



XXIV
Mostra
de Iniciação
Científica

SEMANA DO
CONHECIMENTO

A Universidade em movimento

De **7 a 10** de outubro de 2014



RESUMO

TRANFERÊNCIA DO GENE DERIVADO DA UREASE EM MILHO VIA *Agrobacterium tumefaciens*

AUTOR PRINCIPAL:

Bruna dos Santos da Silva

E-MAIL:

138622@upf.br

TRABALHO VINCULADO À BOLSA DE IC::

Probic Fapergs

CO-AUTORES:

Demais Autores
Dielli Aparecida Didoné
Cassia Canzi Ceccon
Tiago Teixeira
Marília Rodrigues de Silva

ORIENTADOR:

Magali Ferrari Grando

ÁREA:

Ciências Agrárias

ÁREA DO CONHECIMENTO DO CNPQ:

Ciências Agrárias I

UNIVERSIDADE:

Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO:

A utilização de milho geneticamente modificado nas lavouras brasileiras vem crescendo nos últimos anos. Novas alternativas devem ser desenvolvidas para a resistência de plantas a pragas, devido ao aparecimento de insetos resistentes a tecnologia BT em uso.

A urease é uma proteína natural que ao ser ingerida pelos insetos libera peptídeos entomotóxicos causando a morte de alguns tipos de lagartas, percevejos e bruquídeos (CARLINI et al. 2008). Os peptídeos com propriedades inseticidas derivados da Urease podem ser utilizados na produção de transgênicos para a obtenção de plantas resistentes a insetos (CARLINI et al. 2008). Genes produtores da urease, ou genes de peptídeos, podem ser utilizados em conjunto com genes Bt para somar estratégias para controle de lagartas, ou na resistência bruquídeos e percevejos, que não são afetados pela toxina Bt.

O objetivo desse trabalho foi transferir o gene Jaburetox, derivado da urease, em milho visando à produção de plantas resistentes a insetos.

METODOLOGIA:

Foi utilizado o protocolo de transformação genética desenvolvido por Frame et al, (2002) e a estirpe desarmada de *A. tumefaciens* EHA 105 contendo os plasmídeos binários pEaeleyGate/J-V5 e pEaeleyGate/J-Del portador do gene bar (confere resistência ao herbicida Bialaphos) e do gene derivado de Urease que codifica os peptídeos Jaburetox-Del (J-Del) e Jaburetox-V5 (J-V5) (confere resistência a insetos). Foram utilizados para infecção os embriões imaturos dos genótipos de milho BR 451 e H3MT-1.

Foi avaliado o frequência de calos resistentes ao herbicida Bialaphos após seis ciclos de seleção, relativo a expressão do gene bar, bem como a frequência de transformação estável mediante amplificação pelo PCR.

O delineamento experimental foi DIC com 5 repetições para cada tratamento. A unidade experimental foi uma placa de petri com média de 20 embriões imaturos. Foram utilizado controles negativos (explantes não infectados).

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

De 1.675 embriões imaturos infectados com a agrobactéria, 116 calos resistentes ao herbicida foram obtidos (6,9%). A amplificação por PCR confirmou a presença dos genes que codificam os peptídeos J-Del e J-v5 em apenas 12% dos 116 calos resistentes (Tabela 1 e Figura 1) sendo confirmado a obtenção de calos transgênicos de forma estável.

A eficiência de transformação estável, ou seja, frequência de calos transgênicos por embrião infectado, foi de 0,83%. A eficiência de transformação do genótipo H3MT-1 (1,34%) foi maior que a do BR 451 (0,55%). O genótipo do milho utilizado tem um papel extremamente importante na frequência de transformação. Poucos genótipos são responsivos in vitro e existe uma interação muito grande do genótipo com o meio de cultura empregado e as manipulações durante a infecção e co-cultivo com a *A. tumefaciens*. No entanto, a transformação de genótipos alternativos tem sido relatada por alguns grupos de pesquisadores (VEGA et al., 2008; FRAME et al., 2011). A transformação do BR 451 e a capacidade de produção de calos embriogênicos pelo H3MT1 vem sendo relatados em trabalhos do laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF (SILVA, 2013).

O uso do plasmídeo contendo o gene J-Del resultou numa maior frequência de transformação (1,13) do que o J-V5 (0,19). Sugerindo que o tamanho do gene possa influenciar na transferência do mesmo.

Os calos resistentes que não se mostraram transgênicos representam escapes, visto que sobreviveram ao herbicida mesmo sem serem portadores do gene bar. No total, houve 85,7% de escapes (Tabela 1), indicando a necessidade do emprego de uma maior dose de agente seletivo no meio de cultura.

CONCLUSÃO:

Foi possível transformar embriões imaturos de milhos com *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pEaeleyGate/J-V5 e pEaeleyGate/J-Del, obtendo eficiência de transformação de 0,89%. Os calos PCR positivos serão regenerados para produção de plantas transgênicas que serão avaliadas quanto a resistência a insetos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

CARLINI, CR; POLACCO, JC. Toxic properties of ureases. *Crop Science*, v. 48, p.1665-1672, 2008.

FRAME, B. et al. Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos. In: THORPE, A; YEUNG, EC. *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, v. 710, p. 327-341, 2011.

SILVA MR. Cultivo in vitro e transformação genética de milho com *Agrobacterium tumefaciens*. 2013. Tese de Doutorado (Doutorado em Agronomia). Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.

Tabela 1: Eficiência da transformação genética de embriões imaturos de diferentes genótipos de milho com com *A. tumefaciens* EHA105 pEaeleyGate/J-V5 e pEaeleyGate/J-Del. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2014

Genótipo	Plasmídeo/	Nº de embriões infectados	Calos resistentes		Calos PCR positivos (transformação estável)		Escape (%)	Eficiência de transformação (%)
			Nº	%	Nº	%		
H3MT-1	J-V5	222	11	4,9	1	9,0	91	0,45
	J-Del	371	27	7,3	7	25,9	74,1	1,88
Total		593	38	6,4	8	21	79	1,34
BR 451	J-V5	307	3	0,9	0	0	100	0
	J-Del	775	75	9,6	6	8	92	1,03
Total		1082	78	7,2	6	7,6	92,4	0,55
Média geral		1675	116	6,9	14	12	85,7	0,83



Figura 1: Análise de PCR em calos resistentes ao herbicida Bialaphos: M: Marcador 1000pb; C+1: DNA isolado plasmídeo da bactéria *A. tumefaciens* EHA105 pEaeleyGate/J-V5 como controle positivo 1 de 270 pb; C+2: DNA isolado plasmídeo da bactéria *A. tumefaciens* EHA105 pEaeleyGate/J-Del como controle positivo 2 de 240 pb; C-: Calo não transformado como controle negativo; 92;94;96: Fragmentos de 270 pb amplificados por PCR a partir de calos embriogênicos contendo o gene derivado de Urease. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2014.

Assinatura do aluno

Assinatura do orientador