

Genética e Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento Genético Vegetal: relatório de pós-doutorado



ISSN 1517-5111
ISSN online 2176-5081
Março, 2012

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 309

Genética e Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento Genético Vegetal: relatório de pós-doutorado

Fábio Gelape Faleiro

Embrapa Cerrados
Planaltina, DF
2012

Exemplar desta publicação pode ser baixado gratuitamente no link:
http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/versaomodelo/html/2012/doc/doc_309.shtml

Embrapa Cerrados
BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza
Caixa Postal 08223
CEP 73310-970 Planaltina, DF
Fone: (61) 3388-9898
Fax: (61) 3388-9879
<http://www.cpac.embrapa.br>
sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade
Presidente: *Claudio Takao Karia*
Secretária-Executiva: *Marina de Fátima Vilela*
Secretária: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Jussara Flores de Oliveira Arbués*
Equipe de revisão: *Francisca Elijani do Nascimento*
Jussara Flores de Oliveira Arbués
Normalização bibliográfica: *Shirley da Luz Soares*
Editoração eletrônica: *Renato Berlim*
Capa: *Renato Berlim*
Fotos: *Fábio Gelape Faleiro*

1ª edição
1ª impressão (2012): tiragem 100 exemplares
Edição online (2012)

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Cerrados

F187g Faleiro, Fábio Gelape.

Genética e biotecnologia aplicada ao melhoramento genético
vegetal : relatório de pós-doutorado / Fábio Gelape Faleiro.—
Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2012.

74 p. – (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111,
ISSN online 2176-5081; 309).

1. Genética. 2. Biotecnologia. 3. Melhoramento vegetal.
I. Título. II. Série.

631.5233 – CDD 21

Autor

Fábio Gelape Faleiro

Engenheiro-agrônomo, pós-doutor em Genética e
Biotecnologia

Pesquisador da Embrapa Cerrados

fabio.faleiro@embrapa.br

Prefácio

Dr. Fábio Gelape Faleiro, Researcher and Professor at Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brazil was a visiting scientist in my grass biotechnology and breeding program at the Agronomy Department of the University of Florida from October 6th 2010 to October 3rd 2011. My research program is supported by the US Department of Agriculture, US Department of Energy and industry including Syngenta Biotechnology Incorporation and focuses on the genetic improvement of perennial grasses including elephant grass and sugarcane as feedstocks for biofuel production. Dr. Faleiro impressed me with his ambition to get involved in a number of research projects related to elephant grass improvement and to my surprise all of them were very successful.

Dr. Faleiro is one of the most talented young researchers I had the pleasure of working with. He quickly mastered an enormous number of techniques that were new to him. He not only produced reproducible data but also optimized a protocol for tissue culture of elephant grass which led to the world's first genetically engineered elephant grass plants, produced by him. This is an exceptional accomplishment considering the short period of time that Dr. Faleiro spend in my research program. But he continued to impress us by developing a protocol for in vitro chromosome doubling of triploid elephant grass and generating more than 70 independent hexaploid interspecific

hybrids. He also contributed to our breeding program by molecular characterization of genetic diversity in elephant grass accessions and confirming their crosses.

These special accomplishments were presented in form of six posters at 2011 Society for In Vitro Biology Conference and the 2011 Florida Energy System Consortium Summit. In this document, scientific data obtained by Dr. Faleiro are presented. Other post doc and sabbatical activities developed by Dr. Faleiro at University of Florida are also related.

Dr. Fredy Altpeter
Associate Professor
Agronomy Department
Plant Molecular and Cellular Biology Program
Institute of Food and Agricultural Sciences
University of Florida

Apresentação

As várias técnicas relacionadas à genética e biotecnologia têm trazido, via de regra, benefícios para a sociedade. Podemos citar como exemplos, as fermentações industriais na produção de vinhos, cervejas, pães, queijos e vinagres; a produção de fármacos, vacinas, antibióticos e vitaminas; a utilização de biofungicidas no controle biológico de pragas e doenças; o uso de microrganismos visando a biodegradação de lixo e esgoto; o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos para a melhoria de produtividade das plantas; o desenvolvimento de plantas e animais melhorados utilizando técnicas convencionais de melhoramento genético e também a transformação genética.

A partir da descoberta do DNA e do código genético, houve uma revolução incrível na área da genética e biologia molecular, surgindo a manipulação controlada e intencional do DNA por meio das técnicas de engenharia genética. As técnicas e produtos biotecnológicos possuem aplicações em diferentes áreas, sendo as principais aquelas ligadas à indústria, ambiente, saúde, agropecuária, além da área científica.

Neste documento, são relatadas as atividades desenvolvidas pelo pesquisador Fábio Gelape Faleiro no programa de pós-doutorado da Universidade da Flórida na área de Genética e Biotecnologia Aplicada ao

melhoramento vegetal. O conhecimento, treinamento e aplicação dessas novas técnicas vão permitir a melhoria da qualidade e competitividade dos atuais projetos executados na Embrapa Cerrados que utilizam ferramentas da biotecnologia moderna e abrir novas possibilidades e perspectivas de projetos científicos e tecnológicos que utilizam as ferramentas da biotecnologia e genética molecular na Embrapa Cerrados e instituições parceiras.

José Roberto Rodrigues Peres
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Agradecimentos

À Embrapa Cerrados pela oportunidade de realização do pós-doutorado no exterior e, principalmente, pela possibilidade de utilizar os conhecimentos adquiridos em pesquisa aplicada e tecnológica para a melhoria da eficiência e sustentabilidade da agricultura brasileira.

Ao Setor de Gestão de Pessoas, Área de Comunicação e Negócios e Setor de Informação pelo suporte às minhas atividades no exterior.

Aos colegas de Pesquisa & Desenvolvimento por assumirem minhas atividades de pesquisa durante o período que estive fora da Embrapa Cerrados.

À Coordenadoria de Apoio ao Desenvolvimento e à Educação da Embrapa pelo apoio nas documentações e trâmites legais para o desenvolvimento do curso no exterior.

Ao Departamento de Agronomia da Universidade da Flórida pela receptividade e pela oportunidade de desenvolvimento do curso, utilizando toda infraestrutura necessária.

Aos grandes amigos que fiz nos Estados Unidos, Abrahao & família, Eduardo & família, Paulinho & família, Luciano & Lina, Leandro & Rachel, aos professores e colegas do International Friendship, aos

professores e colegas do International Learning Center, às professoras Varner e Turner e aos funcionários e vizinhos do Asbury Park Apartments.

Aos colegas de pesquisa Baskaran Kannan, Jae Yoon Kim, Sobanski Manfredo, Elizabeth B. Mayers, Tenisha Phipps, Je Jeyong Jung, Yuan Xiong, Hao Wu, Yogesh Taparia, Yang Zhao, Faisal Awan, Marco Vinicio, Qianchun Zeng e Angelika Altpeter pelo grande apoio nas atividades científicas e ensinamentos.

Ao Dr. Fredy Altpeter pela competente orientação, pela valiosa oportunidade de realização do pós-doutorado em seu grupo de pesquisa e pela disponibilidade de toda infraestrutura e material de custeio para realização de todas as etapas dos trabalhos de pesquisa no laboratório, casa de vegetação e campo.

Dedico este trabalho a toda minha família,
à minha amada esposa Alessandra,
à minha querida filha Giovana,
grandes bênçãos de Deus na minha vida.

Sumário

| | |
|--|----|
| Escolha do Local | 15 |
| Check in na Universidade | 18 |
| Conhecimento do Grupo de Pesquisa e da Infraestrutura Disponível para o Treinamento | 20 |
| Visão Geral dos Itens de Segurança do Laboratório..... | 21 |
| Visão Geral da Rotina Envolvendo a Cultura de Tecidos e Obtenção de Plantas Transgênicas de Cana-de-Açúcar e Outras Gramíneas | 21 |
| Visão Geral da Rotina Envolvendo a Caracterização de Plantas Transgênicas | 22 |
| Preparo de meios de Cultura | 24 |
| A Biotecnologia Aplicada à Cana-de-açúcar..... | 24 |
| A Cultura de Tecidos de Capim-elefante..... | 26 |
| A Engenharia Genética para Duplicação do Número de Cromossomos..... | 26 |
| Extração de DNA em Alta Escala..... | 27 |
| PCR, Eletroforese e Fotodocumentação | 28 |

| | |
|--|----|
| Preparo de Material do Campo para Indução de Calos | 28 |
| Obtenção de Plantas Transgênicas por Biobalística | 29 |
| Realização de Análises de Qualidade e Quantidade de DNA Utilizando Espectrofotômetro NanoDrop | 33 |
| Análise da Ploidia em Híbridos Interespecíficos de Capim Elefante e Milheto | 34 |
| Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) | 37 |
| Realização do Teste de Elisa para Confirmação de Expressão em Plantas Transgênicas | 38 |
| Montagem de Experimentos de Campo | 39 |
| Participação em Eventos Técnicos e Treinamentos | 41 |
| Desenvolvimento de Trabalhos Científicos | 53 |
| Articulação de Novas Parcerias | 69 |
| Importância dos Resultados Obtidos no Pós-Doutorado para a Embrapa | 69 |
| Considerações Finais | 72 |
| Referências | 73 |
| Abstract..... | 74 |

Genética e Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento Genético Vegetal: relatório de pós-doutorado

Fábio Gelape Faleiro

Escolha do Local

Para atingir os objetivos do pós-doutorado, a escolha do local para realização do treinamento foi baseada na excelência científica na área de biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas, mais especificamente, nas áreas de genômica, bioinformática, engenharia e transformação genética. A capacidade do local e da equipe científica de explorar a natureza multidisciplinar e aplicada da biotecnologia também foi levada em consideração. Outro critério foi relacionado à capacidade de realização de diferentes análises genéticas e aplicações baseadas em marcadores moleculares e sequências de DNA, mais especificamente, em técnicas de alto desempenho na geração de dados genômicos em alta escala. A possibilidade de articular e consolidar uma rede de pesquisa internacional voltada para o uso multidisciplinar e aplicado da biotecnologia moderna com vistas ao treinamento técnico, parcerias científicas e intercâmbio de conhecimentos e informações foi outro ponto chave para a escolha do Programa de Pós-Graduação Interdepartamental de Biologia Celular e Molecular de Plantas (<http://pmcb.ifas.ufl.edu/>) da Universidade da Flórida (Figura 1). Este programa de pós-graduação conta com a participação de professores do Departamento de Agronomia (<http://agronomy.ifas.ufl.edu/>) e possui uma interface com o Centro Interdisciplinar para Pesquisas em Biotecnologia (<http://www.biotech.ufl.edu/>) e com o Instituto de Ciências da Alimentação e da Agricultura (<http://www.ifas.ufl.edu/>) (Figura 2).


Plant Molecular & Cellular Biology Graduate Program

Prospective Students Faculty Contact Us Search GO

- PMCB Program**
Overview | Faculty | Students | Summer Internships | Contact Us
- Academics**
Degree Programs | Curriculum | PMCB Courses | Journal Colloquium |
- Admissions**
Requirements | How to Apply | Funding | For Int'l Students
- News and Events**
Seminar Series | Workshop | Announcements | Awards
- For PMCB Students**
Student & Faculty Handbook | PMCB Deadlines | Student Resources
- UF Links**
UF | My UF | ISIS | ICBR | CALS | FAES | Webmail | Campus Map


PMCB Program

The Plant Molecular and Cellular Biology Program is an intercollegiate and interdepartmental graduate program with emphasis on understanding the molecular and cellular mechanisms that control plant development, adaptation and evolution.




Prospective Students & Program Admissions

The deadline for admission to the PMCB Program for Fall is January 15, 2010. [More...](#)



New! PMBI Scholarships

PMCB is partnering with IFAS breeding faculty to fund students interested in integrating molecular genetics, genomics and breeding. [More...](#)



Summer Internships

PMCB has a Research Internship Program for those with a strong interest in pursuing a PhD or MS in the plant molecular sciences. [More...](#)

What's Going On Now!

Admission deadline for Fall is **January 15, 2010** [more...](#)

Congratulations to Derek and Thomas! who will be receiving their Ph.D. degrees Fall 2009 [more...](#)


Awards and New Pubs

PMCB student receives the prestigious **Natl Science ASPB Pioneer award!** [more...](#)

Dr. Sixue Chen receives the prestigious **Natl Science Found. CAREER Award!** [more...](#)


Rotation project blossoms into journal article. [more...](#)

Copyright 2008 | Site Feedback | Last Modified: July, 2009
Plant Molecular and Cellular Biology, P.O. Box 110990
Gainesville, FL 32611-0180 | Phone: (352) 392-8285




Agronomy Department Solutions for Your Life

Home About Map & Directions Links Search GO


- Personnel**
Faculty
Staff
Graduate Assistants
Post Doctoral Associates
- Student Information**
Graduate
Undergraduate
2010 Spring Courses
2010 Spring Courses
Course Web Sites
- Research**
Genetics
Management & Nutrition
Physiology & Ecology
Weed Science
- Extension**
Pesticide Information Office
Forages of Florida
Weed Control
Agronomy Notes 

Dr. Quesenberry Selected as UK Outstanding Alumni for 2010




[More...](#)

Dr. Newman Receives 2010 Early Career Award in Research




Dr. Yoana Newman received the 2010 Early Career Award in Research from the Southern Branch of the American Society of Agronomy. [More...](#)

Dr. Altpeter Elected Chair of Plant Biotechnology Section




Dr. Fredy Altpeter was elected Chair Plant Biotechnology Section of the Society for In Vitro Biology from 2010 - 2012. [More...](#)

Calendar

Find important dates and upcoming events. [More...](#) 

Support

Support the Agronomy Department. 

Announcements

- Students Win Awards & Scholarships
- April 2010 Agronomy Notes
- Altpeter Wins Outstanding Junior Faculty Award
- Available Positions
- Online Pesticide CEUs and Training for IFAS Employees
- Tri-Societies Annual Meeting

Figura 1. Programa de Pós-Graduação Interdepartamental de Biologia Celular e Molecular de Plantas e Departamento de Agronomia.

Fontes: <http://pmcb.ifas.ufl.edu> e <http://agronomy.ifas.ufl.edu>



Figura 2. Centro Interdisciplinar para Pesquisas em Biotecnologia e Instituto de Ciências da Alimentação e da Agricultura.

Fontes: <http://www.biotech.ufl.edu> e <http://www.ifas.ufl.edu>

Com base na infraestrutura disponível, foi possível o treinamento e a utilização de diferentes e modernas ferramentas e instrumentos metodológicos relacionados à biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas, genética molecular, bioinformática, fisiologia vegetal e engenharia genética. Tais tecnologias estão em constantes aperfeiçoamentos e mudanças, os quais representam aumento de eficiência relacionada à obtenção de grande número de informações em menor tempo e com menor custo. O envolvimento de grupos de pesquisas internacionais e estudantes de pós-graduação permitiu durante o treinamento, o estabelecimento de novas redes de parceria técnico-científica. Esse contato direto com a academia propiciou treinamentos em princípios e técnicas da biotecnologia moderna e em pesquisa básica, conceitual e metodológica.

Check in na Universidade

A primeira providência foi conhecer o campus da universidade (Figura 3). A área de 2 mil hectares e 900 edifícios é de impressionar. Mais impressionantes são os 50 mil estudantes, sendo, aproximadamente, 5 mil estudantes internacionais de 134 diferentes países. O número de cursos oferecidos são aproximadamente 100 de graduação e 200 de pós-graduação, o que faz da Universidade da Flórida uma das maiores dos Estados Unidos.

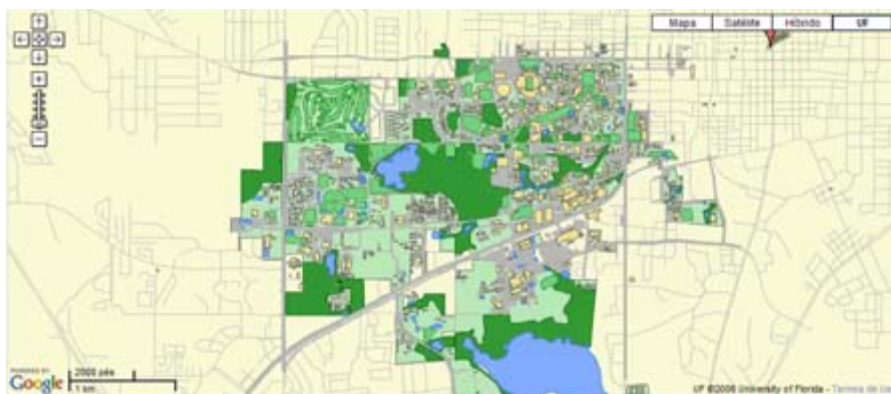


Figura 3. Mapa da Universidade da Flórida.

Fonte: <http://campusmap.ufl.edu>

O campus da UF é muito bonito, considerando a arquitetura histórica e moderna dos prédios e, principalmente, a junção dos prédios com imensa área verde contendo áreas de preservação e áreas com planejada arborização e paisagismo (Figura 4).

No processo de check in é preenchido um formulário, junto com o qual são apresentados o visto J-1, o passaporte do estudante e seus dependentes, o cartão I-94 – obtido no processo de imigração –, os formulários DS 2019 do estudante e de seus dependentes, a comprovação do seguro de saúde do estudante e seus dependentes. Com essa documentação, o estudante recebe um número de registro na universidade. Com esse número, o Departamento de Agronomia emite uma autorização para o estudante fazer sua carteira, que dá direito à utilização do sistema de transporte e infraestrutura da universidade, como acesso à internet, bibliotecas, entre outros espaços.



Figura 4. Imagens do campus da Universidade da Flórida.

Conhecimento do Grupo de Pesquisa e da Infraestrutura Disponível para o Treinamento

Conheci meus colegas de trabalho, finalizei meu check in e meu orientador me mostrou a infraestrutura do laboratório, de casas de vegetação e experimentos de campo do seu grupo de pesquisa. Fiquei impressionado com a infraestrutura disponível (Figura 5). Outro fato que chamou a atenção foi o uso de várias técnicas de genética molecular e biotecnologia na rotina do laboratório e sua associação direta com o programa de melhoramento.



Figura 5. Infraestrutura do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, Centro Interdisciplinar para Pesquisas em Biotecnologia e Casas de vegetação do Instituto de Ciências da Alimentação e da Agricultura.

Visão Geral dos Itens de Segurança do Laboratório

Antes de iniciar as atividades, fui informado sobre alguns locais do laboratório onde a questão de segurança é importante, como a sala onde é utilizada a radioatividade e o setor de utilização da autoclave (Figura 6). Assisti também a um vídeo sobre a exposição de trabalhadores rurais a pesticidas.



Figura 6. Locais e itens de segurança do laboratório.

Visão Geral da Rotina Envolvendo a Cultura de Tecidos e Obtenção de Plantas Transgênicas de Cana-de-Açúcar e Outras Gramíneas

A cultura de tecidos possui uma importância crucial na conservação, criação e utilização da variabilidade genética de cana-de-açúcar, incluindo criopreservação, seleção *in vitro*, instrumento para a engenharia genética, melhoramento genético clássico e também para a produção de biomassa comercial com a produção de mudas e matrizes livres de doenças.

A rotina da técnica de cultura de tecidos no laboratório envolve a preparação de meios e indução de calos; manutenção dos calos em incubadoras; manipulação dos calos em câmaras de fluxo laminar para evitar contaminações; transformação genética utilizando biobalística; bioensaios para verificar a expressão gênica e para seleção de células transgênicas; e regeneração de plantas transgênicas (Figura 7).



Figura 7. Visão geral da rotina das técnicas de cultura de tecidos e transformação genética de plantas.

Fonte: Fredy Altpeter.

Visão Geral da Rotina Envolvendo a Caracterização de Plantas Transgênicas

A caracterização das plantas transgênicas envolve análises moleculares, bioensaios no laboratório e em condições hidropônicas, além dos estudos em casas de vegetação e em condições de campo. Os estudos sobre biossegurança também assumem grande importância nesse processo de caracterização (Figura 8).



Figura 8. Visão geral do processo de caracterização de plantas transgênicas.

Fonte: Fredy Altpeter.

As análises moleculares envolvem análises de *Southern blot* para estudos da integração do transgene, imunocromatografia para estudos de expressão do transgene e marcadores moleculares para seleção assistida. Os bioensaios são utilizados para seleção in vitro de plantas para maior tolerância ao frio, tolerância à seca e resistência a herbicidas e a insetos. A caracterização a campo envolve os estudos das características agrônômicas de resistência e tolerância a estresses bióticos e abióticos, produtividade e qualidade nutricional, além dos estudos relacionados à biossegurança.

Preparo de meios de Cultura

Esta foi minha primeira atividade prática, no laboratório. Aprendi os passos básicos para a preparação de meios, componentes dos meios básicos e manuseio dos principais equipamentos utilizados no processo (Figura 9), como balança de precisão, pHmetro, agitador magnético, vidrarias, micropipetas, autoclave e câmara de fluxo laminar.

Existem várias soluções estoques (macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, antibióticos, etc.) e também vários tipos de meios para organogênese e embriogênese (meios para indução, meios pré-bombardamento, meios para indução + seleção, meios para regeneração + seleção e meios para regeneração).

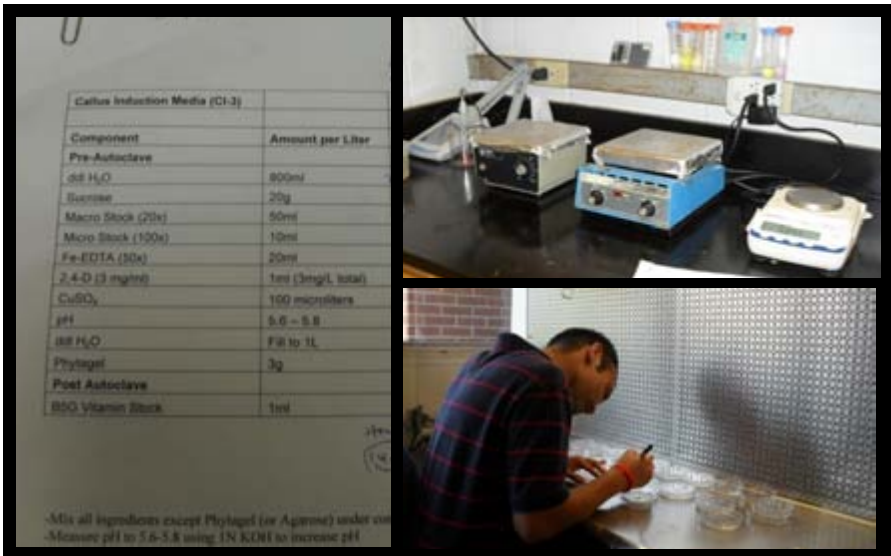


Figura 9. Componentes e equipamentos básicos utilizados no processo de preparo de meios de cultura.

A Biotecnologia Aplicada à Cana-de-açúcar

ALTPETER, F.; ORABY, H. Sugarcane. In: KEMPEN, F.; JUNG, C. (Ed.). *Genetic modification of plants: agriculture, horticulture and forestry*. Berlin: Springer-Verlag, 2010. 675 p. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, v. 64).

Este livro foi adquirido durante o pós-doutorado e doado à biblioteca da Embrapa Cerrados. Neste capítulo é feita uma ótima revisão de literatura sobre aspectos gerais do melhoramento genético, biotecnologia e biossegurança da cana-de-açúcar, incluindo o uso da cultura de tecidos via embriogênese somática e organogênese, engenharia genética, incluindo os métodos de transformação, seleção de tecidos transformados, características de interesse como resistência a herbicidas, tolerância a estresses abióticos como seca e frio, tolerância e resistência a estresses bióticos, engenharia metabólica do metabolismo de carboidratos para agregação de valor. O aumento da sacarose é um dos exemplos.

O melhoramento de características agrônômicas pode ser acelerado por estratégias racionais de engenharia genética. Aumento da sacarose, aumento do período de colheita, aumento da eficiência do uso da água e do nitrogênio, aumento da produção de biomassa, uso da engenharia metabólica são alguns exemplos. Para capitalizar o grande potencial da cana-de-açúcar como produtora de biomassa, a produção de alguns compostos alternativos como proteínas de uso industrial, proteínas de uso médico, proteínas com valiosas propriedades para uso como fibras, adesivos e plásticos biodegradáveis. Outros compostos que podem ser produzidos como subprodutos da sacarose podem ser de interesse para o setor de alimentos. O uso de resíduos como o bagaço e as folhas da cana também são atrativos. Outras possibilidades incluem também açúcares alternativos como produtos funcionais.

O uso do etanol merece destaque especial. Esforços do melhoramento envolvem o aumento da produtividade e redução dos custos de produção. O aumento da conversão da biomassa em glicose fermentável para produção de etanol foi reportado seguindo a expressão de uma endonuclease termoestável ou após a redução do conteúdo de lignina usando RNAi para supressão de genes envolvidos na biossíntese. Estratégias para modificar a composição da parede celular ou para aumentar a despolimerização de carboidratos complexos provavelmente poderão aumentar a produção de etanol a partir da celulose. Com certeza, a integração da fisiologia, genética e biotecnologia permitirá um melhor entendimento dessa biofábrica fotossintética, permitindo a operacionalização das melhores estratégias visando ao melhoramento genético da espécie.

A Cultura de Tecidos de Capim-elefante

Alguns artigos sobre cultura de tecidos de capim-elefante foram utilizados para subsidiar a montagem de experimentos e redação de trabalhos científicos.

VIDIGAL, M. C.; PASSOS, L. P.; SILVA, J. L. O. Conservação in vitro do germoplasma de capim-elefante por meio da micropropagação de meristemas axilares. *Ciência Rural*, v. 28, p. 379-385, 1998.

WANG, D. Y.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from inflorescence segments of *Pennisetum purpureum* Schum. (Napier or elephant grass). *Plant Science Letters*, v. 25, p. 147-154, 1982.

GRANDO, M. F.; FRANKLIN, C. I.; SHATTERS JR., R. G. Optimizing embryogenic callus production and plant regeneration from 'Tifton 9' bahiagrass seed explants for genetic manipulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 71, p. 213-222, 2002.

A Engenharia Genética para Duplicação do Número de Cromossomos

Alguns artigos foram utilizados para montagem de experimentos para manipulações genéticas visando à duplicação do número de cromossomos.

The use of oryzalin and trifluralin as substitutes to colchicine in chromosome doubling. Phyto Technology Laboratories®

A colchicina, orizalina e trifluralina são agentes antimitóticos que se ligam a dímeros de tubulina durante a divisão celular, prevenindo a formação de microtúbulos e, assim, a formação das fibras de fuso. A colchinina é o produto mais popular e tem sido utilizado desde a década de 1930 para aumentar níveis de ploidias, sendo considerada muito perigosa para manipulação em laboratório. A orizalina e trifluralina são produtos que tem capacidade similar para duplicação cromossômica sem efeitos perigosos relacionados à alta toxicidade da colchicina.

QUESENBERRY, K. H.; DAMPIER, J. M.; LEE, Y. Y.; SMITH, R. L.; ACUÑA, C.A. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. *Euphytica*, v. 175, p. 43-50, 2010.

Neste trabalho, foram utilizadas diferentes concentrações de colchicina, orizalina e trifluralina para a duplicação do número de cromossomos do cultivar diploide de bahiagrass 'Tifton 9'. Calos embriogênicos foram submetidos aos produtos e utilizados para regeneração das plantas tetraploides. Tais plantas foram obtidas em todos os tratamentos, mesmo para os com as menores concentrações de 5 μ M de orizalina e 5 μ M de trifluralina. Citometria de fluxo foi utilizada para análise da ploidia.

Extração de DNA em Alta Escala

Este procedimento tem sido realizado no laboratório utilizando uma técnica desenvolvida pela QIAGEN, chamado DNeasy. O protocolo utilizado é o de purificação de DNA total a partir de tecido fresco de plantas, chamado de DNeasy 96 protocol. Utilizando esse protocolo, realizamos a extração de 192 amostras de DNA por dia. Os equipamentos necessários são, Dispensador de bolinhas de Tungstênio, Balança analítica para 50 mg, Tissuelyser e centrífuga de placa (Figura 10). Esse procedimento permite a rápida extração de DNA e análises de vários acessos por dia, viabilizando trabalhos de seleção assistida por marcadores moleculares em pequenos laboratórios.



Figura 10. Principais procedimentos e equipamentos para extração de DNA em alta escala.

PCR, Eletroforese e Fotodocumentação

A análise de vários tipos de marcadores moleculares exige os procedimentos de PCR, eletroforese e fotodocumentação. Na Figura 11, ilustram-se tais procedimentos e equipamentos utilizados.



Figura 11. Principais procedimentos e equipamentos utilizados na PCR, eletroforese e fotodocumentação.

Preparo de Material do Campo para Indução de Calos

Este procedimento, no caso de capim-elefante e cana-de-açúcar é realizado utilizando o colmo a partir do nó do meristema apical. É utilizado um meio básico para indução de calos. Pequenos discos são retirados da base do colmo a partir do início do meristema apical. Para indução de calos, é feita a incubação a 28 °C no escuro e para a regeneração é feita a incubação a 28 °C com fotoperíodo de 16 h dia⁻¹. Esse procedimento está ilustrado na Figura 12.



Figura 12. Preparo de material do campo para indução de calos e cultura de tecidos.

Obtenção de Plantas Transgênicas por Biobalística

A tecnologia de transferência de genes tem criado novas alternativas para a produção de plantas mais adaptadas ao ambiente de cultivo e com maior capacidade de produção. Um dos métodos mais eficientes é o bombardeamento de partículas, denominado biobalística. Esse método consiste na aceleração de micropartículas de ouro ou tungstênio, que atravessam a parede celular e a membrana plasmática, carregando DNA recombinante (segmento de DNA com o promotor, gene para seleção das plantas transformadas e o gene de interesse) para o interior da célula. Após o bombardeamento, uma proporção de células atingidas permanece viável; o DNA é integrado no genoma vegetal e incorporado aos processos celulares de transcrição e tradução, resultando na expressão do gene introduzido. Uma das vantagens do sistema de transformação pela biobalística é que este permite a introdução e expressão gênica em qualquer tipo celular, como de bactérias, fungos, insetos, diferentes espécies de plantas e animais, bem como organelas intracelulares (mitocôndrias e cloroplastos).

O primeiro passo para obtenção de plantas transgênicas é a engenharia genética para construção do cassete de expressão (promotor, gene de interesse e terminador), além do cassete para seleção dos transformantes. O gene de interesse pode ser um gene de resistência a doença, a insetos-praga, resistência a herbicidas, tolerância à seca, bem como genes ou algum fragmento gênico que alteram a rota metabólica (aumentando ou diminuindo) a transcrição do RNAm ou a tradução de uma determinada proteína, a qual pode ter função estrutural (proteínas da parede celular), função enzimática (proteína/enzima de reconhecimento de patógenos e precursoras de uma cascata de reações que levam à resistência da planta ao patógeno) ou função regulatória (proteínas/enzimas que atuam como fatores de transcrição).

Um exemplo de gene de interesse foi identificado no arroz. Este gene (*RID1*) codifica um fator de transcrição (Cys-2/His-2-type zinc finger) crucial para o processo de transição entre a fase vegetativa e a fase reprodutiva das plantas (WU, C.; YOU, C.; LI, C.; CHEN, G.; BYRNE, M.E.; ZHANG, Q. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0806019105, v. 105, n. 35, p. 12915-12920, 2008). É possível, por engenharia genética, nocautear este gene, por exemplo, introduzindo um T-DNA no loco *RID1*. Plantas homocigotas para o alelo mutante têm o florescimento suprimido, ou seja, continuam sempre na fase vegetativa durante seu ciclo de vida.

Para realizar a transformação genética, utiliza-se um sistema de biobalística (Figura 13) que consiste de uma câmara de bombardeamento (principal equipamento), bomba de vácuo, tanque com gás hélio pressurizado e seus componentes (regulador de pressão, válvula solenóide e tubo de conexão). Na Figura 14, ilustram-se a câmara de bombardeamento e seus principais componentes; na Figura 15, ilustram-se os principais acessórios utilizados no bombardeamento; na Figura 16, apresenta-se um esquema de como ocorre o bombardeamento; e, na Figura 17, ilustram-se algumas etapas do procedimento.



Figura 13. Sistema de biobalística.

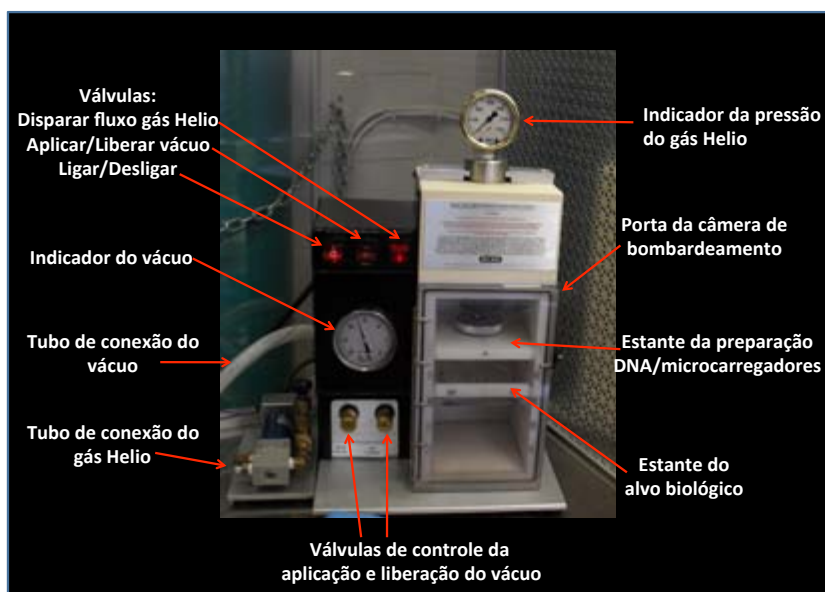


Figura 14. Câmara de bombardeamento e seus principais componentes.

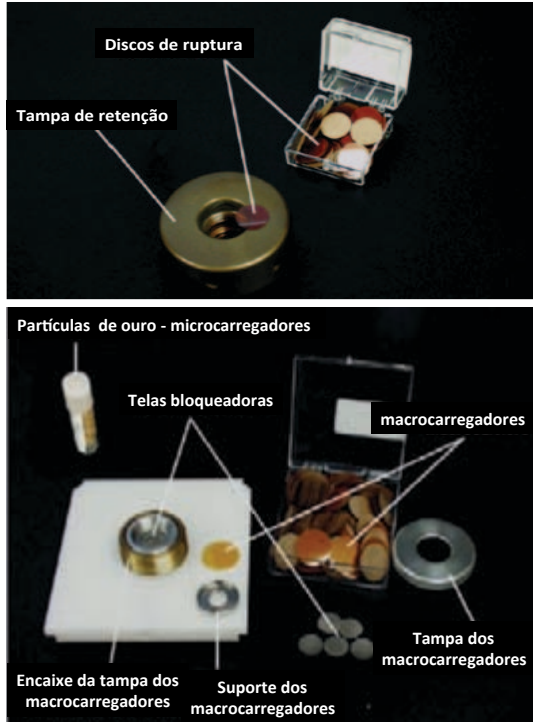


Figura 15. Acessórios utilizados no bombardeamento.

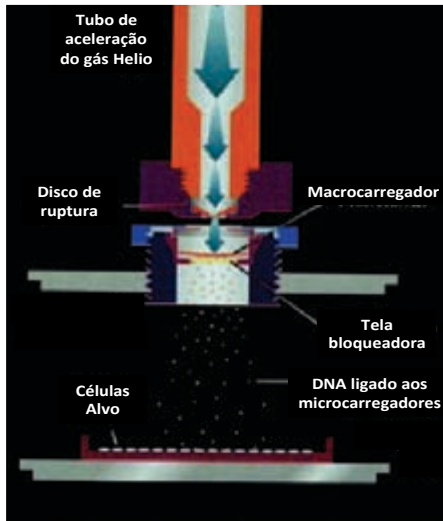


Figura 16. Esquema do processo do bombardeamento.



Figura 17. Algumas etapas do processo de montagem da câmara de bombardeamento.

Realização de Análises de Qualidade e Quantidade de DNA Utilizando Espectrofotômetro NanoDrop

Trata-se de um sistema de análise de DNA utilizando uma pequena gota com o DNA diluído ou concentrado. Uma das vantagens do sistema é a utilização de pequena quantidade da amostra de DNA sem a necessidade de cubetas, tubos e demais acessórios utilizados nos espectrofotômetros convencionais. Outra vantagem é a rapidez da operação do sistema e um software integrado que gera a leitura simultânea em vários comprimentos de onda, além dos cálculos automatizados da quantidade e qualidade do DNA. Nas Figuras 18 e 19, ilustram-se o equipamento e sua utilização.



Figura 18. Sistema NanoDrop de espectrofotometria.



Figura 19. Detalhe da gota de solução utilizada na espectrofotometria.

Análise da Ploidia em Híbridos Interespecíficos de Capim Elefante e Milheto

Um dos trabalhos científicos realizados no pós-doutorado foi a duplicação cromossômica de híbridos interespecíficos de capim elefante e milheto. Cali embriogênicos dos híbridos com melhor desempenho agrônomo foram submetidos a tratamentos com agentes antimitóticos (colchicina, oryzalina e trifluralina). Plantas regeneradas foram obtidas e para analisar a ploidia dessas plantas foram analisados o tamanho dos estômatos e também a citometria de fluxo. A contagem do número de cromossomos também é um método utilizado (Figura 20).

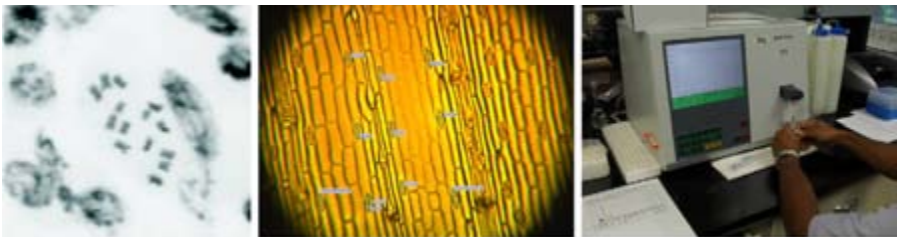


Figura 20. Procedimentos para análise de duplicação do número de cromossomos: contagem do número de cromossomos, medições do tamanho dos estômatos e citometria de fluxo.

O tamanho dos estômatos é utilizado como critério para seleção indireta de prováveis plantas com duplicação cromossômica. Para essa análise, foram utilizados a microscopia ótica com câmera acoplada para captura de imagens e o software infinity para as medições do diâmetro longitudinal, diâmetro transversal e área estomática. Na Figura 21, ilustra-se o procedimento.

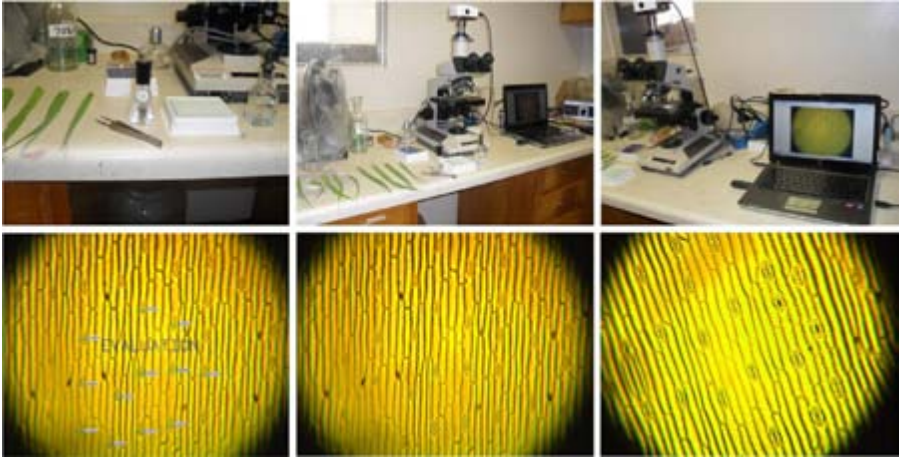


Figura 21. Procedimentos para medições do tamanho dos estômatos.

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Permite a análise de vários parâmetros simultaneamente, sendo conhecida também por citometria de fluxo multiparamétrica. Por meio um aparelho de detecção óptico-eletrônico, são possíveis análises de características físicas e (ou) químicas de uma simples célula.

Um citômetro de fluxo contém os seguintes componentes principais:

- (1) câmara de fluxo, onde é introduzida a suspensão de células;
- (2) fonte de luz, normalmente lâmpadas de mercúrio ou xenon ou diferentes tipos de lasers;
- (3) detector e conversor de sistema analógico para digital (ADC), gerando parâmetros de tamanho e complexidade, assim como sinais fluorescentes;
- (4) sistema de amplificação, podendo ser linear ou logarítmico;
- (5) computador para análise de sinais.

A análise da ploidia por meio da análise do conteúdo nuclear de DNA foi a primeira e continua a ser a principal utilização da citometria de fluxo em plantas. A citometria de fluxo é considerada a metodologia mais

apropriada para esse tipo de ensaio. A análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA nuclear baseia-se na intensidade de fluorescência relativa de núcleos corados com um fluorocromo específico para o DNA. A amostra analisada por citometria de fluxo tem de se encontrar na forma de uma suspensão de partículas individuais.

Segundo Loureiro e Santos (2004), foram desenvolvidas várias metodologias para libertar núcleos intactos de células vegetais. Todavia, o método clássico desenvolvido por Galbraith et al. (1983) continua a ser o mais utilizado, dada a simplicidade e rapidez que consegue libertar diretamente núcleos de tecidos vegetais (Figura 22 e 23). O tecido (approx. 50 mg, no caso de folhas) é cortado (*chopped*) com uma lâmina de barba numa placa de Petri contendo o tampão de lise (usualmente, uma solução tampão hipotônica com um detergente não iônico). Um protocolo (Partec) é apresentado em anexo. Apesar de toda a sua simplicidade e rapidez, esse método fornece resultados bastante bons para a maioria das espécies vegetais.



Figura 22. Diagrama da metodologia utilizada para analisar o conteúdo de DNA nuclear utilizando tecido foliar.

Fonte: Loureiro e Santos (Boletim de Biotecnologia, n. 77, p. 18-29, 2004).



Figura 23. Etapas da metodologia utilizada para analisar o conteúdo de DNA nuclear de híbridos de capim elefante e milho.

Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)

A RT-PCR é um tipo de reação em cadeia da polimerase em que a amplificação pode ser monitorada ao longo do tempo, ou seja, em tempo real. Trata-se de uma PCR mais específica, mais detalhada, mais sensível e mais reprodutível. A RT-PCR é baseada na detecção e quantificação da quantidade do DNA amplificado por meio de um sinal fluorescente. Nesse sentido, o equipamento utilizado é um termociclador acoplado a um sistema de detecção do sinal, o qual é codificado por meio de um software específico instalado em um computador acoplado ao sistema. Entre as várias aplicações, a RT-PCR é utilizada para detecção de patógenos, análise de expressão gênica,

análise quantitativa de presença de transgênicos e carga viral. A não ser pelo alto custo do equipamento, a RT-PCR não é muito mais cara que a PCR tradicional. Na Figura, 24 ilustra-se o procedimento sendo realizado no laboratório.



Figura 24. Realização da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

Realização do Teste de Elisa para Confirmação de Expressão em Plantas Transgênicas

O teste de Elisa (*Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*) se baseia em interações antígeno-anticorpo detectáveis por reações enzimáticas. Durante o trabalho de pós-doutorado, o teste foi utilizado para detectar a expressão da proteína NPTII codificada pelo transgene *nptII* (que confere resistência a antibióticos utilizados no processo de seleção de plantas transgênicas) e Cry1Fa expressa pelo transgene de interesse (que confere resistência a insetos) em plantas supostamente transgênicas de capim elefante. Resumidamente, é feita a extração de proteínas totais de folhas de cada suposta planta transgênica, as quais são quantificadas por espectrofotometria. Aproximadamente 20 μg de proteína de cada planta são colocadas em poços de placas fornecidas em kits comerciais. É adicionado, em sequência, um conjugado proteína-enzima. A placa é incubada por 1 a 2 horas e então o conteúdo

é descartado e os orifícios lavados com um tampão. Um substrato específico é adicionado ao orifício e novamente é feita uma incubação, após a qual é adicionada uma solução para interromper a reação. A análise e quantificação dos resultados são feitas por espectrofotometria. Para as plantas que forem transgênicas e apresentarem expressão gênica e produção da proteína específica, é formada uma coloração, a qual pode ser quantificada. Na Figura 25, ilustra-se o procedimento realizado.

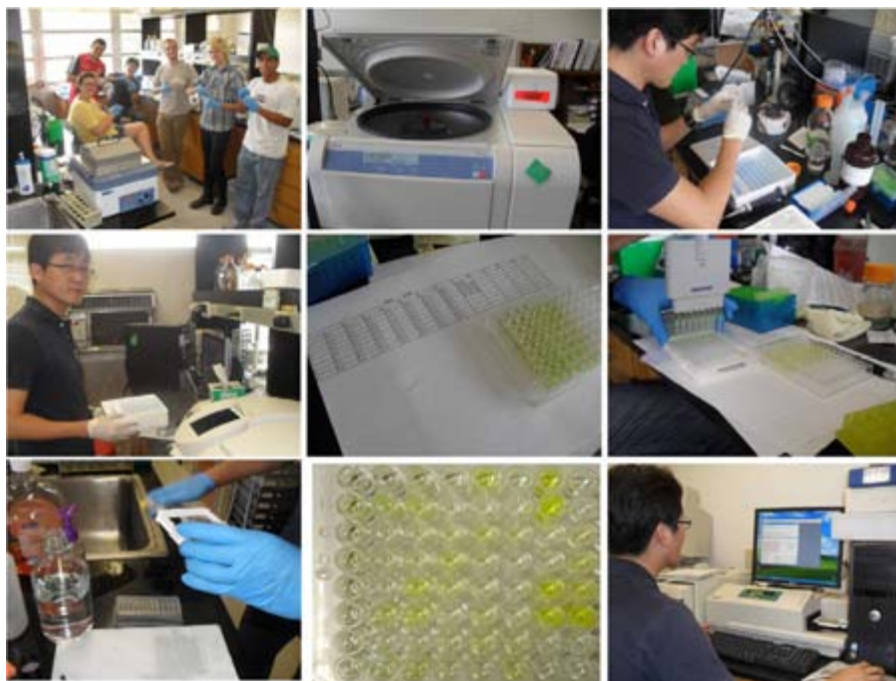


Figura 25. Realização do teste Elisa para detecção a expressão das proteínas NPTII e Cry1Fa em plantas supostamente transgênicas de capim elefante.

Montagem de Experimentos de Campo

O primeiro experimento de campo montado foi para avaliar plantas transgênicas de ryegrass com genes de tolerância à seca (Figura 26). Foi utilizada a seleção assistida por marcadores para selecionar as plantas

PCR + para a presença do gene *hpt*. As plantas transgênicas foram comparadas com o tipo selvagem.

Foi montado um segundo experimento de campo para avaliação de híbridos de capim elefante (Figura 27). Cruzamentos controlados entre seis diferentes genitores foram realizados e as sementes obtidas foram germinadas *in vitro*. Aproximadamente dois meses após a germinação das sementes, as mudas foram transplantadas para o campo.



Figura 26. Montagem de experimento de campo para avaliação de plantas transgênicas de ryegrass (*Lolium perenne* L.).



Figura 27. Montagem de experimento de campo para avaliação de híbridos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.).

Participação em Eventos Técnicos e Treinamentos

Seminários do Departamento de Agronomia

Toda quinta-feira, às 16 h, são apresentados seminários dos projetos de pós-graduação e também das dissertações e teses. Todos os seminários são avaliados pelos participantes. Os critérios de avaliação envolvem o resumo, a qualidade da apresentação e a qualidade da pesquisa. A seguir, a relação dos seminários assistidos durante o período de pós-doutorado.

- Alternative methods for crabgrass management in St. Augustinegrass (Brian Glenn).
- Root depth development and transpirational rate changes of warm-season turfgrass species (Maria Pilar Fuentealba).
- Grazing management of warm-season forage species in South Florida (André De-Stefani Aguiar).
- Strategies for increasing rhizome peanut contribution to productivity and ecosystem services of low-input pasture systems (Kimberly Cline).
- Feedstock production, composition, nitrogen dynamics, and soil responses to harvest management of bioenergy crops (Chae-In Na).
- Biology and control of the invasive emergent plant crested floating heart (*Nymphoides cristata*) (Leif Willey).
- Bread, beer & the seeds of change – Agriculture’s imprint on world history (Thomas R. Sinclair and Carol Janas Sinclair).
- Aminocyclopyrachlor for right-of-way weed management (Michael Durham).
- Accelerating genetic transformation in sugarcane (Yogesh Taparia).
- Sustainable bioenergy cropping systems (Xi Liang).

- Tissue chemistry of potential bioenergy feedstocks (Jeffrey Fedenko).
- Breeding and biotechnology for the improvement of elephantgrass as a bioenergy feedstock (Beth Mayers).
- In vitro and in vivo evaluation of *Arachis paraguariensis* and *A. glabrata* Germplasms (Bunmi Aina).
- Release dynamics of granular herbicides in an aquatic environment (Brett W. Bultemeier).
- Herbage accumulation, nutritive value, and tillering dynamics of bahiagrass genotypes under defoliation intensities (Daniel Reis Pereira).
- Physiological consequences of late leaf spot on peanut cultivars of differing resistance (Maninder Singh).
- RNAi suppression of the lignin biosynthetic gene 4-coumarate-CoA Ligase (*4CL*) in sugarcane (Y. Xiong).

Participação no Co-PI meeting (Monday October 25th)

Este evento é uma reunião técnica do grupo de pesquisa envolvido na *Biotecnologia aplicada ao melhoramento genético de plantas*. Nesse evento, foram apresentados e discutidos os resultados obtidos pelos cientistas do grupo no último mês. Eventualmente, cientistas são convidados para apresentarem palestras sobre temas relacionados.

As apresentações deste evento foram:

- **Je Heyong Jung:** Suppression of *COMT* and *4CL* in sugarcane.
- **Yuan Xiong:** Analysis of lignin suppression in sugarcane and vegetative propagation.
- **Yogesh Taparria:** Alternative tissue culture and biolistic transformation protocol for sugarcane.
- **Jae Yoon Kim:** *Xyl 10B* expression in sugarcane.
- **Mukoh Jain:** Expression analysis of *RCN2*.

- **Hao Wu:** Overcoming limitations for chloroplast transformation of energycane.
- **Qianchun Zeng:** Optimizing selection for chloroplast transformation of sugarcane.
- **Baskaran Kannan:** Elephantgrass, bahiagrass and ryegrass projects.
- **Beth Mayers:** Elephantgrass tissue culture.
- **Fabio Faleiro:** Biotechnology and Savannas.

Participação no Co-PI meeting (Wednesday April 6th)

Neste evento foram apresentados e discutidos os resultados obtidos pelos cientistas do grupo no último semestre. Eventualmente, cientistas são convidados para apresentarem palestras sobre temas relacionados.

As apresentações deste evento foram:

- **Mukesh Jain:** *RCN2* expression.
- **Jae Kim:** *RCN2* expression and *xy110B* expression.
- **Guang Nong:** Processing of sugarcane biomass with in planta produced *Xy110B*.
- **Je Heyong Jung:** Suppression of *COMT* and *4CL* in sugarcane and transfer of transgenic plants to the field.
- **Yuan Xiong:** *4CL* Southern blot.
- **Hao Wu:** New chloroplast transformation vectors.
- **Yogesh Taparia:** Alternative tissue culture and biolistic transformation protocol for sugarcane.
- **Fabio Faleiro:** Update on elephantgrass tissue culture and genetic transformation.
- **Beth Mayers:** Update on elephantgrass transformation.
- **Tenisha Phipps:** Update on germination of elephantgrass hybrids.

- **Baskaran Kannan:** Update on Elephantgrass, bahiagrass and ryegrass field projects.

Participação no Co-PI meeting (Wednesday May 4th)

Neste evento, os resultados do último mês foram apresentados e discutidos.

As apresentações deste evento foram:

- **Mukesh Jain:** *RCN2* expression.
- **Jae Kim:** *xy10B* expression.
- **Guang Nong:** Optimized *TLC* for sugarcane *Xy10B*.
- **Je Heyong Jung:** Suppression of *COMT* and *4CL* in sugarcane and transfer of transgenic plants in the field.
- **Yuan Xiong:** *4CL* Lignin analysis.
- **Fabio Faleiro:** Elephantgrass applied biotechnology.

Participação no Lab meeting (Tuesday August 16th)

Neste evento, os principais resultados obtidos no laboratório no último semestre foram discutidos. Foi feita uma comemoração especial pela obtenção das primeiras plantas transgênicas de capim elefante do mundo. Tive o privilégio e a oportunidade de conduzir essa pesquisa durante o meu pós-doutorado.

As apresentações deste evento foram:

- **Qianchun:** Agrobacterium mediated transformation of sugarcane.
- **Fabio Faleiro:** Biolistic gene transfer of insect resistance gene *cry1F* to elephantgrass.
- **Beth Mayers and Manfred Sobanski:** Towards Agrobacterium mediated transformation of elephantgrass for suppression of flowering.
- **Je Heyong Jung:** *RNAi* suppression of *COMT* in sugarcane.

Participação no Florida Genetics 2010 – The sixth annual symposium of the UF Genetics Institute (October 27-28th)

Este evento é um simpósio anual que envolve o Centro de Epigenética, Colégio de Ciências e Artes, Departamento de Genética Molecular e Microbiologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular de Plantas, Bibliotecas do Centro de Ciências da Saúde, Centro Interdisciplinar para Pesquisa em Biotecnologia e o Instituto de Genética da UF. Foram apresentadas três sessões de palestras, envolvendo genômica de microrganismos, genômica de patógenos e genética da reprodução das plantas. Foram também apresentados 125 trabalhos na forma de pôsteres.

Participação no Hazardous Waste Management Training (November 17th 2010)

Este evento é um treinamento anual oferecido pelo Departamento de Segurança e Saúde Ambiental da Universidade da Flórida. O curso é oferecido com o objetivo de capacitar os participantes em três pontos básicos: (1) identificação de todos os itens de resíduos perigosos gerados em laboratórios; (2) como estocar ou acumular resíduos perigosos de forma segura e cumprindo todas as regulamentações governamentais e institucionais; (3) como minimizar a quantidade de resíduos perigosos gerados pelos laboratórios.

Participação no Treinamentos sobre Shipping and Transport of Biological Materials (June 21th 2011)

Este treinamento é sobre as regulamentações sobre envio e transporte de material biológico, incluindo as plantas geneticamente modificadas. Informações sobre os procedimentos, as embalagens e as exigências da legislação foram apresentadas.

Participação no In Vitro Biology Meeting 2011 (June 4-8th)

O evento foi realizado na cidade Raleigh, capital do Estado da Carolina do Norte. A programação científica envolveu a cultura de tecidos, genética molecular, engenharia genética, transformação genética,

bioinformática e a biologia celular e molecular de plantas e animais. Nesse evento, foram apresentados dois trabalhos científicos realizados durante o pós-doutorado.

FALEIRO, F. G.; KANNAN, B.; ALTPETER, F. Somatic embryogenesis and plant regeneration of superior interspecific hybrids of elephant grass and pearl millet. **In Vitro Celular & Developmental Biology**, v. 47, p. S59-S60, 2011.

FALEIRO, F. G.; ALTPETER, F. Interactions between genotype, explants and media composition for tissue culture response of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **In Vitro Celular & Developmental Biology**, v. 47, p. S62-S63, 2011.

Participação no 3rd Annual Florida Energy Systems Consortium 2011 (September 27-28th)

O evento foi realizado na cidade Gainesville. A programação científica envolveu a discussão das diferentes formas de obtenção de energia e as diferentes inovações tecnológicas envolvidas. A produção de biomassa para produção de energia (bioenergia) teve destaque especial no evento. Nesse evento, foram apresentados quatro trabalhos científicos realizados durante o pós-doutorado.

FALEIRO, F. G.; MANFREDO, S.; LUCIANI, G. F.; ALTPETER, F. Comparison of culture media for regeneration of Elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) Plants from mature seed derived callus. **3rd Annual FESC Summit – Oral and Poster Session Abstracts**, p. 23, 2011.

FALEIRO, F. G.; YOON KIM, J.; ALTPETER, F. Genetic Transformation of Elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) by Biolistic Gene Transfer. **3rd Annual FESC Summit – Oral and Poster Session Abstracts**, p. 23, 2011.

FALEIRO, F. G.; BASKARAN, K.; ALTPETER, F. Evaluation of Genetic Variability between Elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Schum.)

Accessions and Confirmation of Their Crosses Using Microsatellite Markers. **3rd Annual FESC Summit – Oral and Poster Session Abstracts**, p. 23, 2011.

FALEIRO, F. G.; BASKARAN, K.; ALTPETER, F. In vitro Chromosome Doubling of Superior Interspecific Hybrids between Elephantgrass and Pearl Millet Using Different Antimitotic Chemicals. **3rd Annual FESC Summit – Oral and Poster Session Abstracts**, p. 26, 2011.

Participação na disciplina AGR 5307 - Molecular Genetics for Crop Improvement

Trata-se de uma disciplina de 3 créditos (60 horas) que aborda os conceitos e aplicações da genética molecular e biologia celular de plantas e as estratégias para o melhoramento genético de plantas por meio da biotecnologia. Abaixo, os principais assuntos abordados na disciplina:

- Organização, estrutura e controle de genes em procariotos e eucariotos.
- Controle da expressão gênica em procariotos e eucariotos (transcrição, tradução, endereçamento de proteínas, regulação da expressão gênica, estabilidade e degradação de RNA e proteínas).
- Metodologias para isolamento de DNA e RNA, síntese de cDNA, digestão do DNA com enzimas de restrição, eletroforese, clonagem gênica, hibridização, construção de bibliotecas gênicas, PCR, sequenciamento, análises de dados genômicos, construção de vetores, clonagem *in silico* (vetor NTI), comparação de sequências (NCBI), cultura de tecidos, organogênese e embriogênese direta e indireta, transferência de genes, transformação genética, análise de integração e expressão de transgene, *Western blot*, *Southern blot*, engenharia genética, marcadores moleculares, seleção assistida por marcadores moleculares, micro e macroarranjos, sequenciamento em alta escala.

- Mecanismos e aplicações da expressão de transgenes e do silenciamento gênico para o melhoramento de plantas.
- RNA interferente e sua aplicação na mediação da resistência a vírus e genômica funcional.
- Biotecnologia vegetal.
- Barreiras e rotas para o marketing de plantas transgênicas.
- Aspectos éticos de plantas transgênicas.
- Marcadores moleculares no melhoramento de plantas.

Um dos objetivos da disciplina é permitir aos alunos a leitura e interpretação de artigos científicos relacionados à genética molecular aplicada ao melhoramento genético de plantas. Nesse sentido, durante a disciplina, houve a apresentação de artigos científicos pelos alunos. Abaixo a relação dos artigos científicos apresentados:

GAO, S. -Q.; CHEN, M.; XU, Z. -S; ZHAO, C. -P.; LI, L.; XU, H. -J.; TANG, Y. -M.; Zhao, X.; MAS, Y. -Z. The soybean GmbZ1P1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v. 75, n. 6, p. 537-553, 2011. (Hilda)

SHI, J.; AN, H. -L.; ZHANG, L.; GAO, Z.; GUO, X. -Q. GhMPK7, a novel multiple stress-responsive cotton group C MAPK gene, has a hole in broad spectrum disease resistance and plant development. **Plant Molecular Biology**, v. 74, n. 1-2, p. 1-17, 2010. (Norma)

NANDY, S.; SRIVASTAVA, V. Site-specific gene integration in rice genome mediated by the FLP-FRT recombination system. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 6, p. 713-721, 2011. (Christian)

SHUKLA, V. K. et al. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 437-442, 2009. (Jozer)

FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. de. Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose. **Euphytica**, v. 138, n. 3, p. 213–218, 2004. (Fábio)

FUKUZAWA, N. et al. Risk-managed production of bioactive recombinant proteins using a novel plant virus vector with a helper plant to complement viral systemic movement. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 1, p. 38–49, 2011. (Ling)

DODO, H. W. et al. Alleviating peanut allergy using genetic engineering: the silencing of the immunodominant allergen Ara h 2 leads to its significant reduction and a decrease in peanut allergenicity. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, n. 2, p. 135–145, 2008. (Sanghamitra)

GRAY, B. N. et al. High-Level Bacterial Cellulase Accumulation in Chloroplast-Transformed Tobacco Mediated by Downstream Box Fusions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 4, p. 1045-1054, 2009. (Beth)

Outra atividade prática da disciplina foi o estudo de caso sobre “O arroz dourado”. Foram apresentados pelos alunos vários artigos sobre o assunto. Na Tabela 1, são relacionados os assuntos debatidos e os respectivos artigos apresentados e seus apresentadores.

Tabela 1. Apresentadores, referências e assuntos discutidos no estudo de caso sobre o arroz dourado.

| Presenting Student | Reference | Title |
|--------------------|--|--|
| Norma | http://www.sciencemag.org/content/287/5451/303.long Ye et al. 2000, Science 287: 303- 305 Publication from the team of scientist who developed the first golden rice | Engineering the Pro-vitamin A biosynthetic pathway into rice endosperm |

continua...

Tabela 1. Continuação.

| Presenting Student | Reference | Title |
|--------------------|--|--|
| Christian | <p>http://www.grain.org/briefings/?id=18</p> <p>GRAIN is a small international non-profit organization that portrays itself as: "Working to support small farmers and social movements in their struggles for community-controlled and biodiversity-based food systems"</p> | Grains of Delusion: Golden Rice seen from the ground |
| Hilda | <p>http://www.nature.com/nbt/journal/v23/n4/full/nbt1082.html</p> <p>Paine et al. 2005, Nature Biotechnology 23: 482-487</p> <p>Publication from the team of scientist who developed an improved version of golden rice (with improved pro-vitamin A content)</p> | Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content |
| Sanghamitra | <p>http://www.greenpeace.to/publications/All%20that%20glitters%20is%20not%20gold.pdf</p> <p>Greenpeace portrays itself as: "The leading independent campaigning organization that uses peaceful direct action and creative communication to expose global environmental problems and to promote solutions that are essential to a green and peaceful future"</p> | <p>All That Glitters is Not Gold:</p> <p>The False Hope of "Golden Rice"</p> |

continua...

Tabela 1. Continuação.

| Presenting Student | Reference | Title |
|--------------------|---|---|
| Jozer | <p>http://foodwatch.de/search_ger.html?op=search&searchform=0&raw=rice+crossroads</p> <p>Foodwatch portrays itself as: "A non-profit and independent organization that draws public attention to practices in the food industry that are not in the interests of consumers. Foodwatch fights for the right of consumers to honestly know what they are buying and to enjoy good food that is healthy and uncontaminated. We are fed up with being fed off"</p> | The campaign for genetically modified rice is at the crossroads |
| Beth | <p>http://www.ajcn.org/content/early/2009/04/15/ajcn.2008.27119 Tang et al. 2009, Am J Clin Nutr 89:1–8</p> <p>Scientific results from a clinical trial which evaluated if β-Carotene derived from Golden Rice is effectively converted to vitamin A in humans</p> | Golden Rice is an effective source of vitamin A |

continua...

Tabela 1. Continuação.

| Presenting Student | Reference | Title |
|--------------------|--|--|
| Ling | http://www.goldenrice.org/PDFs/Dubock_9th_ICABR_2005.pdf Dubock 2005, 9th ICABR, Ravello Italy, July 6-10, 2005. Adrian Dubock is Scientist at Syngenta International AG, Switzerland and Member of the Golden Rice Humanitarian Board. The Golden Rice Humanitarian Board portrays itself as: "Reaching small farmers in target countries requires a highly professional and interdisciplinary team. For this purpose a Humanitarian Board, composed of internationally recognized experts belonging to various reputed institutions, provides strategic guidance to the Golden Rice project | Golden Rice – The partitioning of influence |
| Fabio | http://www.goldenrice.org/PDFs/Opportunity_squandered_Miller_TIBTEC_2009.pdf Miller 2009 Trends in Biotechnology 27: 129-130 Henry I. Miller, M.S., M.D., is a research fellow at the Hoover Institution Stanford University , where his research focuses on public policy toward science and technology; Potrykus 2010 Nature 466: 561 http://www.nature.com/nature/journal/v466/n7306/full/466561a.html Ingo Potrykus is the lead scientist of the team who developed Golden Rice | A golden Opportunity, squandered; Regulation must be revolutionized |

Desenvolvimento de Trabalhos Científicos

A seguir, são apresentados os abstract dos trabalhos científicos desenvolvidos durante o período do pós-doutorado que foram apresentados em eventos científicos.

Interactions among Genotype, Explants and Media Composition for Tissue Culture Response of Elephant Grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). Fábio G. Faleiro^{1,2} and Fredy Altpeter¹ (¹University of Florida, IFAS, Agronomy Department, Laboratory of Plant Molecular Physiology, 3062, McCarty Hall, Gainesville, FL 32611; ²Embrapa Cerrados, P.O.Box 08223, 73310-970 Planaltina, DF, Brazil. e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br; altpeter@ufl.edu)

Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) has been introduced to all tropical and subtropical areas of the world because of its ability to produce large amounts of forage biomass, with very good forage quality. The feasibility of producing ethanol from cellulosic crops such as napiergrass has greatly improved in recent times. Napiergrass is considered the best adapted perennial feedstock for biofuel production in the southern US. Transgenic modifications of cell wall composition of bioenergy or forage grasses or expression of cell wall degrading enzymes is a promising approach to reduce pretreatment costs for ethanol production or enhance digestibility of the forage. However, a genetic transformation protocol is currently lacking for elephant grass. The first step to enable biotechnological approaches is the development of an efficient plant regeneration protocol from tissue culture. Among the most important factors influencing tissue culture response are genotype, explant and media composition. In this study, fifteen elephant grass genotypes, two explants (immature leaves and young inflorescences) and two auxin types (CPA and 2,4D) were compared in a completely randomized factorial design with 5 replications. Each replication was represented by two petridishes with six explants each. The callus induction, necrosis, quantity and quality of embryogenic callus were evaluated during the first 60 days after culture initiation. The means were compared using the Tukey test at 1% level of probability. Significant effects of genotype, explants, auxin type and particularly interactions among these factors were observed for all characteristics evaluated. The results of this study supported induction

of elephant grass calli with superior plant regeneration frequency and are currently providing the basis for development of a genetic transformation protocol for elephantgrass.

Na Figura 28, apresenta-se o pôster deste trabalho apresentado no In Vitro Biology Meeting 2011.

Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Superior Interspecific Hybrids of Elephant Grass and Pearl Millet. Fábio G. Faleiro^{1,2}; Baskaran Kannan¹ and Fredy Altpeter¹ (¹University of Florida, IFAS, Agronomy Department, Laboratory of Plant Molecular Physiology, 3062, McCarty Hall, Gainesville, FL 32611; ²Embrapa Cerrados, P.O.Box 08223, 73310-970 Planaltina, DF, Brazil. e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br; altpeter@ufl.edu)

Elephant grass is one of the most productive biomass producers in tropical and subtropical regions and considered an important forage and future bioenergy crop. Sexual compatibility between elephant grass (*Pennisetum purpureum* $2n = 4x = 28$) and pearl millet (*Pennisetum glaucum* $2n = 2x = 14$) allows the development of interspecific triploid hybrids, this allows the introgression of favorable alleles by traditional plant breeding. In contrast to elephant grass, which produces large amounts of wind dispersed seeds, interspecific hybrids between elephant grass and pearl millet are male and female sterile due to triploidy ($2n = 3x = 21$) and do not produce seeds. Male and female sterility of interspecific hybrids will enhance containment of genetically improved bioenergy feed stocks. While the doubling of chromosomes of the triploid hybrids may restore seed production and enhance biomass production. The requirement for both genetic engineering of interspecific hybrids and in vitro chromosome doubling is an efficient plant regeneration protocol by tissue culture. We selected the most persistent and productive interspecific hybrids in replicated field studies and evaluated the callus induction and plant regeneration response of seven superior interspecific hybrids of elephant grass and pearl millet. Significant genotypic differences were observed for callus induction, necrosis and quantity and quality of embryogenic callus. The results of this study supported identification of genotypes with induction of highly embryogenic calli with superior plant regeneration frequency. These tissues are currently providing the basis for development

of in vitro chromosome doubling and genetic transformation protocols.

Na Figura 29, apresenta-se o pôster desse trabalho apresentado no In Vitro Biology Meeting 2011.

Comparison of Culture Media for Regeneration of Elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) Plants from Mature Seed Derived Callus. Fábio G. Faleiro^{1,2}, Sobanski Manfredo^{1,3}, Gabriela F.

Luciani^{1,3} and Fredy Altpeter¹ (¹University of Florida, IFAS, Agronomy Department, Laboratory of Plant Molecular Physiology, 3062, McCarty Hall, Gainesville, FL 32611; ²Embrapa Cerrados, P.O.Box 08223, 73310-970 Planaltina, DF, Brazil; ³Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. E-mail: altpeter@ufl.edu)

Elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) is a highly productive forage grass in tropical and subtropical regions and is also considered as one of the best adapted perennial feedstocks for biofuel production in the southern US. Biotechnology will significantly contribute to the genetic improvement of forage grasses and bioenergy feedstocks. However, a genetic transformation protocol is currently lacking for elephant grass. The first step to enable biotechnological approaches is the development of an efficient plant regeneration protocol from tissue culture. Among the most important factors influencing tissue culture response are genotype, explant and media composition. Using seeds as starting material for the establishment of tissue cultures has not been described for elephant grass. In contrast to immature tissues like immature leaves or inflorescences the use of seeds for initiation of regenerable tissue cultures has the benefit of providing explants throughout the year without the need of maintaining donor plants. In this study, the effect of media composition on tissue culture response of mature seeds derived from elephant grass N-74 was evaluated in a factorial design with 2 auxin sources, 3 auxin concentrations and 2 cytokinin concentrations. Additional media evaluating alternative cytokinin to auxin ratios and the supplementation with L-proline as well as light regimes during callus induction were also compared. This experiment was carried out in a completely randomized design with 5 replications. Each replication was represented by one petridish with 10 longitudinally cut mature seeds resulting in a total of 1,000

explants. The tissue culture response was evaluated for unintended germination, callus initiation, callus growth, necrosis, embryogenesis, plant regeneration rate and regeneration frequency. The means were compared using the Tukey test at 1% level of probability and using linear and non-linear regression analysis. The best media composition supported induction of callus from 100% of the cultured seed explants and embryogenic callus that regenerated plants from 37% of the cultured seed explants.

Na Figura 30, apresenta-se o pôster desse trabalho apresentado 3rd Annual Florida Energy Systems Consortium 2011.

Genetic Transformation of Elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) by Biolistic Gene Transfer. Fábio G. Faleiro^{1,2}; Jae Yoon Kim¹ and Fredy Altpeter¹ (¹University of Florida, IFAS, Agronomy Department, Laboratory of Plant Molecular Physiology, 3062, McCarty Hall, Gainesville, FL 32611; ²Embrapa Cerrados, P.O.Box 08223, 73310-970 Planaltina, DF, Brazil. E-mail: alt peter@ufl.edu)

Elephantgrass is one of the prime feedstock candidates for lignocellulosic biofuel production. Biomass yield and low input characteristics like nutrient uptake efficiency and abiotic and biotic stress tolerance are the main targets for genetic improvement of elephantgrass. For example, resistance to Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) is a desirable trait for highly digestible elephantgrass accessions and can be introduced through transgenes encoding specific *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins (called crystal proteins or Cry proteins). However, a genetic transformation protocol is currently lacking for elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). In this study, embryogenic callus of elephantgrass was used as target for biolistic co-transfer of unlinked constitutive selectable marker (*nptII* or *hptII*) expression cassette and the constitutive *cry1Fa* expression cassette. Different selection agents (paromomycin, geneticin and hygromycin) and bombardment parameters were compared. Following selection and regeneration of plants a total of 24 putative lines were confirmed as PCR positive for both *nptII* and *cry1Fa*. 18 of these lines displayed a detectable level of Cry1Fa protein in the Cry1Fa ELISA. We are currently producing vegetative progenies of these transgenic elephantgrass plants for insect resistance testing. This is the first report of genetic

transformation and transgene expression in elephantgrass.

Na Figura 31, apresenta-se o pôster desse trabalho apresentado 3rd Annual Florida Energy Systems Consortium 2011.

Evaluation of Genetic Variability between Elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) Accessions and Confirmation of Their Crosses Using Microsatellite Markers. Fábio G. Faleiro^{1,2}, Baskaran Kannan¹ and Fredy Altpeter¹ (¹University of Florida, IFAS, Agronomy Department, Laboratory of Plant Molecular Physiology, 3062, McCarty Hall, Gainesville, FL 32611; ²Embrapa Cerrados, P.O.Box 08223, 73310-970 Planaltina, DF, Brazil. e-mail: altpeter@ufl.edu)

Elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Schum.), also known as napiergrass, is a warm-season perennial grass, which is used as forage in tropical and subtropical regions of the world. Elephantgrass produces large amounts of lignocellulosic biomass which makes it a promising bioenergy feedstock. Biomass yield and low input characteristics are the main targets for genetic improvement of elephantgrass. Breeding programs recombine desirable genetic variability from different accessions into new breeding lines for the development of advanced cultivars. This study aimed to characterize the genetic variability in selected accessions of elephantgrass using microsatellites markers. Genetic analysis was done for accessions PP 19, N 39-2, N 74, N 122, N 157 and N 190. Genomic DNA samples were amplified by PCR using previously developed primers to detect microsatellites molecular markers. The markers of each accession were converted into a numeric matrix, from which the genetic distances between the accessions were estimated. Agronomic traits from initial development and biomass production were also used to estimate genetic distances between each pair of accessions. Clustering analysis based on genetic distances allowed to detect a wide range of genetic variability among the evaluated accessions of elephant grass. The N 122 accession presented the highest genetic distance to the other accessions, while the genetic distance between N 157 and N 190 was the lowest using both molecular markers and agronomic traits. Genetic distances using molecular markers and agronomic traits had

a significant positive correlation of 0.534. Microsatellites markers were also useful to confirm crosses between the accessions. The verified genetic variability indicates good potential for elephantgrass improvement by traditional breeding using these accessions.

Na Figura 32, apresenta-se o pôster desse trabalho apresentado 3rd Annual Florida Energy Systems Consortium 2011.

In vitro Chromosome Doubling of Superior Interspecific Hybrids between Elephantgrass and Pearl Millet Using Different Antimitotic Chemicals.

Fábio G. Faleiro^{1,2}; Baskaran Kannan¹ and Fredy Altpeter¹ (¹University of Florida, IFAS, Agronomy Department, Laboratory of Plant Molecular Physiology, 3062, McCarty Hall, Gainesville, FL 32611; ²Embrapa Cerrados, P.O.Box 08223, 73310-970 Planaltina, DF, Brazil. E-mail: altpeter@ufl.edu)

Elephantgrass (*Pennisetum purpureum* $2n = 4x = 28$) produces large amounts of biomass in tropical and subtropical regions and is considered a prime candidate for production of lignocellulosic biofuel. Interspecific hybridization between elephantgrass and pearl millet (*Pennisetum glaucum* $2n = 2x = 14$) may allow to improve important traits (e.g. drought tolerance, biomass quality and production). In contrast to elephantgrass and pearl millet, which produce large amounts of seeds, interspecific hybrids are male and female sterile due to triploidy ($2n = 3x = 21$) and do not produce seeds. Chromosome doubling of the triploid hybrids may restore seed production and fertility, allowing backcrosses with elephantgrass to further enhance biomass production and persistence. In this study, chromosome doubling was performed in vitro from the most persistent and productive interspecific hybrids. Callus was induced in vitro from cross-sections of the immature leaf whorl of five superior interspecific hybrids (MN 12, MN 18, MN 51, MN 54 and MN 55). Embryogenic calli were incubated for 48h with two alternative concentrations of the antimitotic agents Oryzalin or Trifluralin. Stomata size measurements and flow cytometry were performed following plant regeneration from embryogenic callus and transfer to soil. A total of 328 regenerated plants were obtained and 74 presented altered ploidy according to flow cytometer analysis. Stomata longitudinal diameter was a good

indicator of altered ploidy. The treatment with 5 μ M Oryzalin produced the highest number (55) of plants with altered ploidy. Chromosome doubling was obtained for all five superior interspecific hybrids. The highest numbers of plants with altered ploidy was obtained from MN 18 and MN 51 genotypes with of 29 and 27 plants, respectively. The plants with altered ploidy have been transferred to the field to evaluate agronomic performance and fertility. The best performing plants with recovered fertility will be used in further elephant grass breeding cycles.

Na Figura 33, apresenta-se o pôster desse trabalho apresentado 3rd Annual Florida Energy Systems Consortium 2011.

Breeding and Biotechnology for Genetic Improvement of Elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Schum.). Fábio G. Faleiro^{1,2}, Baskaran Kannan¹, Jae Yoon Kim¹, Sobanski Manfred^{1,3}, Elizabeth B. Mayers¹, Tenisha Phipps¹ and Fredy Altpeter¹ (¹University of Florida, IFAS, Agronomy Department, Laboratory of Plant Molecular Physiology, 3062, McCarty Hall, Gainesville, FL 32611; ²Embrapa Cerrados, P.O.Box 08223, 73310-970 Planaltina, DF, Brazil; ³Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. E-mail: altpeter@ufl.edu)

Elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) is the most productive perennial biomass grass for the Southern US and a prime candidate for production of lignocellulosic biofuel. Biomass yield and low input characteristics like nutrient uptake efficiency and abiotic and biotic stress tolerance are the main targets for genetic improvement of elephantgrass. Our research involves molecular marker analysis for the identification of superior parents and confirmation of crosses, intra and interspecific hybridization and selection of superior hybrids, chromosome doubling to restore fertility of triploid interspecific hybrids and genetic transformation to introduce transgenes for improved stress tolerance and quality. For the development of the first genetic transformation protocol of elephantgrass tissue culture, gene transfer and selection protocols for various explants including immature leaves, inflorescences and seeds were optimized. For chromosome doubling an *in vitro* protocol which improved the production of non-chimeric plants was developed. Interspecific hybridization between elephantgrass and pearl millet (*Pennisetum glaucum*) allows

improving important traits (e.g. drought tolerance, biomass quality and production). In contrast to elephantgrass and pearl millet, which produce large amounts of wind dispersed seeds, interspecific hybrids are male and female sterile due to triploidy ($2n = 3x = 21$) and do not produce seeds which contributes to biosafety. Chromosome doubling of the triploid hybrids may restore seed production and fertility, allowing backcrosses with elephantgrass to further enhance biomass production and persistence. Intra and interspecific elephantgrass hybrids with high agronomic performance were selected under field conditions. Chromosome doubling was obtained for all interspecific hybrids with superior biomass production and for the first time the generation of transgenic elephantgrass is reported.

Na Figura 34, apresenta-se o pôster desse trabalho.

Além do desenvolvimento de sete trabalhos científicos, foi escrito o capítulo *Biotecnologia Aplicada à Cultura do Maracujazeiro* do livro intitulado *Biotecnologia Aplicada à Agricultura* (Figura 35). Atualmente, estou coordenando o Programa de Caracterização de Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro na Embrapa. A biotecnologia e a genética possuem importância crucial dentro do programa. Durante o pós-doutorado realizei o treinamento em diferentes áreas da biotecnologia e genética, o qual permitiu a elaboração do capítulo com a ajuda dos colegas Eder Jorge de Oliveira, Solange Rocha Monteiro de Andrade, Ana Maria Costa e Nilton Tadeu Vilela Junqueira. No capítulo, foram apresentadas as principais aplicações e resultados promissores da biotecnologia geral e da biotecnologia moderna para o desenvolvimento e diversificação da cadeia produtiva do maracujá, enfocando as aplicações envolvendo a caracterização e uso de germoplasma e o melhoramento genético. Entre os tópicos abordados, merecem destaque a importância da biotecnologia para a cultura do maracujá, uso de recursos genéticos, melhoramento genético, cultura de células e tecidos, uso de marcadores moleculares, base de dados de sequências de DNA e proteínas, engenharia genética, controle biológico e uso de microrganismos nos sistemas de produção.

Figura 28. Pôster apresentado no In Vitro Biology Meeting 2011 (não disponível online).

Figura 30. Pôster apresentado no 3^o Annual Florida Energy Systems Consortium 2011 (não disponível online).

Figura 31. Pôster apresentado no 3rd Annual Florida Energy Systems Consortium 2011 (não disponível online).

Figura 32. Pôster apresentado no 3rd Annual Florida Energy Systems Consortium 2011 (não disponível online).

Figura 34. Pôster da síntese dos trabalhos realizados no pós-doutorado (não disponível online).

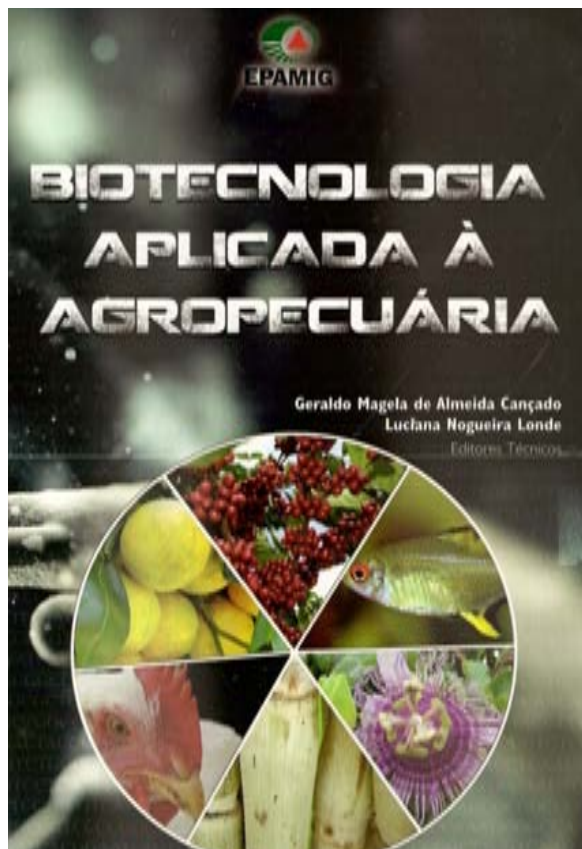


Figura 35. Capítulo *Biotecnologia Aplicada à Cultura do Maracujazeiro* do livro *Biotecnologia Aplicada à Agropecuária*.

BIOTECNOLOGIA NA CULTURA DO MARACUJAZEIRO

Fábio Gelape Faleiro¹
 Eder Jorge de Oliveira²
 Solange Rocha Monteiro de Andrade³
 Ana Maria Costa⁴
 Nilton Tadeu Vilela Junqueira⁵

1. INTRODUÇÃO

O termo biotecnologia pode ter diferentes significados, principalmente quando comparamos a biotecnologia clássica e a moderna. Faleiro e Andrade (2011) resumem o conceito de biotecnologia, com base na origem da palavra, sendo que *bio* significa vida, *tecnó* significa uso prático e aplicado da ciência e *logos* significa conhecimento, ou seja, conhecimentos que usam organismos, células e moléculas de forma prática na obtenção de bens e serviços. Diante desse conceito amplo de biotecnologia, podemos dizer que existem várias formas de aplicação na cultura do maracujazeiro, envolvendo o uso de organismos, incluindo a rica variabilidade do gênero *Passiflora*; o uso de células, incluindo as inúmeras aplicações da cultura de tecidos; e o uso de moléculas, incluindo as modernas análises do DNA e as avançadas técnicas de engenharia e transformação genética.

O maracujazeiro apresenta grande importância social e econômica no Brasil, o qual é o maior produtor e consumidor mundial. A análise da evolução da cadeia produtiva do maracujá no Brasil permite concluir que é uma cultura em franca expansão e que as ações de pesquisa e desenvolvimento têm sido de grande importância para este cenário (FALEIRO et al., 2008a). Entretanto, ainda existem muitos desafios e potencialidades a serem trabalhadas nas áreas de recursos genéticos, fitotecnia e, principalmente, na área de melhoramento genético (FALEIRO et al., 2006). Diante dos vários desafios e demandas para a pesquisa

¹Engº Agrônomo, D.Sc., Pesquisador EMBRAPA Cerrados, Planaltina, DF E-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br

²Engº Agrônomo, D.Sc., Pesquisador EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, E-mail: eder@cnpmf.embrapa.br

³Bióloga, D.Sc., Pesquisadora EMBRAPA Cerrados, Planaltina, DF E-mail: solange@cpac.embrapa.br

⁴Engº Agrônoma, D.Sc., Pesquisadora EMBRAPA Cerrados, Planaltina, DF E-mail:

Articulação de Novas Parcerias

Fui o primeiro pesquisador brasileiro a trabalhar no grupo de pesquisa do Dr. Fredy Altpeter. Dois outros pesquisadores brasileiros tiveram interesse em realizar treinamento no mesmo grupo de pesquisa: Dr. Aloisio Alcantara Vilarinho (Embrapa Roraima) e Dr. Carlos Eduardo Corsato (Unimontes). Esses pesquisadores iniciaram o treinamento em 2012. Por meio de discussões técnicas sobre os trabalhos realizados na Embrapa Cerrados e na Universidade da Flórida, foi possível verificar uma interface de interesses e uma complementaridade das pesquisas envolvendo o melhoramento genético de gramíneas. O Dr. Altpeter fará uma visita à Embrapa Cerrados para conhecer in loco os trabalhos realizados e iniciar o processo de articulação e fortalecimento da parceria Embrapa e Universidade da Flórida.

Importância dos Resultados Obtidos no Pós-Doutorado para a Embrapa

Marcadores moleculares RAPD, microssatélites e baseados em sequências de DNA têm sido utilizados com sucesso no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados, criado em 2002, como desmembramento do Laboratório de Biotecnologia, criado em 1999. Algumas das principais abordagens experimentais desde a criação do Laboratório de Genética e Biologia Molecular envolvem análises de marcadores moleculares, principalmente RAPD e microssatélites. Esses marcadores vêm sendo utilizados como ferramentas auxiliares em programas de melhoramento genético e em programas de caracterização e uso de germoplasma, dando suporte e melhorando a eficiência e competitividade de vários projetos, que estão em sintonia com o Plano Diretor da Embrapa e da Unidade.

Diversos projetos em andamento e aprovados em editais do SEG e em editais externos à Embrapa demandam diferentes análises realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular. Entre esses projetos, podemos destacar:

- Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares, MP2.
- Inovações Genômicas para o Descobrimento de Genes e Melhoramento Genético de Gramíneas, MP1.
- Desenvolvimento de cultivares de leguminosas forrageiras para os diferentes ecossistemas brasileiros, Unipasto.
- Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria* visando a diversificação e renovação de pastagens, MP2.
- Melhoramento genético da mangueira (*Mangifera indica* L.) por meio de métodos convencionais e biotecnológicos visando a criação e adaptação de cultivares com características superiores às existentes no mercado, MP2.
- Caracterização e usos inovadores de espécies frutíferas nativas do cerrado, MP2.
- Supporting emergence or reference drought tolerance phenotyping centres (GCP Drought Phenotyping Network Project) – Challenge Program Generation – Fenotipagem Trigo, Generation Program.
- Caracterização de genótipos de mandioca por meio de descritores morfológicos, caracteres agrônômicos, marcadores moleculares e caracteres bioquímicos em experimentos conduzidos em quatro locais do Cerrado do Brasil Central, CNPq Universal, Banco do Brasil.
- Conservação e caracterização de espécies silvestres de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) e utilização potencial no melhoramento genético, como porta-enxertos, alimentos funcionais, plantas ornamentais e medicinais, CNPq.
- Melhoramento genético do maracujazeiro (*Passiflora* spp.) visando sua utilização diversificada e valoração da biodiversidade essencialmente brasileira, CNPq.
- Fontes Alternativas de Biodiesel, MP1.
- Melhoramento genético de leguminosas forrageiras para recuperação de pastagens degradadas, MP2.

- Desenvolvimento tecnológico para uso funcional das passifloras silvestres - Passitec.
- Caracterização molecular de isolados de *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, PA MP3.
- Caracterização molecular de nematóides e de genótipos de bananeira com vistas ao controle de *Meloidogyne* spp. e de *Radopholus similis*, CNPq.

Com certeza, o treinamento realizado no pós-doutorado vai contribuir de forma efetiva em todos esses projetos, considerando que boa parte deles está em andamento e que grande volume de informações genômicas está sendo gerado em projetos recentemente finalizados que podem ser tratadas de forma mais eficiente, acurada e precisa com as novas metodologias de análise e novas ferramentas de bioinformática. Novos projetos estratégicos serão propostos, utilizando as diferentes metodologias e conhecimentos adquiridos durante o treinamento.

Além da contribuição técnica específica em cada projeto mencionado, o treinamento no exterior vai contribuir para: (1) ampliação da capacidade de uso de marcadores moleculares e análises de sequência de DNA e proteínas como ferramenta auxiliar em programas de melhoramento genético de espécies estratégicas para o Cerrado (cana-de-açúcar e outras plantas com potencial para produção de agroenergia, fruteiras tropicais, fruteiras nativas, forrageiras, leguminosas, cereais, madeiras etc.); (2) ampliação da capacidade de uso de análises genômicas e proteômicas para a caracterização molecular de plantas nativas do Cerrado visando sua conservação e utilização sustentável; (3) ampliação da capacidade de uso de análises genômicas e proteômicas para apoiar atividades de prospecção gênica e seus usos tecnológicos; (4) ampliação da capacidade de uso de análises genômicas, transcriptômicas e proteômicas em estudos de expressão gênica em sistemas vegetais (estresses bióticos, abióticos etc) visando entendimento de mecanismos e apoio a programas de melhoramento genético; e (5) ampliação da capacidade de análise e estabelecer novas metodologias biotecnológicas visando o suporte a diferentes atividades de pesquisa na Embrapa Cerrados.

Outro resultado do treinamento no exterior é a ampliação da quantidade e qualidade de programas de capacitação e treinamento técnico de estudantes e profissionais na área da biotecnologia aplicada. Com a criação do Laboratório de Genética e Biologia Molecular na Embrapa Cerrados, além do aumento da quantidade e competitividade dos projetos, importantes atividades de capacitação e treinamento técnico oferecidos nos últimos anos serão melhorados, merecendo destaque: (a) minicursos (1. Biotecnologia e melhoramento de plantas; 2. Biotecnologia aplicada à pesquisa agropecuária; 3. Aplicações práticas dos marcadores moleculares na pesquisa agropecuária); (b) cursos (1. Curso Internacional de Pré-melhoramento de Plantas; 2. Biotecnologia aplicada à Agropecuária); (c) palestras (várias); (d) estágios supervisionados (34 estudantes desde 2002); (e) orientações e coorientações de estudantes de mestrado e doutorado (21 estudantes desde 2002).

Considerações Finais

As inovações tecnológicas nas áreas da genética e biotecnologia tem sido fascinantes. Inúmeras possibilidades têm permitido o aumento da eficiência de programas de melhoramento genético vegetal. Várias técnicas de biologia e genética molecular estão disponíveis para obtenção de vários tipos de marcadores moleculares e, a cada ano, surgem novas. Algumas técnicas são mais robustas, possibilitando a obtenção de grande quantidade de polimorfismos genéticos em curto espaço de tempo e outras são mais simples demandando uma infraestrutura básica e baixa quantidade de reagentes e suprimentos. O conhecimento, treinamento e aplicação dessas novas técnicas vão permitir a melhoria da qualidade e competitividade dos atuais projetos executados na Embrapa Cerrados que utilizam ferramentas da biotecnologia moderna e abrir novas possibilidades e perspectivas de projetos científicos e tecnológicos que utilizam as ferramentas da biotecnologia e genética molecular na Embrapa Cerrados e instituições parceiras.

Referências

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, v. 220, p. 1049-1051, 1983.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, v. 77, p. 18-29, 2004.

Genetics and Applied Biotechnology to Plant Breeding: postdoctoral report

Abstract

In this document, the activities developed in the postdoctoral program at University of Florida about Genetics and Applied Biotechnology in vegetal breeding were related. The research involves molecular marker analysis, intra and interspecific hybridization and selection of superior hybrids, chromosome doubling to restore fertility of triploid interspecific hybrids and genetic transformation to introduce transgenes for improved stress tolerance and quality. For the development of the first genetic transformation protocol of elephant grass the tissue culture, gene transfer and selection protocols for various explants including immature leaves, inflorescences and seeds were optimized. For chromosome doubling an in vitro protocol which improves the production of non-chimeric plants was developed. Interspecific hybridization between elephant grass and pearl millet may allow improving important traits (e.g. drought tolerance, biomass quality and production). In contrast to elephant grass and pearl millet, which produce large amounts of wind dispersed seeds, interspecific hybrids are male and female sterile and do not produce seeds which will enhance biosafety. Chromosome doubling of the triploid hybrids may restore seed production and fertility, allowing backcrosses with elephant grass to further enhance biomass production and persistence. Activities about participation in scientific events and training were also related.

Index terms: transgenic, genetic engineering, chromosome doubling, tissue culture, hybridization, transformation protocol.

Embrapa

Cerrados

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA