RESUMO

Aumento da transformação estável e transiente utilizando diferentes temperaturas e período no co-cultivo de embriões imaturos de milho

AUTOR PRINCIPAL:
Cássia Canzi Ceccon

E-MAIL:
cassia_ceccon@hotmail.com

TRABALHO VINCULADO À BOLSA DE IC::
Probic Fapergs

CO-AUTORES:
Magali Ferrari Grando, Dielli Aparecida Didoné, Marilia Rodrigues de Silva, Bernado Torres, Lucas Canali Fossatti

ORIENTADOR:
Magali Ferrari Grando

ÁREA:
Ciências Agrárias

ÁREA DO CONHECIMENTO DO CNPQ:
5.01.03.05-9

UNIVERSIDADE:
Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO:
A engenharia genética tem contribuído para o aumento da produtividade e sanidade do milho. A técnica de transformação genética via Agrobacterium tumefaciens tem sido a tecnologia mais utilizada na produção de plantas geneticamente modificadas de milho. A eficiência da transformação, utilizando A. tumefaciens, é dependente de diversos parâmetros, incluindo estirpe da agrobactéria, a resposta ao cultivo in vitro do genótipo de milho e composição do meio de cultura. Segundo Ishida et al. (2007), o co-cultivo é um dos fatores mais importantes dentro do protocolo de transformação. Além do período de co-cultivo, a temperatura utilizada nesta fase também influencia na eficiência da transformação. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do período e da temperatura na etapa de co-cultivo na transformação genética de embriões imaturos do genótipo de milho Hi-II com a A. tumefaciens.

METODOLOGIA:
Na transformação foi utilizado o protocolo de Frame et al, (2002) e a estirpe de A. tumefaciens EHA 101:pTF102 (genes gus e bar). Os embriões imaturos foram imersos na suspensão de A. tumefaciens por 5 minutos. Após a infecção, foram co-cultivados em 4 tratamentos de temperatura e dias: (T1) 3 dias à 20ºC, (T2) 5 dias à 20ºC, (T3) 3 dias à 28ºC e (T4) 5 dias à 28ºC. Após o co-cultivo foi realizada a avaliação da transformação transiente. Para seleção dos tecidos transformados, os embriões foram cultivados em meio de cultura contendo herbicida. Para cada tratamento, foi avaliada a frequência de embriões com pontos azuis e número de pontos por embrião. A transformação estável foi avaliada pelo número de calos resistentes ao herbicida após 5 ciclos de seleção. O delineamento experimental foi completamente casualizado com 5 repetições em cada tratamento. A unidade experimental foi uma placa de petri contendo em media 20 embriões imaturos. O experimento foi realizado em 3 diferentes datas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Nos dois primeiros experimentos os tratamento T1, T2 e T4 produziram maior frequência de transformação transiente (embriões expressando o gene gus) e de transformação estável (frequência de calos resistentes pela expressão do gene bar) quando comparados ao tratamento T3 (Figura 1).

Quando analisado o experimento III observou-se que os tratamentos T1, T2 e T3 apresentaram maior frequência de transformação transiente comparado ao tratamento T4. Para a transformação estável, o tratamento T3 obteve menor eficiência nos três experimentos (Tabela 1). Esta variação entre os experimentos é habitual quando se trabalha com transformação genética e reflete a influência de fatores difíceis de serem controlados, mesmo num sistema de rotina na transformação de plantas de milho e mostra a necessidade de se levar em consideração a média de vários experimentos ao se testar diferentes tratamentos para melhorar os protocolos já existentes para esta espécie.

Considerando a eficiência da transformação, o tratamento T4 (5 dias 28ºC) se destacou nos experimentos I e II (20,9 e 28%, respectivamente). No entanto, no experimento III, o tratamento T1 (3 dias 20ºC) promoveu uma maior eficiência de transformação (32,6%). O bom desempenho do tratamento T4 pode ser explicado pela maior formação de calos em todos os tratamentos, sendo, em média, transformados 114 embriões e destes 96 formaram calos (84,8%) (Tabela 1).

Provavelmente, a alta temperatura e o aumento de dias de co-cultivo proporcionam ao tecido um melhor desempenho na divisão celular, além de ser benevolente para transferência do T-DNA. Considerando os três experimentos, o co-cultivo dos embriões por 3 dias a 20ºC (T1) resultou em uma eficiência de transformação com média de 21,6%.

A figura 2 demonstra a expressão do gene gus em embriões imaturos e a expressão do gene bar em calos de milho transformados geneticamente pela A. tumefaciens e a influência do período e temperatura no co-cultivo observadas nesses experimentos.

CONCLUSÃO:

O co-cultivo de embriões durante 5 dias à 28ºC (T4) favoreceu a formação de calos. Para frequência de transformação estável e transiente os tratamentos 1, 2 e 4 tiveram respostas semelhantes.

Para a transformação genética do genótipo Hi-II pode ser utilizada na etapa de co-cultivo tanto 3 ou 5 dias a 20ºC, como 5 dias a 28ºC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R. K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T. M.; PEGG, S. E. K.; LI, B.; NETTLETON, D. S.; PEI, D.; WANG, K. Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of Maize Embryos Using a Standard Binary Vector System Breakthrough Technologies. Plant Physiology, v. 129, p.13-22, 2002.

ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. Agrobacterium mediated transformation of maize. Nature Protocols, v.2, p.1614-1621, 2007.

INSIRA ARQUIVO.IMAGEM - SE HOUVER:

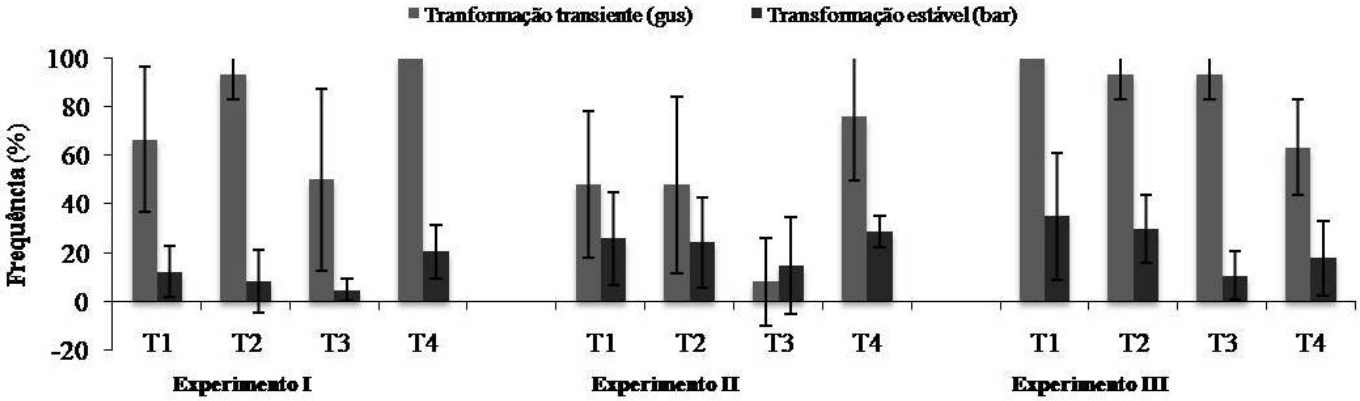

Figura 1. Efeito do período e temperatura do co-cultivo na transformação de embriões imaturos do híbrido Hi-II, nos três experimentos realizados nas datas 18/01, 28/01 e 01/02 de 2013. As barras verticais representam o Desvio Padrão. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2013.

Tabela 1. Eficiência da transformação utilizando diferentes temperatura e períodos na etapa de co-cultivo na transformação genética de embriões de milho com *A. tumefaciens Estirpe EHA101:pTF102*. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2013

		Expressão do gene *gus*			Expressão gene *bar*	
Experimento	**Tratamentos de Co-cultivo**	**N° de embriões infectados**	**% embriões com pontos azuis***	**Média de pontos azuis por embrião**	**% de calos formados**	**Eficiência de transformação (%)**
I	3 dias 20°C (T1)	146	80	9,9	48,6	10,9
	5 dias 20°C (T2)	142	92	27,9	19,7	7,7
	3 dias 28°C (T3)	134	60	4,7	46,3	4,5
	5 dias 28°C (T4)	139	100	26,3	84,9	20,9
	TOTAL/media	**561**	**83**	**17,2**	**49,9**	**11**
II	3 dias 20°C (T1)	112	48	9,9	55,3	21,4
	5 dias 20°C (T2)	136	48	13,3	61	24,3
	3 dias 28°C (T3)	110	8	0,9	23,6	9,1
	5 dias 28°C (T4)	132	76	14,6	78,8	28
	TOTAL/media	**490**	**45**	**9,7**	**54,7**	**21,2**
III	3 dias 20°C (T1)	184	100	23,8	88,6	32,6
	5 dias 20°C (T2)	191	93,2	23,1	94,2	27,2
	3 dias 28°C (T3)	66	93,2	16,2	74,2	16,7
	5 dias 28°C (T4)	71	63,2	4,5	95,8	18,3
	TOTAL/media	**512**	**87,4**	**16,9**	**88,2**	**26,6**
TOTAL/media GERAL		**1563**	**71,8**	**14,6**	**64,3**	**19,6**

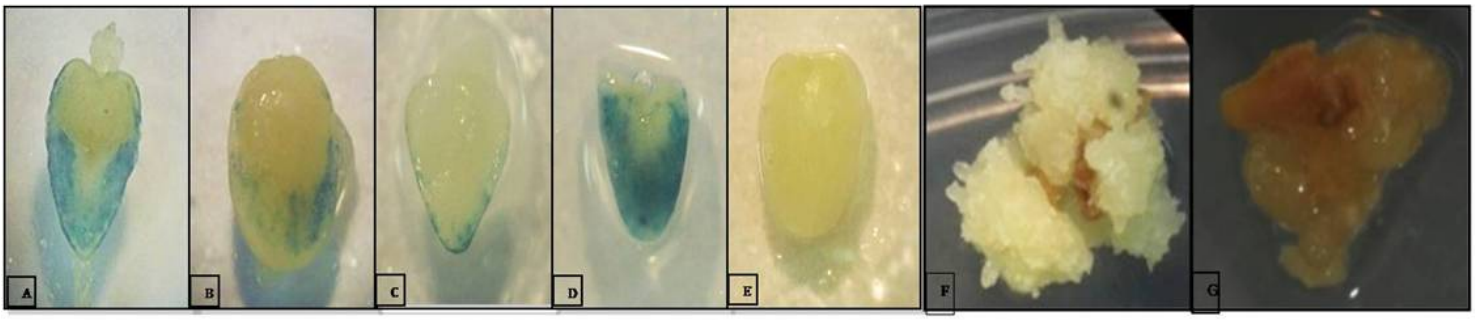

Figura 2. Expressão do gene *gus* em embriões do híbrido de milho Hi-II infectados com *A. tumefaciens* EHA101:pTF102: A) T1= embriões co-cultivados 3 dias a 20ºC; B) T2= 5 dias a 20ºC; C) T3= 3 dias a 28ºC; D) T4= 5 dias a 28ºC; E) Controle negativo não infectado. Expressão gene *bar*: F) Calo expressando resistência ao herbicida Bialaphos, apresentando embriões somáticos em sua superfície. G) Calo não resistente, sensível a presença do herbicida. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2013.

Assinatura do aluno

Assinatura do orientador