

Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DE ESTRESSE FÍSICO EM EMBRIÕES IMATUROS NA EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MILHO COM *Agrobacterium tumefaciens*.

AUTOR PRINCIPAL: Tiago Teixeira

CO-AUTORES: Dielli Didone, Cássia Ceccon, Leticia Formighieri, Caroline Ceolin, Natalia Crestani, Marilia Rodrigues de Silva, Lucas Fossatti, Magali Ferrari Grando

ORIENTADOR: Magali Ferrari Grando

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO

A transgenia é uma ferramenta empregada no melhoramento de plantas e no desenvolvimento de uma agricultura sustentável, proporcionando um aumento na produtividade, redução no uso de defensivos agrícolas, além de ampliar os limites de disponibilidades de genes para melhoramento vegetal. A transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* é um dos métodos mais utilizados para este fim, visto que a mesma transfere genes para o genoma da planta durante seu processo natural de infecção. No entanto, em milho o uso deste método apresenta limitações, principalmente pelo milho não ser um hospedeiro natural da agrobactéria.

Estresses ao explante da planta podem facilitar a transferência de genes do T-DNA da agrobactéria para o genoma do milho (Ishida et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi o emprego de estresse físico ao embrião zigótico imaturo de milho antes da sua infecção com *A. tumefaciens*, visando aumentar a eficiência da transformação genética.

DESENVOLVIMENTO:

Embriões imaturos de milho medindo de 1,2- 1,8 mm do genótipo Hi-II foram submetidos a dois tratamentos de infecção com *A. tumefaciens*: (T1) pré-tratamento dos explantes (46°C por 3 min, seguido pelo resfriamento em gelo por 1 min, Centrifugação a 20,000g a 4°C por 10 min) conforme descrito por Ishida et al (2007) seguido de infecção por 5 minutos em temperatura ambiente e (T2) infecção por 5 minutos a temperatura ambiente (25°C) (Frame et al., 2011). Para tal foi utilizada 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. Cada tratamento teve 12 repetições com 30 embriões cada.

Posteriormente, os embriões foram co-cultivados por três dias e 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.

A eficiência de transformação genética foi avaliada através da expressão transiente do gene uidA mediante teste histoquímico de GUS e também pela frequência de calos resistentes ao herbicida Bialaphos devido a presença do gene bar. A frequência de embriões sobreviventes foi contabilizada para registrar efeitos colaterais do estresse no embrião. Os dados foram submetidos a ANOVA e Tukey a 5%.

O pré-tratamento com estresse não resultou em efeito significativo para a expressão do gene uidA, tanto para número de embriões Gus positivos (média de 5,3 embriões positivos) quanto para percentagem de área do embrião corada no teste histoquímico (média de 25%). As áreas azuis nos embriões indicam o local onde o T-DNA da *A. tumefaciens* foi inserido durante a transformação (Figura 1). Já o número de embriões que apresentam pontos azuis representa a percentagem de transformação transiente, prova da transferência do t-DNA da *A. tumefaciens* para as células do embrião de milho. Quanto maior a área do embrião corada maior o número de células do embrião que tiveram inserção do T-DNA agrobacteria.

A frequência de calos resistentes ao herbicida também não diferiu significativamente entre os tratamentos (médias de 0,5% calos resistentes). Os calos resistentes indicam a frequência de transformação estável. A resistência ocorre devido a expressão do gene bar o que condiciona que

os calos transformados sobrevivam ao agente seletivo (herbicida Bialaphos) adicionado ao meio de cultura.

O estresse reduziu significativamente ($p=0.0016$) a capacidade de sobrevivência dos embriões em relação aos embriões não submetidos ao pré-tratamento (Figura 2). Os embriões expostos ao estresse tiveram frequência de 54,5% de sobrevivência, enquanto os embriões que não sofreram estresse, o índice de sobrevivência foi de 95,6%. A redução na sobrevivência dos embriões expostos ao estresse diminuiu a eficiência de transformação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O estresse imposto aos embriões imaturos de milho antes da etapa de infecção com a agrobacteria reduz a eficiência de transformação devido a redução da sobrevivência dos embriões. Desta forma não é indicado o uso do estresse físico descrito neste experimento para o híbrido de milho Hi-II.

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.l.]. v. 710, p. 327-341, 2011.

ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. Agrobacterium-mediated transformation of maize. Nature protocols, vol. 2, pp. 1614–1621, 2007.

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

ANEXOS

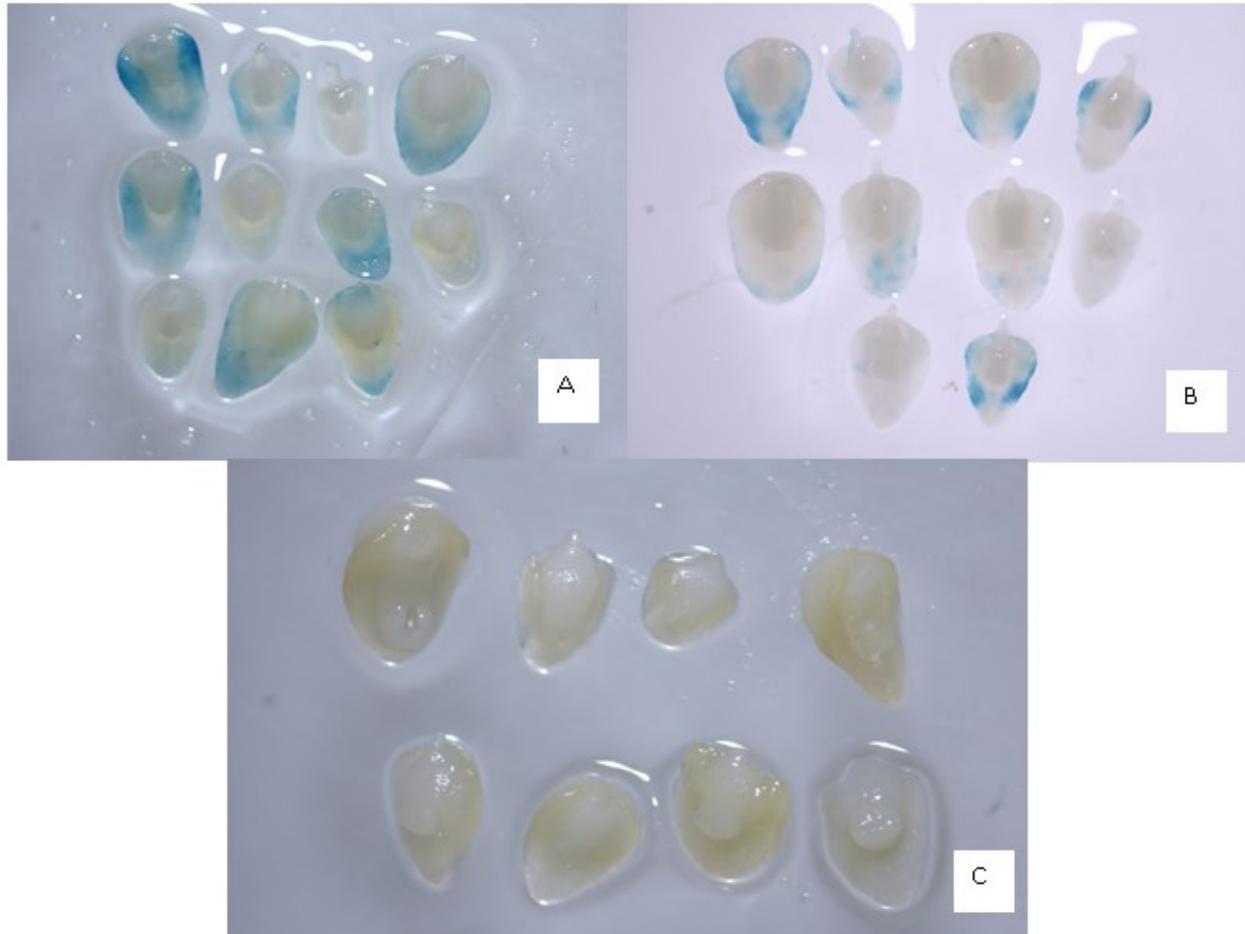


Figura 1: Embriões submetidos ao teste histoquímico de gus comprovando a área onde o t-DNA foi inserido. A: tratamento 1 embriões expostos ao estresse; B: tratamento 2 embriões infectados sem aplicação de estresse; C: controle negativo sem infecção com *A. Tumefaciens*.

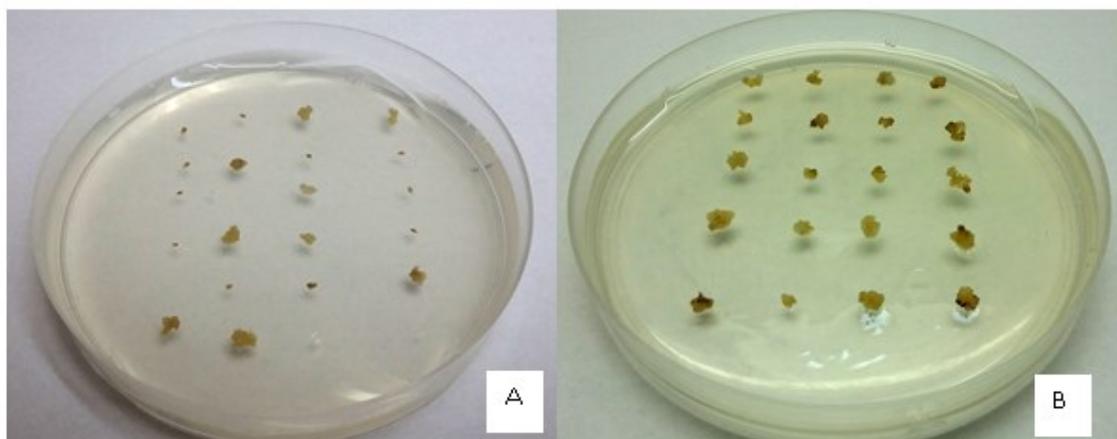


Figura 2: Sobrevivência dos embriões no cultivo em meio nutritivo. A: tratamento 1 embriões expostos ao estresse; B: tratamento 2 embriões infectados sem aplicação de estresse