazes em baixas dosagens e têm baixa toxicidade em mamíferos (Tan *et al.*, 2005).

Plantas tolerantes a herbicidas do grupo das imidazolinonas foram descobertas em muitas culturas e nessas se observou a presença de genes da enzima AHAS mutados (Tan *et al.*, 2005). Sendo assim, o uso de genes mutantes codificantes para essa enzima apresenta-se como uma alternativa de grande potencial no desenvolvimento de sistema de controle de ervas daninhas. Deve-se ainda considerar que se trata de um gene encontrado naturalmente em culturas tolerantes. Além disso, alguns estudos asseguram que a enzima codificada por esse gene não tem características de alergenicidade (www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0001/1257.doc).

Variedades de plantas geneticamente modificadas já existem no mercado mundial desde 1996 e a tolerância a herbicida tem sido a principal modificação em 15 anos (1996-2010). A área plantada com cultivares tolerantes a herbicidas chegou a 89,3 milhões de hectares em 2010, sendo elas: a soja, milho, canola, algodão, beterraba e alfafa, o que compreende 61% do total de hectares plantados com culturas geneticamente modificadas (James, 2010).

No Brasil, 24,5 milhões de hectares são ocupados com cultivares biotecnológicas que incluem a soja resistente a herbicida, o milho e o algodão Bt, e

destes, 17,8 milhões de hectares estão ocupados pela soja RR (tolerante ao herbicida glifosato), liberada desde 1998 para comercialização. Desde 2009 há a aprovação comercial da soja CV 127 desenvolvida pela Embrapa e BASF (Vianna *et al.*, 2011), resistente a herbicidas do grupo das imidazolinonas, graças a inserção do gene *Atahas* (James, 2010).

Objetivo Geral

Obter plantas de feijão-caupi tolerantes ao herbicida imazapyr por meio da introdução de um gene mutante da enzima acetohidroxiácido sintase.

Objetivos específicos

- Transformar feijão-caupi, cultivar BRS Nova Era, com vetor contendo o cassete de expressão da enzima AHAS mutante de *Arabidopsis thaliana* (*Atahas*);
- Selecionar as plantas positivas para o cassete de expressão da enzima AHAS mutante de *Arabidopsis thaliana* por PCR;
- Avaliar as progênies obtidas dos eventos transgênicos quanto ao grau de tolerância ao herbicida imazapyr;
- Analisar as plantas tolerantes ao herbicida por *Southern blot* para avaliar a integridade do cassete de expressão.

Materiais e métodos

Vetor de expressão plasmidial

Para este trabalho foram utilizados dois vetores, ambos baseados no vetor pAC321 (Rech *et al.*, 2008), que contém o cassete de expressão do gene *ahas* mutante de *A. thaliana*, incluindo promotor, peptídeo sinal, sequência codificante e terminador. Ambos os vetores também contém um gene de resistência à ampicilina, para facilitar o processo de clonagem em *Escherichia coli* (Figura IIa). Os vetores foram construídos inicialmente para dois projetos diferentes de melhoramento de feijão-caupi:

- 1) Obtenção de resistência a dois vírus que atacam o feijão-caupi, o do mosaico severo do caupi (CPSMV) e o do mosaico transmitido por pulgão (CABMV), vetor pSIUCSMVCABMV: contém um cassete para expressão de um íntron *hairpin* dos vírus CPSMV e CABMV
- 2) Obtenção de resistência ao caruncho da semente (pBetacist): contém além do cassete do gene *ahas*, um cassete para expressão semente específico para o gene de uma cistatina do ovo de galinha.

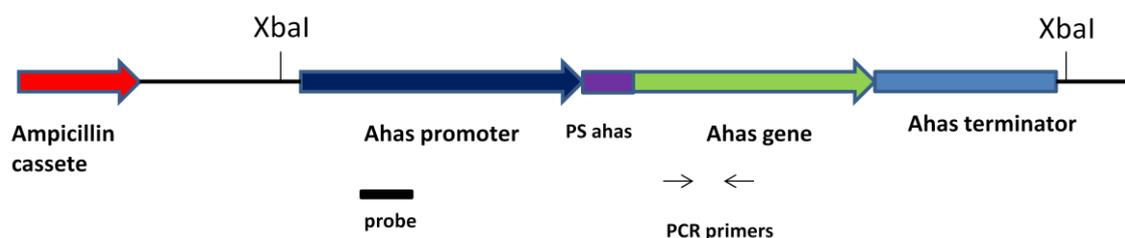


Figura IIa. Região consenso de vetores de expressão contendo o cassete de expressão do gene *ahas* e de resistência a ampicilina (gene *bla*). A barra preta indica a região onde a sonda utilizada para o *Southern blot* hibridiza e as flechas indicam a região onde os *primers* usados nas PCRs flanqueiam. O tamanho do cassete de expressão do *ahas* corresponde à 5.8 kb.

Transformação de feijão-caupi

Eixos embrionários de feijão-caupi cultivar BRS Nova Era foram preparados e bombardeados como descrito anteriormente (Ivo *et al*, 2008) com os plasmídeos pBetacist e pSIUCSMVCABMV. Antes de ser utilizado no bombardeio o plasmídeo pSIUCSMVCABMV foi digerido com a enzima *FspI* que corta duas vezes dentro do gene da ampicilina, inativando-o.

Após o bombardeio, os eixos embrionários foram transferidos para o meio de seleção e indução de multibrotação (Meio basal MS + vitaminas, suplementado com BAP 5 mg/L, 3% de sacarose, 300 nM imazapyr e 0.7% de agar, pH 5.8) em frascos tipo *baby-food* contendo 30 ml de meio de cultura, e mantidos em fotoperíodo de 16h. Ao aparecimento das primeiras folhas, as plântulas regeneradas foram testadas por PCR para a presença do gene *Atahas* e os positivos foram transferidos individualmente para copos descartáveis contendo uma mistura de solo fertilizado:vermiculita (1:1), cobertos com saco plástico transparente e este preso com uma borracha ao copo e mantidos em casa de vegetação. Após uma semana, a borracha foi removida e na semana seguinte o saco plástico foi removido. Assim que as plântulas aclimatadas atingiram aproximadamente 10 cm de comprimento, foram transferidas para um pote de 5 dm³ contendo solo adubado e cultivadas para produção de sementes.

Triagem das plantas transgênicas por PCR

O DNA foi isolado a partir de discos foliares e a reação de PCR foi feita de acordo com o Kit *Extract-N-Amp Plant PCR* (Sigma) e protocolo do fabricante. O protocolo foi otimizado para usar apenas 20 µl das soluções de extração e mantido o volume sugerido para o *mix* de PCR. Os *primers* utilizados, AHASP (5'-ACTAGAGATTCCAGCGTCAC-3', que anela no promotor do *ahas*) e o AHAS500C

(5'-GTGGCTATACAGATACCTGG-3', que anela na sequência codante do *ahas*) amplificam uma sequência de 685 pb. O mix foi desnaturado por 5 min à 95° C e amplificado por 35 ciclos (95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min) com um ciclo final de 7 min a 72° C em termociclador *MyCycler* (Bio Rad). A reação foi aplicada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e em seguida visualizados sob luz UV e fotografados.

Análises de Southern blot

DNA genômico foi isolado de 3 g de folhas maceradas em nitrogênio líquido com o auxílio de grau e pistilo, à mistura foram adicionados 15 mL de tampão CTAB 2% (Doyle e Doyle, 1987) acrescido de β -mercaptoetanol 2 μ l/mL, pré-aquecido a 65° C e mantido em banho-maria durante 1 hora com agitação a cada 15 minutos. Após isto foram adicionados 15 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1), agitado e centrifugado a 8.228 g por 10 minutos. Ao sobrenadante coletado foi adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), então agitado e centrifugado a 8.228 g por 10 minutos. O sobrenadante foi então precipitado com igual volume de isopropanol gelado, misturado e centrifugado a 18.514 g durante 20 minutos. O *pellet* foi então lavado com 1 mL de etanol 70% e após secar, ressuspendido em 400 μ l de água Milli Q e tratados com RNase A (100 μ g/mL) durante 30 minutos a 37° C. O *Southern blot* foi conduzido como descrito por Sambrook e Russell (2001). O DNA genômico (60 μ g) foi digerido com a enzima *Xba*I, separado em gel de agarose 0,8% e transferido para uma membrana de nylon (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech). A hibridização foi feita com uma sonda compreendendo a região do promotor do gene *ahas* amplificada com os *primers* SOJAE1F: 5'-CATTGCTTCTGCTATCGACACG-3' e SOJAE1R: 5'-CCTCGGGATTTGATTTTTGGTCCT-3' a partir do vetor Pbetacist,

gerando um fragmento de aproximadamente 600 pb, a qual foi marcada com dCTP P³² usando o kit *Amersham Ready-To-Go DNA Labelling Beads - dCTP* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. As membranas foram expostas por pelo menos 16 horas em filme *Imaging Plate* (Fujifilm). As bandas foram visualizadas com auxílio do equipamento *Fluorescent image analyzer* (FLA-3000) (Fujifilm).

Teste de progenies quanto à tolerância ao herbicida imazapyr

Dez sementes da geração T₃ de cada linhagem transgênica foram plantadas em potes plástico de 5-dm³ contendo solo fertilizado autoclavado. Assim que as plantas germinadas desenvolveram seu primeiro ramo trifoliado, elas foram pulverizadas com herbicida Imazapyr Arsenal (BASF) em concentrações de 100 g/ha e 200g/ha. Após 2 semanas, elas começaram a ser fotografadas. As plantas apresentando maior desempenho foram testadas também para concentrações de 300 e 400 g/ha.

Resultados e discussão

Dentre 2.020 embriões bombardeados com o vetor pSIUCSMVCABMV foram obtidas 15 plantas positivas. Com o vetor pBetacist foram bombardeados 912 embriões e obtidas 3 plantas positivas. Após o desenvolvimento em plantas adultas, foi possível observar que todas estas apresentavam um fenótipo normal, eram férteis e suas vagens e sementes eram normais. Estas plantas foram cultivadas para produzir sementes e as linhagens foram avaliadas quanto à segregação.

Nas análises das progênies das linhagens obtidas com o plasmídeo pSIUCSMVCABMV, as análises de PCR confirmaram que o transgene foi eficientemente integrado no genoma. Este resultado está de acordo estudos de otros autores que mostraram que a maioria dos genes exógenos introduzidos pelo processo de biobalística são normalmente transmitidos para a progênie (Christou *et al.*, 1989; Hinchee *et al.*, 1988; McCabe e Martinell 1993; Aragão *et al.*, 2000, Ivo *et al.*, 2008). Nas análises das linhagens obtidas com o plasmídeo da pBetacist verificou-se que apenas uma única linhagem mostrou a presença dos transgenes na primeira geração. O padrão de segregação dessa única linhagem (C119a) foi de 15:1, sugerindo a inserção dos transgenes em dois *loci*. Posteriores análises de *Southern blot* confirmaram a presença dos transgenes na linhagens C119a.

Dez plantas de cada uma das 14 linhagens geradas com o vetor pSIUCSMVCABMV e 20 plantas da linhagem gerada com o vetor pBetacist foram pulverizadas com o herbicida imazapyr nas concentrações de 100 e 200g/ha. Em um período entre 2 semanas a 2 meses após a tratamento foi possível observar diferentes níveis de tolerância ao herbicida em todas as linhagens transgênicas (Tabela IIa e IIb). Os sintomas típicos de ação do herbicida, como nervuras avermelhadas e folhas murchas foram observados em quase todas as linhagens, exceto a linhagem 59, que

apresentou tolerância total ao herbicida aplicado nas concentrações de 100 e 200 g/ha de imazapyr (Figura IIb). As linhagens 72, 52, 106, 118 e 68 morreram após 3 semanas da aplicação de imazapyr nas duas dosagens testadas. As outras linhagens foram afetadas de diferentes formas entre as linhagens quanto entre plantas de uma mesma linhagem. Os sintomas também foram diferenciados, além do aparecimento das nervuras avermelhadas, multibrotação após o aparecimento dos primeiros sintomas e recuperação, chegando à fase adulta. Algumas plantas apresentaram retardo no desenvolvimento (Figura IIb, Tabela IIa e IIb). As plantas não transformadas usadas como controle negativo apresentaram todos os sintomas característicos e morreram dentro de duas semanas após aplicação do herbicida.

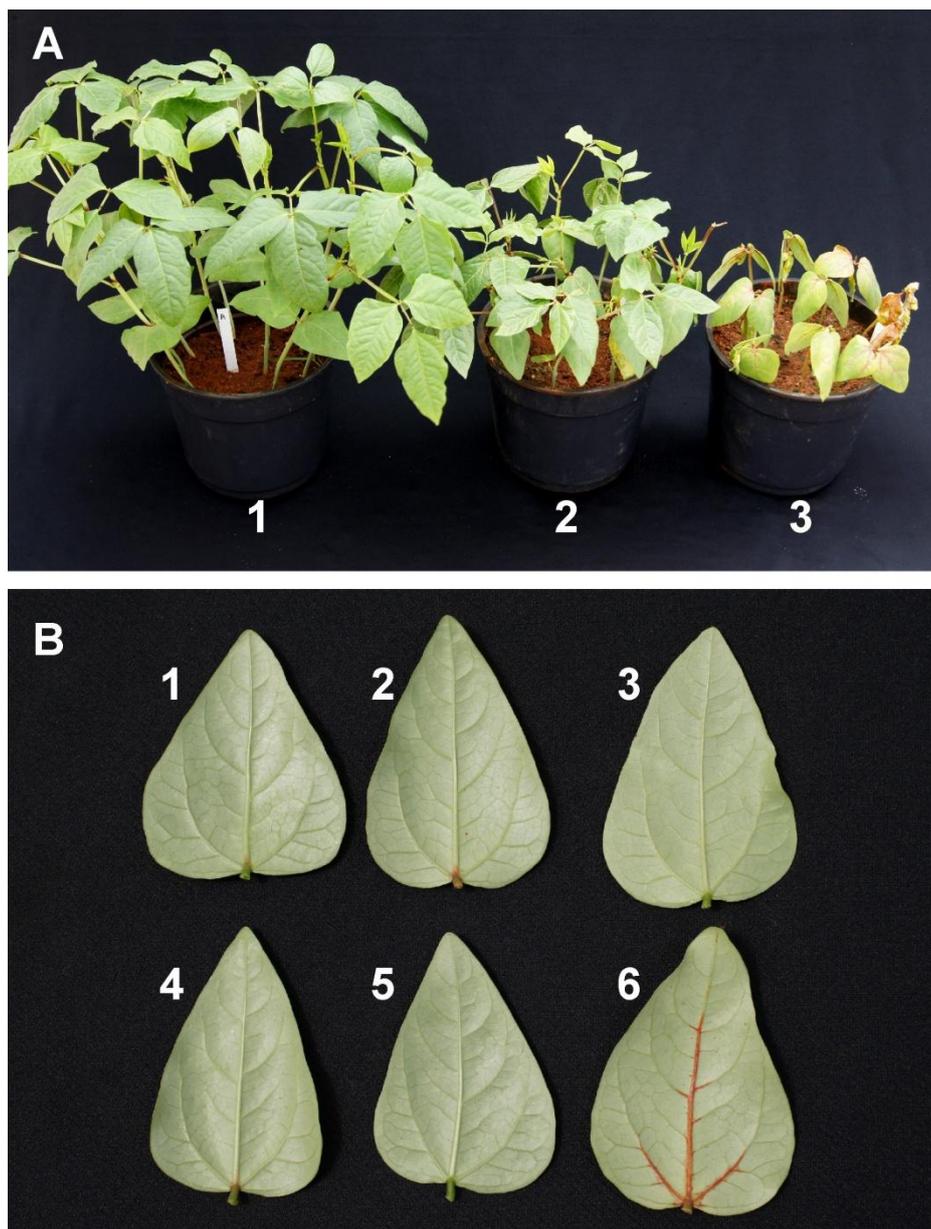


Figura 11b. Plantas transgênicas e folhas de plantas transgênicas de feijão-caupi após 2 semanas de aplicação do herbicida imazapyr. Em A estão as plantas 59 (1), 12 (2) e não transformada (3). Em B estão folhas das linhagens 99 (1), 112 (2), 110 (3), 119 (4), 59 (5) e não transformada (6), onde é possível observar as nervuras avermelhadas nas plantas não transformadas e um pequeno sinal de vermelhidão próximo do pecíolo nas plantas 99, 112, 119.

Tabela IIa. Relação do número de plantas e sintomas apresentados após um mês de pulverização com 100g/ha do herbicida imazapyr nas 15 linhagens transgênicas de feijão-caupi testadas.

	99	72	52	12	68	106	118	112	59	71	119	110	39	21	C119a
Sobreviveram após apresentar sintomas				10				10			10	3		9	3
Planta sem sintoma	1								10	5			4	1	3
Apresentou multibrotação				10							8			9	3
Morreram	9	10	10		10	10	10			5		7	6		4

Tabela IIb. Relação do número de plantas e a reação dentro das 15 linhagens transgênicas de feijão-caupi após um mês de pulverização com 200g/ha do herbicida imazapyr.

	99	72	52	12	68	106	118	112	59	71	119	110	39	21	C119a
Sobreviveram após apresentar sintomas	6			10		8	8	10		5	10	7	9	10	
Planta sem sintoma	4								10	1					4
Apresentou multibrotação			6	10			8	10		5		7			
Morreram		10	4		10	2	2			4		3	1		6

Na tabela IIa e IIb é possível observar diferenças nos sintomas entre plantas de uma mesma linhagem, por exemplo, em C119a e 71, houveram plantas que morreram, plantas que sobreviveram após apresentar sintomas, algumas tendo até multibrotação e plantas sem sintomas. Uma explicação para isso pode ser o fato de que essas linhagens

ainda estejam segregando, e assim, plantas de uma mesma linhagem podem diferenciar-se por:

- a) Presença de um ou mais loci contendo o transgene e esses loci diferenciarem-se por regiões de maior ou menor atividade gênica;
- b) Presença de plantas em hemizigose, podendo ter menor nível relativo de expressão do transgene;
- c) Presença de plantas em homozigose, com maiores níveis de expressão do transgene.

Curiosamente, na tabela IIb, nota-se que as linhagens 99, 106 e 118, tiveram melhor desempenho na dosagem de 200 g/ha do que de 100 g/ha de imazapyr. Novamente, uma sugestão que pode explicar isso é o fato de essas plantas não estarem em homozigose, e como a seleção das sementes foi aleatória, na segunda dosagem havia um número maior de indivíduos com algum nível de tolerância.

Devido ao excelente desempenho da linhagem 59, esta foi escolhida para ser testada também em maiores concentrações do herbicida (de 100 a 400 g/ha de imazapyr) e mostrou-se tolerante até a máxima dosagem (figura IIc).

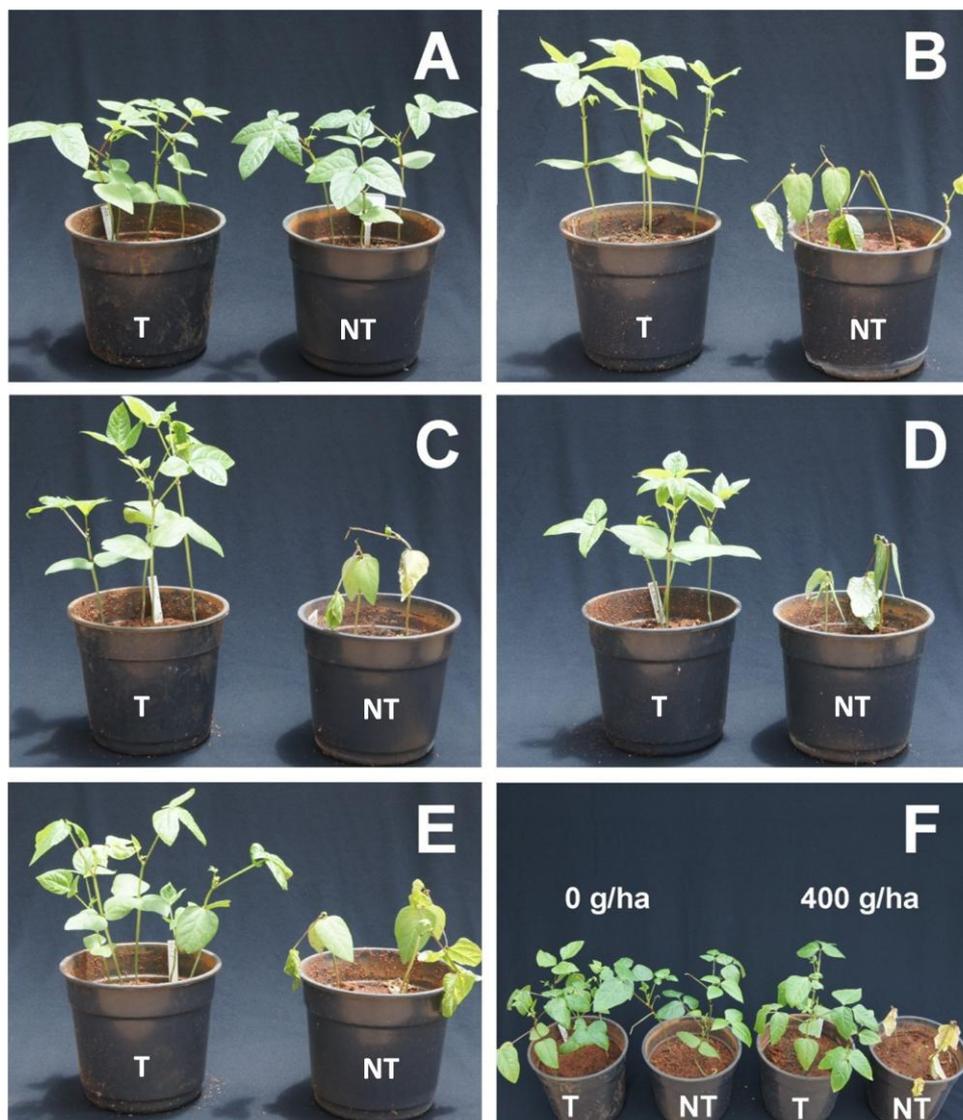


Figura IIc. Linhagem transgênica 59 testada em 4 diferentes concentrações do herbicida imazapyr. A) Não aplicado; B) 100 g/ha; C) 200 g/ha; D) 300 g/ha; E) 400 g/ha; F) Após 20 dias de aplicação do herbicida imazapyr. De A – E, após 11 dias de aplicação do herbicida.

Análises de *Southern blot* de 10 plantas testadas para tolerância ao herbicida foram realizadas para avaliar a integridade do cassete de expressão e possivelmente correlacionar esta com as diferenças na tolerância ao herbicida nas linhagens. Os resultados mostraram a presença da seqüência do gene *ahas* em todas as linhagens analisadas (Figura IId). A enzima *XbaI* foi utilizada para a digestão do DNA genômico pois esta corta em dois locais que flanqueiam o cassete de expressão em ambos vetores utilizados (pSIUCSMVCABMV e pBetacist), permitindo mostrar se o

cassete está completo. O *Southern blot* permitiu confirmar a integração do cassete de expressão para AHAS, bem como revelou que todas as linhagens testadas apresentam o transgene íntegro, a julgar pela presença da banda com um tamanho esperado de 5,8 kb (Figura II d).

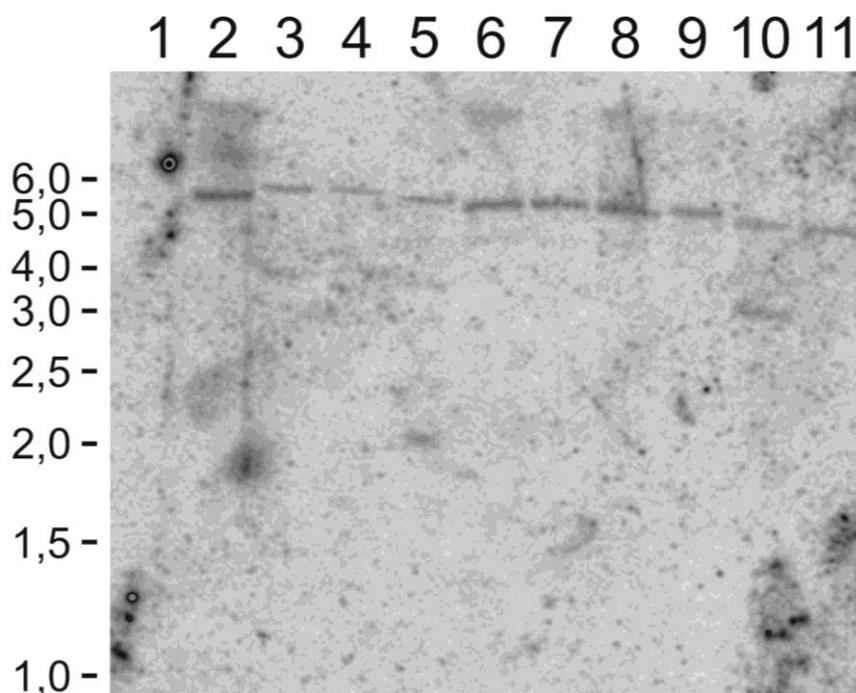


Figura II d. *Southern blot* de 10 plantas transgênicas tolerantes ao herbicida imazapyr. São elas, de 2 a 11 respectivamente: 119, 99, 68, 71, 112, 110, 12, 21, 59 e 39. A coluna 1 corresponde a planta não transformada. Os números a esquerda da figura correspondem ao tamanho molecular em kb.

Não se observou correlação entre os diferentes níveis de tolerância encontrados com a perda de fragmentos do cassete. As diferenças de tolerância ao herbicida podem ser explicadas pela inserção do cassete em diferentes locais do genoma nas linhagens geradas. Regiões com altos níveis de metilação representam normalmente *locus* com baixa taxa de expressão, onde se observa maior enovelamento da cromatina, podendo ser essa a explicação para os diferentes níveis de tolerância (Lewin, 2007). É possível ver também algumas plantas com tolerância que se recuperaram após apresentarem algum sintoma. Pode-se sugerir que os níveis de expressão do gene *ahas*,

nessas plantas recuperadas, foram suficientes para evitar a morte, mas não para evitar os sintomas iniciais. Além disso, algumas linhagens podem ter mais de uma cópia do transgene segregando independentemente, gerando indivíduos com distintos padrões genéticos e, portanto, com distintas respostas ao herbicida em uma mesma linhagem. Também não pode ser descartada a possibilidade de existência de plantas em homozigose e hemizigose nas populações testadas. Desde a década de 1990 têm-se observado diferenças fenotípicas importantes entre as plantas com os transgenes em homozigose ou hemizigose (De Carvalho *et al.*, 1992).

Na planta 59 (Figura IIId) observa-se uma banda extra em tamanho inferior, entre 3 e 4 kb. Esse resultado sugere que pode haver uma sequência truncada do cassete de expressão para AHAS presente no genoma dessa linhagem. No entanto, isso não afetou a alta tolerância a imazapyr observada na linhagem 59. A possibilidade de uma sequência truncada na linhagem 59 deverá ser mais bem caracterizada no futuro com o sequenciamento completo do locus de integração.

Conclusão e perspectivas

Neste capítulo, é reportada a obtenção de feijão-caupi tolerante ao herbicida imazapyr e dentre os resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que:

- A enzima AHAS mutada de *A. thaliana* é capaz de conferir tolerância ao herbicida imazapyr em feijão-caupi;
- Diferentes níveis de tolerância foram observados entre as diferentes linhagens;
- Progenies de uma mesma linhagem também apresentaram diferentes níveis de tolerância entre elas;
- A presença do cassete completo em todas as plantas não foi garantia de iguais níveis de tolerância em todas as linhagens;
- Para entender os motivos dos diferentes níveis de tolerância observados fazem-se necessárias mais análises, como por exemplo, localização e sequenciamento do sítio de integração do transgene no genoma;

Ao contrário de muitos genes incorporados por transgenia, o gene aqui utilizado, *Atahas*, está presente em algumas plantas que possuem tolerância natural a herbicidas. Somando-se com o fato de que uma cultivar de soja resistente a imidazolinonas contendo a enzima AHAS mutada já foi liberada para comercialização, é possível que estas linhagens de feijão-caupi tolerantes ao imazapyr sejam mais bem aceitas pela população.

Experimentos de campo e análises de biossegurança futuras serão realizados e poderão permitir a conversão de algumas dessas linhagens em um produto comercial de utilização para os produtores de feijão-caupi.

Referencias Bibliográficas

Aragão FJL, Sarokin L, Vianna GR, Rech EL. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theor Appl Genet* 2000, 101:1–6.

Christou P, Swain WF, Yang N-S, McCabe DE. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:7500–7504.

Citadin CT, Ibrahim AB, Aragão FJL. Genetic Engineering in Cowpea (*Vigna unguiculata*): History, Status and Prospects. *GM Crops* 2011, *in press*.

De Carvalho F, Gheysen G, Kushnir S, Van Montagu M, Inzé D, Castresana C. Suppression of beta-1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO J* 1992, 11: 2595-2602.

Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 1987, 19: 11-15.

Ehlers JD, Hall AE. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research* 1997, 53: 187-204.

Fontes JRA, Gonçalves JRP, Morais RR. Tolerância do feijão-caupi ao herbicida oxadiazon. *Pesq Agropec Trop* 2010, 40: 110-115.

Frazão OH, Silva JF. Tolerância de cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) a herbicidas pós-emergentes. Conac 2006.

Freitas FCL, Mesquita HC, Freitas MAM, Felipe RS, Guimarães FCN. Seletividade de herbicidas para a cultura do feijão-caupi. XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas 2010, Ribeirão Preto – SP, 1748-1752.

Freitas FCLI, Medeiros VFLP, Grangeiro LCI, Silva MGO, Nascimento PGML, Nunes GHI. Interferência de plantas daninhas na cultura do feijão-caupi. Planta Daninha 2009, 27: 241-247.

Hinchee MAW, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Fischhoff DA, Re DB, Fraley RT, Horsch RB. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium* mediated DNA transfer. Bio/Technology 1988, 6:915–922

Ivo NL, Nascimento CP, Vieira LS, Campos FAP, Aragão FJL. Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. Plant Cell Rep 2008, 27: 1475-1483.

James, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010. ISAAA Briefs 2010, No. 42.

Lewin B. Genes. 9ª Ed. Jones & Bartlett Publishers: New York 2007, 892p.

Li J, Lis KE, Timko MP. Molecular genetics of race-specific resistance of cowpea to *Striga gesnerioides* (Willd.). *Pest Manag Sci* 2009, 65: 520–527.

McCabe DE, Martinell BJ. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. *Bio/technology* 1993, 11:596–598.

Sambrook J, Russel DW. Rapid isolation of yeast DNA. In: Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning, a laboratory manual* (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2001, 631-632.

Rech EL, Vianna GR, Aragão FJL. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nat Protoc* 2008, 3: 410-418.

Sathasivan K, Haughn GW, Murai N. Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone resistant *Arabidopsis thaliana* var. Columbia. *Nucleic Acids Res* 1990, 18:2888.

Shaner DL, Anderson PC, Stidham MA. Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol* 1984, 76:534–546.

Silva AA, Ferreira FA, Ferreira LR, Santos JB. *Biologia de plantas daninhas*. In: Silva AA, Silva JF. *Tópicos em manejo de plantas daninhas*. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. p. 17-61.

Steel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill: New York 1980.

Tan S, Evans RR, Dahmer ML, Singh BK, Shaner DL. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag Sci* 2005, 61: 246–257.

Vianna GR, Aragão FJL, Rech EL. A minimal DNA cassette as a vector for genetic transformation of soybean (*Glycine max*). *Genet Mol Res* 2011, 10: 382-390.

Capítulo III

Transformação de feijão-caupi com o gene de um δ -zeína do milho para aumento dos níveis de metionina na semente

Introdução

As espécies da família fabaceae comumente chamadas de leguminosas, possuem dentre suas características comum o teor baixo de aminoácidos sulfurados como metionina e cisteína (Shewry *et al.*, 1995). A desvantagem deste fator é que esses aminoácidos são considerados essenciais, ou seja, não podem ser sintetizados pelo organismo humano e precisam ser obtidos diretamente da alimentação (Nelson e Cox, 2002). Dentre os membros da família fabaceae, destacamos o feijão-caupi, que apesar de ser uma fonte nutricional valiosa de muitos compostos (Frota *et al.*, 2008), possui baixo teor dos aminoácidos metionina e cisteína.

Análises recentes da cultivar BRS-Milênio (Frota *et al.*, 2008), encontraram em feijão-caupi uma composição de 24,5 g.100 g⁻¹ de proteínas, 2,2 g.100 g⁻¹ de lipídeos totais, sendo que destes, 70% são insaturados prevalecendo os ácidos linoléico (41%) e linolênico (20,2%), ácidos graxos essenciais relativamente raros, especialmente o linolênico (Tinoco, 1982). O teor de fibras desta cultivar chegou a 19,4 g.100 g⁻¹. Os teores do aminoácido triptofano encontrado nessa variedade foi ainda maior do que encontrado em feijão-caupi até então (Iqbal *et al.*, 2006). Essas características, juntamente com suas características de adaptabilidade a diferentes climas e condições ambientais, colocam o feijão-caupi como uma cultura de destaque em programas de melhoramento (Citadin *et al.*, 2011).

Estratégias baseadas no uso de engenharia genética têm sido desenvolvidas para aumentar o valor nutritivo de culturas modificando sua composição de proteínas. Proteínas com alto teor de metionina ou lisina têm sido expressas em plantas. Em tentativas iniciais, a albumina 2S da castanha-do-pará e sua homóloga em girassol foram expressas em algumas espécies de leguminosas (Marcellino *et al.*, 1996; Tu *et al.*,

1998; Aragão *et al.*, 1999; Quecini *et al.*, 2006). No entanto, com a descoberta de um epítopo responsável por alergenicidade na albumina 2S da castanha-do-pará (Stanley *et al.*, 1997), esta teve que ser substituída por outra proteína rica em metionina e que não gerasse resposta de hipersensibilidade.

As proteínas que vieram substituir a albumina 2S foram as zeínas, proteínas de reserva do milho com alto teor de metionina. O gene de algumas zeínas do milho já foi utilizado para transformar algumas culturas como alfalfa, tabaco e soja (Coleman *et al.*, 1996; Bagga *et al.*, 1997; Dinkins *et al.*, 2001), obtendo relativo sucesso na expressão da proteína.

As zeínas pertencem a uma classe de proteínas denominadas prolaminas e recebem esse nome porque são ricas em resíduos de aminoácidos prolina e glutamina. Na maioria dos cereais as prolaminas são os componentes mais abundantes, exceção feita ao arroz, no qual as glutelinas são os principais componentes (Shewry *et al.*, 1995).

O nome zeína vem do nome científico do milho, *Zea mays*, onde perfazem cerca de 60% do total de proteínas do grão desta cultura (Carneiro *et al.*, 2000). Elas estão divididas em quatro tipos distintos: as α -zeínas, as β -zeínas, γ -zeínas e as δ -zeínas. Cada uma dessas quatro classes de zeínas são subdivididas em frações protéicas de 19 e 22 kDa para α -zeínas, 14 e 15 kDa para β -zeínas, 16 e 27 kDa para γ -zeínas e 10, 11 e 18 kDa para δ -zeína (Kim e Krishnan, 2003).

As δ -zeínas, em particular, possuem grande conteúdo de aminoácidos essenciais sulfurados, chegando a 26% do seu conteúdo só em metioninas (Alexandrov *et al.*, 2009), e por esse motivo são proteínas alvo para expressão heteróloga em cultivares onde se objetiva realizar melhoramento nutricional, especialmente em leguminosas.

As proteínas de reserva estão contidas nas sementes em um ou mais grupos e é a composição destas que confere o valor nutricional e as características fenotípicas das

sementes. Estas proteínas são sintetizadas em abundância e acumulam-se nas células, formando os corpos protéicos, apresentando um polimorfismo advindo de famílias multigênicas. Nos cereais cerca de 10% do peso seco da semente são proteínas, enquanto que nas leguminosas, este valor chega a 30% (Marcellino, 2002).

A principal fonte de proteína vegetal na alimentação humana e animal são as proteínas de reserva e por esse motivo sempre chamaram a atenção da comunidade científica e foram umas das primeiras a serem estudadas (Shewry *et al.*, 1995). Com os avanços da biologia molecular, os genes das proteínas de reserva e seus produtos passaram a ser fortes candidatos de investigação, especialmente sob o foco da engenharia genética (Altenbach *et al.*, 1989; Bogue *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 1995).

Neste contexto, a expressão heteróloga de uma δ -zeína do milho em feijão-caupi, poderia gerar uma planta contendo níveis aumentados deste aminoácido e possivelmente satisfazendo a demanda dos aminoácidos essenciais ao organismo humano nesta cultura tão importante, especialmente em regiões semi-áridas do nordeste do Brasil, onde é o grão mais importante e a principal fonte de proteína (Freire-Filho *et al.*, 1999).

Neste capítulo é relatada a estratégia utilizada e os trabalhos já realizados em transformação genética de feijão-caupi com o intuito de conferir um teor aumentado de metionina nas sementes utilizando uma δ -zeína de 18 kDa do milho.

Objetivo geral

Obter plantas de feijão-caupi portando um cassete de expressão semente específico para o gene de uma proteína rica em resíduos do aminoácido metionina.

Objetivos específicos

- Construir vetor de expressão semente específico para o gene de uma δ -zeína de 18 kDa;
- Transformar feijão-caupi com o vetor de expressão semente específico para o gene de uma δ -zeína de 18 kDa;
- Selecionar plantas positivas por PCR e *southern blot* para o gene da δ -zeína de 18 kDa;
- Avaliar as sementes das progênies positivas para o gene da δ -zeína de 18 kDa quanto a expressão desta.

Materiais e métodos

Construção de vetor de expressão semente específico contendo o gene de uma δ -zeína

Para obtenção do gene da δ -zeína do milho foram desenhados os *primers* ZEINF 5'-TAAGCTTATCCCAGGGCACTTGTCAC-3' e ZEINR 5'-GAATTCCTAGAATGCAGCACCAACAAAGGG-3' com base na sequência de uma δ -zeína rica em metionina (GenBank: AY047317.1), contendo sítios de restrição para *HindIII* e *EcoRI* e usados para amplificar um gene a partir de uma biblioteca de cDNA de endosperma de milho gerada previamente no LTG-Embrapa/Cenargen. O gene foi clonado no plasmídeo pGEM-T-*easy vector* e sequenciado. Após isso, o gene foi retirado do vetor utilizando as enzimas *HindIII* e *EcoRI* e inserido no plasmídeo pBSKS, o qual contém o promotor semente específico da β -conglucina da soja, subunidade α' , seguido de seu peptídeo sinal para acúmulo de proteína em corpos proteicos, além do terminador 35S de CaMV. O cassete de expressão foi retirado com as enzimas *SalI* e *KpnI* e inserido no plasmídeo pAC321, o qual contém o gene *ahas* mutado de *Arabidopsis thaliana* (Aragão *et al.*, 2000; Rech *et al.*, 2008), para seleção das plantas regenerados com o herbicida imazapyr (capítulo II).

Transformação do feijão-caupi

O vetor de expressão construído foi utilizado para transformar embriões de feijão-caupi por meio da técnica de biobalística e cultivo com seleção em meio contendo o herbicida imazapyr como descrito no capítulo II.

Triagem das plantas transgênicas por PCR

As plantas regeneradas foram avaliadas por PCR como descrito no capítulo II. A presença do transgene foi confirmada usando *primers* específicos para o gene *ahas* (capítulo II – materiais e métodos) e para o gene da δ -zeína (ZEINF e ZEINR).

Análises de Southern blot

Para avaliar a integração do transgene nas linhagens obtidas e na progênie foram realizadas análises de *Southern blot* como descrito no capítulo II, utilizando como sonda um fragmento do gene da δ -zeína amplificado com os *primers* ZEINF e ZEINR.

Extração de DNA e PCR de sementes

Para extração de DNA de semente, um pequeno pedaço do cotilédone foi excisado, descartando-se o tegumento, e então, macerado. O protocolo de extração seguiu como utilizado para *Southern blot*, mas em pequena escala. A PCR foi realizada com os *primers* específicos para a δ -zeína com a *Taq* polimerase da invitrogen e protocolo sugerido pelo fabricante.

Extração das proteínas álcool-solúveis

A presença da proteína transgênica expressa foi analisada por meio de *western blot* e espectrometria de massa, para isso, a fração álcool-solúvel das proteínas foi extraída como descrito por Esen (1986), com algumas modificações. Para cada amostra foram utilizados 100 mg da semente macerada em nitrogênio líquido e a este acrescentado 1 mL de solução de extração alcoólica correspondendo a 60% de isopropanol e 1% de β -mercaptoetanol. A mistura foi deixada em agitação leve em equipamento vortex, *overnight*, a temperatura ambiente. As amostras foram

centrifugadas durante 10 minutos a 4° C em 15.295 g. O sobrenadante foi coletado e o *pellet* reextraído duas vezes com a solução de extração alcoólica durante 5 horas e 1 hora, com frequentes agitações em vortex, à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram misturados numa única fração.

Espectrometria de massa

Da fração protéica extraída, 1µl foi misturado a 3µl de uma matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico (5mg ácido alfa-ciano, 250 µl de acetonitrila, 200µl de água, 50µl de ácido trifluoroacético 3%) e desta mistura 1µl foi aplicado em placa de MALDI-TOF MSP96 de aço e após seca analisada em espectrômetro de massa MALDI-TOF (Microflex – Bruker Daltonics), modo de operação linear positivo.

Western blot

Para o gel SDS-page do *western blot*, o sobrenadante foi precipitado com 3 volumes de acetona a -20°C *overnight* e em seguida centrifugado a 15294 g e o *pellet* ressuspenso em 50 µL de tampão de extração de proteína (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 10 mM, PMSF 2 mM). O gel para separação das proteínas foi realizado como descrito por Marcellino e Grossi de Sá (1998) e as condições de transferência como sugerido pelo fabricante para utilização de membranas de PVDF (*Immobilon-P*, Millipore). A membrana foi enviada para os Estados Unidos e o *western blot* foi realizado na *University of North Carolina at Chapel Hill* com anticorpo específico para delta-zeína (Wu *et al.*, 2009) gentilmente cedido por Joachim Messing (Waksman Institute of Microbiology, Rutgers University) sendo revelado pela atividade da fosfatase alcalina conjugado em anticorpo secundário em substrato NBT-BCIP.

Resultados e discussão

A PCR utilizando os *primers* desenhados para a δ -zeína resultou em uma banda de aproximadamente 600 pb que foi clonada no plasmídeo pGEM-T *easy vector* e sequenciada (figura IIIa). Esse fragmento quando sequenciado confirmou tratar-se de uma δ -zeína do milho de 18 kDa (Genbank BT067174) com 26% de seu conteúdo em resíduos do aminoácido metionina, uma alta porcentagem conforme esperado. O vetor final foi confirmado por digestão e sequenciamento gerando um plasmídeo de 10.624 pb contendo o cassete de expressão da δ -zeína entre os sítios de *KpnI* e *SalI* e um cassete de expressão para o gene *ahas* mutado, além do gene de resistência à ampicilina para seleção em *E. coli* (figura IIIb). O plasmídeo foi nomeado como pBetazeína.

De 3052 embriões bombardeados com o vetor pbetazeína, dez plantas foram confirmadas positivas para o gene da zeína pela técnica de PCR. Em um total de dez plantas, somente cinco sobreviveram durante o processo de aclimação e chegaram a produzir flores. Dessas plantas positivas, quatro foram confirmadas por *Southern blot*, sendo que três delas apresentaram um padrão de multicópias do transgene (figura IIIc).

[GENE ID: 541921 dzs18](#) | delta zein structural18 [Zea mays]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 1042 bits (564), Expect = 0.0
Identities = 566/567 (99%), Gaps = 0/567 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	1	ATCCCAGGGCACTTGTCACTACTGATGCCATGGCTACCATGAACCCATGGATGCAG	60
Sbjct	79	ATCCCAGGGCACTTGTCACTACTGATGCCATGGCTACCATGAACCCATGGATGCAG	138
Query	61	TACTGCATGAAGCAACAGGGGGTTGCCAAGTTGCTAGCGTGGCCGACCCCTGATGCTGCAG	120
Sbjct	139	TACTGCATGAAGCAACAGGGGGTTGCCAAGTTGCTAGCGTGGCCGACCCCTGATGCTGCAG	198
Query	121	CAACTGTTGGCCTCACCGCTTCAGccctgcccagatgccaatgatgatgcccaggtatgatg	180
Sbjct	199	CAACTGTTGGCCTCACCGCTTCAGCCGTGCCAGATGCCAATGATGATGCCAGGTATGATG	258
Query	181	ccaccgatgacaatgatgcccagatgcccgaatatgaCGCCATCGATGATGGTGCCGACTATG	240
Sbjct	259	CCACCGATGACAATGATGCCGATGCCGAATATGATGCCATCGATGATGGTGCCGACTATG	318
Query	241	ATGTCACCAATAACGATAGCTAGTATGATGCCACCGATGATGATGCCAAACATGGTTTCA	300
Sbjct	319	ATGTCACCAATAACGATAGCTAGTATGATGCCACCGATGATGATGCCAAACATGGTTTCA	378
Query	301	CCAATGATGATGCCGAGTATGATGCCTTCGACGATGACCCGAGTATGATGCCACCGATA	360
Sbjct	379	CCAATGATGATGCCGAGTATGATGCCTTCGACGATGACCCGAGTATGATGCCACCGATA	438
Query	361	ATGATGCCAAGTATGATACCACCGATGATGATGCCGAGCATGGTGTCAATGATAATG	420
Sbjct	439	ATGATGCCAAGTATGATACCACCGATGATGATGCCGAGCATGGTGTCAATGATAATG	498
Query	421	CCAAACATGATGACAGTGCCACAATGTTACTCTGATTCCATCTCGCACATTATAACAACAA	480
Sbjct	499	CCAAACATGATGACAGTGCCACAATGTTACTCTGATTCCATCTCGCACATTATAACAACAA	558
Query	481	CAACAATTACCATTTCATGTTTCAGCCCCACAGCCGTGGCGATCTCACCCATGTTTTTACAG	540
Sbjct	559	CAACAATTACCATTTCATGTTTCAGCCCCACAGCCGTGGCGATCTCACCCATGTTTTTACAG	618
Query	541	CAGCCCTTTGTTGGTGCATCTAG	567
Sbjct	619	CAGCCCTTTGTTGGTGCATCTAG	645

KLIPGHLSPLLMPLATMNPWMQYCMKQQGVANLLAWPTLMLOQLLASPLQPCQMPMMMPPMTMMPMPNMTPS
MMVPTMSPITIASMPPMMPN MVSPMMPSMMPSTMTPSMMPPIMMPSMIPPMMPSMVSSMIMPNMMPVTPQCY
SDSISHIIQQQLPFMFSPTAVAISSMFLQQPFVGAAF*

Figura IIIa. Alinhamento da sequência de nucleotídeos e sequência de aminoácidos preditos da zeína amplificada a partir da biblioteca de cDNA de endosperma de milho. Em amarelo estão os resíduos do aminoácido metionina, totalizando 26% da proteína.

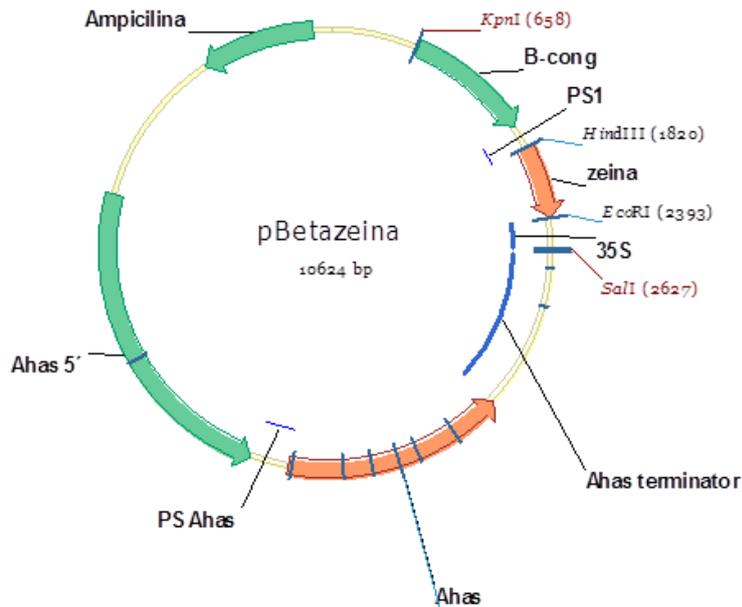


Figura IIIb. Vetor plasmidial para expressão semente específica do gene da δ -zeína de 18 kDa do milho. Nesse esquema estão representados: promotor da beta-conglicina da soja (B-cong), peptídeo sinal utilizado (PS1), o gene da delta-zeína, o terminador do 35S e o cassete de expressão do gene *ahas*, sendo o promotor (*ahas* 5'), um peptídeo sinal (PS *ahas*), o gene *ahas* e o terminador do *ahas* (*ahas* terminator).

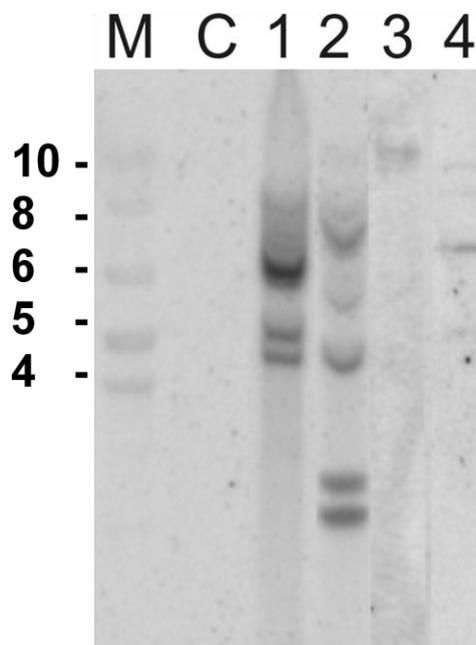


Figura IIIc. Southern blot das linhagens transgênicas contendo o cassete de expressão para a δ -zeína. C= feijão-caupi não transformado; 1= Z153; 2= Z146a; 3= Z4a; 4= Z35a. M = marcador de tamanho molecular, os números ao lado correspondem ao tamanho em Kb.

O número de plantas obtidas, confirmadas por PCR gerou uma frequência muito baixa (próxima de 0,3%) em relação ao esperado para este protocolo de transformação de feijão-caupi, que é de 0,9% (Ivo *et al.*, 2008), o que leva a supor que o gene da δ -zeína pode conferir alguma característica indesejada às plantas que leva a sua morte antes da regeneração e mesmo depois, já que metade das plantas morreram no processo de aclimação. No entanto a presença de plantas positivas para este transgene mantém a questão em aberto.

Dentre as plantas positivas, somente uma, denominada Z153, foi capaz de passar o gene para a progênie, apresentando uma proporção aproximada de 1:1 após análise de 20 sementes germinadas. Essa proporção vai contra padrões mendelianos de segregação independente, e ainda que consideremos a rara possibilidade de todas as cópias do transgene estarem presentes num mesmo cromossomo (Burns e Bottino, 1991). Alguns trabalhos mostram casos específicos onde os transformantes falharam em apresentar a habitual proporção Mendeliana (Forsthoefel *et al.*, 1992; Feldmann *et al.*, 1997; Aragão *et al.*, 1996, Howden *et al.*, 1998; Bonhomme *et al.*, 1998). Uma hipótese para tal evento seria a presença de uma quimera onde apenas parte da planta estaria transformada ou a perda de parte dos gametas portando o transgene devido a um evento de mutagênese insercional (Bonhomme *et al.*, 1998; Pawlowski e Somers, 1998). A presença de multicópias do transgene observadas no *Southern blot* (figura IIIc) aumenta as chances de o padrão de segregação observado estar relacionado com mutagênese insercional (Pawlowski *et al.*, 1998). Nesse caso, algum gene importante para a gametogênese poderia estar sendo interrompido pelo transgene. Esses dados corroboram com uma observação durante a coleta das vagens: havia uma média de 5 sementes por

vagem, enquanto o comum para esta cultivar é de 11 sementes por vagem chegando até 14 sementes.

Da progênie T₁ de Z153 germinada, somente 7 sobreviveram e chegaram a fase adulta. Um *Southern blot* realizado com essas plantas mostra a presença e manutenção do padrão multicópias do transgene em 4 delas (figura IIIId). Pelo padrão é possível perceber que estes não segregaram, permanecendo como na planta T₀, o que leva a inferir que essas cópias podem estar no mesmo cromossomo (Burns e Bottino, 1991).

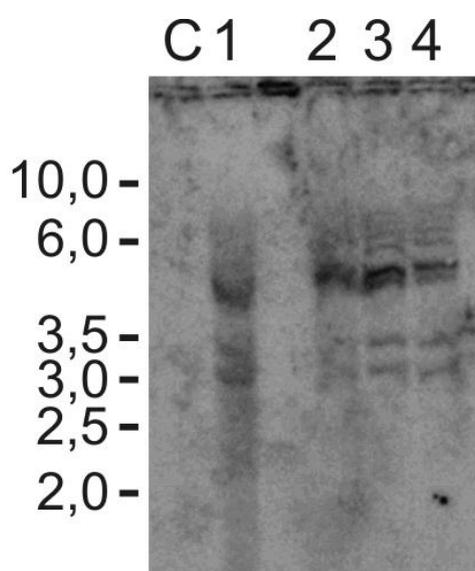


Figura IIIId. *Southern blot* de plantas progênie de Z153. Na imagem é possível verificar a presença de múltiplos lócus correspondentes ao gene nas plantas progênes 1, 2, 3 e 4, enquanto nenhuma cópia é observada na planta não transformada (C). Os números ao lado correspondem à massa molecular em kilobases.

Das progênes germinadas, uma planta produziu sementes, as quais foram analisadas por PCR para confirmar a presença do transgene e das sementes positivas a fração álcool-solúvel das proteínas foi extraída e analisada por espectrometria de massa. A comparação dos perfis de espectro de massa observados entre as plantas transgênicas e a planta controle (figura IIIe) não mostra a presença de proteína na faixa da massa molecular da delta-zeína. No entanto, nem mesmo o milho usado como controle

positivo, apresentou o perfil da proteína nativa esperada, o que nos leva a supor que o protocolo de extração não foi eficiente para a análise de espectrometria de massa, considerando que a espectrometria de massa já foi usada com sucesso para este tipo de proteína (Adams *et al.*, 2004; Cabra *et al.*, 2005).

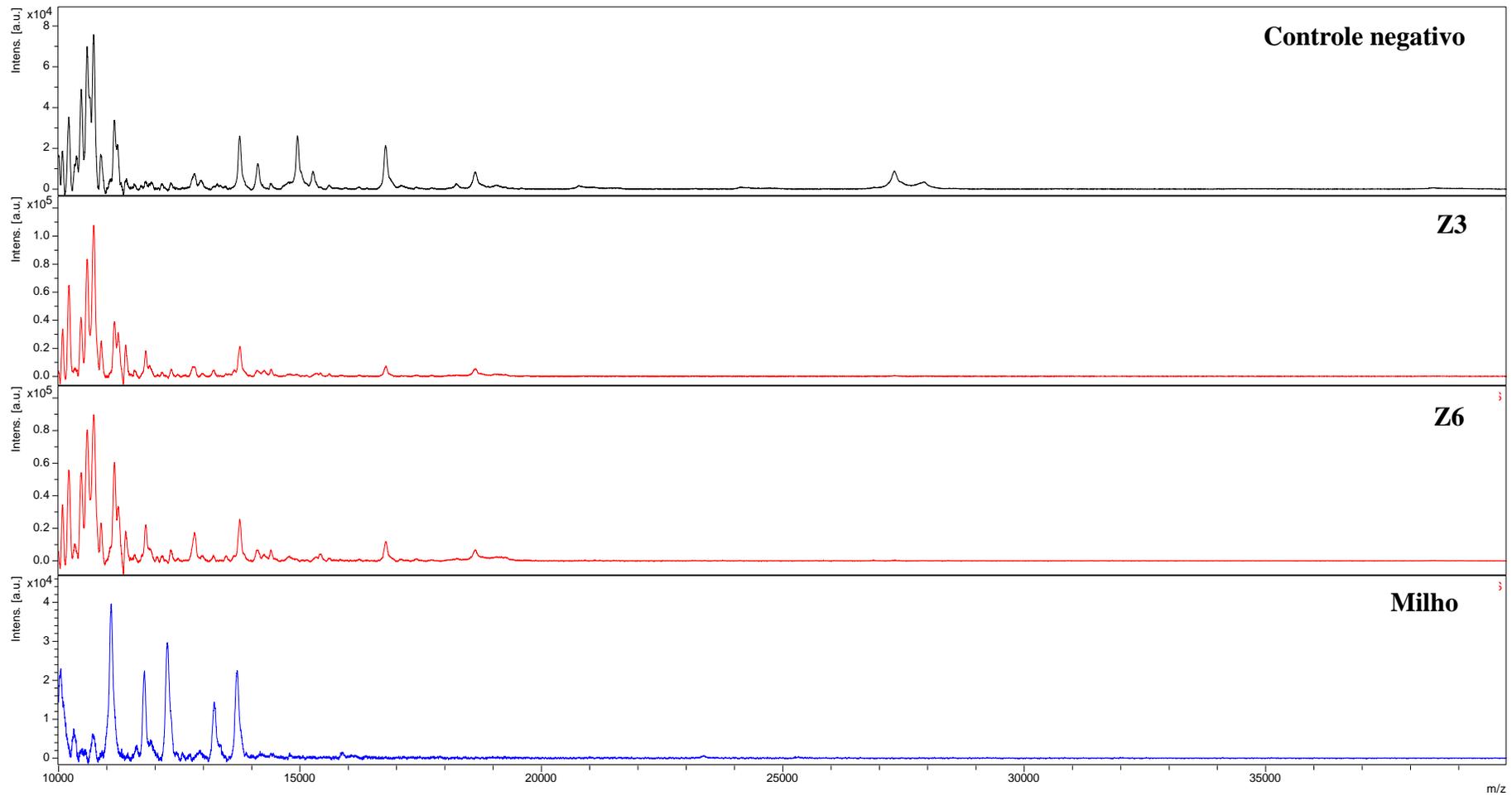


Figura IIIe. Espectro de massa das proteínas da fração álcool solúvel de feijão-caupi e milho. As diferentes cores do espectro representam respectivamente: preto, feijão-caupi não transformado; vermelho, feijão-caupi transgênico; azul, milho.

Posterior análise de *western blot* desta fração proteica permitiu verificar a presença de proteínas no milho hibridizadas com a sonda para a δ -zeína de 18 kDa (dados não mostrados), mas não foi possível observar a presença da delta-zeína de 18 kDa nas plantas transgênicas, o que nos leva a acreditar que ela não está sendo expressa ou que sua expressão não esteja em quantidade suficiente para ser detectada.

Para um evento transgênico esperado ser gerado, na maioria das vezes é necessária a obtenção de vários eventos até que um ou outro seja satisfatório (Kim e Krishnan, 2004; Bonfim *et al.*, 2007; Solleti *et al.*, 2008). Vários motivos podem estar interferindo para que o gene não seja expresso ou acumulado como desejado: pode ser resultado da inserção do gene em locais do genoma de pouca expressão gênica onde há hipermetilação e consequente maior enovelamento da cromatina refletindo num controle transcricional da expressão (Lewin, 2007) ou a deposição e acúmulo desta proteína específica não estaria ocorrendo em feijão-caupi. Bagga *et al.* (1997) reportaram a transformação de tabaco com o gene de um δ -zeína e uma β -zeína e observaram que o nível de δ -zeína em corpos proteicos quando expressa juntamente com a β -zeína era cinco vezes maior do que quando expressa sozinha. Com base nisso, pode-se inferir que o acúmulo de δ -zeína em corpos protéicos pode estar condicionado à presença das outras zeínas do milho. No entanto, trabalhos mostrando a expressão da δ -zeína em soja (Kim e Krishnan, 2004; Dinkins *et al.*, 2001) nos direcionam a questão de que é preciso um número maior de eventos transgênicos para o cassete de expressão aqui utilizado.

Conclusão e perspectivas

- Para os embriões bombardeados com o gene da delta-zeína, foi obtida uma planta transgênica capaz de passar o transgene para a progênie;
- A frequência de transformação de feijão-caupi com o cassete de expressão da delta-zeína de 18 KDa do milho foi bem abaixo do esperado para esta cultura;
- A planta apresentou um padrão multicópias do transgene no genoma quando avaliada por *Southern blot*;
- A proporção de progênes desta planta não condiz com os padrões mendelianos esperados;
- O protocolo de extração de proteínas álcool solúveis revelou-se inadequado para análise por espectrometria de massa;
- A única planta obtida não apresentou sinais da proteína transgênica quando analisada fração álcool-solúvel das sementes por *western blot* com anticorpo específico para a δ -zeína de 18 kDa do milho.

Procedimentos de transformação utilizando a técnica de biobalística continuam sendo realizados a fim de se obter mais eventos transgênicos e aumentar a chance de obter uma planta de feijão-caupi na qual haja de expressão do transgene e aumento do teor de metionina.

Referências bibliográficas

Adams WR, Huang S, Kriz AL, Luethy MH. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Analysis of Zeins in Mature Maize kernels. *J Agric Food Chem* 2004, 52: 1842–1849.

Alexandrov NN, Brover VV, Freidin S, Troukhan ME, Tatarinova TV, Zhang H, et al. Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. *Plant Mol Biol* 2009, 69: 179-194.

Altenbach SB, Pearson KW, Meeker G, Staraci LC, Samuel SM.. Enhancement of the methionine content of seed proteins by expression of a chimeric gene encoding a methionine-rich protein in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 1989, 13: 513–522.

Aragão FJL, Barros L, Sousa MV, Sá MFG, Almeida ER, Gander ES *et al.* Expression of a methionine-rich storage albumin from the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K., Lecythidaceae) in transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Genetics and Mol Biol* 1999, 22: 445-449.

Aragão FJL, Barros L, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria JC, Rech EL. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris*) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics* 1996, 93: 142-150.

Aragao FJL; Sarokin L; Vianna GR; Rech EL. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in there covery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.)Merril) plants at high frequency. *Theor Appl Genet* 2000, 101:1-6.

Bagga S, Adams HP, Rodriguez FD, Kemp JD, Sengupta-Gopalan C. Coexpression of the Maize δ -Zein and β -Zein Genes Results of δ -Zein in Endoplasmic in Stable Accumulation Reticulum-Derived Protein Bodies Formed by β -Zein. *The Plant Cell* 1997, 9: 1683-1696.

Bogue MA, Vonder Haar RA, Nuccio ML, Griffing LR, Thomas TL. Developmentally regulated expression of a sunflower 11S seed protein gene in transgenic tobacco. *Mol Gen Genet*. 1990, 222:49-57.

Bonfim K, Faria JC, Nogueira E, Mendes E, Aragão FJ. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol Plant Microbe Interact* 2007, 20: 717-726.

Bonhomme S, Horlow C, Verzon D, de Laissardiere S, Guyon A, Ferault M *et al.* T-DNA mediated disruption of essential gametophytic genes in *Arabidopsis* is unexpectedly rare and cannot be inferred from segregation distortion alone. *Mol Gen Genet* 1998, 260: 444- 452.

Burns GW, Bottino PJ. *Genética*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
Carneiro NP, Carneiro AA, Carvalho CHS, Vasconcelos MJV, Lopes MA. Milho transgênico. *Revista de biotecnologia* 2000, 01 dez: 42-46.

Cabra V, Arreguin R, Galvez A, Quirasco M, Vazquez-duhalt R, Farres A. Characterization of a 19 kDa α -Zein of High Purity. *J Agric Food Chem* 2005, 53: 725–729.

Citadin CT, Ibrahim AB, Aragão FJL. Genetic Engineering in Cowpea (*Vigna unguiculata*): History, Status and Prospects. *GM Crops* 2011, *in press*.

Coleman CE, Herman EM, Takasaki K, Larkinsai BA. The maize γ -zein sequesters α -zein and stabilizes its accumulation in protein bodies of transgenic tobacco endosperm. *The Plant Cell* 1996, 8: 2335-2345.

Dinkins RD, Reddy S, Meurer CA, Yan B, Trick H, Thibaud-Nissen FO, et al. Increased sulfur amino acids in soybean plants overexpressing the maize 15 KDa zein protein. *Plant* 2001, 37:742-747.

Esen A. Separation of Alcohol-Soluble Proteins (Zeins) from Maize into Three Fractions by Differential Solubility. *Plant Physiol* 1986, 80: 623-627.

Feldmann KA. T-DNAi insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: A mutational spectrum. *Plant J* 1991, 1: 19-21.

Forsthoefel NJ, Wu Y, Schulz B, Bennet MJ, Feldman KA. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: prospects and perspectives. *J Plant Physiol* 1992, 19: 353:366.

Freire-Filho FR, Ribeiro VQ, Barreto PD, Santos CAF. Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região nordeste. In: Queirós MA, Goedert CO, Ramos SRR. Eds. Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro. EMBRAPA-CPATSA: Petrolina, 1999.

Frota KMG, Soares RAM, Arêas JAG. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. Ciênc Tecnol Aliment 2008, 28: 470-476.

Howden R, Park SK, Moore JM, Orme J, Grossniklaus U, Twell D. Selection of T-DNA-tagged male and female gametophytic mutants by segregation distortion in *Arabidopsis*. Genetics 1998, 149: 621-631.

Iqbal A, Kalil IA, Ateeq N, Khan MS. Nutritional quality of important food legumes. Food Chemistry, Oxford 2006, v. 97, n. 2, p. 331-335.

Ivo NL, Nascimento CP, Vieira LS, Campos FAP, Aragão FJL. Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. Plant Cell Rep 2008, 27: 1475-1483.

Kim WS, Krishnan HB. Allelic variation and differential expression of methionine-rich δ -zeins in maize inbred lines B73 and W23a1. Planta 2003, 217: 66-74.

Kim W-S, Krishnan HB. Expression of an 11 kDa methionine-rich delta-zein in transgenic soybean results in the formation of two types of novel protein bodies in transitional cells situated between the vascular tissue and storage parenchyma cells.

Lewin B. Genes. 9ª Ed. Jones & Bartlett Publishers: New York 2007, 892p.

Marcelino LH. Proteínas de reserva de plantas: Caracterização e estudos de expressão gênica. Tese de doutorado, 2002.

Marcellino LH, Grossi de Sá MF. Detecção e Análise de Proteínas pela Técnica de *Western Blot*. In: Brasileiro AC, Carneiro V T C. Manual de transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998, 223-238.

Marcellino LH, Neshich G, Grossi De Sá MF, Krebbers E, Gander E. Modified 2S albumins with improved tryptophan content are correctly expressed in transgenic tobacco plants. *Febs letters* 1996, 385: 154-158.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 3ª Ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

Pawlowski WP, Somers DA. Transgenic DNA integrated into oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc Natl Acad Sci* 1998, 95: 12106-12110.

Pawlowski WP, Torbert KA, Rines HW, Somers DA. Irregular patterns of transgene silencing in allohexaploid oat. *Plant Mol Biol* 1998, 38: 597-607.

Quecini VM, Alves AC, Oliveira CA, Aragão FJL, Rech EL, Almeida ER *et al*. Microparticle bombardment of *Stylosanthes guianensis*: transformation parameters and expression of a methionine-rich 2S albumin gene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2006, 87: 167-179.

Rech EL, Vianna GR, Aragão FJL. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature protocols* 2008, 3: 410-418.

Shewry PR, Napie JA, Tatham AS. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell* 1995, 7: 945–956.

Solleti SK, Bakshi S, Purkayastha J, Panda SK, Sahoo L. Transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds expressing a bean α -amylase inhibitor 1 confers resistance to storage pests, bruchid beetles. *Plant Cell Rep* 2008, 27: 1841-1850.

Stanley JS, King N, Burks AW, Huang SK, Sampson H, et al. Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen *Ara h 2*. *Arch Biochemistry Biophysics* 1997, 342: 244–253.

Tinoco J. Dietary requirements and functions of alpha-linolenic acid in animals. *Prog Lipid Res.* 1982, 21:1-45.

Tu HM, Godfrey LW, Sun SSM. Expression of the Brazil nut methionine-rich protein and mutants with increased methionine in transgenic potato. *Plant Molecular Biology* 1998, 37: 829–838.

Wu Y, Goettel W, Messing J. Non-Mendelian regulation and allelic variation of methionine-rich delta-zein genes in maize. *Theor Appl Genet* 2009, 119:721–731.

Zheng Z, Sumi K, Tanaka K, Murai N. The Bean Seed Storage Protein [beta]-Phaseolin Is Synthesized, Processed, and Accumulated in the Vacuolar Type-II Protein Bodies of Transgenic Rice Endosperm. *Plant Physiol* 1995, 109:777-786.

Capítulo IV

Alterações morfológicas e moleculares em plantas transgênicas de feijão-caupi com a δ -zeína

Introdução

A transformação genética de plantas tem muitos relatos de sucesso com obtenção de cultivares melhorados. No entanto, durante o processo de obtenção de transformantes podem-se gerar eventos que não apresentam a característica esperada associada à expressão do gene inserido. Os motivos para estes eventos se devem em parte pelo fenômeno de mutagênese insercional, porque não há como dirigir o inserto a um local específico do genoma, e em parte porque ao tratar-se de um gene exógeno ao organismo, este pode comportar-se de maneira inesperada.

A mutagênese insercional é um evento de alteração na expressão de um gene dada pela inserção de uma sequência na região genômica no locus onde esse gene se encontra. Um dos fatores que levam à mutagênese insercional causando silenciamento gênico é o aparecimento de multicópias do transgene na planta transformada, que pela técnica de bombardeamento de partículas é relativamente frequente (Pawlowski e Somers, 1998).

Uma das características que podem ser observadas em plantas que sofreram esse tipo de mutagênese é não apresentarem padrão de segregação mendeliano nas progênes, que pode ser resultado da alteração em genes envolvidos direta ou indiretamente no desenvolvimento do gametófito (Howden *et al.*, 1998; Bonhomme *et al.*, 1998).

Fenômenos de mutagênese como este, onde a produção de gametas é afetada, oferece a oportunidade de isolar e caracterizar genes, especialmente aqueles expressos apenas em determinados tecidos e fases do desenvolvimento. Em feijão-caupi não há relatos de estudos de mutagênese insercional ou de genes envolvidos com o desenvolvimento do gametófito

Neste trabalho, é apresentada uma avaliação preliminar em algumas características morfológicas e moleculares de plantas inférteis obtidas durante o

processo de transformação de feijão-caupi para aumento dos níveis do aminoácido metionina nas sementes (capítulo III). O experimento, como já descrito, obteve quatro plantas: uma linhagem não apresentou transferência do transgene para a progênie, mesmo a planta tendo sido fértil; uma linhagem transferiu o transgene para a progênie, mas fora do padrão Mendeliano de segregação (a planta descrita no capítulo III) e duas linhagens mostrando infertilidade.

As plantas avaliadas aqui, denominadas de Z35a e Z146a, despertaram a atenção porque apresentaram baixíssima e nenhuma produção de vagens respectivamente. As vagens, quando produzidas continham uma única semente e esta não continha o transgene. Além disso, apresentaram características macroscópicas distintas como poucas e pequenas folhas, multibrotação e multifloração (figura IVa).

O silenciamento gênico pode estar diretamente relacionado com integração de multicópias de um transgene no genoma, que em plantas transformadas por bombardeamento de partículas é comum (Pawlowski *et al.*, 1998b). O feijão-caupi é uma planta diploide com 22 cromossomos (Ehlers e Hall, 1997) que totalizam aproximadamente 620 megabases de comprimento de genoma nuclear, o que o coloca como um dos menores genomas dentre as leguminosas e plantas vasculares em geral (Chen *et al.*, 2007). Por ser um genoma relativamente pequeno, isso pode conferir menor plasticidade ao feijão-caupi e aumentar as chances de que plantas geneticamente transformadas apresentem diferentes tipos de mutações, em eventos de mutagênese insercional.

Por outro lado, o efeito do transgene inserido, a δ -zeína (Capítulo III), não é conhecido em feijão-caupi, tampouco o comportamento do promotor da beta-conglicinina da soja nesta leguminosa. A δ -zeína do milho utilizada como transgene neste trabalho é uma proteína rica em metionina e esforços têm sido realizados para

umentar o conteúdo de metionina em plantas utilizando zeínas do milho, incluindo a β -zeína (Dinkins *et al.*, 2001; Bellucci *et al.*, 2005; Bagga *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1998; Kim e Krishnan, 2004), no entanto, ambos os trabalhos não relatam o padrão de segregação obtido, tampouco se este padrão obedecera as leis mendelianas da hereditariedade.

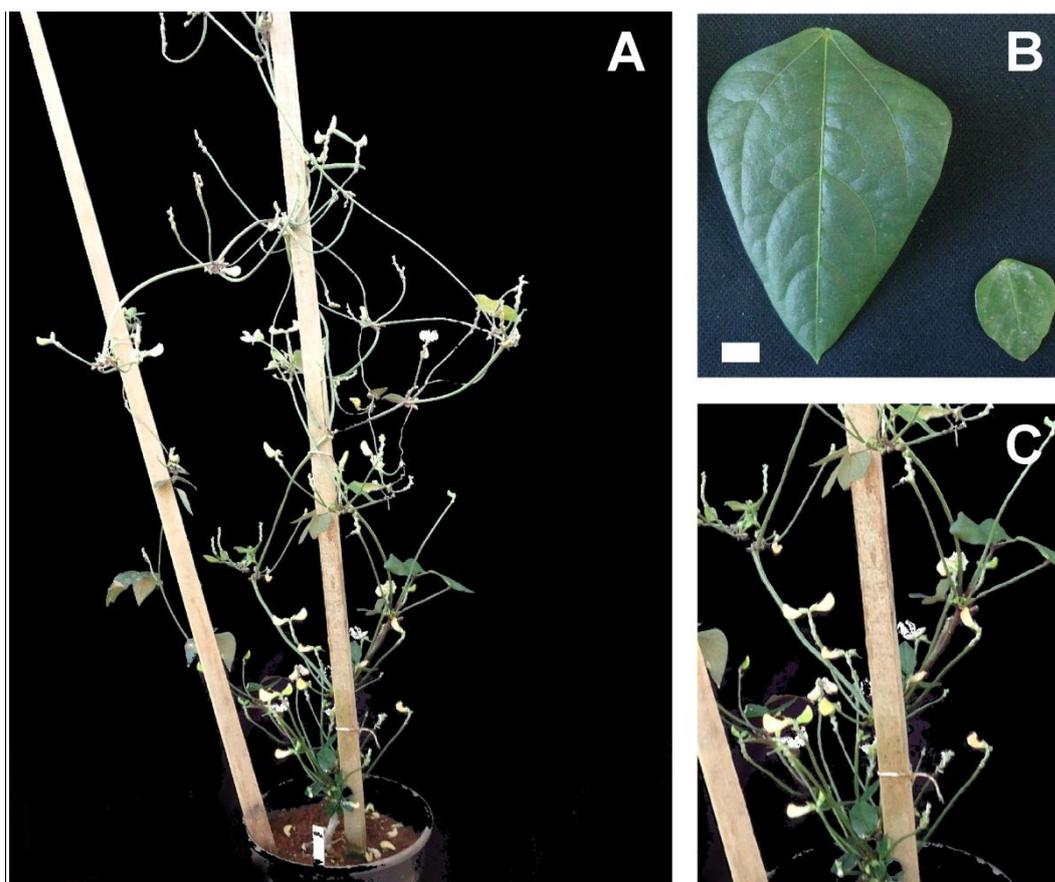


Figura IVa. Plantas transgênicas inférteis portando o gene de uma delta-zeína de 18 kDa do milho. A) Linhagem Z35a apresentando multifloração, folhas pequenas e multibrotação; B) Diferença no tamanho da folha entre uma planta não transformada e a linhagem Z146a; C) Detalhe das flores, da multifloração e da multibrotação. Barra em B = 1 cm.

Em um trabalho realizado por Amira *et al.* (2005) há um breve relato de segregação 3:1 em plantas T1 de tabaco, portando o gene de uma beta-zeína do milho, descendentes de 2 plantas T0 dentre 30 regeneradas. Esse relato escasso não esclarece se essa proporção ocorreu nas outras 28 plantas e leva a questionar porque nenhum

trabalho relata o estudo de segregação nessas plantas transformadas com o gene da delta-zeína, mais ainda, leva a supor que a expressão transgênica desta proteína pode estar relacionada com alterações no gametófito.

Por esse motivo, foram aqui relacionadas algumas alterações morfológicas e moleculares observadas nas plantas com fenótipo de infertilidade, as quais o poderão ser usadas para melhor entender os fenômenos envolvidos na gametogênese, seja por mutagênese ou pela expressão do transgene.

Objetivo geral

Analisar alterações morfológicas e moleculares em plantas transformadas com um cassete de expressão semente específico da delta-zeína de 18 kDa do milho

Objetivos específicos

- Realizar análises de *Southern blot* das plantas Z35a e Z146a para confirmar a presença de multicópias do transgene;
- Avaliar a estrutura floral das plantas Z35a e Z146a na fase de antese;
- Realizar contagem o número de óvulos presente nos ovários das plantas Z35a e Z146a;
- Analisar desenvolvimento de óvulos e anteras das plantas Z35a e Z146a;
- Avaliar a presença de transcritos do gene da delta-zeína nas folhas das plantas Z35a e Z146a;
- Construir bibliotecas de *genome walking* das plantas Z35a e Z146a para futura análise de local de inserção do transgene no genoma.

Materiais e métodos

Material biológico

Para este trabalho foram selecionadas duas linhagens de feijão-caupi transgênico (Z35a e Z146a) obtidas durante transformação com o gene da δ -zeína de 18 kDa do milho, por apresentarem fenótipo de esterilidade. Como controle negativo foram utilizadas plantas não transgênicas da mesma cultivar, BRS - Nova Era.

Análises de Southern blot

Para avaliar a integração e número de cópias do transgene nas linhagens Z146a e Z35a foram realizadas análises de *Southern blot* como descrito no capítulo II, utilizando como sonda um fragmento do gene da δ -zeína amplificado com os primers ZEINF e ZEINR, descritos no capítulo III.

Análise de alterações morfológicas

O androceu e o gineceu das plantas foram observadas em lupa para observar a deiscência das anteras e então fotografados. O ovário de ambas as plantas foi aberto longitudinalmente e os óvulos contados.

Clarificação das anteras e dos ovários para análise de microscopia em DIC

Flores das plantas controle, Z35a e Z146a em diferentes estágios de desenvolvimento, antes da deiscência das anteras, foram coletadas e fotografadas.

Após a coleta das flores, estas foram dissecadas com o cuidado de não destruir a integridade dos ovários e do androceu e colocadas imediatamente no tampão de fixação FAA₇₀ (formaldeído 37% - 50 ml; ácido acético glacial - 50 ml; Etanol 70% - 900 ml) por 24 horas. Os ovários foram transferidos para etanol 70% e deixados por 1 h e depois

desidratados em série de etanol (70, 80, 90, 100, 100 e 100%) pela imersão das amostras por 30 minutos em cada concentração. Os ovários foram então infiltrados com xileno (etanol: xileno) (3:1, 1:1, 1:1, 1:2, 1:3, xileno puro por 3 vezes) em série, pela imersão das amostras por 1 hora em cada concentração da mistura. Após a completa infiltração com xileno, os ovários foram então infiltrados com metil salicilato (xileno: metil) (3:1, 1:1, 1:1, 1:2, 1:3, metil puro por 3 vezes) em série, pela imersão das amostras 2 horas em cada concentração da mistura.

Para análise dos óvulos foi montada uma lâmina com duas lamínulas coladas paralelamente sobre a lâmina deixando um espaço de aproximadamente 0,5 cm, que gerou uma cavidade onde os óvulos foram colocados com metil salicilato e cobertos com lamínula. As anteras, assim como os óvulos, foram cuidadosamente retiradas e colocadas em lâmina escavada com metil salicilato e lamínula. Os preparados foram observados em microscópio com Contraste de Interferência Diferencial (DIC) em aumentos de 10, 20 e 40X.

Análise de transcritos de δ -zeína em folhas das plantas inférteis

Folhas das plantas transgênicas foram maceradas em nitrogênio líquido e cerca de 100 mg do macerado foram utilizados para extração do RNA com o reagente trizol[®] (*Invitrogen*) segundo protocolo do fabricante. A qualidade do RNA foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 1% e quantificada em aparelho espectrofotômetro (*Nanodrop*). O RNA então foi submetido a tratamento com DNase 1ul (1U/ul) (*Promega*) para digestão de possíveis contaminantes de DNA e em seguida utilizados para síntese do cDNA o *Kit Superscript* (*Invitrogen*) e protocolo sugerido pelo fabricante. Reações de PCR foram realizadas utilizando *primers* para a delta-zeína

(capítulo III) e *primers* para o gene do fator de alongamento da RNA polimerase EF1F 5'-TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG-3' e EF1R 5'-AACAGTTTGACGCATGTCCCTAAC-3', como controle positivo. Para a PCR foi utilizado a *Taq* polimerase (*Invitrogen*), e *mix* sugerido pelo fabricante. O *mix* foi desnaturado por 5 min à 95° C e amplificado por 35 ciclos (95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min) com um ciclo final de 7 min a 72° C em termociclador *MyCycler* (*Bio Rad*). A amplificação foi analisada em eletroforese em gel de agarose 1%.

Confeção de bibliotecas de Genome Walking

Bibliotecas de *Genome Walking* das plantas Z35a, Z146a e controle (planta não transformada) foram confeccionadas utilizando o *GenomeWalker Universal Kit* (*Clontech*) e protocolo do fabricante. Duas bibliotecas foram construídas para cada planta transgênica e uma planta não transgênica utilizando para digestão do DNA as enzimas *NruI* numa biblioteca e *SmaI* noutra biblioteca. Para extração do DNA foi utilizado o tampão CTAB 2X e respectivo protocolo como descrito no capítulo II.

Resultados e discussão

Durante o processo de obtenção de plantas transgênicas contendo um cassete de expressão do gene de uma delta-zeína de 18 kDa sob o controle do promotor da beta-conglicinina da soja, utilizando a técnica de biobalística, foram obtidas duas plantas, nomeadas Z35a e Z146a. Essas linhagens apresentavam características morfológicas diferenciadas, como alta produção de flores com posterior aborto e com pouca ou nenhuma vagem. Estas plantas inférteis levaram ao questionamento sobre os motivos pelos quais essas alterações estariam acontecendo, considerando que algum silenciamento gênico estivesse envolvido.

Pelos motivos relatados acima, foi realizada uma análise de *Southern blot* para as linhagens transgênicas Z35a e Z146a com o objetivo de assegurar que as plantas em questão apresentavam a integração dos transgenes incorporados, bem como possível determinação do número mínimo de cópias integradas baseadas no número de locus. Na figura IIIc (capítulo III) é possível observar que estão presentes pelo menos 4 cópias integradas na planta Z35a e pelo menos 7 cópias integradas na planta Z146a. Esse primeiro resultado confirma a primeira hipótese de que as mutações observadas podem ser resultados da presença de múltiplas cópias do transgene no genoma. Plantas transgênicas de feijão comum apresentando alterações no desenvolvimento de gametófito masculino com conseqüente alteração no padrão de segregação do transgene também foram relacionadas com a presença de múltiplas cópias do gene exógeno em análises de *Southern blot* (Ferreira, 2004) e reforçando a hipótese da relação entre multicópias e mutagênese alterando a produção de gametas.

Para entender se a ausência de vagens nas plantas transgênicas estava diretamente relacionada à liberação de pólenes, anteras de flores em antese (estágio onde

ocorre a abertura e liberação dos pólenes para fecundação dos óvulos) foram observadas em lupa. Em ambas as plantas transgênicas, as anteras continuavam fechadas enquanto na planta controle as anteras estavam abertas e os pólenes estavam distribuídos em diversas partes da flor incluindo no estigma e estilete (figura IVb). Além disso, flores analisadas em estágio próximo à antese, mostraram as anteras menores e quando comparada às anteras de plantas não transgênicas (figura IVb). Esse primeiro dado explicou claramente porque as plantas eram inférteis, uma vez que não há liberação de pólen. Observação similar foi encontrada por Ge e colaboradores (2008), onde alto grau de esterilidade em plantas T₁ de *A. thaliana* transformada com diferentes vetores foi encontrado. Além de diferentes vetores utilizados, a frequência de indivíduos estéreis foi menor do que 10%, sugerindo que a esterilidade não estava relacionada com o transgene inserido, mas com um evento de mutagênese insercional.

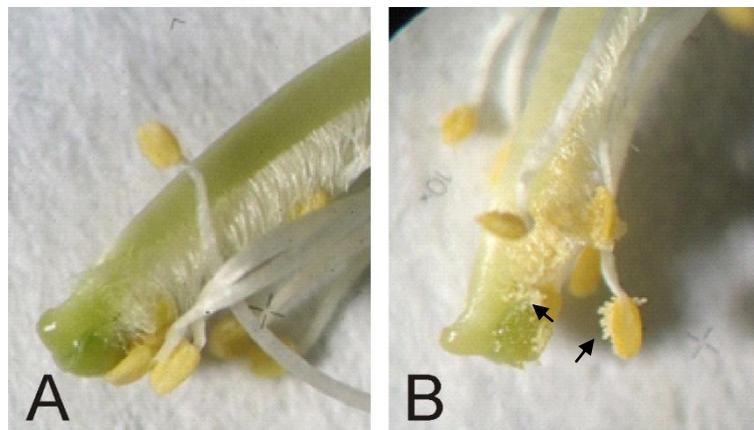


Figura IVb. Estames e região superior do pistilo em fase de antese floral em flores de feijão-caupi. A) Linhagem Z35a mostrando a não deiscência das anteras. B) Planta de feijão-caupi não transformada mostrando grãos de pólen liberados da antera em deiscência. As setas indicam os pólenes.

Esse primeiro dado levou a questionar se a alteração observada nos gametas estendia-se à parte feminina da flor e então, foi realizada uma contagem de óvulos (figura IVc). De 5 flores analisadas foram encontrados 67 óvulos na planta controle,

numa média de 13,4 óvulos por ovário (12, 14, 14, 14 e 13). Na planta Z35a foram contados 52 óvulos perfazendo a média de 10,8 óvulos por ovário (12, 11, 9, 10 e 12). Na planta Z146a foram contados 61 óvulos, numa média de 12,2 óvulos por ovário. Essa alteração na média dos óvulos é pequena, mas sugere que a produção geral de óvulos também pode ter sido comprometida nessas plantas transgênicas. No entanto, inferir se essa alteração é significativa, faz-se necessária uma análise estatística.



Figura IVc. Ovário e óvulos de feijão-caupi. A seta a esquerda indica o ovário e a seta a direita indica os óvulos.

Para a verificação da integridade e normalidade dos óvulos e dos grãos de pólen dentro das anteras dos mutantes foi realizado o trabalho de clarificação dos mesmos, no qual a luz incidente do microscópio passa através dos óvulos e das anteras, deixando visível apenas os contornos das estruturas celulares.

Antes da comparação dos óvulos entre plantas não transformadas transgênica foram designados estágios das flores a serem analisadas para fins deste experimento conforme tamanho da flor (figura IVd) em E0, E-1, E-2, E-3, E-4 e E-5, sendo que E0 é o estágio mais próximo da antese e E-5 o menor tamanho obtido para análise das flores, a fim de gerar uma perspectiva sobre momentos de maturação do óvulo e a presença das estruturas como: saco embrionário, e suas células internas (antípodas, célula central, sinérgides e oosfera) (Gilbert, 2000).

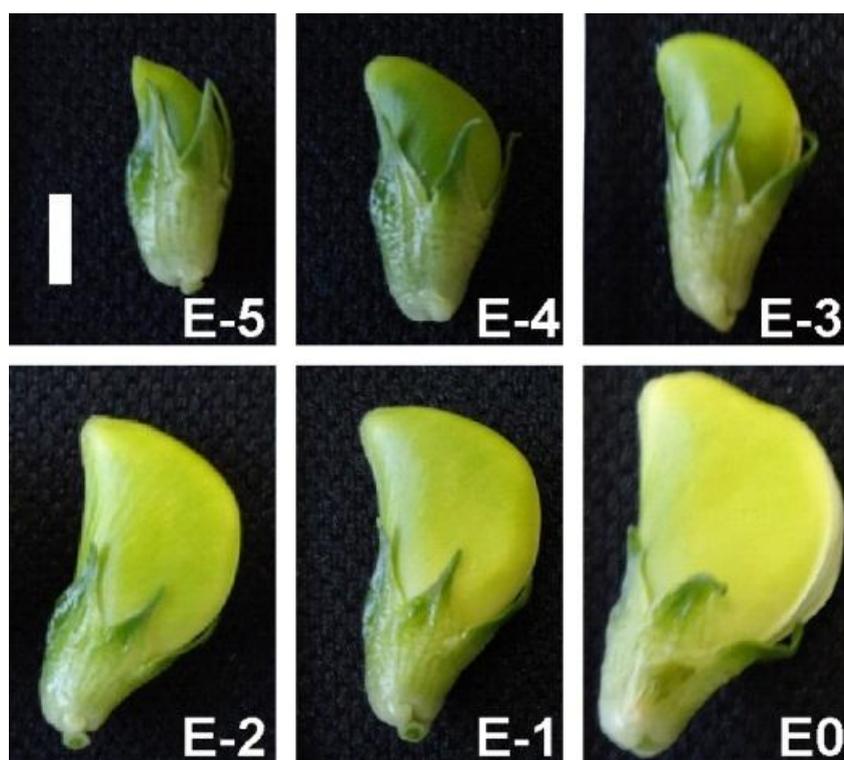


Figura IVd. Flores de feijão-caupi em 6 estágios de desenvolvimento que precedem a antese, selecionados para análise de óvulos e pólenes. Barra = 5 mm.

Não foi possível encontrar diferença que pudesse ser levada como referência para definição de momento em que alterações na planta transgênica estariam acontecendo entre os estágios de maturação dos óvulos, apenas uma diferença no tamanho.

Ao observar a planta Z35a, foi constatado que muitos óvulos encontravam-se com o saco embrionário colapsado, diferente do observado nas plantas controle, sendo este um importante indício de infertilidade no gametófito feminino.

Na planta controle, a observação em DIC mostrou que de 65 óvulos em 6 flores, 62 foram normais, dois apresentaram saco embrionário colapsado e um com o saco embrionário invertido e dividido (figura IVe). A planta Z35a, por outro lado, apresentou apenas 42 óvulos em 5 flores, dos quais 27 estavam colapsados, sete com o saco

embrionário invertido e apenas 8 estavam normais (figura IVe). As alterações nos óvulos apresentadas pela planta Z146a foram ainda mais significativas para a questão da sua infertilidade e de 24 óvulos analisados em 4 flores, 22 tinham o saco embrionário colapsado.

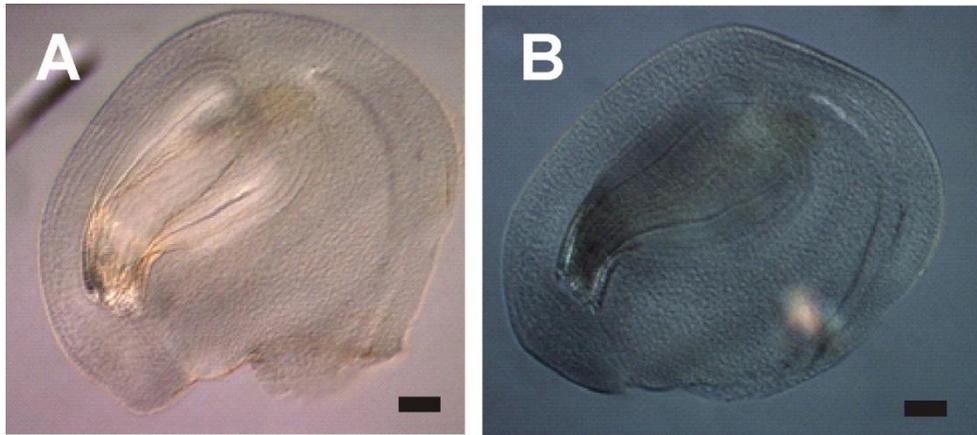


Figura IVe. Óvulos de feijão-caupi em microscopia de luz com DIC. A) Óvulo de uma planta não transformada, mostrando o saco embrionário normal (aberto). B) Óvulo da planta Z35a mostrando o saco embrionário colapsado. Barra: 50 μ m.

A análise das anteras mostrou que as linhagens Z35a e Z146a possuem pólenes em diferentes estágios de maturação ou estourados (figura IVf), numa quantidade escassa quando comparada com a planta controle, a qual apresentou antera cheia de polens e estes todos iguais caracterizando polens viáveis em um total de 27 anteras analisadas para cada planta.

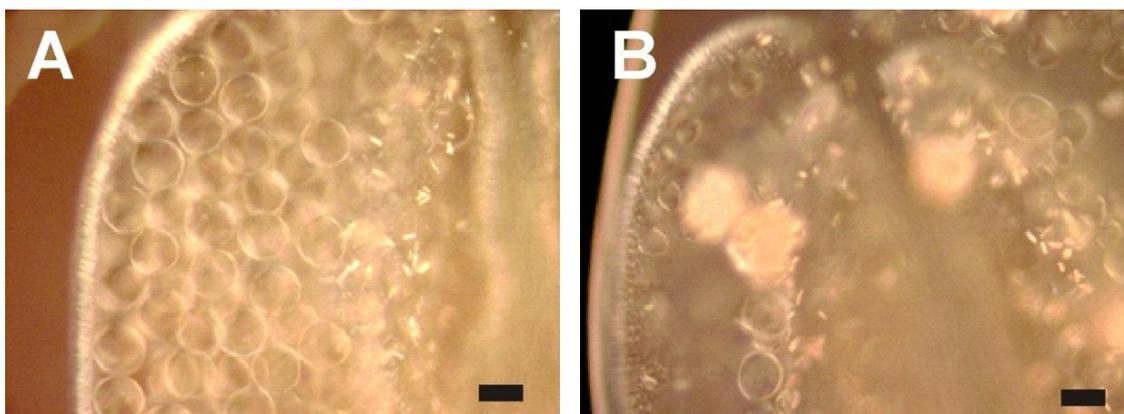


Figura IVf. Anteras de feijão-caupi em microscopia de luz com DIC. A) Antera de uma planta não transformada. B) Antera da planta Z35a onde é possível ver a escassez de pólen e diferenças no tamanho dos pólenes. Barra: 50 μ m.

Alguns trabalhos, como o de Bonhomme e colaboradores (1998) sugerem que o controle gênico do desenvolvimento do grão de pólen e do saco embrionário funciona simultaneamente. Os dados aqui apresentados corroboram com essa hipótese já que o desenvolvimento de ambos os gametas foi afetado.

Embora a presença de multicópias do transgene no genoma tenha sido confirmada nas análises de *Southern blot*, não é totalmente descartada a hipótese de haver correlação entre o transgene e as alterações morfológicas observadas na planta, com poucas folhas e multifloração ou mesmo que este possa estar trabalhando junto com o evento de silenciamento gênico da geração das alterações observadas. Essa dúvida aumenta ao considerar o experimento no qual foram geradas as duas plantas transgênicas inférteis (Z35a e Z146a) em um total de quatro plantas transgênicas geradas. Além disso, as outras duas plantas obtidas apresentaram algum tipo de alteração, sendo que uma delas não passou o transgene para a progênie mesmo após análise de 100 indivíduos da sua progênie e a outra gerou progênies numa segregação não mendeliana.

Eventos de mutagênese insercional costumam acontecer numa frequência inferior a 10% (Ge *et al.*, 2008), diferente do experimento em que foram geradas as

plantas observadas, onde todas as plantas obtidas tiveram algum tipo de alteração além da segregação não-Mendeliana. Por esse motivo, foi realizada uma análise preliminar de transcritos da δ -zeína nas plantas de feijão-caupi transgênico, em que também se pôde inferir sobre a especificidade tecidual do promotor da beta-conglicinina nesta planta. Para isso, reações de RT-PCR a partir do RNA total de folhas das plantas inférteis foram feitas buscando amplificar o gene da delta-zeína. Um banda correspondente ao tamanho esperado foi observada no gel após amplificação com *primers* específicos (figura IVg), comprovando que há expressão do gene nas folhas, pelo menos ao nível de transcritos em outro tecido e pode estar sendo traduzido.

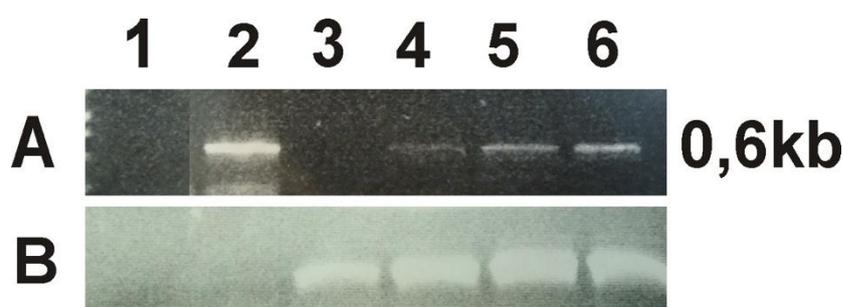


Figura IVg. Análise de transcritos em folhas de feijão-caupi amplificados por RT-PCR. A) Transcritos amplificados com *primers* para a delta-zeína (1: branco; 2: DNA da linhagem Z35a; 3: cDNA de feijão-caupi não transformado; 4: linhagem Z35a; 5: linhagem Z146a). B) Transcritos amplificados com *primers* para fator de elongação (controle).

Análises específicas para detectar a presença da proteína nas folhas serão analisadas futuramente e isso leva a crer que a expressão do gene pode estar interferindo no desenvolvimento dessas plantas. Este resultado também confirma que promotor não está sendo específico apenas para a semente como esperado. Kim e Krishan (2004) também observaram isso em soja para o gene de uma δ -zeína de 11 kDa rica em metionina, em que baixos níveis de transcritos sob orientação do promotor da beta-

conglucina foram observados nas folhas, mas não em outros tecidos, o que leva a concluir que este promotor é capaz de induzir a expressão em tecido foliar.

As análises preliminares para transcritos de δ -zeína nas folhas sugere expressão da proteína nesses tecidos, mas, para confirmar essa sugestão, ainda faltam estudos, como a própria presença da proteína e a geração de mais eventos que continuem com esse tipo de infertilidade observado, ou pelo menos com segregações não mendelianas dos transgenes para melhor inferir se a alteração se deve ao transgene ou a mutagênese insercional. Uma outra possibilidade é que os eventos observados possam ainda ser resultantes da combinação dos dois fatores.

A fim de conhecer a localização do transgene no genoma e auxiliar no estudo de mutagênese insercional, bem como inferir nos genes candidatos a estarem relacionados com o processo de gametogênese em feijão-caupi, foram construídas bibliotecas de *Genome Walking* para as duas plantas transgênicas contendo a construção para expressar a delta-zeína. Para cada planta foi construída 2 bibliotecas, diferenciando-se pelo tipo de enzima usada para digerir o genoma, *NruI* e *SmaI*. A opção por utilizar duas enzimas diferentes foi para aumentar a chance de gerar fragmentos próximos ao sítio de inserção do transgene no genoma e facilitar a busca por PCR. As bibliotecas se encontram armazenadas e *primers* específicos para diferentes partes do vetor foram desenhados para serem realizadas reações de PCR na busca por amplificadores diferenciais entre controle negativo e transgênicas e sequenciamento dessas bandas.

Conclusão e perspectivas

Durante o processo de transformação genética de plantas o DNA exógeno pode integrar-se ao genoma da planta alvo de forma que cause uma interrupção física de um determinado gene, resultando, em alguns casos em alteração fenotípica, dada pela formação incorreta ou não formação do produto gênico correspondente.

Através dos experimentos de biobalística para produção e desenvolvimento de linhagens com teores aumentados do aminoácido metionina nas sementes foram obtidos feijões-caupi com deficiência na produção de vagens, caracterizando plantas inférteis com alterações morfológicas e fisiológicas. A interpretação desses dados sugere que algum gene envolvido com o desenvolvimento dos gametas ou do embrião poderia ter sido alterado, justificando tal anomalia.

Os dados apresentados neste trabalho visam facilitar e contribuir para a compreensão dos processos de integração de DNA exógeno e as razões porque a planta transgênica tem o desenvolvimento dos gametas afetado.

As plantas Z35a e Z146a apresentaram um padrão multicópias do transgene no genoma, como esperado em casos de mutagênese insercional, confirmando que pode haver relação entre o número e cópias e local de inserção no genoma para as alterações fenotípicas observadas.

Os abortos observados nas plantas, com conseqüente queda das flores e, portanto, não formação de vagens, são explicados pela não deiscência das anteras que por sua vez decorre da escassez de pólenes maduros nas anteras das plantas transgênicas, como observado em microscopia utilizando DIC. A observação de grande número de óvulos inviáveis, dados pela morfologia dos sacos embrionários colapsados mostra que

a alteração gênica sofrida pelas plantas se dá em um ou mais genes importantes para desenvolvimento de ambos os gametas.

A observação de transcritos da delta-zeína nas folhas das plantas transgênicas nos leva a questionar se as alterações podem estar também relacionadas com a presença da proteína sendo expressa em outros tecidos que não apenas a semente.

O sequenciamento de fragmentos genômicos correspondentes ao local de inserção do transgene pode nos levar a entender, especialmente por meio de uma análise comparativa entre as plantas Z35a e Z146a, quais genes estão sendo afetados e relacioná-los com o desenvolvimento dos gametas em feijão-caupi, o que também pode ser aplicado a outras plantas, mais especificamente, as leguminosas. Para isso, será utilizada a técnica de *Genome Walking* a partir das bibliotecas já construídas das linhagens transgênicas. Essa informação será importante no que concerne às pesquisas na área de mutagênese insercional e desenvolvimento de gametas.

Bombardeamentos com o vetor de expressão da δ -zeína de 18 kDa do milho continuam sendo realizados a fim de obter mais eventos transgênicos e gerar o objetivo esperado de plantas de feijão-caupi com maiores níveis de metionina em sua semente. Esses novos eventos podem auxiliar a entender se as alterações aqui observadas estão relacionadas apenas com o local de inserção do transgene, independente da sequência inserida ou se há alguma relação com o cassete de expressão para a δ -zeína.

Referencias bibliográficas

Amira G, Ifat M, Tal A, Hana B, Shmuel G, Rachel A. Soluble methionine enhances accumulation of a 15 kDa zein, a methionine-rich storage protein, in transgenic alfalfa but not in transgenic tobacco plants. *J of Experimental Botany* 2005, 56: 2443–2452.

Bagga S, Adams HP, Rodriguez FD, Kemp JD, Sengupta-Gopalanasi C. Co-expression of the Maize δ -Zein and β -Zein Genes Results in Stable Accumulation of δ -Zein in Endoplasmic Reticulum-Derived Protein Bodies Formed by β -Zein. *The Plant Cell* 1997, 9: 1683-1696.

Bellucci M, De Marchis F, Mannucci R, Bock R, Arcioni S. Cytoplasm and chloroplasts are not suitable subcellular locations for β -zein accumulation in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 2005, 56: 1205-1212.

Bonhomme S, Horlow C, Verzon D, de Laissardiere S, Guyon A, Ferault M *et al.* T-DNA mediated disruption of essential gametophytic genes in *Arabidopsis* is unexpectedly rare and cannot be inferred from segregation distortion alone. *Mol Gen Genet* 1998, 260: 444- 452.

Chen X, Laudeman TW, Rushton PJ, Spraggins TA, Timko MP. CGKB: an annotation knowledge base for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) methylation filtered genomic genespace sequences. *BMC Bioinformatics* 2007, 8: 129-138.

Dinkins RD, Srinivasa R, Meurer CA, Yan B, Trick H, Thibaud-Nissen FO *et al.*

Increased sulfur amino acids in soybean plants over expressing the maize 15 KDa zein protein. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2001, 37:742-747.

Ehlers JD, Hall AE. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research* 1997, 53: 187-204

Ferreira AS. Estudo da integração e segregação não-mendeliana de transgenes em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). UnB: Brasília 2004.

Ge X, Wang H, Cao K. Transformation by T-DNA integration causes highly sterile phenotype independent of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 2008, 27:1341–1348.

Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6^a Ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.

Howden R, Park SK, Moore JM, Orme J, Grossniklaus U, Twell D. Selection of T-DNA-tagged male and female gametophytic mutants by segregation distortion in *Arabidopsis*. *Genetics* 1998, 149: 621-631.

Kim W-S, Krishnan HB. Expression of an 11 kDa methionine-rich delta-zein in transgenic soybean results in the formation of two types of novel protein bodies in transitional cells situated between the vascular tissue and storage parenchyma cells. *Plant Biotech Journal* 2004, 2: 199–210 .

Pawlowski WP, Torbert KA, Rines HW, Somers DA. Irregular patterns of transgene silencing in allohexaploid oat. *Plant Mol Biol* 1998, 38: 597-607.

Pawlowski WP, Somers DA. Transgenic DNA integrated into oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc Natl Acad Sci* 1998, 95: 12106-12110.

Sharma SB, Hancock KR, Ealing PM, White DWR. Expression of a sulfur-rich maize seed storage protein, δ -zein, in white clover (*Trifolium repens*) to improve forage quality. *Molecular Breeding* 1998, 4: 435-448.

APÊNDICE