RESUMO

Obtenção de plantas transgênicas de milho na Universidade de Passo Fundo

AUTOR PRINCIPAL:
Cássia Canzi Ceccon

E-MAIL:
cassia_ceccon@hotmail.com

TRABALHO VINCULADO À BOLSA DE IC::
Probic Fapergs

CO-AUTORES:
Magali Ferrari Grando, Marilia Rodrigues de Silva, Dielli Aparecida Didoné,Bernardo Torres, Marilei Suzin

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 é um potente instrumento no melhoramento do milho, possibilitando uma rápida resposta à demanda por quantidade de alimentos. A Agrobacterium tumefaciens é um método inovador para transferência de genes nesta espécie, sendo que o genótipo e o explante desempenham um papel fundamental neste processo. Embriões imaturos do híbrido Hi-II têm sido internacionalmente utilizados na produção de milho transgênico. Porém, a utilização de calos embriogênicos apresenta a vantagem de disponibilidade o ano todo, e a utilização de genótipos alternativos ao Hi-II, que apresenta pobres características agronômicas, é altamente desejável. O híbrido de milho H3MT-2, desenvolvido pela UPF, apresenta alta resposta in vitro, mas a possibilidade de transformação genética ainda não foi acessada. O objetivo foi avaliar a resposta de calos embriogênicos dos híbridos H3MT-2 e Hi-II submetidos a tratamentos alternativos na infecção e co-cultivo visando à obtenção de plantas transgênicas.

METODOLOGIA:
A transformação genética foi adaptada do protocolo de Sidorov e Duncan (2009). Foi utilizada a estirpe de A. tumefaciens EHA101:pTF102 (genes gus e bar). Calos embriogênicos dos híbridos Hi-II e H3MT-2 foram infectados por 30 minutos com A. tumefaciens. Alternativamente, antes da infecção os calos foram tratados por 5 minutos a 40oC. Após a infecção os explantes foram transferidos para 2 tratamentos de co-cultivo por 2 dias a 24oC em placas de petri contendo: (1) meio de cultura, (2) 2 folhas de papel filtro. Após, foi realizado o teste histoquímico de GUS. Para seleção dos tecidos transformados, os calos foram cultivados em meio de cultura contendo o herbicida. As variáveis analisadas foram frequência de calos gus positivos, frequência de calos resistentes após 6 ciclos de seleção e número de plântulas regeneradas. A comprovação da transformação nas plantas foi realizada por PCR para o gene gus e pintura das folhas com herbicida. Os dados foram avaliados pela média ± 1 desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

A coloração azul relativo à expressão do gene gus não foi observada após 2 dias de co-cultivo, indicando a insuficiência deste período na visualização da expressão do gene. A expressão do gene bar, determinado pela produção de calos resistentes ao herbicida está apresentada na Tabela 1. No tratamento sem estresse de temperatura o híbrido H3MT-2 obteve os melhores resultados, produzindo 43,75% de calos resistentes no co-cultivo com dessecação (papel filtro) e 38,75% no co-cultivo em meio de cultura. Já o híbrido Hi-II, em infecção sem temperatura produziu 5 e 20% de calos resistentes no co-cultivo com papel filtro e meio de cultura, respectivamente.

Quando foi aplicado a temperatura antes da infecção, o híbrido Hi-II co-cultivado em meio de cultura produziu frequência superior de calos resistentes (8,75%) comparado ao cultivado em papel filtro (3,75%). Para o híbrido H3MT-2 a frequência de calos resistentes em papel filtro (16,25%) e em meio de cultura (47,5%) se apresentou superior ao Hi-II (Tabela 1).

Os calos embriogênicos do H3MT-2, produzido na UPF, apresentaram resultados superiores comparado ao modelo Hi-II. Porém, a utilização do tratamento de estresse de temperatura juntamente com a dessecação resultou na menor formação de calos resistentes para este genótipo, indicando que a aplicação dos 2 estresses pode reduzir a eficiência de transformação.

Das doze plantas regeneradas do híbrido H3MT-2 provenientes do tratamento sem estresse de temperatura e co-cultivo com dessecação, 7 foram aclimatizadas (Figura 1d,e,f), e submetidas ao teste de pintura com o herbicida PPT (Figura 1 g,h) e ao PCR para amplificação do gene gus (Figura 2). O teste químico e molecular indicaram o sucesso na obtenção de plantas transgênicas do novo híbrido de milho H3MT-2 desenvolvido pela UPF.

Este trabalho representa um grande avanço científico, abrindo possibilidade de produção de milho geneticamente modificado com genes agronomicamente importantes para o melhoramento desta espécie.

CONCLUSÃO:

Foi possível a produção de 7 plantas transgênicas contendo os genes gus e bar introduzidos via A. tumefaciens em calos embriogênicos do novo híbrido de milho H3MT-2. Para este genótipo a infecção sem estresse de temperatura e co-cultivo em papel filtro foi o melhor tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

SIDOROV, V.; DUNCAN, D. Agrobacterium-Mediated Maize Transformation: Immature Embryos Versus Callus. Methods Molecular Biology. v. 526, p. 47-58, 2009.

INSIRA ARQUIVO.IMAGEM - SE HOUVER:

Tabela 1. Expressão do gene *bar* em dois híbridos de milho submetidos a diferentes de dessecação na etapa de co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens* EHA101/pTF102

Genótipo	Tratamento Infecção	Tratamento Co-Cultivo	Calos resistentes(%)
Hi-II	Sem Tº	Papel filtro	5
Hi-II	Sem Tº	Meio	20
H3MT-2	Sem Tº	Papel filtro	43,75 S
H3MT-2	Sem Tº	Meio	38,75 S
		Média + 1dp	11,54
		Média – 1dp	-0,79
Hi-II	Tº na infecção	Papel filtro	3,75
Hi-II	Tº na infecção	Meio	8,75 S
H3MT-2	Tº na infecção	Papel filtro	16,25 S
H3MT-2	Tº na infecção	Meio	47,5 S
		Média + 1dp	7,97
		Média – 1dp	0,03

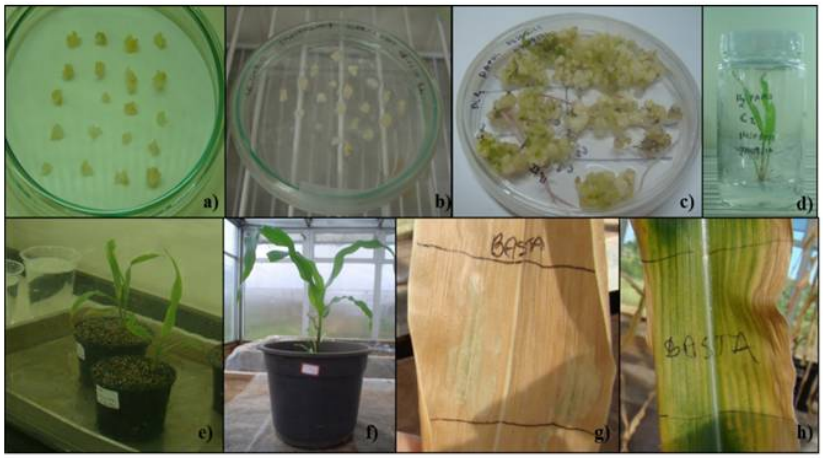

Figura 1. Etapas da obtenção de plantas transgênicas de milho via *A. tumefaciens*. a) Calos embriogênicos de milho durante o co-cultivo em papel filtro. b) Calos embriogênicos durante o co-cultivo em meio de cultura. c) Calos resistentes ao herbicida PPT em meio de regeneração de plantas R1. d) Plântulas de milho regeneradas de calos resistentes ao herbicida em meio de regeneração R2. e) Plântulas de milho em etapa de aclimatização. f) Planta de milho em casa de vegetação. g) Folha planta da controle do genótipo H3MT-2 (não submetidas a transformação genética) mostrando susceptibilidade a aplicação do herbicida). h) Folha de planta de milho do híbrido H3MT-2 expressando a resistência ao herbicida, indicando a inserção do gene bar em seu genoma. Laboratório de Biotecnologia Vegetal-UPF, 2013.

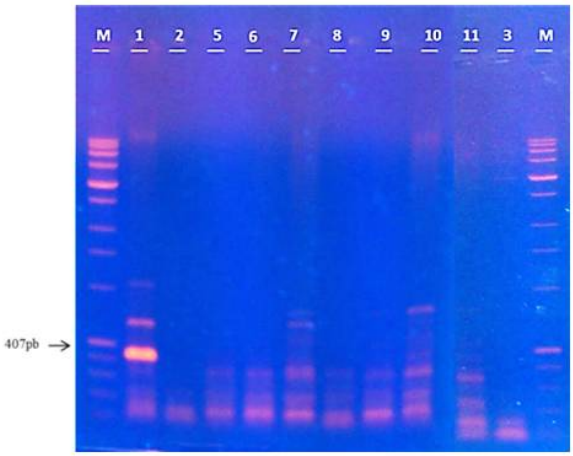

Figura2. Gel de agarose corado com brometo de etídio demonstrando a analise de PCR confirmando a presença do gene *bar* em diferentes plantas do genótipo H3MT-2 provenientes do co-cultivo de calos em papel filtro regeneradas após transformação com *Agrobacterium tumefaciens* estirpe EHA 101:pTF102. Linha M= marcador; 1= Controle positivo (plasmídeo); 2=Branco; 3= Planta Controle negativo; 5= Planta 1; 6= Planta 2; 7= Planta 3; 8= Planta 4; 9= Planta 5; 10=Planta 6; 11=Planta 7. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2013.

INSIRA ARQUIVO.IMAGEM - SE HOUVER:

Assinatura do aluno

Assinatura do orientador