



Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

Processo de Produção de Explantes viáveis para Produção de Plantas Transgênicas de Milho no Laboratório de Biotecnologia Vegetal de UPF

AUTOR PRINCIPAL: Lucas Fossatti

CO-AUTORES: Tiago Teixeira, Dielli Didone, Cássia Ceccon, Natalia Crestani, Leticia Formighieri, Marília Rodrigues de Silva, Magali Ferrari Grando

ORIENTADOR: Magali Ferrari Grando

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO

A metodologia da *Agrobacterium tumefaciens* tem sido a mais utilizada para estudos de transformação genética de milho. Esta técnica necessita de um eficiente sistema de transformação e de regeneração de plantas, pois o gene é introduzido ao nível de células totipotentes que devem dar origem a plantas férteis contendo o transgene em todos os seus tecidos. O explante alvo mais utilizado para introdução de genes em milho é o embrião zigótico imaturo e a obtenção de plantas geneticamente modificadas a partir do mesmo é influenciada por inúmeros fatores, entre elas o genótipo, estágio de desenvolvimento e condição fisiológica. Portanto, é necessária a produção de plantas doadoras do explante em perfeito estado para geração de plantas transgênicas de milho visando à introdução de novos genes de importância agrônômica. Desta forma o objetivo deste trabalho foi obter explantes aptos para transformação genética de milho no Laboratório de Biotecnologia na Universidade de Passo Fundo.

DESENVOLVIMENTO:

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF. Para a transformação genética utilizou-se os embriões imaturos do híbrido americano de milho Hi-II (provenientes do cruzamento das linhagens A188 X B73). Os trabalhos realizados consistiram na multiplicação das linhagens A188 e B73 para manutenção dos genitores, cruzamentos sexuais entre as mesmas para obtenção do híbrido Hi-II, e semeadura deste híbrido, seguido pela autopolinização para produção dos embriões (Figura 1) utilizados na transformação genética.

Para tal, os genitores e o híbrido foram semeados escalonadamente (todas as segundas-feiras e sextas-feiras) em telado e casa de vegetação contendo solo previamente analisado e

corrigido, também foi realizado o controle de pragas e doenças conforme a recomendação da cultura. Quando na fase de reprodução, as plantas emitiram a inflorescência feminina, esta foi coberta com saco plástico para evitar contaminação com pólen de outros genótipos. Quando o pendão (inflorescência masculina) se apresentava em fase viável (Figura 1) para cruzamento e autopolinização foi realizada a coleta do pólen e subsequente autofecundação dos genótipos para obtenção de sementes dos genitores. Para obtenção de novas sementes do híbrido americano Hi-II, as plantas parentais A188 e B73 foram cruzadas, sendo as plantas B73 utilizadas como parental masculino e A188 como parental feminino.

Para obtenção dos embriões utilizados na transformação genética, as plantas F1 do híbrido Hi-II foram autopolinizadas e após doze dias foi realizada a verificação do tamanho do embrião e quando estes estavam com 1,2-1,8 mm as espigas foram coletadas, identificadas, esterilizadas e os embriões excisados foram submetidos à transformação de plantas via *A. tumefaciens*. O processo de transformação foi dividido em quatro etapas sequenciais: infecção, co-cultivo, descanso e seleção (Figura 2) utilizando o protocolo de Frame et al. (2002, 2011) e a estirpe da *A. tumefaciens* EHA 101 contendo o plasmídeo binário pTF102 portador dos genes *uidA* (confere coloração azul) e *bar* (confere resistência ao herbicida Bialaphos), ambos sob controle do promotor CaMV35S. No fim dos três dias de co-cultivo uma amostra de embriões foi submetida ao ensaio histoquímico para verificar a expressão do gene *uidA*, sendo os demais embriões mantidos por oito subcultivos em meio seletivo até a obtenção de calos resistentes ao herbicida, quando se iniciou o processo de regeneração de plantas *in vitro*.

Foram transformados um total de 3.789 embriões em diferentes datas: 23/01/15 (811 embriões), 09/02/15 (641 embriões), 30/03/14 (251 embriões), 07/04/15 (693 embriões), 17/04/15 (651 embriões), 20/04/15 (352 embriões), 28/04/15 (390 embriões), sendo que a transformação foi comprovada pela expressão do gene *uidA* (Figura 1). Foi obtida uma percentagem de 2,7% de calos resistentes ao herbicida Bialaphos a partir dos embriões, os quais se encontram em processo de regeneração de plantas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Obteve-se sucesso na multiplicação de sementes dos parentais A188 e B73 e na produção do híbrido Hi-II, bem como na obtenção de explantes aptos a transformação de plantas. Foi possível transferir o gene *uidA* para embriões de milho bem como produzir calos resistentes ao herbicida Bialaphos mediante a introdução do gene *bar* no genoma vegetal.

REFERENCIAS

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*, Bethesda, v. 129, p.13-22, 2002.

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.

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

ANEXOS



Figura 1. Multiplicação de genótipos e obtenção de explantes aptos para a transformação de plantas. A) Estádios iniciais das plantas de milho crescidas em telado; B) Plantas desenvolvidas em casa de vegetação; C) proteção da inflorescência masculina e feminina para posterior polinização manual; D) Polinização manual para produção dos embriões zigóticos imaturos a serem transformados e para multiplicação dos genótipos; E) Sementes de Hi-II obtidas pelo cruzamento das linhagens A188X B73; F) Sementes de A188 e de B73 obtidas para multiplicação das linhagens parentais do Hi-II; G) Embriões imaturos de milho expressando coloração azul após ensaio histoquímico de Gus comprovando a introdução do gene *uidA*; H) Plântula de milho em meio de germinação de embriões somáticos; I) Plântula transgênica de milho sendo regenerada *in vitro in vitro*.

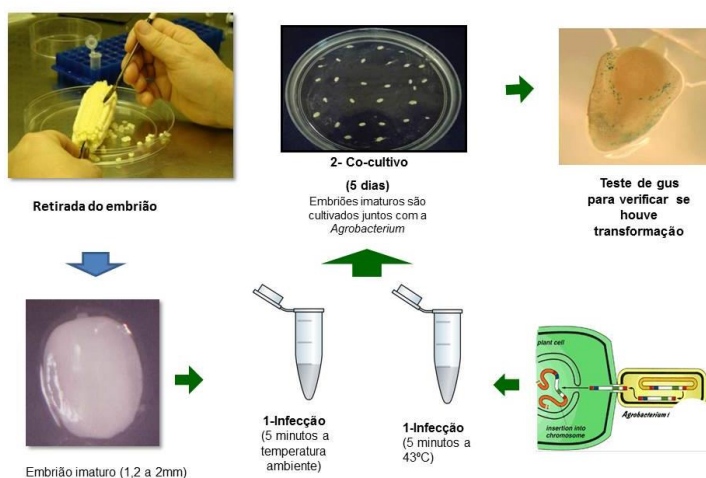


Figura 2. Esquema da etapa da infecção dos embriões imaturos de milho com a agrobactéria, co-cultivo dos mesmos por 3 dias e teste histoquímico de gus após 5 dias da infecção para detecção da expressão transiente do gene inserido.