



RESUMO

Regeneração de plantas transgênicas do híbrido Hi-II de milho portadoras do gene bar em meio contendo o herbicida glufosinato de amônio

AUTOR PRINCIPAL:

Bernardo Torres

E-MAIL:

ber_torres92@hotmail.com

TRABALHO VINCULADO À BOLSA DE IC::

Pibic UPF ou outras IES

CO-AUTORES:

Dielli Aparecida Didoné, Marília Rodrigues de Silva, Cássia Ceccon, Magali Ferrari Grando.

ORIENTADOR:

Ph.D. Magali Ferrari Grando

ÁREA:

Ciências Agrárias

ÁREA DO CONHECIMENTO DO CNPQ:

5.01.03.00-8- Fitotecnia

UNIVERSIDADE:

Universidade de Passo Fundo - UPF

INTRODUÇÃO:

A regeneração in vitro é um pré-requisito para a produção de plantas geneticamente modificadas. A capacidade de responder in vitro tem sido limitada a poucos genótipos de milho. O híbrido de milho americano Hi-II apresenta alta capacidade embriogênica e de regeneração in vitro e por esse motivo tem sido empregado mundialmente na engenharia genética. O estabelecimento do processo de regeneração de milho pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal/UPF é um passo importante para a geração de plantas transgênicas com novos genes de importância agronômica. A regeneração de plantas in vitro ocorre a partir da embriogênese somática indireta, ou seja, pela indução de calos embriogênicos (FRAME et al 2002). Este trabalho objetivou avaliar a regeneração de calos embriogênicos do híbrido Hi-II já transformados e não transformados via *Agrobacterium tumefaciens* EHA101:pTF102 empregando a metodologia de Frame et al. (2011), na presença de agente seletivo glufosinato de amônio.

METODOLOGIA:

Calos embriogênicos do híbrido Hi-II transformados com *A. tumefaciens* EHA 101:pTF102 e não transformados (Embrapa Milho e Sorgo) foram avaliados pelo sistema de regeneração Frame et al. (2011) (Tabela 1) na presença de glufosinato de amônio. Os calos foram transferidos para meio de Pre-reg e posteriormente para RI, permanecendo 14 dias no escuro, em ambas as etapas. Após foram transferidos para o meio RII, permanecendo na luz com fotoperíodo de 16h:8h por 21 dias, sendo transferidos para meio de mesma composição até a formação de brotos. Brotos com 1,5 a 3cm foram repassados para recipientes maiores. Foram utilizadas 5 repetições, cada repetição foi constituída por uma placa de petri com 15 calos embriogênicos de 1cm de diâmetro. As variáveis analisadas foram: sobrevivência dos calos, percentagem dos calos contendo embriões somáticos alongados, número de embriões maduros, frequência de germinação, número de plântulas obtidas a partir de calos transformados e não transformados.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Os calos embriogênicos cultivados em meio Pré-reg de ambos os tratamentos não apresentaram embriões somáticos alongados como previsto por Frame et al. (2011). Isso pode ser devido a perda da embriogenicidade dos calos pela manutenção prolongada das culturas embriogênicas (Torres et al, 1999). Quando transferidos para meio RI, os calos transformados apresentaram crescimento médio de 2cm, o mesmo não ocorreu com os calos não transformados onde não apresentaram crescimento e se mostraram amarelados além de perderam a embriogenicidade (Figura 1), demonstrando assim a eficiência do herbicida glufosinato de amônio no processo de seleção na regeneração de tecidos previamente transformados com o gene bar que determina resistência a este herbicida. O meio RI apresenta alta concentração de sacarose que promove a maturação de embriões somáticos em milho. Os embriões somáticos dos calos transformados foram maturados neste meio conforme o esperado devido ao estresse osmótico causado pela alta concentração de açúcar. Nesta etapa, os calos transformados aumentaram a frequência de embriogenicidade e apresentaram embriões somáticos maduros com estruturas bipolares e esbranquiçadas, as quais apresentam eixo embrionário e radicular capaz de formar uma planta completa (Figura 2d). As diferentes etapas do processo de regeneração de plantas de milho in vitro são demonstradas na figura 2. Em média foram obtidas uma frequência de 149,3% embrião maduros, 153,6% pontos verdes, 121,1% raiz, 36,9 % brotos e 44,2% plântulas enraizadas, a partir de 75 calos no total do experimento (Figura 3). Alguns embriões somáticos não regeneraram plântulas e alguns calos embriogênicos produziram mais de uma planta. Este estudo teve sucesso na adaptação do sistema de regeneração do híbrido Hi-II a partir de calos embriogênicos geneticamente transformados. O domínio desta tecnologia permitirá que a engenharia genética seja empregada no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF.

CONCLUSÃO:

Foi possível regenerar plantas do híbrido Hi-II de milho pelo método de regeneração de plantas de Frame et al. (2011) O herbicida glufosinato de amônio é eficiente no processo de seleção durante a regeneração de plantas transformadas com o gene marcador bar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- FRAME, B. R et al 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. et al. Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos. Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, v. 710, p. 327-341, 2011.
- TORRES, A.C et al. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPQ, 1999.

Tabela 1. Meios utilizados para regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos de milho (FRAME et al, 2011)

Preparação dos meios de cultura para regeneração	
Pre-Reg ¹	En: MS acrescida dos vitaminas MS (0,5 mg.L ⁻¹ de tiamina HCl, 7 mg.L ⁻¹ de glicina, 0,5 mg.L ⁻¹ de piridoxina HCl, 0,5 mg.L ⁻¹ de ácido nicotínico), 100 mg.L ⁻¹ de ácido ascórbico, 0,25 mL.L ⁻¹ 2,4-D, 30 g.L ⁻¹ sacarose, 5 g.L ⁻¹ Phytogel, pH 5,8. Sem adição de 100 mg.L ⁻¹ cafeína e 6 mg.L ⁻¹ de Glufosinato.
Manutenção dos meios de cultura	
RP ²	En: MS, acrescida de vitaminas MS, 100 mg.L ⁻¹ de ácido ascórbico, 60 g.L ⁻¹ sacarose, 5 g.L ⁻¹ Phytogel, pH 5,8. Sem adição de 100 mg.L ⁻¹ cafeína e 6 mg.L ⁻¹ de Glufosinato.
Germinação dos meios de cultura	
RP ³	Méio Reg. I com conteúdo concentração de sacarose 30 g.L ⁻¹ ; pH 5,8.
Pre-Reg ²	Méio de pré-regeneração.
RP ¹	Méio de Regeneração I.
RP ²	Méio de Regeneração II.

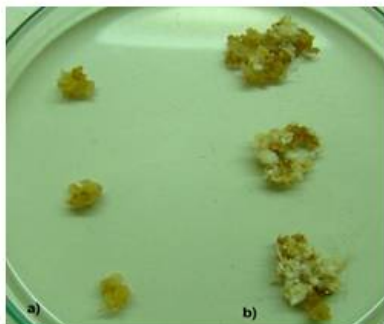


Figura 1: Eficiência do herbicida glufosinato de amônio na seleção da regeneração: a) Calos não transformados amarelados; b) Calos embriogênicos transformados com o gene bar que determina a resistência ao herbicida.

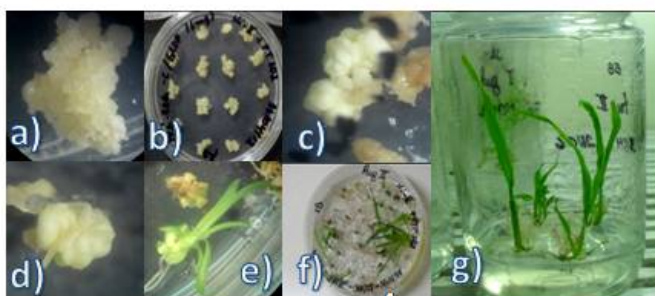


Figura 2. Plantas regeneradas de milho em diferentes estágios de desenvolvimento: a) Calo embriogênico; b) placa de petri com meio de regeneração contendo calos embriogênicos; c) embrião maduro em meio de regeneração I (RP1); d) Embrião maduro isolado apresentando estrutura bipolar em meio regeneração II (RP2); e) Desenvolvimento de brotação e raízes em embrião maduro germinado; f) placas contendo plântulas; g) plântula de milho transferida para vidros. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2012.

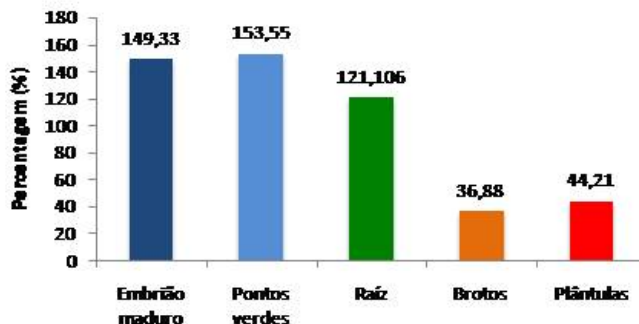


Figura 3: Percentagem de embriões maduros, pontos verdes, raiz, brotos, plântulas transgênicas enraizadas, provenientes de calos embriogênicos do híbrido H-III de milho transformados via *Agrobacterium tumefaciens* cultivados no sistema de regeneração desenvolvido por Frame et al., (2011) na presença do herbicida glufosinato de amônio como agente seletivo. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2012.

Assinatura do aluno

Assinatura do orientador