



Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

Produção de plantas transgênicas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo visando o desenvolvimento de milho resistentes a insetos

AUTOR PRINCIPAL: Bruna dos Santos da Silva

CO-AUTORES: Dielli Didone, Tiago Teixeira, Cassia Ceccon, Caroline Ceolin, Marília Rodrigues da Silva, José Roberto Salvadori, Celia Carlini, Magali Ferrari Grando

ORIENTADOR: Magali Ferrari Grando

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO

Insetos praga são considerados um dos principais fatores limitantes da produtividade em milho. A engenharia genética tem sido empregada como uma importante ferramenta no controle de insetos. As plantas transgênicas resistentes a insetos liberadas comercialmente expressam proteínas inseticidas codificadas pelo gene *Bt*. Porém existe a preocupação de que o emprego de um único mecanismo de resistência a insetos exerça uma alta pressão de seleção levando ao desenvolvimento de insetos resistentes. A introdução de um gene diferente do *Bt* no genoma do milho é uma alternativa para evitar este problema.

O gene *Jaburetox*, derivado da urease de *Canavalia ensiforme*, codifica um peptídeo com propriedades inseticidas (MARTINELLI, 2012), podendo ser utilizado para o desenvolvimento de plantas resistentes a insetos mediante as técnicas de engenharia genética. O objetivo do trabalho foi a introdução do gene *Jaburetox* em milho via *Agrobacterium tumefaciens* para produzir plantas resistentes a insetos.

DESENVOLVIMENTO:

Os experimentos foram realizados utilizando a estirpe de *A. tumefaciens* EHA 105 portando o plasmídeo pEarleyGate 100-JV-5, o qual carrega o gene *Jaburetox* para resistência a insetos e o gene marcador bar que confere resistência a herbicida, ambos sob controle do promotor CaMV 35S. Os explantes embriões imaturos de 1,2 a 1,8 mm do genótipo de milho Hi-II foram transformados com a agrobactéria conforme protocolo de Frame et al. (2011). Os embriões foram

imersos em 1 ml da suspensão de *A. tumefaciens* em meio de infecção durante 5 minutos no escuro. Após a infecção os explantes foram transferidos para o meio de co-cultivo. As placas de petri foram vedadas com fita porosa e co-cultivados no escuro por três dias.

Foram realizadas transformações seguintes datas: 15/01/2015, 19/01/2015, 26/01/2015, 30/01/2015, 02/02/2015, 27/02/2015 e 02/03/2015. Os explantes co-cultivados com *A. tumefaciens* foram transferidos do meio para meio de descanso contendo os antibióticos cefotaxima e vancomicina para eliminação da bactéria. As placas de Petri foram vedadas com fita porosa e mantidas no escuro a 28 °C por sete dias.

Após o período de descanso, os explantes foram transferidos para o meio de SM1 contendo 1,5 mg.L⁻¹ de Bialaphos para seleção de calos resistentes ao herbicida. As placas de Petri foram vedadas com fita porosa mantidas a 28°C no escuro durante duas semanas. Após, os embriões foram transferidos para meio SM2 contendo 3 mg.L⁻¹ de Bialaphos, sendo subcultivados para este mesmo meio a cada três semanas. Estas culturas foram mantidas no escuro a 28oC por 4 subcultivos onde foram selecionados os calos resistentes ao herbicida Bialaphos (Tabela 1, Figura 1a), estes calos selecionados passaram novamente para mesmo meio com maior concentração de L-Prolina para favorecer o desenvolvimento dos calos. Posteriormente os calos embriogênicos resistentes foram segmentados em fragmentos de 3 a 5 mm de diâmetro e transferidos para meio de maturação e posteriormente ao meio de germinação dos embriões somáticos.

Os experimentos estão atualmente em processo de regeneração de plantas, sendo que algumas destas já estão em processo de aclimatação (Figura 1b-e).

A Tabela 1 apresenta os resultados dos experimentos realizados com o genótipo Hi-II e evidencia a variação na resposta entre as datas de realização do experimentos e também o expressivo número de eventos e plantas regeneradas dos experimentos. Em média a porcentagem de calos resistentes ao herbicida Bialaphos e possivelmente transformados foi de 4,4%, sendo que no total foram obtido 26 eventos diferentes de transformação e até o presente momento 106 plantas regeneradas in vitro. Estas plantas possivelmente são transgênicas pois passaram por um rigoroso processo de seleção e serão analisadas molecularmente quanto a presença e expressão do transgene inserido. Algumas plantas foram avaliadas pela PCR, comprovando a presença do gene marcador *bar* no seu genoma (Figura 1f), confirmando a condição de transgênica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Foi possível produzir calos embriogênicos resistentes ao herbicida e regenerar plantas de milho transgênicas a partir do co-cultivo de embriões zigóticos imaturos com a agrobacteria.

REFERÊNCIAS

FRAME, B.; MAIN, M.; SCHICK, R.; WANG, K. Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos. In: THORPE, A.; YEUNG, E. C. Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, [S.I.]. v. 710, p. 327-341, 2011.

MARTINELLI, A.H.S. Jaburetox, Peptídeo Tóxico Derivado da Urease: Estudos de Estrutura e Função. Dezembro de 2012. 103 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa): Número da aprovação.

ANEXOS

Tabela 1. Frequência de calos resistentes ao herbicida Bialaphos obtida a partir da transformação de embriões imaturos do genótipo Hi-II de milho e número de plantas obtidas dos eventos de transformação. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015

Experimento	Nº de embriões infectados	Expressão gene <i>bar</i>			Plantas regeneradas <i>in vitro</i>	
		Número médio de embriões por repetição	Média número de calos embriogênicos resistentes	Porcentagem de calos resistentes ao herbicida Bialaphos	Número de eventos	Nº plantas
15/01/2015	1200	28,5	2,9	10,7	3	9
19/01/15	1400	29,6	1,8	6,2	18	65
26/01/2015	310	26	0,4	1,6	-	-
30/01/2015	1110	37,1	0,7	1,9	2	15
02/02/2015	270	27,3	1,6	5,3	3	17
27/02/2015	630	30,2	0,9	3,2	-	-
02/03/2015	540	28,3	0,4	1,2	-	-
Total/Média	5.460			4,3%	26	106

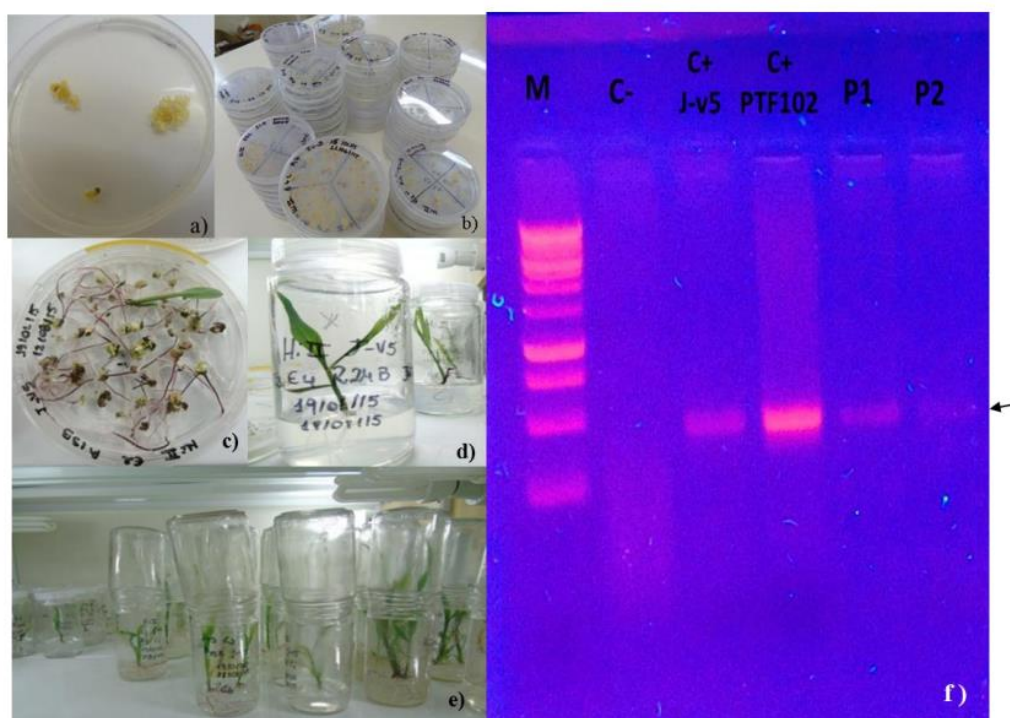


Figura 1. Etapas do processo de transformação de plantas de milho via *A. tumefaciens* EHA 105: pEarleyGate 100-JV-5 . 1a) Calo resistente ao herbicida Bialaphos após quatro subcultivos em meio de seleção contendo 3 mg.L⁻¹ do agente seletivo; 1b-e) experimentos contendo calos resistentes ao herbicida em fase de regeneração de plantas *in vitro*; f) Análise de PCR das duas plantas transgênicas portadoras do gene *bar*: M: Marcador 1000pb; C-: planta não transgênica utilizada como controle negativo C+1: DNA do plasmídeo pEaeleyGate/J-V5 (portados do gene *bar* e jaburetox) como controle positivo (banda de 407 pb, seta); C+2: DNA isolado plasmídeo pTF102 (portador do gene *bar*) como controle positivo 2; P1: planta transgênica 1 ; P2: Planta transgênica 2. Passo Fundo, 2015.