

III SEMANA DO CONHECIMENTO

Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

**Biotecnologia e transformação genética.
Transformação genética de milho para resistência a insetos.**

AUTOR PRINCIPAL: Matheus Augusto de Abreu

CO-AUTORES: Me. Tiago Teixeira, Me. Dielli Didone, Me. Cássia Ceccon, Dra. Marília Rodrigues de Silva, Ph. D. Magali Ferrari Grando

ORIENTADOR: Ph. D. Magali Ferrari Grando

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo - UPF

INTRODUÇÃO:

A metodologia da *Agrobacterium tumefaciens* tem sido a mais utilizada para transformação genética de milho. Porém esta tecnologia é pouco eficiente para milho visto que este não é hospedeiro natural da *A. tumefaciens* (Frame et al., 2007). Desta forma esta técnica necessita de um eficiente sistema de transformação e 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 mais utilizado para introdução de genes em milho é o embrião zigótico imaturo e a obtenção de plantas geneticamente modificadas a partir deste é influenciada por inúmeros fatores: genótipo, estágio de desenvolvimento e condição fisiológica (Ishida et al., 2007). Desta forma o objetivo deste trabalho foi obter explantes aptos para transformação genética de milho e conduzir plantas transgênicas de experimentos de transformações anteriores até obtenção de sementes seguindo as normas de biossegurança.

DESENVOLVIMENTO:

O trabalho foi desenvolvido em casa de vegetação (Figura 1A), estufa (Figura 1B) e telado (Figura 1C) do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF. O trabalho consistiu em três etapas distintas: (1) manutenção das plantas regeneradas in vitro provenientes da transformação genética de milho com o gene *jaburetox* de experimentos realizados em 2015, (2) produção de sementes de diferentes genótipos de milho e (3) obtenção de explantes aptos para transformação genética via *A. tumefaciens*. As plantas de milho foram cuidadas e realizado tratamentos fitossanitários conforme recomendação da cultura.

(1) Após aclimação as plantas foram transferidas para vasos e mantidas em casa de vegetação. Para obtenção de sementes T1 das plantas transgênicas, quando a mesma

III SEMANA DO CONTECIMENTO

37 DE OUTUBRO
2016

tinha pólen ela era autopolinizada, caso contrário era utilizado pólen do híbrido Hi-II não transformadas (Tabela 1). As sementes obtidas foram transportadas e armazenadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e plantas e restos vegetais foram autoclavados e descartados. Das 68 plantas aclimatadas provenientes de experimentos realizados em 2015, 57 apresentaram o gene jaburetox conforme análise de PCR e 24 plantas (Tabela 1) geraram sementes, este resultado é importante visto que plantas férteis irão passar o transgene para próxima geração.

(2) Para a produção de sementes das linhagens A188 e B73, do híbrido Hi-II e da variedade BR451 o solo do telado foi previamente preparado e corrigido. Foram semeadas 20 sementes por semana durante 10 semanas de cada genótipo. Quando na época reprodutiva as plantas foram autopolinizadas. Para obtenção do híbrido Hi-II a linhagem mãe A188 foi polinizada com pólen da linhagem pai B73. Foi possível a obtenção de sementes das linhagens A188 e B73, bem como do híbrido Hi-II e variedade BR451, aproximadamente 1kg de cada (Figura 1D).

(3) As plantas foram cultivadas no telado em solo preparado e corrigido e em estufa climatizada (Figuras 1B, 1C) em vasos contendo substrato e vermiculita. Foram semeadas no telado 20 sementes R1 do híbrido Hi-II por semana durante 15 semanas e na estufa 10 sementes por semana deste híbrido. As plantas quando estavam no estágio reprodutivo foi realizada a polinização (Figura 1C). Após 10 dias da polinização foi iniciada a verificação do tamanho do embrião e quando no estágio ideal (1,5 a 2 mm) a espiga foi coletada e levada ao laboratório para transformação, seguido do descarte da planta. Foram produzidos 15000 embriões imaturos visando a utilização nos experimentos para a introdução do gene jaburetox e realizados nove experimentos que estão na fase de seleção de calos transformados. Para os experimentos que visam melhoria do protocolo de transformação foram produzidos 5000 embriões imaturos para quatro experimentos que se encontram na fase de seleção de calos transformados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Foram produzidas plantas saudáveis, cujas sementes com poder germinativo significativo, obtendo embriões de alta qualidade que se mostraram muito efetivos na transformação genética em laboratório. Também foi produzido um número significativo de sementes, podendo estas serem selecionadas e garantidas para continuidade da pesquisa.

REFERÊNCIAS:

- FRAME, B. R.; MCMURRAY, J. M.; FONGER, T. M.; MAIN, M. L.; TAYLOR, K.W. TORNEY, F. J.; PAZ, M. M.; WANG, K. Improved Agrobacterium-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. *Plant Cell Reports, Genetic Transformation e Hybridization*, Ames, v..25, p.1024-1034, 2007.
- ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. Agrobacterium mediated transformation of maize. *Nature Protocols*, [S.l.], v.2, n.7. p. 1614-1621, 2007.

ANEXOS:

III SEMANA DO CONHECIMENTO

Tabela 1 - Número de eventos e plantas de milho transgênico portadoras do gene *Jaburetox* que determina a resistência a insetos. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2016

Evento	Número de plantas regeneradas e identificação	Identificação do Evento	Número de espigas (Nº sementes)	Identificação espiga autofecundada ou cruzada (Proporção)
1	1 (Planta 4)	R1C1-15/01/15	0 (0)	-
2	2 (Plantas 7 e 8)	R23C1-19/01/15	3 (114)	7 (2 esp) - auto (3:1) 8 - cruzada (1:1)
3	1 (Planta 10)	R3C2-02/02/15	2 (9)	2 esp - cruzada (1:1)
4	9 (Plantas 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20)	R21C1-30/01/15	3 (20)	13 - cruzada (1:1) 12- cruzada (1:1) 20 - cruzada (1:1)
5	3 (Plantas 21, 22 e 130)	R22C4-19/01/15	2 (18)	22 (2 esp)-cruzada(1:1)
6	11 (Plantas 24, 25, 26, 27, 47, 48, 49, 50, 92, 93 e 95)	R22C2-19/01/15	1 (17)	25- cruzada (1:1)
7	2 (Plantas 28 e 29)	R23C2-19/01/15	3 (93)	28(2 esp)-cruzada (1:1) 29 - cruzada (1:1)
8	1 (Planta 30)	R15C3-19/01/15	1 (97)	Cruzada (1:1)
9	1 (Planta 31)	R1C4-19/01/15	0 (0)	Auto (3:1)
10	3 (Plantas 32, 33 e 77)	R2C1-30/01/15	1 (9)	32 - auto (3:1)
11	3 (Plantas 35, 36 e 53)	R7C2-02/02/15	1 (39)	35 - cruzada (1:1)
12	1 (Planta 39)	R7C3-19/01/15	0 (0)	-
13	2 (Plantas 40 e 41)	R12C3-19/01/15	1 (19)	40 - cruzada (1:1)
14	1 (Planta 52)	R13C3-19/01/15	1 (26)	1 cruzada (1:1)
15	1 (Planta 75)	R7C3-02/02/15	1 (62)	Cruzada (1:1)
16	3 (Planta 85, 87 e 88)	R6C1-19/01/15	2 (60)	88 - cruzada (1:1) 85 - cruzada (1:1) Auto - (3:1)
17	1 (Planta 102)	R13C1-19/01/15	1 (26)	-
18	1 (Planta 106)	R4C6-27/02/15	0 (0)	-
19	1 (Planta 107)	R13C5-19/01/15	0 (0)	-
20	2 (Plantas 115 e 123)	R4C3-27/02/15	1 (30)	115 - cruzada (1:1)
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)	5 - auto (3:1) 19 - cruzada (1:1)

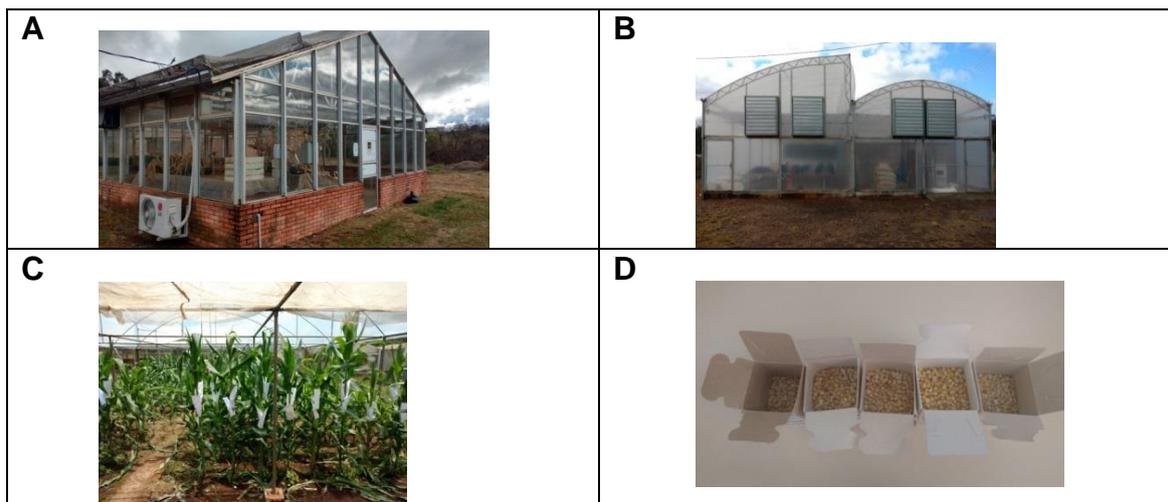


Figura 1 - Multiplicação dos genótipos de milho na Universidade de Passo Fundo. A) Casa de Vegetação do Laboratório de Biotecnologia Vegetal; B) Estrutura da estufa do Laboratório de Biotecnologia Vegetal; C) Plantas de milho em telado com a inflorescência feminina coberta com sacos de papel para polinização controlada; D) Caixas contendo sementes coletadas em telado, ficam estocadas no Laboratório de Sementes da UPF.