



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA – FAV

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NA EMPRESA
LONGPING HIGH-TECH (CITIC GROUP), NA CIDADE DE CRAVINHOS-SP,
DURANTE O SEGUNDO SEMESTRE DE 2020**

ANA CLARA RIBEIRO QUITANIA

MONOGRAFIA DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA – DF
DEZEMBRO/2020

ANA CLARA RIBEIRO QUITANIA

Relatório de estágio das atividades desenvolvidas na empresa LongPing High-Tech (CITIC GROUP), na cidade de Cravinhos-SP, durante o segundo semestre de 2020

Trabalho de conclusão de curso apresentada à Banca Examinadora da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária como exigência final para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo. Orientador: Prof. Dr. Danilo Batista Pinho

BRASÍLIA – DF
DEZEMBRO/2020

Memorando nº 01_04122020/2020/IB /
FIT

Em 04 de dezembro de 2020.

Para:	Coordenador do Curso de Graduação em Agronomia
Assunto:	Banca de Monografia de TCC não presencial

Prezado Professor Márcio,

Solicito a autorização do Colegiado do Curso de Graduação em Agronomia para a realização não presencial da banca de monografia do Trabalho de Conclusão de Curso da estudante Ana Clara Ribeiro Quitania (150116781).

A realização da banca está prevista para o dia 17 de dezembro de 2020, às 14 h, utilizando a plataforma Teams do Office 365. A pesquisadora Alessandra Alves Martins, CPF 091.775.776-98, e o pesquisador Lander Santos de Oliveira, CPF 419.411.138-93, aceitaram o convite para compor a banca de avaliação.

A apresentação não presencial justifica-se pela situação de provável formando do estudante, faltando somente o trabalho de TCC para concluir os créditos. A estudante, assim como os pesquisadores membros da banca, concordam com a avaliação neste formato.

Att.



Documento assinado eletronicamente por **Danilo Batista Pinho, Professor(a) de Magistério Superior do Instituto de Ciências Biológicas**, em 04/12/2020, às 09:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Clara Ribeiro Quitania, Usuário Externo**, em 09/12/2020, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Lander Santos de Oliveira, Usuário Externo**, em 10/12/2020, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Alves Martins, Usuário Externo**, em 10/12/2020, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.unb.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, José Dias e Solange Maria, também ao meu irmão Lucas Ribeiro, sendo esses o meu alicerce.

Toda minha família e amigos. Todos que de alguma forma contribuíram na minha formação pessoal e profissional.

Agradeço a Deus pela presença de cada um ao longo desse percurso, e pela concretização de mais uma etapa em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Virgem Maria, que em sua infinita sabedoria e misericórdia, colocou força em meu coração para vencer esta etapa. Aos servos da Renovação Carismática Católica que sempre me colocaram em suas orações.

A minha amada família por ter apoiado nas minhas decisões, meus sonhos e objetivos, meu pai José Dias, minha mãe Solange Maria e meu irmão Lucas Ribeiro sendo esses os principais responsáveis por essa grande conquista. Meus avós José Paulo e Conceição pelas experiências e inspirações passadas, tios, tias e primos que sempre torceram por mim e contribuíram para essa conquista.

A família Lima Gesteira, que desde o meu nascimento sempre esteve presente em minha vida, apoiando e incentivando meus passos.

Ao meu namorado, Charles Chou, pelo carinho e companheirismo, principalmente, nessa reta final.

Alguns amigos, obrigado por mostrarem o valor da amizade. Sei que a minha felicidade é a felicidade de vocês, Sidnéya, Micaella, Ritta, Carol, Taynara, Amanda, Matheus, Maycon e Herlen. Aos amigos e colegas de curso, pelas festas, grupo de estudos, todos os altos e baixos durante a trajetória do curso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Danilo Batista Pinho e ao departamento de Fitopatologia da UnB, por todo aprendizado durante o curso, pela confiança e pela paciência que tiveram comigo. Por toda a minha vida serei grata a vocês.

A empresa LongPing High-Tech, aos engenheiros agrônomos Roberto Carvalho, Alessandra Martins, Acácio Miotto e Diego Resende, aos biotecnologistas Lander Oliveira e Michelle Pacheco, e aos técnicos agrícolas André, Carlos e Donizete por todos os aprendizados durante o período de estágio, pela paciência em responder todas as minhas dúvidas, pela oportunidade e receptividade que tiveram comigo na empresa, serei sempre grata a vocês pelos conhecimentos adquiridos tanto profissional quanto pessoal.

A todos os funcionários da LongPing High-Tech, por terem me recebido com muito carinho e atenção e pelo conhecimento transmitido.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1. A cultura do milho	12
3.2. Melhoramento genético na cultura do milho	13
3.3. Estratégias de melhoramento na cultura do milho	14
4. DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	18
4.1. Caracterização da região e o local de desenvolvimento do estágio	18
4.2. Apresentação da Empresa	18
5. ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O ESTÁGIO	20
5.1. Plantio e colheita das espigas	20
5.2. Preparo de Agrobacterium	21
5.3. Preparo de meio de cultura	21
5.4. Resgate e transformação de embriões imaturos de milho	21
5.5. Cultivo de embriões somáticos e seleção de transformantes	22
5.6. Transplântio e coleta foliar	23
5.7. Análises dos eventos	23
5.8. Aclimação e cultivo de transformantes	24
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
7. REFERÊNCIAS	27

QUITANIA, A.C.R. **Relatório de estágio das atividades desenvolvidas na empresa LongPing High-Tech (CITIC GROUP), na cidade de Cravinhos-SP durante o segundo semestre de 2020.** 29p. 2020. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade de Brasília - UnB, Brasília, 2020.

RESUMO

O Estágio Supervisionado foi realizado na empresa LongPing High-Tech localizada na cidade de Cravinhos-SP. As atividades exercidas durante o período do estágio envolveram o desenvolvimento de produtos visando a obtenção de novas linhagens e híbridos de milho com características benéficas ao seu plantio. O objetivo do estágio foi o acompanhamento da rotina técnica do time de Trait Development associado aos conhecimentos adquiridos na Universidade, além de compreender as dificuldades da rotina no campo de produção. Todas as atividades acompanhadas contribuíram significativamente para a formação acadêmica e pessoal da estudante, facilitando as oportunidades para o mercado de trabalho. Por ser uma região em que o agronegócio possui grande importância para a economia do Brasil e o aumento tecnológico tem exigido a busca de engenheiros agrônomos qualificados.

Palavras-chave: *Agrobacterium*, *Zea mays*, transformação genética, embrião imaturo.

ABSTRACT

The Supervised Internship took place at LongPing High-Tech located in the city of Cravinhos-SP. As the activities carried out during the internship period involved the development of products, resulting in the obtaining of new lines and corn hybrids with beneficial characteristics for their planting. The objective of the internship was to monitor the technical routine of the Trait Development time associated with the knowledge acquired at the University, in addition to understanding the difficulties of routine in the production field. All accompanied activities contributed to the student's academic and personal training, facilitating opportunities for the job market. As it is a region in which agribusiness has great importance for the economy of Brazil and the technological increase has required the search for created agronomists.

Keywords: *Agrobacterium*, *Zea mays*, genetic transformation, immature embryo.

1. INTRODUÇÃO

Este relatório refere-se às atividades realizadas durante o Estágio Supervisionado, desenvolvido no segundo semestre de 2020 no time de Trait Development da empresa LongPing High-Tech, que fica situada no município de Cravinhos, no interior de São Paulo.

A companhia global LongPing High-Tech atua principalmente no mercado de sementes de milho, especialmente pelo fato de ser um dos cereais mais cultivados do mundo, sendo considerado a cultura de maior importância nos países industrializados e em muitos países em desenvolvimento (HUANG & WEI, 2005). O Brasil é o terceiro produtor mundial de milho, com uma produção aproximada de 101,0 milhões de toneladas, ficando atrás somente dos Estados Unidos e da China.

O milho é uma planta cultivada e amplamente estudada, devido em grande parte à sua natureza cruzada e, notável diversidade genética natural que a torna adequada para pesquisa básica e aplicada em função da imensa importância que o milho representa, o melhoramento genético desta cultura vem sendo amplamente estudado, sendo a combinação de técnicas de biologia molecular, cultura de tecidos e transformação genética têm sido uma ferramenta poderosa para introduzir novas características em plantas e representam importante instrumento para este fim (HUANG & WEI, 2005).

O progresso no melhoramento genético do milho através da aplicação combinada de biotecnologia e abordagens convencionais de melhoramento tem fornecido ferramentas poderosas para a criação de variedades eminentes com melhor genética para adaptação e tolerância a estresses abióticos e bióticos entre outras características, melhorando assim a produtividade e as perspectivas de atender à crescente demanda de uma expansão rápida população e mercado global. Um exemplo claro é o milho transgênico expressando genes Bt (*Bacillus thuringiensis*) para resistência a insetos, sozinha esta tecnologia foi responsável por mais de 48 milhões de hectares cultivados globalmente em 2014, com os Estados Unidos, Brasil, Argentina, África do Sul e Canadá emergindo como cinco dos maiores produtores países em todo o mundo (RAJI, 2018).

Atualmente existem diversos métodos de transformação genética que são baseados em abordagens físicas e/ou biológicas. Entre eles, *Agrobacterium tumefaciens* e bombardeio de partículas são os métodos mais comumente usados em empresas públicas e privadas ao redor de todo o mundo. A *Agrobacterium*

tumefaciens é um patógeno de solo, aeróbicas e gram-negativas (GANDER, 1996 & MONQUERO, 2005), possuem uma capacidade natural de transferir e integrar um pedaço de seu próprio DNA (T-DNA) no genoma da planta. Esta característica foi explorada para a transformação genética de plantas por meio de técnicas de engenharia de vetor binário de T-DNA, substituindo os genes indutores de tumor pelo gene de interesse.

A transformação mediada por *Agrobacterium* é um método de transformação popular devido à sua previsível integração e herança gênica, bem como à inserção gênica de baixo número de cópias, entre outras características. No entanto, apenas um número limitado de linhagens de milho foram transformadas até agora por meio da transformação de *Agrobacterium*.

Um das formas de identificar as células geneticamente modificadas é fazendo uso de um gene repórter, sendo os mais usados o gene *gus*, que codifica a enzima β -glucuronidase e o gene *lucA* da luciferase e o gene *gfp* (green fluorescent protein). Sendo assim, a proteína marcadora mais utilizada é a β -glucuronidase, que é a enzima codificada pelo gene *gus*. A expressão é visualizada pelo contato do tecido transformado com o substrato x-gluc, o substrato sofre hidrolisação pela enzima, no que resulta em um produto de coloração azulada. (MONQUERO, 2005 & CARMO, 2003). Os genes marcadores de seleção são necessários para selecionar as células transformadas que originarão uma planta transgênica, um marcador de seleção permite o crescimento preferencial das células transformadas na presença da enzima seletiva, evitando o crescimento das células não transformadas. Genes que conferem resistência a antibióticos ou herbicidas podem ser usados como marcadores de seleção, entre os mais usados temos o gene *bar* que confere resistência ao herbicida Basta® (BESPALHOK, 19990).

Para se realizar a transformação de milho é necessário fazer uso de explantes, tais como embriões zigóticos imaturos, que é o explante mais utilizado para iniciar culturas embriogênicas, pois calos derivados destes embriões imaturos são mais eficientes para a regeneração da planta do que calos obtidos em outros explantes, mas a resposta de cultura embriogênica e competência de transformação são altamente dependentes do genótipo. Normalmente, a modificação e otimização de meios de cultura para induzir embriões somáticos de alta frequência é a primeira etapa importante quando estar tentando transformar uma linhagem.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste relatório de Estágio Supervisionado foi conhecer a rotina técnica do time de Trait Development e acompanhar as principais atividades desenvolvidas, visando a obtenção de novas linhagens e híbridos de milho com características benéficas ao seu plantio e consumo sendo superiores aos do mercado de sementes brasileiro.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A cultura do milho

O milho (*Zea mays L.*) é uma gramínea que pertence à família Poaceae, todos os milhos provindos do teosinto estão incluídos nesta única espécie e na tribo Maydeae, esta possui sete gêneros dos quais dois são nativos do hemisfério ocidental (*Zea* e *Tripsacum*) e cinco da Ásia. Logo, estima-se que seja o México (região sudoeste do México) a sua região de origem, tendo sido desenvolvido entre 8 ou 10 mil anos a.C (Paterniani et al., 2000).

O milho moderno possui grande importância econômica, especialmente pela diversidade na sua forma de uso, é caracterizada como uma cultura de manejo simples, o que facilita sua produção em praticamente todos os continentes do mundo. Cerca de 70% da produção mundial de milho é destinada para a alimentação animal e somente 15% da produção é destinada ao consumo humano, sendo de forma direta ou indireta (DUARTE, 2004). Segundo o Departamento do Agronegócio (DEAGRO, 2018), o milho é o cereal de maior quantidade produzido no mundo. O Brasil ocupa o terceiro lugar na produção mundial de grãos de milho com uma área plantada de 18,8 milhões de hectares e uma produção de 101,0 milhões de toneladas, estando atrás somente dos Estados Unidos e China, que juntos representam cerca de 65% da produção mundial.

A semente de milho é dentre todas as tecnologias agrícolas hoje empregadas no cultivo, a que mais se desenvolveu nos últimos tempos. Com os avanços da biotecnologia, houve grande impacto para a produção de milho no Brasil o que permite a sua flexibilidade de cultivo nas mais diferentes regiões e condições de clima e solo.

Os avanços tecnológicos envolvem além do potencial genético visando produtividade, graças aos avanços genéticos, têm-se disponíveis cultivares mais responsivas a incorporação de características como resistência a doenças, insetos, assim como a moléculas de herbicidas como Glifosato e Glufosinato para o controle eficiente de plantas daninhas (PEREIRA FILHO; BORGHI, 2016).

Segundo Pereira Filho e Borghi (2016) as cultivares transgênicas disponibilizadas no mercado apresentam várias tecnologias responsáveis por grande parte de controle das lagartas que atacam a cultura tanto na parte aérea quanto de solo. A Tecnologia YieldGard® VT PRO promove controle das três

principais lagartas que atacam o milho: lagarta-do-cartucho, lagarta-da-espiga e broca-do-colmo. O VT PRO2 também apresenta controle a estas 3 principais pragas, além da tolerância ao glifosato, permitindo o controle mais eficaz das plantas daninhas. O VT PRO3 vai mais além porque apresenta duas proteínas Bt (*Bacillus thuringiensis*) para controle das principais lagartas da parte aérea do milho e uma proteína Bt específica para o controle da larva-alfinete, praga que fica escondida no solo e se alimenta das raízes do milho, diminuindo a capacidade de absorção de água e nutrientes, reduzindo o potencial produtivo da lavoura, além da tolerância ao herbicida glifosato e controle das principais pragas aéreas do milho.

Nas condições brasileiras, a cultura do milho apresenta ciclo variável entre 110 e 150 dias da semeadura à colheita, variando de acordo com as características dos genótipos em superprecoce, precoce e tardio (FANCELLI; DOURADO NETO, 1997).

3.2 Melhoramento genético na cultura do milho

O milho é uma espécie diplóide e alógama, é uma das espécies vegetais mais estudadas e conhecidas, pois possui uma caracterização genética mais detalhada dentre as espécies cultivadas, isso se dá pela facilidade na manipulação dos cromossomos e o seu baixo número ($n=10$). O milho foi uma das primeiras espécies cultivadas a ser levada aos laboratórios de genética para que se entendesse conceitos básicos de mitose, meiose, segregação cromossômica e efeitos de *crossing-over* (Hallauer, 1988).

A importância desta cultura para a sociedade fez com que houvesse uma pressão para um aumento da produtividade cada vez maior, o crescimento da produtividade de milho desde a metade do século passado segue o modelo já descrito nos Estados Unidos de utilização de sementes híbridas com maior potencial de rendimento (melhoramento genético), maior uso de fertilizantes e agrotóxicos, melhoria no arranjo espacial de plantas (espaçamento e densidade), máquinas agrícolas mais eficientes e adoção do sistema de plantio direto na palha. A adoção conjunta de cultivares melhoradas, de insumos e de técnicas de cultivos adequados fez com que o rendimento do milho superasse em muito, outros cereais.

A proposta de cruzar o milho, para explorar o vigor do híbrido, foi exposta, independentemente, em 1909, por Shull, East e Collins (Shull,1910), que

estabeleceram assim as bases dos modernos métodos de melhoramento deste cereal.

As cultivares comerciais de milho disponibilizadas atualmente são identificadas como híbridos de linhagens endogâmicas (HLE) e variedades de polinização livre (VPL) ou aberta (VPA). Os HLE apresentam sementes mais caras e são encontrados nas seguintes versões: híbridos simples (HS), híbridos triplos (HT) e híbridos duplos (HD), conforme o número de linhagens.

A hibridação é um aspecto fundamental utilizado no melhoramento e na produção de milho. O milho pode haver vários tipos de hibridação nos quais se destacam:

a) Híbrido simples: resulta do cruzamento entre duas linhagens endogâmicas divergentes (linhagem A x linhagem B). Caracterizam por maior uniformidade, maior potencial de produtividade. Porém a semente tem um custo elevado, devido a baixa produtividade da linhagem endógama utilizada como fêmea.

b) Híbrido duplo: é obtido pelo cruzamento entre dois híbridos simples de linhagens distintas, portanto são envolvidas quatro linhagens. Neste tipo encontram-se as cultivares com maior estabilidade de adaptação aos diferentes ambientes, devido à ampliação de sua base genética. Entre os híbridos de linhagem este é o menos produtivo e também o de semente mais barata porque não há problema de produtividade das sementes. É indicado quando se adota nível tecnológico médio.

c) Híbrido triplo: é obtido pelo cruzamento entre um híbrido simples e uma terceira linhagem distinta daquelas utilizadas no HS. É uma cultivar com maior capacidade de adaptação ao ambiente porque as plantas não têm a mesma constituição. Este híbrido é menos produtivo que o HS, entretanto as suas sementes são mais baratas porque são produzidas no HS, a partir da polinização da linhagem. Cultivares comerciais de HT são indicadas para média a alta tecnologia.

3.3 Estratégias de melhoramento na cultura do milho

O milho vem sendo cada vez mais utilizado em programas de melhoramento genético, visando a introdução de genes que conferem resistência a pragas e doenças, melhoria da qualidade nutricional, precocidade da planta e tolerância a estresses abióticos (CARVALHO, 2014).

A transformação genética se dá pela transferência de um ou vários genes em um organismo sem que haja necessidade de fecundação ou cruzamento das plantas. Os organismos transformados geneticamente recebem o nome de transgênicos e os genes inseridos são denominados de transgenes. Segundo definições do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, um Organismo Geneticamente Modificado (OGM) constitui um organismo produzido através de modificação genética.

Na agricultura, tal modificação visa a obtenção de características benéficas ao plantio do alimento e/ou ao seu consumo, podendo variar entre modificações pequenas, como uma troca de base nitrogenada, ou modificações mais complexas como a transgenia, que resulta na inserção de material genético de um outro organismo através de técnicas de DNA recombinante.

Desde a autorização e venda de um alimento OGM, em 1994, o reconhecimento e adesão desse tipo de plantação cresceu exponencialmente entre os agricultores. Com 39% da produção mundial de OGMs, o Estados Unidos constitui o maior produtor mundial de OGM, seguido pelo Brasil, cuja projeção para 2019/20 é de um total de 53,2 milhões de hectares de organismos geneticamente modificados plantados, atribuindo a este país 27% da produção mundial de OGMs. Entre os principais OGMs produzidos pelo Brasil, destaca-se o milho transgênico.

Com uma previsão total de 17 milhões de hectares plantados em 2019/20, dos quais 66% são transgênicos, o Brasil caracteriza-se como o terceiro maior produtor mundial de milho, setor no qual a LongPing High-Tech, produtora de sementes de milho híbrido, lidera o mercado brasileiro.

Pode-se citar, como uma das principais transgenias em milho, os genes bt, resultantes no famoso "Milho Bt". Visando o controle de uma praga de genótipos de milho tropicais, a *Spodoptera frugiperda*, a inserção dos genes de *Bacillus thuringiensis* no genoma de milho permite a produção de proteínas que, com alta especificidade, causa alto dano seletivo às Spodopteras. Entretanto, devido ao processo de adaptação e evolução dos organismos, ocorre uma obtenção natural de resistência das *S. frugiperda* ao milho Bt, demonstrando de maneira prática a necessidade do investimento em novas biotecnologias relacionadas ao manejo de pragas, além de outras formas de melhoria de plantio de alimentos.

A transformação genética em vegetais só foi possível com o desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos vegetais. Essas técnicas possibilitam a

regeneração de uma planta a partir de uma única célula ou um grupo de células. Os métodos de transformação de plantas podem ser divididos em dois grupos indiretos (através do uso da *Agrobacterium tumefaciens*), e diretos (bombardeamento ou eletroporação) (BESPALHOK, GUERRA & OLIVEIRA, 1999).

Para a obtenção de uma planta transgênica é necessário seguir algumas etapas que podem ser resumidas em:

1. Isolamento e clonagem de um gene de interesse;
2. Transferência desse gene para a célula vegetal;
3. Integração desse gene no genoma da planta;
4. Regeneração de plantas a partir da célula transformada;
5. Expressão do gene introduzido nas plantas regeneradas;
6. Transmissão do gene introduzido de geração em geração

A transferência de DNA por meio da *Agrobacterium tumefaciens* é um dos métodos comumente usados na obtenção de plantas transgênicas. A *Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria gram-negativa que possui um plasmídeo (DNA extracromossomal) chamado de plasmídeo Ti (indutor de tumor) que possui a habilidade de transferir uma parte de seu DNA para a célula vegetal. Esse DNA é chamado de T-DNA, e contém genes envolvidos na produção de reguladores de crescimento vegetais. Em condições naturais, quando o T-DNA é transferido para a célula vegetal onde essa célula produzirá substâncias que servem de alimento (opinas) para o patógeno e levam a célula vegetal a se multiplicar, formando tumores ou calos (BESPALHOK, GUERRA & OLIVEIRA, 1999).

A transformação genética mediada por *Agrobacterium* geralmente é feita em explantes tais como folhas, cotilédones, hipocótilo, embriões e outras partes que tenham a capacidade de se regenerar, em milho o embrião zigótico imaturo é o explante mais utilizado para estabelecer a regeneração de plantas. Em geral, coloca o *Agrobacterium* em co-cultivo com o tecido a ser transformado por 1 a 7 dias, sendo em seguida transferido para meios com agentes seletivos com a finalidade de selecionar as células transformadas e eliminar a bactéria, que serão então regeneradas (BESPALHOK, 1999).

O gene bar codifica a enzima PAT (phosphinothricin-N-acetyltransferase) de *Streptomyces hygroscopicus* (Murakani et al., 1986) que confere resistência ao glifosinato de amônio (PPT), que é usado como agente seletivo. O glifosinato de

amônio é utilizado como herbicida, sendo um dos mais amplamente empregados pela engenharia genética no desenvolvimento de OGMs vegetais (SOUZA, VENTUROLI, COELHO & RECH 2001).

As técnicas de cultura de tecidos em vegetais têm contribuído aos estudos de fisiologia, bioquímica, histologia, embriogênese, genética e melhoramento, bem como na produção de metabólitos de interesse e também na obtenção de plantas resistentes a fatores adversos como pragas e doenças (TORRES, 1998; OLIVEIRA, 2000; SOUZA, 2006, CAMPOS, 2009).

A regeneração é fundamentada na capacidade de proliferação das células vegetais que se organizam em tecidos e conseqüentemente formando a planta, e a capacidade das células vegetais é chamada de totipotência, definida como a habilidade que uma célula ou grupo de células têm de responder ao estímulo indutivo visando o seu desenvolvimento (ANDRADE, 2002).

4. DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

4.1. Caracterização da região e o local de desenvolvimento do estágio - Município de Cravinhos-SP

O município possui uma população estimada de 35.292 habitantes em uma área de 311.423 km² e densidade demográfica de 101,77 habitantes/km². Possui um PIB per capita de R\$ 29.876,08 (IBGE, 2017).

4.2. Apresentação da Empresa

A LongPing High-Tech é uma companhia global que atua no mercado de sementes realizando pesquisa, produção e comercialização de um amplo portfólio de produtos para lavouras de milho, arroz, vegetais, trigo e algodão. No Brasil, a empresa atua no mercado de sementes de milho híbrido com duas marcas comerciais: Forseed e Morgan.

A presença da Longping High-Tech no Brasil é resultado da profunda convicção no agronegócio brasileiro por parte da Yuan Longping High-Tech Agriculture Co., empresa líder de sementes na China, e do Citic Group, maior conglomerado corporativo chinês. É com esta inspiração que a Longping High-Tech trabalha para ser um exemplo da capacidade de geração de riqueza para o produtor rural por meio da sinergia entre os sistemas agroindustriais brasileiro e chinês.



 **MORGAN**[®]
INVISTA NA EFICIÊNCIA


FORSEED
Certo é ser específico

Figura 1. Faixada do prédio de laboratórios da LongPing High-Tech em Cravinhos, juntamente com os logos das marcas comerciais.

Criada em 1º de dezembro de 2017 como uma das líderes no mercado brasileiro em seu segmento, a LongPing High-Tech conta com uma equipe de colaboradores experientes e engajados, que se dedicam a oferecer as melhores soluções do mercado em sementes.

A LongPing High-Tech também reúne diversos ativos estratégicos. Além de um completo e diversificado portfólio de híbridos, a empresa conta com laboratórios e centros de pesquisa e desenvolvimento, campos de produção, unidades industriais de beneficiamento e um amplo banco de germoplasma tropical.

5. ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O ESTÁGIO

O estágio consistiu em acompanhar e executar atividades no preparo de soluções e meios de culturas diversos, acompanhamento do material vegetal em casa-de-vegetação e tratos culturais, extração de embrião imaturo de milho, transformação de embriões imaturos utilizando *Agrobacterium*, cultura de tecidos in-vitro, análises moleculares para detecção de transgenes, cultivo de microrganismos, análise de dados experimentais e organização de laboratório e casa-de-vegetação, no período de 03 de agosto de 2020 a 31 de dezembro de 2020.

5.1. Plantio e colheita das espigas

O milho é uma cultura que possui um ciclo extremamente variável que depende diretamente de diversos fatores ambientais, como: água, quantidade de graus dias e temperatura, portanto em condições brasileiras o seu ciclo pode ter entre 110 a 180 dias.

Para se obter plantas saudáveis, com quantidades de grãos adequados e os explantes em tamanho ideal, deve-se conduzir as plantas de milho em um ambiente controlado como casas-de-vegetação, pois a temperatura, umidade e intensidade luminosa são controladas em cada ambiente de acordo com as necessidades de cada linhagem ou material, logo deve-se semear no máximo duas sementes por vaso contendo substrato rico em nutrientes, com fibra de coco e húmus.

Entre 45 e 60 dias após o plantio as plantas devem ser polinizadas manualmente. De acordo com a linhagem utilizada, deve-se checar diariamente

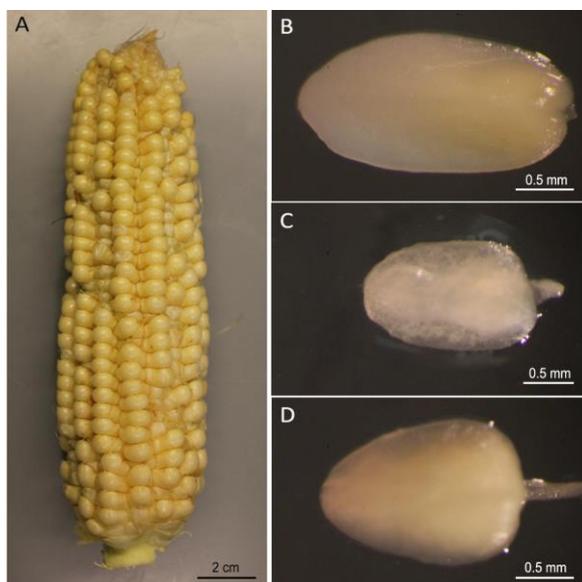


Figura 2. (A) Espiga após 12 dias de polinização. (B), (C) e (D) embriões imaturos de linhagens usadas pela empresa.

tamanho dos embriões a partir do 10^a dia após a polinização, quando a espiga possuir embriões imaturos com o tamanho entre 1,5 e 2,0 mm deve-se colhê-la.

5.2. Preparo de *Agrobacterium*

De acordo com a linhagem obtida para a transformação é selecionado um vetor binário adequado para a mesma, após a seleção deve-se crescer uma placa mãe de bactéria por dois dias em meio de cultura específico com antibióticos e cerca de 24h antes da transformação deve-se estriar novamente a bactéria em uma nova placa.

5.3. Preparo de meio de cultura

A produção de meios de cultura foi mais voltada ao cultivo e manutenção de calos embriogênicos, derivados dos embriões imaturos transformados e plantas de milho. Primeiramente, uma solução de água milli-q, com nutrientes basais é preparada e seu pH é ajustado, sendo então adicionado ágar (um agente gelificante). Após autoclavagem a 121 °C por 20 minutos são adicionados antibióticos, vitaminas e herbicidas específicos de cada linhagem de milho e dos vetores utilizados, ocorrendo posterior plaqueamento em placa de petri, em fluxo laminar.

5.4. Resgate e transformação de embriões imaturos de milho

Após colheita das espigas é realizada a desinfecção das mesmas com uma solução de hipoclorito de sódio 2%, diluído em água milli-q estéril e uma gota de Tween20, por 20 minutos. Após a desinfecção, em um fluxo laminar, ocorre o resgate dos embriões imaturos, retirados por meio do uso de agulha, pinça e lâminas pré-autoclavados, os mesmos ficam localizados entre o endosperma e o pericarpo e é voltado para a ponta da espiga.



Figura 3. Embriões imaturos em meio de cultura.

A transformação dos embriões procede utilizando *Agrobacterium* pré-transformadas, de acordo com o protocolo determinado à cada linhagem e vetor utilizado.

5.5. Cultivo de embriões somáticos e seleção de transformantes

Seguindo o protocolo de cada linhagem e o método utilizado, após a reação de transformação, ocorre a seleção dos embriões transformados. Os embriões são transferidos a uma série de meios de cultura contendo hormônios capazes de induzir a desdiferenciação celular e formação de tecidos pluripotentes, os calos.

De acordo com cada protocolo, esses calos são cultivados em condições específicas e transferidos entre diferentes meios, por tempo determinado, de forma a induzir sua multiplicação. A cada troca de meio de cultivo, a concentração do agente

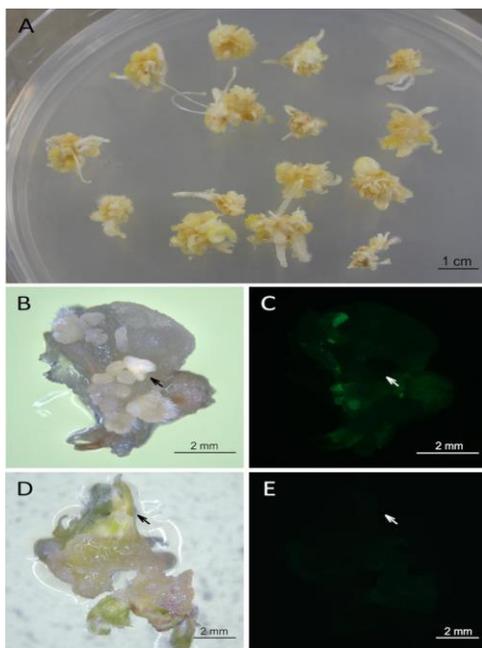


Figura 4. (A) Desenvolvimento de tecido em meio de maturação com seleção, (B) tecido em desenvolvimento 15 dias após infecção, (D) tecido em desenvolvimento 28 dias pós-infecção, (C) e (E) as setas apontam para tecidos em regeneração que não apresentam expressão.

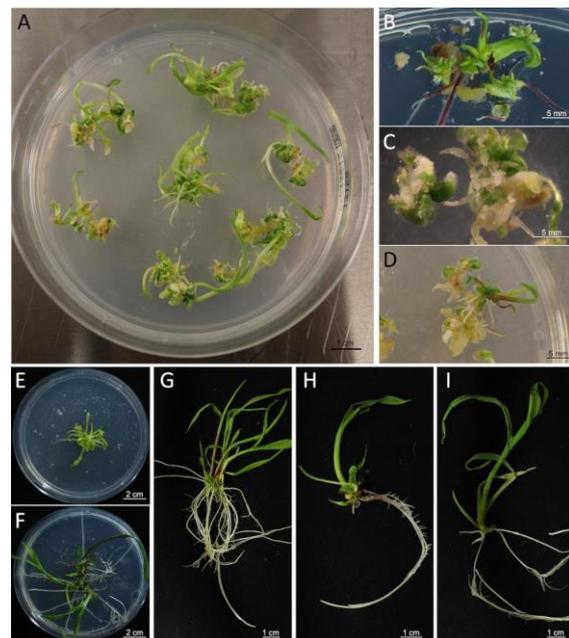


Figura 5. (A) Desenvolvimento de tecido em meios de enraizamento. (B), (C) e (D) brotos com várias folhas (gramado regenerantes) (E), (F), (G), (H) e (I) brotos com raízes.

seletivo aumenta, permitindo a seleção dos calos produzidos a partir de células transformadas, ou seja, que contém o T-DNA e o gene de resistência do vetor.

Após consecutivas trocas de meio e seleção dos calos resistentes, os calos são transferidos para um meio de regeneração, capaz de induzir a formação de plântula e raíz.

5.6. Transplântio e coleta foliar

Após as plantas regeneradas estiverem com aspecto vigoroso, são transferidas para copos individuais contendo substrato, em seguida amostras foliares destas plantas são coletadas e encaminhadas ao departamento de extração de DNA da LongPing High-Tech, onde o DNA foliar é mecanicamente extraído utilizando-se do protocolo FastID e dos equipamentos Biomek, Genogrinder e KingFisher, que são capazes de isolar e purificar o DNA genômico a partir de sua interação intermolecular com esferas magnéticas positivamente carregadas.



Figura 6. Câmara úmida para aclimatação das plantas.

5.7. Análises dos eventos

Após a extração e quantificação do DNA foliar, é realizada PCR em tempo real no equipamento Viia 7. Nele, a sonda fluorescente SybrGreen é capaz de se anelar e assim identificar uma sequência específica do T-DNA. Nesta mesma PCR, são utilizados como controles negativos uma amostra de água e uma amostra da mesma

linhagem, porém não transformada, já como controle positivo são utilizados o vetor de transformação e, se possível, uma planta já transformada. As amostras podem, também, ser encaminhadas para sequenciamento.

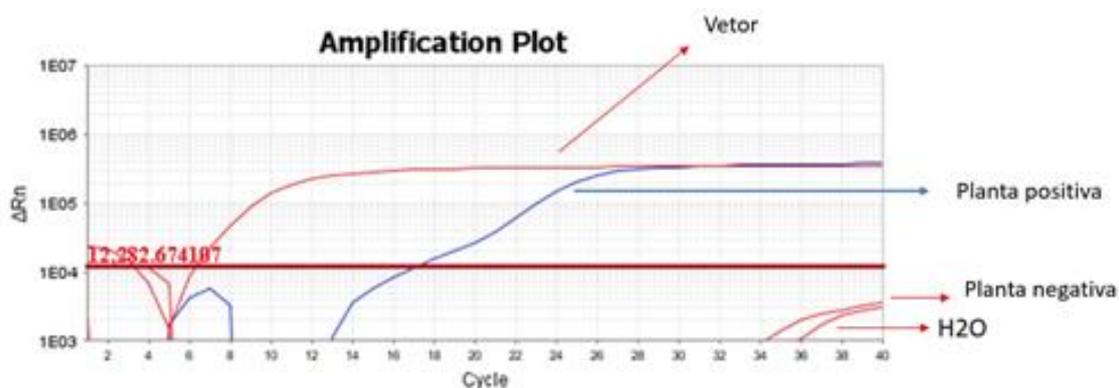


Figura 7. Gráfico do resultado da PCR em tempo real, realizada no Viia 7.

5.8. Aclimação e cultivo de transformantes

Ocorrendo a confirmação da presença da sequência de interesse no DNA genômico da plântula, ela é transferida para uma câmara úmida feita em caixa de isopor, em que a temperatura, umidade e intensidade luminosa são controladas, não ocorrendo troca de gás com o ambiente externo.



Figura 8. Plantas positivas transplantadas em casa de vegetação.

Após 7 dias, ocorre abertura da câmara para troca de gases entre os sistemas, as plantas se tornam mais vigorosas e nos dias seguintes podem ser transferidas para casa de vegetação onde são transplantadas em vasos e sofrem autopolinização guiada para que suas progênies sejam analisadas molecularmente e fenotipicamente.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio supervisionado é de grande importância para todo e qualquer estudante pois é a melhor maneira de consolidar os ensinamentos obtidos na academia e vivenciar os problemas que ocorrem na produção agrícola.

A oportunidade que me foi concedida de realizar o estágio em uma multinacional altamente tecnológica e organizada, foi uma experiência incrível. O relacionamento com profissionais com alto padrão de qualificação, apresentou e ensinou postura e atitudes diante de circunstâncias indesejadas e inesperadas para tomadas de decisões, deixando-me munida de experiências que só poderiam ser adquiridas através desse convívio, além da convivência com os demais funcionários, que mesmo sem nenhuma formação acadêmica possuem um incrível conhecimento devido a vivência na área, acrescentando no conhecimento profissional e pessoal.

Observando o conduzimento de uma grande companhia pode-se observar a grande responsabilidade que o Engenheiro Agrônomo possui na realização de suas funções, o acompanhamento técnico e o acréscimo de seus conhecimentos técnicos colaboram com a inserção de novas tecnologias, inovação e ganhos de produtividades safra após safra.

7. REFERÊNCIAS

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira** – grãos: safra 2019/2020 – sétimo levantamento, abril/2019. Brasília: CONAB, 2019. 67p.

Frame BR, Shou H, Chikwamba RK, Zhang Z, Xiang C, Fonger TM, Pegg SE, Li B, Nettleton DS, Pei D, Wang K. **Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system**. Plant Physiol. 2002 May;129(1):13-22. doi: 10.1104/pp.000653. PMID: 12011333; PMCID: PMC1540222.

FANCELLI, A.L.; DOURADO-NETO, D. Milho: ecofisiologia e rendimento. In: **Tecnologia da produção de milho**, Piracicaba: ESALQ, 1997. p.157-170.

Frame BR, Paque T, Wang K. **Maize (Zea mays L.)**. **Methods Mol Biol**. 2006;343:185-99. doi: 10.1385/1-59745-130-4:185. PMID: 16988344.

BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. **Introdução ao Melhoramento de Plantas**. Cap. 5.2, pág.15 In: 1 ed, 1999.

CARVALHO, Julita Maria Frota Chagas, e VIDAL, Márcia Soares, . Campina Grande, 2003. **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais** por 39p. (Embrapa Algodão, Campina Grande, PB. Documentos, 116).1. Tecido - Cultura. 2. Biotecnologia. I.Carvalho, J.M.F.C. II. Vidal, M.S. III.Título. IV. Série. CDD 660.6.

Wang K, Frame B. **Biolistic gun-mediated maize genetic transformation**. **Methods Mol Biol**. 2009;526:29-45. doi: 10.1007/978-1-59745-494-0_3. PMID: 19378004.

MONQUERO, Patrícia Andréa, 2005. **Plantas Transgênicas Resistentes aos Herbicidas: Situação e Perspectivas**. *Bragantia*, Campinas, v.64, n.4, p.517-531, 2005.

QUISEN, Regina Caetano. **Manual de Procedimentos do Laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia ocidental** / Regina Caetano Quisen, Paula

Cristina da Silva Ângelo. Manaus :Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 44 p- (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos ; 61).

SOUZA JÚNIOR, M. T.; VENTUROLI, M. F. ; COELHO, M. C. F. , RECH FILHO, E. L., 2001, **Análise de Sistemas Gene Marcador/ Agente Seletivo Alternativos para Seleção Positiva de Embriões Somáticos Transgênicos de Mamoeiro** **Laboratório de Transformação e Expressão de Genes**, Cenargen, Embrapa. R. Bras. Fisiol. Veg., 13(3):365-372, 2001.

USDA (2013) **Sweet Corn for Fresh Market Area Planted and Harvested, Yield, Production, Price and Value – States and United States: 2010-2012**. Disponível em :<http://usda01.library.cornell.edu/usda/current/VegeSumm/VegeSumm-01-29-2013.pdf>>. (acesso em novembro de 2020).

BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV. 2005. 969p.

TZFIRA, T., VAIDYA, M. & CITOVSKY, V. **VIP1, an Arabidopsis protein that interacts with Agrobacterium VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and Agrobacterium infectivity**. The EMBO Journal 20:3596-3607. 2001.

Reis, S.R.,Pereira, M.G., Silva, R.F., Meireles, R.C., (2011) **Efeito da heterose na qualidade de sementes de milho doce**. Revista Brasileira de Sementes. 33(2):310-315.

WANG, K., STACHEL, S.E., TIMMERMAN, B., VAN MONTAGU, M. & ZAMBRYSKI, P.C. **Site-specific nick in the T-DNA border sequence as a result of Agrobacterium vir gene expression**. Science 235:587-591. 1987.

Raji JA, Frame B, Little D, Santoso TJ, Wang K. **Agrobacterium- and Biolistic-Mediated Transformation of Maize B104 Inbred**. Methods Mol Biol. 2018;1676:15-40. doi: 10.1007/978-1-4939-7315-6_2. PMID: 28986902.

Zhong H, Elumalai S, Nalapalli S, Richbourg L, Prairie A, Bradley D, Dong S, Su XJ, Gu W, Strebe T, Shi L, Que Q. **Advances in Agrobacterium-mediated Maize Transformation. Methods Mol Biol.** 2018;1676:41-59. doi: 10.1007/978-1-4939-7315-6_3. PMID: 28986903.

Sidorov V, Duncan D. Agrobacterium-mediated maize transformation: **immature embryos versus callus.** Methods Mol Biol. 2009;526:47-58. doi: 10.1007/978-1-59745-494-0_4. PMID: 19378003.

Zhao ZY, Ranch J. **Transformation of maize via Agrobacterium tumefaciens using a binary co-integrate vector system.** Methods Mol Biol. 2006;318:315-23. doi: 10.1385/1-59259-959-1:315. PMID: 16673926.

K.C. Glenn, E. Bell, M. Goley, J. Jenkinson, B. Liu, C. Martin, C. **Souder, Bringing New Plant Varieties to Market: Plant Breeding and Selection Practices Advance Beneficial Characteristics while Minimizing Unintended Changes.** Cytogenet. Genome Res. 129:17–23. doi:10.1159/000312724.