



RESUMO

Efeito de estresse tecidual por temperatura na transferência de genes em tecidos de milho (*Zea mays*) via *Agrobacterium tumefaciens*.

AUTOR PRINCIPAL:

Vinícius de Oliveira Almeida

E-MAIL:

vinicius.almeida.bio@gmail.com

TRABALHO VINCULADO À BOLSA DE IC::

Probic Fapergs

CO-AUTORES:

Marília Rodrigues Silva, Bernardo Torres, Dielli Aparecida Didone, Cássia Canzi Ceccon, Magali Ferrari Grandó

ORIENTADOR:

Magali Ferrari Grandó

ÁREA:

Ciências Agrárias

ÁREA DO CONHECIMENTO DO CNPQ:

5.01.03.00-8

UNIVERSIDADE:

Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO:

A demanda crescente por alimentos devido ao aumento da população mundial força a expansão do setor agrícola. O uso de plantas transgênicas é uma notória ferramenta empregada no melhoramento de plantas e no desenvolvimento de uma agricultura sustentável, proporcionando um aumento na produtividade e redução no uso de defensivos agrícolas. *Agrobacterium tumefaciens*, bactéria que em condições naturais, infecta magnoliopsidas, introduzindo parte do seu DNA no genoma vegetal. tem sido utilizada como vetor natural na transferência de genes em plantas. Busca-se adaptar a infecção de *A. tumefaciens* a outras espécies, que não correspondem ao hospedeiro natural da *A. tumefaciens*, como é o caso do milho. O presente trabalho objetiva adaptar o protocolo de transferência de genes em milho e testar o efeito do tratamento de alta temperatura antes e durante o processo de infecção de embriões imaturos pela *A. tumefaciens*, mediante expressão do gene repórter *gus* que produz a coloração azul.

METODOLOGIA:

Embriões imaturos (1,2 a 2.0 mm) do genótipo modelo de milho Hi-II foram colocados em contato com o meio de infecção contendo *A. tumefaciens* cepa EHA101 carregando o plasmídeo pTF102 (genes *gus* e *bar*). Nessa etapa os embriões passaram por três tratamentos: (a) infecção sem choque térmico por 5 min, (b) infecção com *A. tumefaciens* a 40°C por 5 min, e (c) embriões imaturos submetidos a um estresse tecidual prévio a etapa de infecção utilizando uma temperatura de 40°C por 3 minutos, seguidos de 5 min de infecção em temperatura ambiente. Os embriões infectados foram transferidos para o meio de co-cultivo, permanecendo no mesmo por três dias no escuro a 20°C. Para transformação, empregou-se protocolo desenvolvido por Frame¹. Para avaliação da transferência gênica foi utilizado o ensaio histoquímico de GUS². Para análise dos dados, calculou-se o número de embriões com pontos azuis (NECP) e o número de pontos azuis por embrião (NPPE) resultantes do ensaio histoquímico três dias após infecção.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

No presente trabalho a frequência de embriões que apresentaram pontos azuis variou entre 22 e 50% entre os tratamentos (tabela 1). O tratamento de temperatura durante o processo de infecção, resultou na maior frequência de embriões expressando o gene repórter *gus*. Já a temperatura aplicada antes da etapa de infecção não favoreceu a transformação genética, resultando na menor frequência de embriões com pontos azuis.

A temperatura durante a infecção, além de produzir maior frequência de explantes transformados, também favoreceu a transferência de genes em mais sítios no embrião, visto resultou num maior numero de pontos azuis (em média 15,2 pontos) por embrião (tabela 1). A figura 1 mostra aspectos de embriões imaturos do genótipo Hi-II submetidos a diferentes tratamentos de temperatura expressando o gene *gus* inserido no genoma do milho. Na natureza, plantas liliopsidas não são infectadas por *A. tumefaciens*, acredita-se que moléculas sinalizadoras específicas, encontradas em magnoliopsidas, indutoras da região vir de *A. tumefaciens*, não são ativas em liliopsidas. A instabilidade nas membranas plasmáticas causada pelo choque térmico pode facilitar a infecção por *A. tumefaciens*. A adição de choque térmico durante os cinco minutos da infecção pode ser uma alternativa para aumentar a eficiência da transformação via *A. tumefaciens* em milho. Ishida et al., 2007³, teve sucesso no emprego de calor durante a infecção de embriões imaturos de milho por este método. O aumento da eficiência de transferência de genes via *A. tumefaciens* proporciona maior possibilidade de obtenção de plantas transgênicas regeneradas, o que permitirá a introdução de genes de resistência a doenças, estresses ambientais e expressão de proteínas farmacêuticas nessa espécie.

CONCLUSÃO:

Processos de estresse tecidual são efetivos na transferência de genes de *A. tumefaciens* para embriões imaturos de milho. O tratamento com alta temperatura durante a etapa de infecção mostrou-se mais eficiente na transferência de genes tendo como base a expressão do gene repórter *gus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

¹ 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. 2002.

² JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. *GUS* fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in high plants. *EMBO Journal*, v. 6. 1987.

³ ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. *Nature protocols*, vol. 2. 2007.

INSIRA ARQUIVO.IMAGEM - SE HOVER:

Tratamentos	% embriões com pontos azuis	Número de pontos azuis por embriões
Sem Temperatura	30,9	6,8
Temperatura durante infecção	50	15,2
Temperatura antes da infecção	22	5,4
Média	29,19	7,54
Desvio Padrão	29,26	9,20

Tabela 1. Efeito dos tratamentos de temperatura aplicado antes e durante a infecção de embriões imaturos do híbrido de milho Hi-II com a *Agrobacterium tumefaciens* linhagem EHA 101: PTF102, portadora do gene repórter *gus* que determina a coloração azul. Laboratório de Biotecnologia Vegetal/FAMV/UPF, 2012

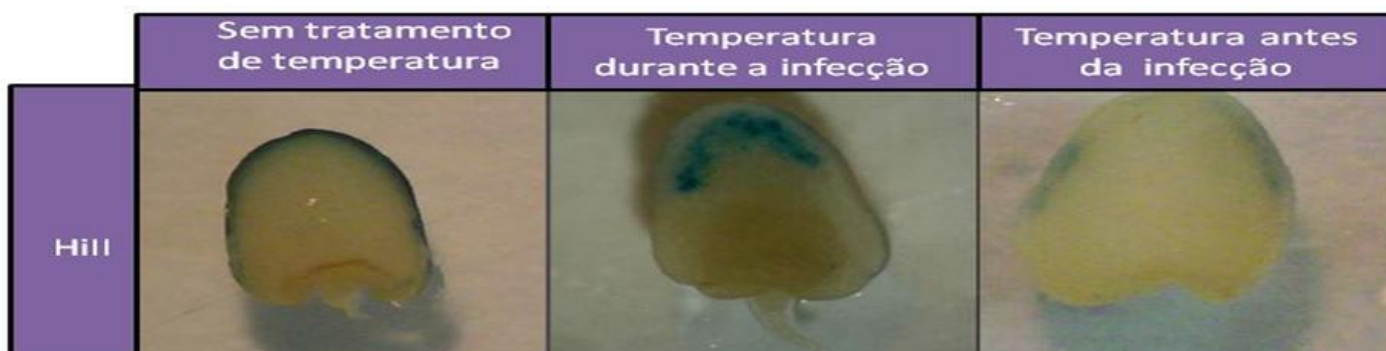


Figure 1. Ensaio histoquímico para GUS para detecção da expressão do gene *gus* após três dias da infecção de embriões imaturos do genótipo Hi-II via *Agrobacterium tumefaciens* EHA101/pTF102 submetidos a diferentes tratamentos de temperatura

Assinatura do aluno

Assinatura do orientador