

III SEMANA DO CONHECIMENTO

Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

Produção de milho transgênico contendo o peptídeo entomotóxico Jaburetox

AUTOR PRINCIPAL: Bruna dos Santos da Silva

CO-AUTORES: Dielli Aparecida Didoné, Cassia Canzi Ceccon, Tiago Teixeira, Marília Rodrigues de Silva, Matheus Augusto Abreu.

ORIENTADOR: Magali Ferrari Grandó

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO:

Os danos causados por insetos-praga nas plantações podem representar grandes perdas e prejuízo aos agricultores e, por isso, novas abordagens para o melhoramento das culturas são necessárias, incluindo na cultura do milho. As ureases são enzimas níquel-dependentes que catalisam a reação de hidrólise da ureia para formar amônia e dióxido de carbono. As ureases são encontradas em plantas, fungos e bactérias. A urease da semente de *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) possui três isoformas cujas propriedades inseticidas de seus peptídeos internos já foram comprovadas (MARTINELLI et al., 2012). Tendo em vista que insetos-praga são um dos principais agentes que causam danos às culturas agrícolas, os peptídeos internos de urease, como o Jaburetox (Jbtx), representa um grande potencial biotecnológico para a transformação genética do milho. O objetivo desse trabalho foi testar se é possível transformar geneticamente plantas de milho com Jbtx via *Agrobacterium tumefaciens*.

DESENVOLVIMENTO:

Foram transformados, utilizando protocolo de Frame et al. (2011), via *A. tumefaciens* Estirpe EHA105 pEarleyGate 100 contendo o Jbtx, 5.460 embriões imaturos de milho do genótipo Hi-II, destes foram regenerados 131 plantas e aclimatadas 68 (Tabela 1). O DNA genômico destas 68 plantas de milho

III SEMANA DO CONSEGUIMENTO

30 DE OUTUBRO
DE 2016

aclimatadas dos experimentos de transformação genética tiveram seu DNA extraído com o auxílio do kit de extração da Qiagen (DNA Extraction - DNeasy Plant Mini Kit Qiagen). A quantificação do DNA obtido foi realizada por eletroforese em gel agarose (1%) seguindo quatro etapas: (1) preparação do gel 1% (200 ml de TBE 0,5 M e 2 g de agarose); (2) preparação das amostras (3 μ l de Green Go taq (5x) + 2 μ l de DNA); (3) corrida do gel (80 volts por 1 hora); e (4) A visualização do DNA em gel foi realizada por meio do corante de DNA GelRed. A quantificação do DNA foi realizada com o espectrofotômetro nanodrop. Após foi realizada a análise para a detecção do gene Jbtx (gene que produz o peptídeo entomotóxico) no genoma das plantas transgênicas através da análise por PCR que amplifica o gene alvo a partir de primers específicos para o mesmo: Jbtx FORWARD CACCATGGGTCCAGTTAATGAAGCC e o Jbtx REVERSE ATAACCTTTCCACCTCC com um tamanho de amplificação de 279 pb. As reações de amplificação da PCR continham 100 ng de DNA; 2,5 nM de cada nucleotídeo; 2,5 μ L de MgCl₂; 3 μ L Tampão (5X); 0,15 μ L da Taq polimerase (5U por μ L); 10 μ M do primer 1; 10 μ M do primer 2 em 20 μ L do volume final. A reação de amplificação foi efetuada em um ciclo de 94 $^{\circ}$ C (2 min), 40 ciclos de 94 $^{\circ}$ C (30 seg), 54 $^{\circ}$ C (45 seg), 72 $^{\circ}$ C (1 min) e extensão final de 72 $^{\circ}$ C (4 min). O produto amplificado foi separado em eletroforese de gel agarose 1,0%, corado com Gel Red e visualizado em fotodocumentador contendo lâmpada ultravioleta (254 nm). Das 68 plantas avaliadas, 57 comprovaram ser transgênicas pela análise de PCR (Figura 1). As plantas comprovadamente transgênicas pertencem a 24 eventos de transformação. Isso significa que foram obtidas plantas transformadas independentes, podendo o gene ter sido inserido em diferentes locais do genoma do milho, o que influencia sua expressão e funcionamento, possibilitando maiores chances de plantas expressando o Jbtx e portando resistentes a insetos. A tabela 2 mostra o número de eventos diferentes e plantas pertencentes a cada evento, bem como a identificação dos mesmos. As plantas transgênicas aclimatadas (geração R0) foram mantidas em casa de vegetação com ambiente controlado, autopolinizadas (quando o pólen era presente) ou polinizadas com plantas de milho Hi-II não transgênicas (controles) e mantidas até a produção de sementes. Essas sementes (Figura 2) foram coletadas e o número de sementes contabilizadas (Tabela 2) para futuros testes moleculares de expressão gênica e proteica e bioensaios com insetos para comprovar sua resistência.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Foi possível produzir plantas de milho contendo o peptídeo entomotóxico Jbtx pelo método de *A. tumefaciens*. Possibilitando uma nova estratégia de

III SEMANA DO CONHECIMENTO

Universidade e comunidade em transformação

controle de insetos-praga, já que os mesmos vêm apresentando resistência aos métodos de controle utilizados atualmente.

3 A 7 DE OUTUBRO DE 2016

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. 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 co-cultivados com *A. tumefaciens* Estripe EHA105 pEarleyGate 100-J-V5 e número de plantas obtidas dos eventos de transformação. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2015

Experimento	Expressão gene bar			Plantas regeneradas in vitro		
	Nº embriões infectados	Nº calos embriogênicos resistentes herbicida	Calos resistentes ao herbicida Bialaphos (%)	Nº de eventos	Nº plantas regeneradas	Nº plantas aclimatadas
15/01/2015	1200	100	8,3	4	10	2
19/01/2015	1400	84	6,0	19	68	33
26/01/2015	310	5	1,6	-	-	-
30/01/2015	1110	28	2,5	2	16	15
02/02/2015	270	17	6,3	6	23	9
27/02/2015	630	22	3,4	3	14	9
02/03/2015	540	4	0,7	-	-	-
TOTAL	5.440	240	4,8	34	131	68

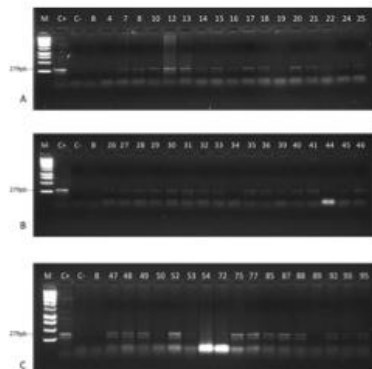


Figura 1. Análise de PCR de plantas regeneradas de experimentos de transformação genética com o gene *Jaburetox* via *Agrobacterium*. A, B e C: M: Marcador de DNA Ladder 1 kb plus; C: DNA do plasmídeo da bactéria *A. tumefaciens* estripe EHA105 pEarleyGate 100-JV-5 como controle positivo; C: Planta de milho não transformada como controle negativo; B: Branco; Amostras das plantas 34, 44, 54, 72 e 89 não apresentam o produto da amplificação, sendo consideradas não transgênicas. As amostras das plantas 4, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 39, 40, 41, 43, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 75, 77, 85, 87, 88, 92, 93 e 95 apresentam a banda de amplificação de 279 pb, sendo consideradas plantas transgênicas. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2016.



Figura 2. Espigas e sementes produzidas pelas plantas transgênicas R0 regeneradas in vitro que conservaram a presença do gene *Jaburetox* (via PCR) mesmo pela regeneração genética. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2016.

Tabela 2. Número de eventos e plantas de milho transgênico portadoras do gene *Jaburetox* que determinam a resistência a insetos. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2016.

Evento	Número de plantas regeneradas e identificação	Identificação do Evento	Número de espigas (Nº sementes)
1	1 (Planta 4)	R1C1-15/01/15	0 (0)
2	2 (Plantas 7 e 8)	R25C1-19/01/15	3 (114)
3	1 (Planta 10)	R2C2-02/02/15	2 (9)
4	9 (Plantas 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20)	R21C1-30/01/15	3 (20)
5	3 (Plantas 21, 22 e 150)	R22C4-19/01/15	2 (18)
6	11 (Plantas 24, 25, 26, 27, 47, 48, 49, 50, 92, 93 e 95)	R22C2-19/01/15	1 (17)
7	2 (Plantas 28 e 29)	R23C2-18/01/15	3 (93)
8	1 (Planta 30)	R15C3-19/01/15	1 (97)
9	1 (Planta 31)	R1C4-19/01/15	0 (0)
10	3 (Plantas 32, 33 e 77)	R2C1-30/01/15	1 (9)
11	3 (Plantas 35, 36 e 53)	R7C2-02/02/15	1 (39)
12	1 (Planta 39)	R7C3-19/01/15	0 (0)
13	2 (Plantas 40 e 41)	R12C3-19/01/15	1 (19)
14	1 (Planta 52)	R13C3-19/01/15	1 (26)
15	1 (Planta 75)	R7C3-02/02/15	1 (62)
16	3 (Plantas 85, 87 e 88)	R6C1-19/01/15	2 (60)
17	1 (Planta 102)	R13C1-19/01/15	1 (26)
18	1 (Planta 106)	R8C6-27/02/15	0 (0)
19	1 (Planta 107)	R13C5-19/01/15	0 (0)
20	2 (Plantas 115 e 123)	R4C3-27/02/15	1 (30)
21	2 (Plantas 118 e 119)	R4C1-27/02/15	0 (0)
22	1 (Planta 128)	R2C1-02/02/15	0 (0)
23	1 (Planta 129)	R4C4-15/01/15	0 (0)
24	3 (Plantas 131, 132 e 133)	R4C1-27/02/15	0 (0)
24	57		24 (637)

III SEMANA DO CONHECIMENTO

Universidade e comunidade
em transformação

3 a 7 DE OUTUBRO
DE 2016