

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
ÁREA: BIOTECNOLOGIA VEGETAL

Aluno: Kléber Saatkamp
Supervisor: Dra. Leandra Texeira Polo
Orientador: Dra. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial
para a conclusão do CURSO DE
GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
EM BIOTECNOLOGIA

PALOTINA – PR
Dezembro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

OBTENÇÃO DE PLANTAS DUPLO HAPLÓIDES DE TRIGO

Aluno: Kléber Saatkamp
Supervisor: Dra. Leandra Texeira Polo
Orientador: Dra. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial
para a conclusão do CURSO DE
GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
EM BIOTECNOLOGIA

PALOTINA – PR

Dezembro de 2013

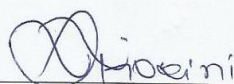
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE PALOTINA
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

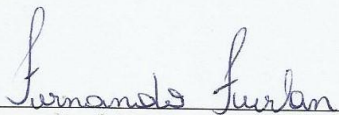
Universidade Federal do Paraná
Setor Palotina
Curso de Tecnologia em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso
Área de Estágio: Biotecnologia Vegetal
Acadêmico: Kléber Saatkamp
Supervisor do Estágio: Dra. Leandra Texeira Polo
Orientador do Estágio: Dra. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo

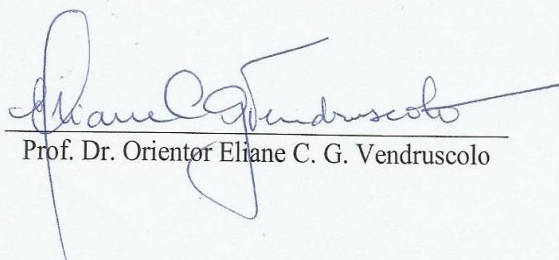
O PRESENTE TCC FOI APRESENTADO E APROVADO PELA
SEGUINTE BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dra. Adriana Fiorini



Prof. Dr. Fernando Furlan



Prof. Dr. Orientor Eliane C. G. Vendruscolo

Palotina, PR, 12 de dezembro de 2013.

Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.

Friedrich Nietzsche

Dedico esse trabalho aos meus pais e irmãos, pois eles são minha fortaleza, tenho grande amor e eterno respeito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois com ele mantive minha fé e perseverança.

À minha família em especial meu pai Konrad Roland Saatkamp e minha mãe Maria de Lurdes

Saatkamp por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões.

À Universidade Federal do Paraná que me auxiliou no crescimento intelectual e profissional.

À minha orientadora Dra. Eliane Cristina Gruzka Vendruscolo por ter me orientado durante

toda a minha graduação e pelos seus sábios ensinamentos.

A todos os meus professores da UFPR Setor Palotina pela dedicação e ensinamentos.

À Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC) pela oportunidade de realização

do estágio.

À minha supervisora Dra. Leandra Texeira Polo pelos ensinamentos e orientação.

A toda equipe do Núcleo de Biotecnologia da COODETEC pela amizade, carinho e

companheirismo.

Aos pesquisadores Dra. Fabiane Lazzari e Dr. Ivan Schuster me auxiliando e acompanhando

nesse período de aprendizado.

A toda equipe do Laboratório de Bioquímica e Genética (LABIOGEN), em especial a

Professora Doutora Marise Fonseca dos Santos.

Aos meus amigos de graduação, Andressa Caroline Patera, Angélica Luana Khel, Lucas

Schuster e Sílvia Leduc que durante estes três anos e meio descobrimos o valor da

amizade e mostrando que qualquer barreira é pequena quando se tem amigos.

Em especial aos meus amigos Alexandre Santana, Samaila Pujarra, Suélen Pujarra e Marco

Túlio Gomes pelo companheirismo, confiança e carinho. A vocês, muito obrigado.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e

não foram mencionados.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIACOES	viii
1 INTRODUÇAO	1
2 CARACTERIZAAO DO LOCAL DE ESTÁGIO	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 HISTÓRICOS DO TRIGO NO MUNDO	5
3.2 HISTÓRICOS DO TRIGO NO BRASIL	5
3.3 MELHORAMENTO GENÉTICO DO TRIGO	6
3.4 TÉCNICAS DE DUPLO-HAPLÓIDES EM TRIGO	6
4 OBJETIVOS GERAIS	9
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
5 MATERIAL E MÉTODOS	10
5.1 CULTIVO E OBTENAO DAS SEMENTES	10
5.2 EMASCULAAO	10
5.3 POLINIZAAO	10
5.4 APLICAÇAO DE 2,4-D	11
5.5 COLHEITA DAS ESPIGAS E PREPARO DAS CONDIOES <i>IN VITRO</i> PARA O DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS	12
5.6 TRANSPLANTE PARA VERMICULITE	12
5.7 TRATAMENTO COM COLCHICINA	12
5.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	14
5.9 OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NA UNIDADE DE ESTÁGIO	14
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
7 CONCLUSOES	18
8 ANÁLISE CRÍTICA	19
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Parâmetros morfológicos avaliados no processo duplo-haplóide.....	15
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Genótipos formados a partir de uma planta F1 por autofecundação e duplo-haploidização, considerando dois genes com dois alelos.....	8
FIGURA 2 - Esquema de aplicação de 2,4-D.....	11
FIGURA 3 – Processo de obtenção de plantas duplo-haplóides em trigo.....	13
FIGURA 4 – Processo de multiplicação e avaliação de linhagens a campo.....	17

LISTA DE ABREVIACÕES

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

OCEPAR – Organização das Cooperativas do Estado do Paraná.

COODETEC – Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola.

IAC – Instituto Agrônomo de Campinas.

DH – Duplo haplóide.

2,4-D - Ácido 2,4 diclorofenoxiacético.

OGM – Organismos Geneticamente Modificados.

DNA - Ácido desoxirribonucléico.

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

Mg - Miligrama

a.C – Antes de Cristo.

LN – Linhagem

NE - Número de Espigas

NS - Número de Sementes

NEM - Número de Embriões

NFPF - Número de plântulas em Foto periodismo

NPACC - Número de plântulas Aclimatadas em Câmara de Crescimento

TC - Tratamento com Colchicina

PR – Paraná

MG – Minas Gerais

GO – Goiás

MT – Mato Grosso

CD – Coodetec

MS - Murashige e Skoog

CIBio - Comissão Interna de Biossegurança

CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

CQB – Certificado de Qualidade em Biossegurança

1 INTRODUÇÃO

Cerca de dois terços da população mundial tem o trigo e seus derivados como base de sua dieta alimentar diária, sendo uma das principais fontes de calorias e proteínas na dieta humana (Jones, 2005). A produção nacional de trigo 2012/2013 foi de cerca de 4,3 milhões de toneladas (Conab, 2013). O consumo interno brasileiro é de 10,21 milhões de toneladas, sendo que sua produção anual oscila entre 5 e 6 milhões de toneladas, o que deixa o país à mercê dos países produtores para o suprimento deste déficit na produção (Conab, 2013), tornando assim o 5º maior importador de trigo (Café *et al.*, 2003).

A região oeste do Paraná se caracteriza pela agricultura extensiva de grãos, incluindo a triticultura. A região é responsável por uma grande produção deste cereal e exibe recordes de produtividade. Contudo, a triticultura paranaense fica a mercê de intempéries climáticas como veranicos que afetam a produção limitando o crescimento vegetal e a produtividade desta cultura. Aliado a este fato, o trigo exige uma intensa adubação nitrogenada o que encarece a sua produção, reduzindo a lucratividade do agricultor, desmotivando o aumento da área plantada.

O trigo é um cereal que possui várias espécies do gênero *Triticum*, sendo constituído por três grupos distintos de ploidia: diplóides, tetraplóides e hexaplóides, com número básico de cromossomos de 7, 14 e 21, respectivamente. A espécie mais importante no mundo que é a cultivada no Brasil é o *Triticum aestivum* L. (EMBRAPA, 2013).

Dois estratégias têm sido utilizadas para a obtenção de novas variedades: a primeira onde o melhorista procura desenvolver novas linhagens pela introdução de caracteres relacionados à produtividade (rendimento, capacidade de afilamento, tamanho da espiga, etc.) e a segunda onde o pesquisador procura identificar linhagens que tenham alta estabilidade de produção, resistência a moléstias e tolerância as adversidades ambientais. Entretanto, uma das grandes limitações no melhoramento de plantas autógamas, como o trigo, é o tempo necessário para se atingir a homozigose após a hibridação, já que o procedimento para a obtenção destas linhagens com alta homozigose requer várias gerações de autofecundação, sem contar com os testes que a nova linhagem terá que ser submetida até o seu lançamento como cultivar (SILVA, 2003).

Plantas duplo-haplóides são altamente valiosas em programas de melhoramento genético, pois constituem de uma alternativa para a geração de linhagens endogâmicas em reduzido período de tempo, quando comparada aos métodos tradicionais que envolvem

sucessivas autofecundações (Pioneer, 2013). Dentre as características vantajosas proporcionadas pelos duplo-haplóides pode-se citar a máxima variação genética, a completa homozigose e a redução do tempo e custo envolvidos na obtenção das linhagens (GEIGER e GORDILLO, 2009).

O cultivo de anteras “in vitro” visando à redução do tempo de obtenção de linhagens com alto grau de homozigose, em relação ao programa de melhoramento tradicional, torna mais rápida a liberação de novas cultivares (CAMARGO et al., 2003). Enquanto pelo processo convencional seriam necessárias de seis a nove gerações de autofecundação para obter elevado grau de homozigose, as plantas obtidas com base nesse método de melhoramento, conhecidas como diaplóides (DH), proporcionam 100% de homozigose em apenas uma geração (CAMARGO et al., 2006).

O programa de melhoramento genético de trigo tradicional despende muitos anos de intenso trabalho, em condição de campo, onde as plantas são selecionadas a partir de populações segregantes para se obter uniformidade genética. Por outro lado, é possível reduzir substancialmente o tempo despendido, utilizando-se a técnica da cultura de antera “in vitro”. Com essa técnica, obtêm-se plantas haplóides, que se podem tornar férteis com a duplicação do número de cromossomos utilizando-se a colchicina.

A Colchicina é um produto natural obtido da planta *Colchicum autumnale*, também conhecido como açafraão-do-prado e cólchico. É o agente antigota mais antigo que se conhece. Preparações feitas com essa planta datam de mais de 2000 anos e até hoje, é um dos medicamentos mais efetivos no tratamento da dor intensa associada à gota. Foi somente em 1820 que a colchicina, o princípio ativo do cólchico, foi isolado pelos químicos franceses Pelletier e Caventon. Sua configuração absoluta só foi descrita em 1955, por Corrodi e Hardegger.

A colchicina é um alcaloide tricíclico, contendo em sua estrutura uma trimetoxifenila (anel A), um anel de sete membros (anel B) com um grupo acetamida na posição 7, e um anel trolônico (anel C). A colchicina natural apresenta apenas um centro estereogênico no carbono 7, com configuração absoluta S, de acordo com sistema de nomeação de estereoisômeros descrito por Cahn-Ingold-Prelog.

Como a colchicina é capaz de interromper a divisão celular, os cientistas avaliaram se ela poderia ser um agente anticâncer. Porém, sua toxicidade impede que seja utilizada. A colchicina também é muito utilizada para fazer cariótipos de células para estudo devido a sua ação inibitória de polimerização das proteínas do fuso mitótico na fase de divisão celular, conhecida como metáfase. Na metáfase, os cromossomos se encontram no maior grau de

condensação, facilitando a observação ao microscópio. As plantas obtidas com base nesse tratamento apresentam 100% de homozigose, sendo convencionalmente consideradas diaplóides (DH). Essa técnica é muito valiosa nos programas de melhoramento genético, visto que a homozigose é alcançada em apenas uma geração (SALOMON et al., 2003).

A identificação de genitores de trigo que expressem a capacidade de elevar o número de embriões haplóides obtidos às populações segregantes formadas bem como a utilização de fontes de pólen que contribuam para o caráter podem ser de grande utilidade nos programas de melhoramento, permitindo com isso, auxiliar o melhorista em concentrar seus esforços nas combinações mais promissoras, orientando o sentido dos cruzamentos e do genótipo dos genitores paterno e materno a ser empregado (SILVA, 2004).

2 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

Em 1974, a Ocepar – Organização das Cooperativas do Estado do Paraná, criou seu Departamento de Pesquisa, voltada ao desenvolvimento e pesquisa de novas variedades e híbridos. Em 1995, as Cooperativas decidiram ampliar o projeto, instituindo a COODETEC - Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, que absorveu os trabalhos e o acervo genético até então desenvolvidos com o objetivo de desenvolver estrategicamente suas próprias tecnologias e cultivares de soja, trigo e híbridos de milho e reduzir o grau de dependência do governo e grandes capitais internacionais.

A COODETEC é uma empresa de base tecnológica voltada à agricultura, nacional e de propriedade exclusiva dos 185 mil agricultores filiados as 32 mais destacadas cooperativas de produção do Brasil. Formada por uma sede complexa de ensaios, um departamento de pesquisa estruturado, com modernos laboratórios de biotecnologia, entomologia, fitopatologia, sementes e solos. Possui sede em Cascavel/PR, onde mantém escritório central, centro de treinamento, além dos modernos laboratórios, câmaras secas e casas de vegetação. Outros centros de apoio e fazendas experimentais de Pesquisa da COODETEC estão localizados em Palotina/PR, Goioerê/PR, Paracatu/MG, Rio Verde/GO e Primavera do Leste/MT.

A COODETEC desenvolve melhoramento genético para as três principais culturas do Brasil: milho, soja e trigo, há 38 anos e lançou mais de 200 produtos agrícolas. Tem atuação no Paraguai e Bolívia e está estendendo para Uruguai e Argentina. A Cooperativa investe constantemente em tecnologia e orientação técnica e vê comprovada a eficácia de suas sementes, quando conquista o primeiro lugar no mercado brasileiro de trigo, além de manter a preferência absoluta entre os triticultores paraguaios. É detentora da maior participação de mercado entre as empresas nacionais de melhoramento de híbridos de milho. Também é a empresa que mais cresce em vendas neste concorrido segmento.

A infra-estrutura de pesquisa da COODETEC conta com um moderno Núcleo de Biotecnologia, composto por: laboratório de purificação de DNA, laboratório de marcadores moleculares, laboratório de genômica, laboratório de cultura de tecidos com sala de cultivo *in vitro* e um laboratório de análises de constituintes das sementes.

Todas as atividades executadas no Núcleo de Biotecnologia têm vínculo com os programas de melhoramento da COODETEC.

Principais atividades desenvolvidas no Núcleo de Biotecnologia da COODETEC:

- Caracterização e identificação do Banco genético básico convencional com genes de alto interesse, devidamente identificados;
- Criação de variedades transgênicas de interesse. Uso de marcadores no melhoramento;
- Cultura de tecidos;
- Obtenção de Diplóides;
- Microanálises;
- Análise de óleo e proteína.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HISTÓRICOS DO TRIGO NO MUNDO

A origem do trigo é bastante remota. O homem cultivava o trigo há pelo menos seis mil anos, no início, triturando entre pedras rústicas, para aproveitar a farinha. Foram encontrados grãos de trigo nos jazigos de múmias do Egito, nas ruínas das habitações lacustres da Suíça e nos tijolos da pirâmide de Dashur, cuja construção data de mais de três mil anos a.C (EMBRAPA, 2013).

O trigo é uma das culturas mais antigas do mundo, sendo essencial para o desenvolvimento da agricultura e da civilização humana. A economia de antigas cidades e civilizações, como Babilônia (Mianmar), Grécia, Creta, Egito e Roma, eram baseadas na cultura do trigo. A área geográfica de distribuição e domesticação do trigo coincide com a da civilização do homem e início da agricultura. O trigo, pré-domesticado, possuía características importantes, como sementes grandes, rápida germinação, ciclo anual e autofecundação, levando a rápida fixação dos mutantes desejáveis, o que deve ter influenciado os primeiros coletores de alimentos. O centro de origem e domesticação do trigo situa-se das montanhas de Zagros (Irã - Iraque) até as montanhas Taurin, na Turquia e as montanhas a sudoeste do mar Mediterrâneo (BORÉM & MIRANDA, 2005).

3.2 HISTÓRICOS DO TRIGO NO BRASIL

A chegada do trigo ao Brasil remonta ao período colonial. Ainda no século XVI, os portugueses que para cá vieram, tentaram o cultivo desse cereal no centro do país, como a iniciativa de Martin Afonso de Souza, em 1531, de cultivar trigo na Capitania Hereditária de São Vicente, que hoje corresponde ao Estado de São Paulo. Depois o trigo migrou para o sul, encontrando ambiente, clima e solo, mais adequados as suas exigências (EMBRAPA, 2013).

Depois da Segunda Guerra mundial, em 1954, surgiram as primeiras lavouras mecanizadas no Rio Grande do Sul que acabaram se consolidando por volta de 1960, com a política de amparo a triticultura e a moagem de trigo.

Atualmente os maiores produtores são os estados do Paraná e Rio Grande do Sul, responsáveis por mais de 90% da produção brasileira. Em nível mundial os maiores produtores são China, Índia, Estados Unidos e Rússia (BORÉM & MIRANDA, 2005).

3.3 MELHORAMENTO GENÉTICO DO TRIGO

O melhoramento genético vegetal é a mais valiosa estratégia para o aumento da produtividade de forma sustentável e ecologicamente equilibrada, associada ao emprego de melhores práticas culturais como manejo, adubação e irrigação adequados (BORÉM & MIRANDA, 2005).

O trabalho básico do melhoramento genético de plantas consiste em desenvolver genótipos que usem eficientemente os nutrientes do solo, a energia solar e outros fatores de ambiente que dêem uma maior produção econômica por área e que sejam adaptados às necessidades dos agricultores e dos consumidores. Portanto, o melhoramento genético tem sido um fator decisivo no aumento da produtividade agrícola (SILVA, 2011)

A introdução de plantas é considerada um método de melhoramento, pois contribui efetivamente para a melhoria do potencial genético em uma determinada região, podendo ser vista por dois prismas: introdução de germoplasma para ser usado como fonte de variabilidade em hibridações e o uso direto como uma cultivar em uma dada região, sempre observando a legislação vigente (RAMALHO *et al.*, 2001).

3.4 TÉCNICAS DE DUPLO-HAPLÓIDES EM TRIGO

Há previsão de que a haploidização transformará drasticamente a criação de linhagens puras de cereais, trazendo com isto substancial economia de tempo, podendo permitir alta variância genética entre linhas, melhor resposta à seleção devido a ausência do heterozigoto e grande valor como teste para identificar cruzamentos artificiais promissores. Num processo normal de autofecundação as espécies de flores perfeitas, onde os genitores diferem em apenas dois pares de locos independentes, o genótipo recessivo aabb tem a probabilidade de ser encontrado na proporção de 1/16 na população F2. Entretanto, se for utilizada a haploidia o mesmo genótipo terá a probabilidade de ocorrência de ¼, isso devido a ausência dos heterozigotos, prevalecendo apenas quatro genótipos homozigotos como mostra a Figura 1. Com a obtenção de linhas homozigotas a variância aditiva é maximizada, os efeitos de

dominância são neutralizados e as vantagens em caracteres quantitativos podem ser maiores, uma vez que a seleção é realizada somente com base na aditividade, não havendo interferência dos efeitos de dominância e epistasias (SILVA *et. al.* 2002).

Indivíduos haplóides são aqueles portadores de uma única cópia de cada cromossomo característico da espécie, ou seja, apresenta nas células somáticas o mesmo número de cromossomos característico das células gaméticas. No momento em que esses indivíduos haplóides (n) têm seu genoma duplicado ($n + n = 2n$), são denominados de di-haplóides para espécies com genomas diplóides ou duplo-haplóides para aquelas espécies que apresentam genomas poliplóides. Duas técnicas são basicamente utilizadas: i) Androgênese, pela cultura de anteras e micrósporos (grãos de pólen) e ii) Gimonogênese, pela cultura de ovários e/ou óvulos e pela cultura de embriões em cruzamentos interespecíficos ou intergenéricos, via eliminação somática (CARVALHO, 2008).

Como toda técnica inovadora, muita discussão tem ocorrido em torno do assunto, sendo apontadas vantagens e desvantagens do seu emprego no melhoramento de plantas. Os autores CARVALHO *et al.* (2008) apresentam as seguintes:

Vantagens: *i*) Linhagens homozigotas são obtidas em menor número de gerações (2 ou 3), reduzindo o tempo envolvido no desenvolvimento de linhagens; *ii*) a seleção entre progênies homozigotas, provenientes de duplo-haplóides pode ser mais eficiente do que a seleção entre e dentro de progênies heterozigotas, quando realizadas pelos métodos clássicos; *iii*) não ocorre mudanças no momento da seleção, entre indivíduos homozigotos dominantes e heterozigotos.

Desvantagens: *i*) o ganho de tempo obtido no desenvolvimento de linhagens homozigotas pelo processo de DH pode ser perdido em função do aumento de tempo requerido para as avaliações a campo das linhagens homozigotas. Por outro lado, no processo de aclimação, o melhorista pode ir observando o desempenho de suas plantas durante a condução, já conduzindo a uma pré-adaptação e descartando as constituições genéticas indesejáveis em gerações precoces; *ii*) a técnica de obtenção de DH pode requerer equipamentos especiais e técnicos especializados, inviáveis em alguns programas de melhoramento; *iii*) para reduzir os efeitos da escassez dos recombinantes desejados é necessário que indivíduos haplóides sejam obtidos com alta frequência, o que em muitos casos torna-se difícil, trabalhoso e oneroso; *iv*) ausência de heterozigotos desfavorece o balanceamento com o ambiente, fator de grande importância na formação de indivíduos homozigotos com alto potencial e elevada capacidade adaptativa

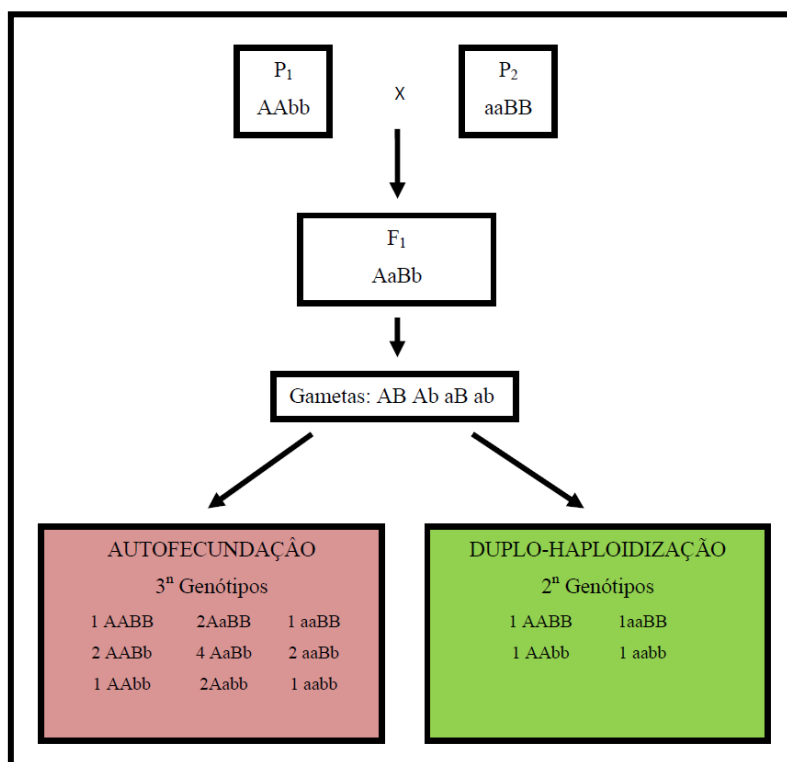


FIGURA 1 – Genótipos formados a partir de uma planta F₁ por autofecundação e duplo-haploidização, considerando dois genes com dois alelos. CARVALHO et al. (2008).

O cruzamento interespecífico surgiu para superar as dificuldades encontradas na cultura de anteras, além de propiciar maior eficiência na obtenção de haplóides abrindo novos horizontes para a técnica na cultura de trigo.

4 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho objetivou avaliar o processo de Duplo-Haplóide das cultivares de trigo do Programa de Melhoramento Genético da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC).

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a quantidade de sementes por espiga apta para o resgate de embriões de trigo duplo-haplóide, juntamente com o desenvolvimento dos mesmos em condição *in vitro*.

Estabelecer a quantidade de plântulas desenvolvidas e aptas para a transferência do ambiente escuro para condições de foto periodismo.

Observar a utilização da colchicina para a duplicação cromossômica e início do processo de aclimação das plântulas em câmara de crescimento e casa de vegetação.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos em telado, casa de vegetação e no Laboratório de Cultura de Tecidos do núcleo de Biotecnologia, pertencentes à COODETEC, localizados no município de Cascavel – PR, de setembro a novembro de 2013.

5.1 CULTIVO E OBTENÇÃO DAS SEMENTES

Foram obtidas sementes F_1 de cruzamentos entre linhagens elite de trigo de interesse para o programa de melhoramento da Empresa. Estas foram semeadas em vasos em telado para fins de multiplicação de sementes e para propiciar condições para quebra de blocos de ligação, aumentando assim as taxas de recombinação. As sementes F_2 obtidas foram novamente semeadas em vasos, desta vez em casa de vegetação, com temperatura e umidade controladas.

Como fontes de pólen foram utilizados híbridos de milho CD 384, CD 316, CD 397, CD 324 da COODETEC, semeados em intervalos de sete dias em casa de vegetação.

5.2 EMASCULAÇÃO

A emasculação foi realizada com a retirada dos antécios centrais, corte das glumas e a retirada das anteras na fase em que a espiga apresentasse $\frac{3}{4}$ do seu tamanho fora da bainha. As aristas das espigas foram cortadas com tesoura para poda e com o auxílio de pinça as espiguetas foram abertas e as 3 anteras de cada espiguetas foram removidas. Após este processo as espigas foram cobertas com envelopes de papel manteiga para a proteção e umidade aos ovários.

5.3 POLINIZAÇÃO

Entre 3 a 5 dias após a emasculação, foi realizada a polinização nas espiguetas que foram abertas com o auxílio de pinça e inserido pólen de milho híbrido com o auxílio de pincel sobre os ovários.

5.4 APLICAÇÃO DE 2,4-D

Após a polinização entre 24 e 48 horas, aplicou-se solução de 2,4-D (*ácido 2,4 diclorofenoxiacético*) na concentração de $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ no colmo da planta com auxílio de seringa visando favorecer o desenvolvimento do embrião.

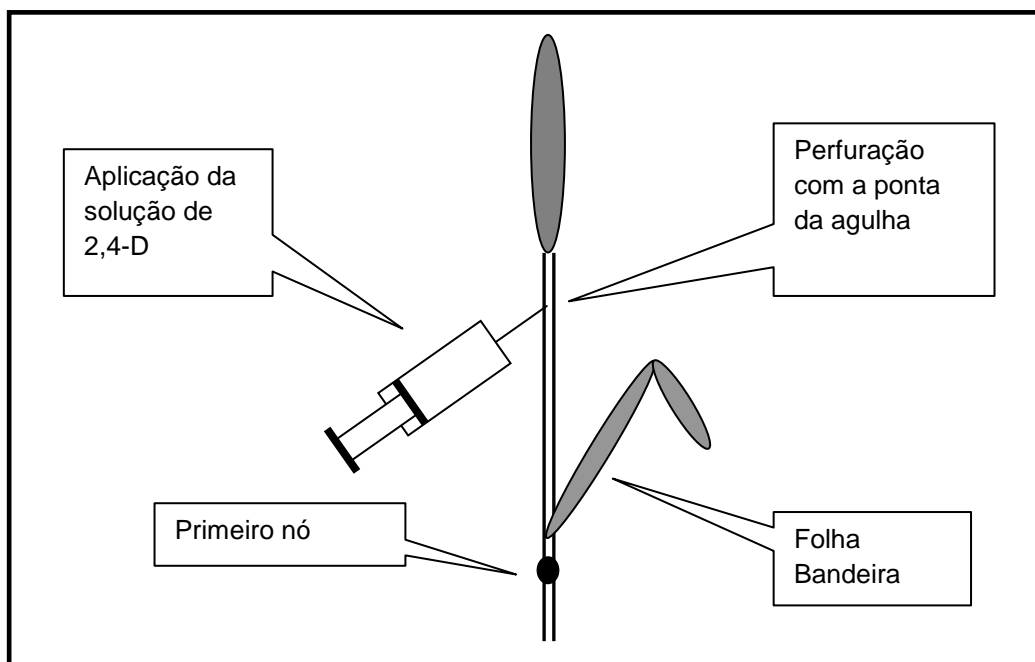


FIGURA 2 - Esquema de aplicação de 2,4-D (SAATKAMP, 2013)

O colmo foi perfurado bem próximo à espiga e após a injeção da solução foi feita pouco acima do primeiro nó, até a saída de uma gota na perfuração acima, como mostra a Figura 2. Como trigo ($6n=3x=60$ cromossomos) e milho ($2n=2x=20$ cromossomos) são espécies diferentes, na fecundação do óvulo pelo grão de pólen não ocorre pareamento cromossômico, pois se trata de um cruzamento interespecífico induzido por regulador de crescimento (2,4-D). Assim os embriões formados serão haplóides, apresentando apenas os cromossomos maternos.

5.5 COLHEITA DAS ESPIGAS E PREPARO DAS CONDIÇÕES *IN VITRO* PARA O DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS

Entre 15 e 20 dias após a polinização realizou-se a colheita das espigas imaturas de trigo que estavam na casa de vegetação. Estas foram levadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos onde as sementes imaturas foram retiradas das espigas e em seguida as sementes foram desinfestadas com três lavagens com uma solução de hipoclorito de sódio 50% seguidas de três enxágues com uma solução de álcool 70% e por último três lavagens com água destilada autoclavada. Posteriormente, na câmara de fluxo laminar, os embriões haplóides imaturos foram resgatados com auxílio de bisturi e estereomicroscópio. Estes embriões foram então acondicionados em tubos de ensaio contendo meio de cultivo sólido MS (Murashige e Skoog). Os embriões haplóides resgatados foram incubados nos tubos de ensaio, permanecendo sete dias no escuro e após, transferidos para a luz (fotoperíodo de 14:10 hs luz/escuro), ficando em câmara de crescimento por mais 30 a 60 dias para o desenvolvimento da plântula haplóide.

5.6 TRANSPLANTE PARA VERMICULITE

Após as plântulas apresentarem bom desenvolvimento do sistema radicular e aéreo (aproximadamente 30 dias de luz), estas foram retiradas dos tubos de ensaio e as raízes foram lavadas em água corrente para retirada do meio de cultura. As pontas secas e amarelas foram cortadas e transplantadas em potes com vermiculite, previamente embebido com solução nutritiva de Hoagland (2 partes de água: 1 parte de solução nutritiva) (HOAGLAND and ARNON, 1950) e identificados segundo o código proveniente do cruzamento realizado no setor de pesquisa do trigo.

5.7 TRATAMENTO COM COLCHICINA

O tratamento com colchicina visa duplicar os genomas das plantas com bom desenvolvimento. A colchicina atua na formação das fibras do fuso mitótico, impedindo a migração dos cromossomos para os pólos da célula, formando assim células com o número cromossômico duplicado.

Após aproximadamente 15 dias as plântulas foram retiradas do pote com vermiculite e lavadas com água corrente. Foram despontadas as folhas e cortadas as raízes, deixadas com aproximadamente 5 cm. Após esse processo as plântulas são condicionadas em Becker contendo solução de colchicina (0,25%) e DMSO 2% (Dimethyl Sulfoxide), durante 3 horas deixando a coroa das plântulas submersas na solução. Conseqüentemente as plântulas foram enxugadas e novamente transplantadas para vasos contendo terra e vermiculite na proporção (1:1). Como mostra a Figura 3, o processo de obtenção de plantas duplo-haplóide é demorado e espera-se que com o tratamento com colchicina, alguns dos novos perfilhos formados apresentarão cromossomos duplicados.

Em seguida, as plântulas são aclimatizadas em casa de vegetação para multiplicação e desenvolvimento das sementes. Estes processos não foram totalmente acompanhados devido ao tempo de estágio na Cooperativa ter terminado e o ciclo completo da técnica duplo-haplóide levar mais de 4 meses.

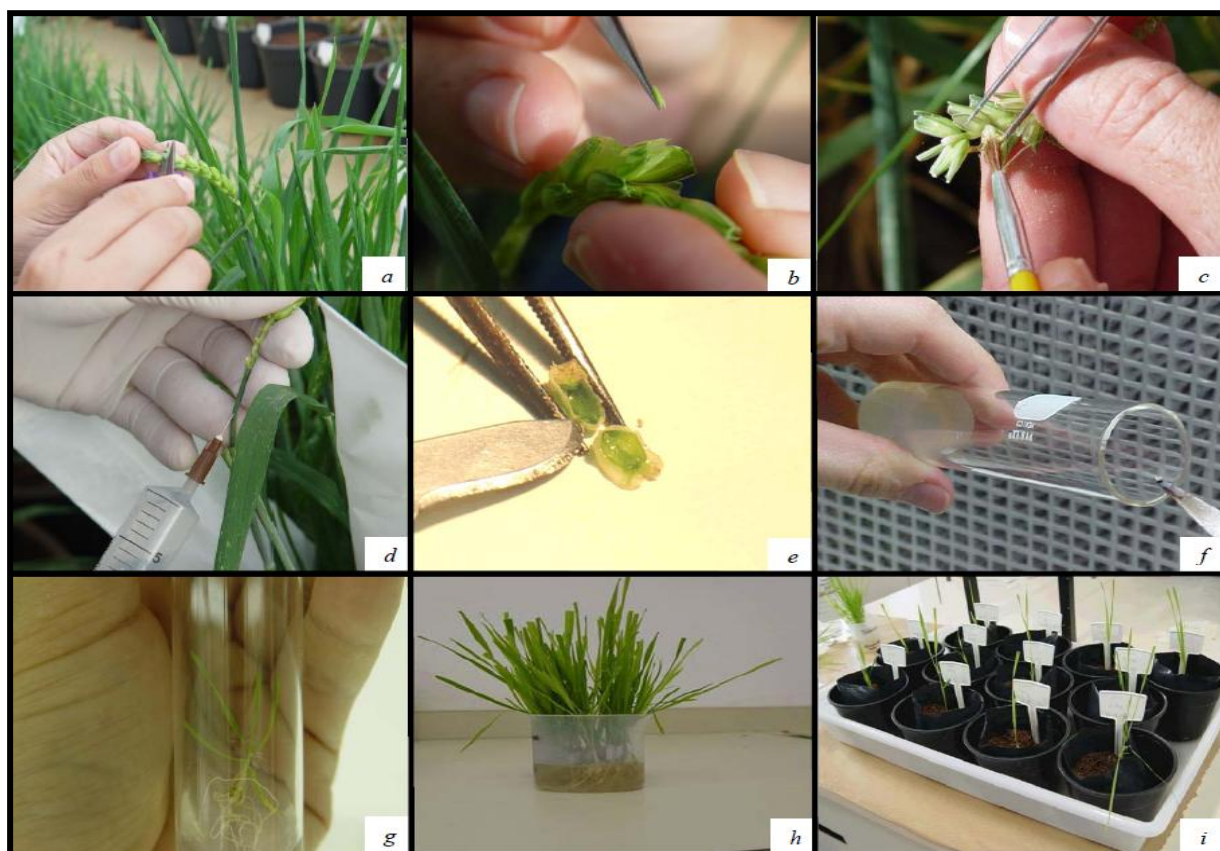


FIGURA 3 – Esquema do processo de obtenção de plantas duplo-haplóides em trigo. Emasculação (a e b); Polinização artificial com pólen de milho (c); Aplicação de hormônio 2,4-D no internódio proximal da espiga (d); Resgate do embrião haplóide (e); Acondicionamento e crescimento do embrião haplóide em tubo de ensaio (f e g); Tratamento de plântulas haplóides com colchicina (h); Transplante de plântulas tratadas com colchicina para vasos com substrato (i). COODETEC, Cascavel - 2013.

5.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os dados obtidos foram avaliados por estatística descritiva. Foram avaliadas quatro linhagens, denominado de tratamentos. As mesmas são oriundas de cruzamentos de diferentes genótipos. De cada linhagem, foram utilizadas todas as espigas disponíveis no dia da coleta, por isso o número inicial para cada linhagem/tratamento é diferente. As plântulas obtidas foram sempre agrupadas pela linhagem inicial.

5.9 OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NA UNIDADE DE ESTÁGIO.

Durante o período de estágio, outras atividades puderam ser vistas dentro dos laboratórios da área de biotecnologia: algumas análises no Laboratório Físico Química, tais como teste ELISA e outros testes para detecção de OGM em amostras de milho; e análise da quantidade de óleo e glúten presentes em amostras de soja. Posteriormente, foram desenvolvidos os métodos de extração de DNA de soja e preparo de soluções e meio de cultivo no Laboratório de Extração e Preparação de amostras. No Laboratório de Marcadores Moleculares foram preparadas as amostras de DNA para serem seqüenciadas e analisadas posteriormente e a utilização de alguns oligos específicos para esta atividade.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Programa de Melhoramento de Trigo iniciou os trabalhos com duplo-haplóides no ano de 2006 com o objetivo primário de conhecer e dominar a técnica para futuras aplicações no avanço de gerações segregantes promissoras.

Os resultados obtidos em diferentes etapas durante o período de avaliação do processo de obtenção de duplo - haplóide de trigo estão dispostos na Tabela 1. É possível perceber que a linhagem 460 foi a que evidenciou maior número de espigas desenvolvidas no processo do melhoramento. Em relação ao número de sementes, a linhagem 474 apresentou os melhores resultados em relação às outras linhagens de trigo analisadas apresentando 1626 sementes.

TABELA 1: Parâmetros morfológicos avaliados no processo duplo-haplóide.

Características avaliadas nas linhagens utilizadas durante a técnica						
LN	NE	NS	NEM	NPFP	NPACC	NPTC
460	220	1343	262	135	100	97
474	140	1626	496	234	187	174
484	130	1282	166	97	69	64
451	93	1277	207	135	135	120

LN (Linhagem), NE (Número de Espigas), NS (Número de Sementes), NEM (Número de Embriões), NPFP (Número de plântulas em Foto periodismo), NPACC (Número de plântulas aclimatadas em Câmara de Crescimento) e NPTC (Número de plântulas com Tratamento com Colchicina).

O número de embriões formados e resgatados foi considerado baixo para a maioria das linhagens trabalhadas (Silva et., al. 2004). Fato este considerado importante, e que necessita de uma série de trabalhos que possibilitem elevar a taxa de embriões haplóides resgatados. Após o desenvolvimento desses embriões no período de aclimação no escuro, estes são dispostos em ambiente com luz considerando o foto periodismo de 14 horas luz / 10 horas escuro como forma de avaliação e os quais apresentaram valores médios, apresentando a menor porcentagem de desenvolvimento para a linhagem 474 com 47% e maior valor para a linhagem 451 com 65%, A aclimação no escuro se caracteriza na melhor fase em que plântulas se adaptam à luminosidade com pleno desenvolvimento, onde as plântulas são

consideradas aptas e sadias para a próxima etapa da técnica duplo - haplóide. Na fase de aclimatação na câmara de crescimento todas as linhagens apresentaram bons resultados (74, 80, 71 e 100%) respectivamente, as poucas perdas apresentadas foram devido a algumas contaminações fúngicas ou pelo baixo vigor das plântulas.

Em seguida, para o tratamento com colchicina, os resultados para a linhagem 474 foi a que obteve maior número de plântulas tratadas com colchicina (174) e a linhagem 484, ao menor número (64). Após o processo de duplicação dos genomas, as plantas foram submetidas em condições de telado para produção de afilhos férteis, ambiente adverso às condições normais de desenvolvimento da espécie, o que reduziu consideravelmente o número de plantas sobreviventes. Desta forma, ficou evidente que após o processo de duplicação, o cultivo das plantas em casa de vegetação com controle de ambiente também assume importância, principalmente pela maior estabilidade e previsibilidade de produção de genótipos duplo-haplóides recombinantes. (SILVA et., al. 2008).

A provável existência de efeitos distintos entre as fontes de pólen sobre o número de embriões resgatados representa o caráter mais importante a ser estudado, principalmente devido à reduzida frequência de embriões haplóides recuperados. Fato este, comprovado pelos resultados apresentados em que houve uma eficiência de 6,4%, sendo que nas etapas subsequentes que vai do desenvolvimento da planta haplóide até duplicação de cromossomos e produção de sementes, a eficiência se dá em torno de 50%, confirmando desta forma, que a fase inicial de obtenção de embriões é o estágio limitante da técnica de duplo-haploidização. Este fato evidencia, portanto, a necessidade do conhecimento pelo melhorista do desempenho dos genótipos doadores do grão de pólen, visto que podem representar estratégia eficiente para o incremento na frequência de embriões imaturos recuperados.

Vários fatores estão envolvidos no sucesso da obtenção de haplóides por cruzamento trigo x milho como a constituição genética dos genitores, o período de emasculação e polinização, o resgate dos embriões e os meios de cultura antes e depois da polinização, bem como condições adequadas de ambiente como luz, temperatura e outros.

Não foi possível acompanhar a etapa seguinte e final, correspondente à avaliação do desempenho das plântulas duplo-haplóides (DH) em casa de vegetação, devido ao término do período do estágio. Mas algumas características agronômicas são consideradas na avaliação de plantas ou variedades no melhoramento genético de trigo pela técnica duplo – haplóide como altura e acamamento. De acordo com Salomon, (2001) as linhagens diplóides de trigo obtidas via cultura de anteras apresentaram correlações positivas e significativas entre altura

das plantas e acamamento, indicando uma tendência de os genótipos mais altos apresentarem as maiores porcentagens de acamamento.

Na COODETEC, nos anos de 2007, 2008 e 2009 foram obtidas 176, 207 e 400 linhagens duplo-haplóides (DH), respectivamente. Destas, cerca de 30 a 40% foram selecionadas e levadas a ensaios preliminares. No ano de 2010, o número de linhagens DH produzidas permaneceu constante em relação ao ano anterior. Atualmente, cerca de 20 linhagens DH promissoras participam de ensaios de Valor de Cultivo e Uso coordenados pelo Programa de Melhoramento (Figura 4) e também em blocos de cruzamento dirigido.

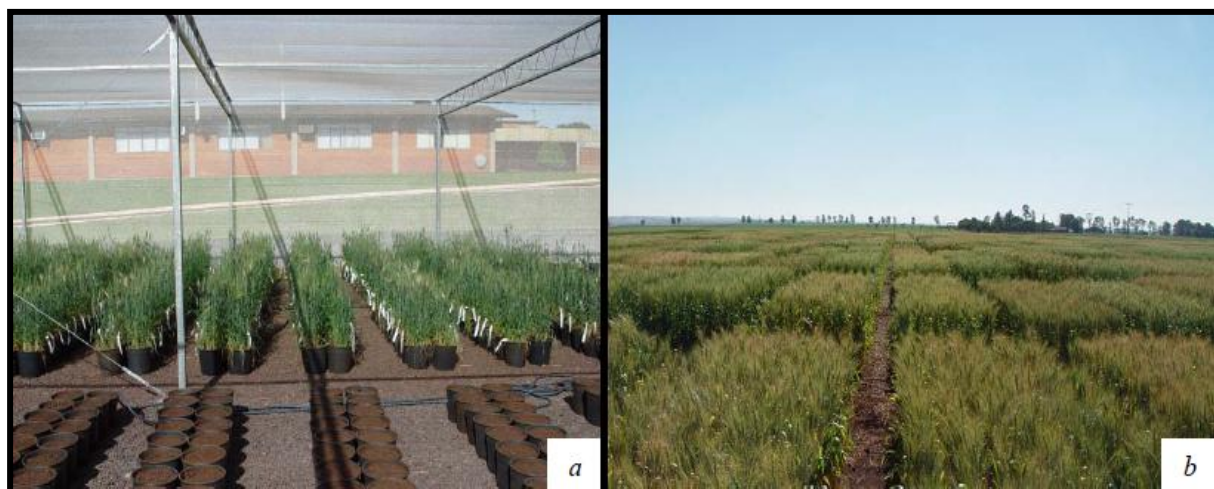


FIGURA 4 – Processo de multiplicação e avaliação de linhagens a campo. Multiplicação de sementes em telado (a) e avaliação de linhagens a campo (b). COODETEC, Cascavel – 2013.

7 CONCLUSÕES

-Foram observadas todas as etapas do processo de obtenção do duplo-haplóide

-A linhagem 474 foi a que obteve maior eficiência, pois obteve os maiores índices para os parâmetros avaliados e a linhagem 484 apresentou a menor eficiência.

8 ANÁLISE CRÍTICA

Ao acompanhar as atividades relacionadas à técnica duplo-haplóide em trigo, sugere-se a mudança de alguns pontos críticos na casa de vegetação, como a umidade excessiva do local propiciando condições ótimas para o desenvolvimento de fungos e conseqüentemente os danos causados para as plantas polinizadas e sugere-se também a melhor organização dos vasos contendo as plantas de trigo e de milho, pois a luminosidade do local não é favorável para todas as plantas, dificultando o desenvolvimento.

Há diversos trabalhos científicos na literatura que mostram que o momento certo da realização da polinização é no período da manhã devido à viabilidade do pólen do milho, porém esse cuidado não está sendo tomado, reduzindo o desenvolvimento de embriões sadios.

Este estágio foi importante para a minha carreira profissional, pois obtive ótimos conhecimentos, apesar do curto prazo de estágio, aprendi a tomar decisões e desenvolver meu lado profissional dentro de uma empresa de pesquisa.

O estágio também contribuiu para o desenvolvimento de trabalho em equipe, saber lidar com situações inesperadas e também propiciou novas amizades e contatos com profissionais do ramo da biotecnologia. Atualmente, continuo realizando estágio não obrigatório no laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia da COODETEC, finalizando o processo da técnica duplo-haplóide e ajudando da melhor forma possível para o desenvolvimento da empresa.

Em relação ao meu processo de graduação do curso superior de Tecnologia em Biotecnologia, ficam aqui meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que fizeram parte direta ou indiretamente desta fase e principalmente a oportunidade de estágio em uma empresa que tem como ferramenta principal a biotecnologia.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. Melhoramento de plantas. – 4.ed. – Viçosa : UFV, 525p., 2005.
2. CAFÉ, S. L., P. S. M. D. FONSECA, et al. Cadeia produtiva do trigo: BNDES Setorial. p.193-220, 2003.
3. CARVALHO, F.I.F.; LORENCETTI, C.; MARCHIORO, V.S.; SILVA, S.A.; Condução de populações no melhoramento genético de plantas. 2 ed. Revisada e ampliada. Pelotas: UFPel, 2008.
4. CAMARGO, C. E. O.; FELÍCIO, J.C.; FERREIRA FILHO, A. W. P.; BARROS, B. C.; FREITAS, J. G. de; PETTINELLI JÚNIOR, A.; GALLO, P. B.; KANTHACK, R. A. D. Melhoramento do trigo XXV. Avaliação de genótipos oriundo de populações híbridas introduzidas de Oregon (EUA) no Estado de São Paulo. *Bragantia*, v. 50, n. 2. P. 225-246, 2003 a.
5. CAMARGO, C. E. O.; RAMOS, L. C. S.; FERREIRA FILHO, A. W.P.; FELÍCIO, J. C.; PETTINELLI JUNIOR, A.; CASTRO, J. L. de; YOKOO, E. Y. Linhagens diaplóides de trigo: produção de grãos, característica agrônômica e tolerância à toxicidade de alumínio. *Bragantia*, v. 58, n. 2, p. 235-246, 2006.
6. CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos 2009/2010, décimo primeiro levantamento agrícola – agosto, 2013. Brasília: CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, 2013.
7. CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 28 de outubro de 2013.
8. COODETEC. Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola. Disponível em: <http://www.coodetec.com.br/auditoria.asp>> Acesso em: 28 de outubro de 2013.

9. DOWD L. M., Medical College of Virginia. Disponível em: <http://www.pharmacy.vcu.edu/medchem/articles/colchicine/index.html>> Acesso em: 16 de dezembro de 2013.
10. EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Trigo. História do Trigo. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/aunidade/histori.htm>> Acesso em: 07 de novembro de 2013.
11. GEIGER, H.H.; GORDILLO, G.A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica*, v.54, p. 485-499, 2009.
12. HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agr. Exp. STA. Cir*, 347p., 1950.
13. JONES, H. D. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *Journal of Cereal Science*, v. 41, n. 2, p. 137-147, 2005.
14. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* v. 15, p.473-479, 1962.
15. PIONEER SEMENTES. Artigos. Disponível em: <http://www.pioneersementes.com.br/ArtigosDetalhe.aspx?Id=90>. Acesso em: 05 de novembro de 2013.
16. RAMALHO, M.A. P.; ABREU, A. de F. B.; SANTOS, J. B. dos. Melhoramento de espécies autógamas. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C.(Ed.) Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas. Rondonópolis, MT, Fundação MT. p.1-28, 2001.
17. SALOMON, M.V.; CAMARGO, C.E.O.; PETTINELLI JUNIOR, A.; AZEVEDO FILHO, J A. Performance of dihaploid wheat lines obtained via anther culture. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v.60, n.1, p. 43-50, 2003.
18. SALOMON, M. V. Trigo: Avaliação de linhagens diaplóides obtidas via cultura de anteras. 2001. 91f. Tese (Mestrado em Agronomia) – ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

19. SILVA, J.A.G.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C. et al. Populações e fontes de pólen como fatores potenciais na formação de embriões haplóides em cruzamento intergenérico. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v.10, n.1, p.31-36, 2004.
20. SILVA, J. A. G. Produção de haplóides e obtenção de Di-Haplóides em trigo submetidos a cultura hidropônica ara a seleção de caracteres de importância agrônômica. – Pelotas, 2003, - 90f. : il. Dissertação (Mestrado). Fitomelhoramento. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2003.
21. SILVA, José A.G. da; CARVALHO, Fernando I. F. de; SILVA, Simone A; et., al. Temperatura e seus efeitos na polinização para a obtenção de embriões haplóides de trigo em cruzamento intergenérico. *Revista brasileira Agrociência*, v. 8, n. 2, p. 97-102, mai-ago, 2002.
22. SIILVA, José A.G. da; CARVALHO, Fernando I. F. de; SILVA, Simone A; et., al. Populações e fontes de pólen como fatores potenciais na formação de embriões haplóides em cruzamento intergenérico. *34 R. bras. Agrociência*, v. 10, n. 1, p. 31-36, jan-mar, 2004.
23. SILVA G. A. J. da; CARVALHO F. I. F. de; HARTWIG I; et al. Efeito materno e fontes de pólen na obtenção de haplóides e de duplo-haplóides em trigos “stay-green”. *R. Bras. Agrociência*, Pelotas, v.14, n.1, p.49-57, jan-mar, 2008.
24. SILVA, M. F. Desempenho de genótipos de trigo em condições edafoclimáticas distintas do estado de São Paulo. - Campinas, 2011. - 102f. : Dissertação (Mestrado). Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia. Instituto Agrônômico (IAC). Campinas, 2011.