

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ISADORA BIANCHIN

**PLASMÍDEOS DERIVADOS DE VÍRUS PARA CONFERIR RESISTÊNCIA A
HERBICIDAS EM *Eucalyptus urophylla***

Porto Alegre

2018

ISADORA BIANCHIN

**PLASMÍDEOS DERIVADOS DE VÍRUS PARA CONFERIR RESISTÊNCIA A
HERBICIDAS EM *Eucalyptus urophylla***

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
como parte dos requisitos necessários para a
obtenção do Grau de Bacharel em
Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia
Molecular

Orientador: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

Coorientador: Biotecnologista Daniel Barletta Sulis

Porto Alegre

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por me iluminar em minhas caminhadas.

Agradeço aos meus pais, Orisa e Altemir, e à minha irmã, Sofia, pelo amor, apoio e incentivo incondicionais. Obrigada por acreditarem em mim e nos meus objetivos.

Ao meu namorado, Elias, pelo amor, amizade e companheirismo, por compartilhar das minhas alegrias e se fazer presente em todos os momentos.

Aos meus queridos colegas de curso e amigos, obrigada pelo companheirismo e por todos as conversas, momentos e sentimentos compartilhados.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório, pela colaboração, amizade e momentos de descontração.

Ao meu orientador, prof. Giancarlo Pasquali, por me permitir fazer parte do projeto e pelos ensinamentos e orientações que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho e enriqueceram minha formação acadêmica. Ao meu coorientador Daniel Sulis pelo interesse, paciência e dedicação a este trabalho.

RESUMO

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família *Myrtaceae*, inclui diversas espécies de importância florestal e industrial que se destacam pelas suas excelentes características silviculturais e pela aplicação na produção de madeira maciça, celulose e papel. A geração de variantes geneticamente modificadas (GM) de eucalipto que possam conferir vantagens fenotípicas e, conseqüentemente, atender à crescente demanda por produtos derivados da madeira, é de grande importância. Porém, a transgenia do eucalipto ainda apresenta grandes limitações, especialmente nas etapas de regeneração de mudas GM derivadas de matrizes “elite”. Recentemente, a tecnologia *TraitUP*TM foi desenvolvida pela empresa Morflora (Israel) como alternativa para a introdução de genes de interesse em plantas, tendo sido comprovadamente eficaz em diversas espécies e gêneros. O método está fundamentado em vetores virais desarmados denominados “IL-60” (pIR e p1470) contendo o(s) gene(s) de interesse. Tais vetores comportam-se como plasmídeos e são capazes de se propagar pela planta de forma assintomática e epissomal, levando à expressão do(s) gene(s) de modo sistêmico e duradouro. No presente trabalho, foi investigada a aplicabilidade da tecnologia *TraitUP*TM em *Eucalyptus urophylla*, gerando e testando versões dos vetores IL-60 contendo genes capazes de conferir resistência a herbicidas e a antibióticos seletivos. Os genes *bar* (ou *pat*, fosfinotricina-acetiltransferase) e *nptII* (neomicina-fosfotransferase), capazes de conferir resistência ao herbicida glifosinato e amônio e ao antibiótico canamicina, respectivamente, foram utilizados no estudo e inseridos no vetor p28_35S-Gateway, variante do vetor pIR (Morflora) adaptado à tecnologia Gateway (Invitrogen). *Primers* específicos para as sequências codificadoras dos genes foram projetados e utilizados em PCRs para a amplificação das mesmas a partir dos plasmídeos comerciais pWBVec4a (Ming-Bo Wang, 1996) e pCAMBIA2300 (Cambia). Os *amplicons* resultantes foram ligados direcionalmente no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen) e, após, recombinados com o vetor de destino p28_35S-Gateway. Os vetores resultantes p28_35S-*bar* e p28_35S-*nptII* tiveram suas identidades e sequências confirmadas por

clivagens com enzimas de restrição e por sequenciamento de DNA. Em paralelo às clonagens moleculares, foram realizadas curvas de seleção para a determinação das doses letais mínimas de glifosinato de amônio e de canamicina para a seleção de plantas de *E. urophylla* cultivadas em hidroponia e em solo, tendo sido obtidos resultados conclusivos para o herbicida. A concentração ideal de glifosinato de amônio para a seleção de plantas em hidroponia foi experimentalmente definida em 10 mg/L e, para plantas cultivadas em solo, em 120 mg/L. No primeiro caso, foram necessários 35 dias de exposição para a seleção, enquanto no segundo caso foram requeridas aplicações por 4 dias. Plântulas de *E. urophylla* serão inoculadas com o plasmídeo p28_35S-*bar* e com o plasmídeo auxiliar p1470 via contato direto com as raízes e injeção no caule, em concentração experimental de 20 µg/mL. As plantas inoculadas serão submetidas à seleção nas concentrações e tempo definidos experimentalmente e a resistência será aferida por meio da comparação fenotípica. Ainda, plantas de *E. urophylla* foram inoculadas com o plasmídeo p28_35S-*gfp* e com o plasmídeo auxiliar p1470 via contato direto com as raízes e injeção no caule, em concentração experimental de 10 µg/mL, e a expressão de *gfp* foi avaliada por microscopia de fluorescência.

Palavras-chave: *Eucalyptus*, transgenia, vetores virais, *TraitUP*, resistência a herbicida, glifosinato de amônio, canamicina, GFP.

ABSTRACT

The genus *Eucalyptus* belongs to the *Myrtaceae* family and includes several species of industrial and forest importance that stand out for their excellent silvicultural characteristics and their application in the production of solid wood, cellulose pulp and paper. The generation of genetically modified (GM) variants of eucalypts capable to provide phenotypic advantages and consequently meet the increasing demand for wood-derived products is highly required. However, *Eucalyptus* transgenic techniques still exhibit great limitations, especially when it comes to the regeneration of GM seedlings derived from elite varieties. Recently, an Israeli company named Morflora developed the TraitUP™ technology as an alternative for the introduction of foreign genes into plants. This new method has been proven effective in several plant species and genera and it is based on disarmed viral vectors, called "IL-60" (pIR and p1470), containing the gene(s) of interest. Such vectors behave as plasmids and are capable to propagate through the plant in an asymptomatic and epizomal manner, leading to the expression of the gene(s) in a systemic and durable way. The present work aimed to investigate the applicability of the TraitUP™ technology in *Eucalyptus urophylla*, through the generation and test of versions of IL-60 vectors containing genes capable of conferring resistance to selective herbicides and antibiotics. The genes *bar* (or *pat*, phosphinothricine acetyltransferase) and *nptII* (neomycin phosphotransferase), which confer resistance to the herbicide glufosinate-ammonium and to the antibiotic kanamycin, respectively, were used in this study and inserted into the p28_35S-Gateway vector, a variant of the pIR vector (Morflora) adapted to the Gateway technology (Invitrogen). Specific primers for the coding sequences of the genes were designed and used in PCRs for their amplification from the commercial plasmids pWBVec4a (Ming-Bo Wang, 1996) and pCAMBIA2300 (Cambia). The obtained amplicons were ligated into the pENTR/D-TOPO entry vector (Invitrogen) and then recombined with the p28_35S-Gateway final vector. The identities of the resulting vectors p28_35S-*bar* and p28_35S-*nptII* were confirmed by restriction enzyme digestions and DNA sequencing. In addition to molecular cloning experiments, we

established selection curves to determine minimal lethal doses of glufosinate-ammonium and kanamycin required to select *E. urophylla* plants cultivated under hydroponics and soil conditions. The ideal concentration of glufosinate-ammonium for plant selection under hydroponics and soil were experimentally established at 10 mg/L and 120 mg/L, respectively, while the ideal intervals for selection were 35 and 4 days, respectively. *E. urophylla* seedlings shall be inoculated with plasmid p28_35S-*bar* and the helper plasmid p1470 through root uptake and injection into the stem, both at an experimental concentration of 20 µg/mL. The inoculated plants will be subjected to selection at the concentration and time determined experimentally and resistance will be measured by means of phenotypic comparison. Furthermore, *E. urophylla* plants were inoculated with p28_35S-*gfp* and the helper plasmid p1470 through root uptake and stem injection at an experimental concentration of 10 µg/mL, and *gfp* expression was assessed by fluorescence microscopy.

Keywords: *Eucalyptus*, transgenic, viral vectors, *TraitUP*, herbicide resistance, glufosinate-ammonium, kanamycin, GFP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de plantios florestais com <i>Eucalyptus</i> nos estados do Brasil, área e percentual de plantios por estado.....	15
Figura 2. Comparação de sintomas em plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) susceptíveis e tolerantes ao TYLCV.....	19
Figura 3. Organização genômica do TYLCV.....	20
Figura 4. Comparação da resistência a fungos em planta tratada com o vetor IL-60 contendo o operon <i>prn</i> versus planta controle.....	22
Figura 5. Vetores pIR e p1470 da plataforma IL-60.....	24
Figura 6. Mapa dos vetores pCAMBIA3300 e pCAMBIA2300.....	28
Figura 7. Representação do vetor de entrada pENTR/D-TOPO.....	30
Figura 8. Representação da clonagem direcional TOPO®.....	30
Figura 9. Representação da germinação de <i>E. urophylla</i> em placas de Petri.....	39
Figura 10. Representação da curva de concentrações para cada um dos agentes seletivos, para plantas de <i>E. urophylla</i> cultivadas em placas de Petri.....	40
Figura 11. Representação da curva de concentrações para cada um dos agentes seletivos, para plantas de <i>E. urophylla</i> cultivadas em placas de RT-qPCR.....	41
Figura 12. Demonstração da inoculação mecânica dos vetores p1470 e p28_35S- <i>gfp</i> ou p28_35S-Gateway no caule de plantas de <i>E. urophylla</i>	43
Figura 13. Região de anelamento dos <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> nas sequências de <i>bar</i> e de <i>nptII</i>	46
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% das regiões codificadoras de <i>bar</i> e <i>nptII</i> amplificadas a partir dos DNAs molde pWBVec4a e pCAMBIA2300 nas concentrações de 25 ou 200ng.....	47
Figura 15. Mapa dos vetores pENTR/D-TOPO (parental), pENTR/D-TOPO- <i>bar</i> e pENTR/D-TOPO- <i>nptII</i> (recombinantes), com destaque para o sítio de clivagem da endonuclease EcoRV.....	48
Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 0.8% dos produtos da clonagem TOPO para o gene <i>bar</i> , clivados com enzima de restrição EcoRV.....	49

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 0.8% dos produtos da clonagem TOPO para o gene <i>nptII</i> , clivados com enzima de restrição EcoRV.....	49
Figura 18. Mapa dos vetores p28_35S-Gateway (parental), p28_35S- <i>bar</i> e p28_35S- <i>nptII</i> (recombinantes), com destaque para os sítios de clivagem da endonuclease SacI.....	50
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose a 0.8% dos produtos de recombinação para os genes <i>bar</i> e <i>nptII</i> , clivados com enzima de restrição SacI.....	51
Figura 20. Mapas dos vetores p28_35S- <i>bar</i> e p28_35S- <i>nptII</i> , e representação do sítio de anelamento de diferentes <i>primers</i>	52
Figura 21. Eletroforese em gel de agarose a 0.8% dos produtos de PCR para regiões dos vetores p28_35S- <i>bar</i> e p28_35S- <i>nptII</i>	53
Figura 22. Representação da cobertura dos sequenciamentos de DNA ao longo dos cassetes gênicos de p28_35S- <i>bar</i> (A) e p28_35S- <i>nptII</i> (B).....	54
Figura 23. Troca de bases na OFR de <i>nptII</i> , revelada pelo sequenciamento.....	55
Figura 24. Curva de seleção do herbicida glifosinato de amônio para plantas de <i>E. urophylla</i> cultivadas em placas de Petri.....	58
Figura 25. Curva de seleção do antibiótico canamicina para plantas de <i>E. urophylla</i> cultivadas em placas de Petri.....	59
Figura 26. Curva de seleção do herbicida glifosinato de amônio para plantas de <i>E. urophylla</i> cultivadas em placas de RT-qPCR.....	62
Figura 27. Curva de seleção do antibiótico canamicina para plantas de <i>E. urophylla</i> cultivadas em placas de RT-qPCR.....	62
Figura 28. Resultado da seleção com glifosinato de amônio e canamicina para plantas de <i>E. urophylla</i> cultivadas em solo.....	64
Figura 29. Comparação da expressão de GFP em folhas de planta controle (não inoculada) e tratada com os vetores p1470 e p28_35S- <i>gfp</i> , via inoculação mecânica no caule.....	66
Figura 30. Comparação da expressão de GFP em folhas de planta controle (inoculada com os vetores p1470 + p28_35S-Gateway (vazio)) e tratada com os vetores p1470 + p28_35S- <i>gfp</i> , via inoculação mecânica no caule.....	66
Figura 31. Comparação da expressão de GFP em plântulas controle (exposta aos vetores p1470 + p28_35S-Gateway (vazio)) e tratada com os vetores p1470 + p28_35S- <i>gfp</i> , via absorção pelas raízes.....	67

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Programa do termociclador para PCR de amplificação das regiões codificadoras dos genes de interesse *bar* e *nptII* a partir dos DNAs molde pWBVec4a e pCAMBIA2300.....29
- Tabela 2.** *Primers* utilizados para a amplificação de regiões de junção entre o vetor de destino p28_35S-Gateway e a sequência codificadora de *bar*.....34
- Tabela 3.** *Primers* utilizados para a amplificação de regiões de junção entre o vetor de destino p28_35S-Gateway e a sequência codificadora de *nptII*.....35
- Tabela 4.** Programa do termociclador para PCR de amplificação de regiões de junção entre o vetor p28_35S-Gateway e a sequência codificadora de *bar* ou *nptII*.....36
- Tabela 5.** Programa do termociclador para PCR de amplificação de regiões de junção entre o vetor p28_35S-Gateway e a sequência codificadora de *bar* ou *nptII* - condição 2.....36
- Tabela 6.** *Primers* utilizados neste trabalho para a amplificação de sequências dos genes de interesse a partir de vetores de origem.....45
- Tabela 7.** Sobrevivência de plantas de *E. urophylla* cultivadas em placas de Petri ao tratamento com diferentes concentrações de glifosinato de amônio.....56
- Tabela 8.** Sobrevivência de plantas de *E. urophylla* cultivadas em placas de Petri ao tratamento com diferentes concentrações de canamicina.....57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amp ^R	Gene de resistência à ampicilina
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP(s)	Desoxirribonucleosídeo(s) trifosfatado(s)
dsDNA	DNA fita dupla, do inglês <i>double stranded DNA</i>
EtBr	Brometo de etídio, do inglês <i>ethidium bromide</i>
GM	Geneticamente modificado
IR	Região intergênica, do inglês <i>intergenic region</i>
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
NPTII	Neomicina fosfotransferase II, do inglês <i>neomycin phosphotransferase II</i>
o/n	Durante a noite, do inglês <i>overnight</i>
ORF	Fase aberta de leitura, do inglês <i>open reading frame</i>
pb	Par(es) de bases, do inglês <i>base pair(s)</i>
PIB	Produto Interno Bruto
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
SM	Meio <i>Super Medium</i>
SMPB	Tampão <i>Super Medium Phosphate buffer</i>
SLS	Lauril sulfato de sódio, do inglês <i>sodium laureth sulfate</i>
ssDNA	DNA fita simples, do inglês <i>single stranded DNA</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. O <i>Eucalyptus</i>	14
1.1.1. O <i>Eucalyptus</i> no Brasil	14
1.2. Transformação genética do eucalipto e suas limitações.....	16
1.3. Vetores virais	18
1.3.1. Tecnologia <i>TraitUp</i> TM	18
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo Geral	26
3.2. Objetivos Específicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Inserção dos genes <i>bar</i> e <i>nptII</i> em vetor da série IL-60.....	27
4.1.1. Projeção e síntese de oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) para as sequências codificadoras de BAR e de NPTII.....	27
4.1.2. Amplificação das sequências codificadoras de BAR e NPTII por PCR...28	
4.1.3. Clonagem das sequências codificadoras de interesse no vetor pENTR/D-TOPO.....	29
4.1.4. Reação de recombinação entre os vetores pENTR/D-TOPO- <i>bar</i> e pENTR/D-TOPO- <i>nptII</i> e o vetor de destino p28_35S_Gateway.....	32
4.1.5. Sequenciamento dos vetores finais p28_35S- <i>bar</i> e p28_35S- <i>nptII</i>	33
4.1.6. Midipreparação e purificação dos vetores p1470, p28_35S- <i>bar</i> e p28_35S- <i>nptII</i>	37
4.2. Cultivo de <i>E. urophylla</i>	38
4.3. Determinação das doses letais mínimas dos agentes de seleção para plântulas de <i>E. urophylla</i> cultivadas em placas de Petri	39

4.4.	Determinação das doses letais mínimas dos agentes de seleção para plântulas de <i>E. urophylla</i> cultivadas em hidroponia em poços de 200 µL.....	40
4.5.	Determinação de concentração letal dos agentes de seleção para plantas de <i>E. urophylla</i> cultivadas em solo.....	41
4.6.	Tratamento de plântulas de <i>E. urophylla</i> com vetor da plataforma IL-60 adaptado para a expressão do gene repórter <i>gfp</i> , via absorção pelas raízes.....	42
4.7.	Tratamento de plântulas de <i>E. urophylla</i> com vetor da plataforma IL-60 adaptado para a expressão do gene repórter <i>gfp</i> , via injeção no caule.....	43
4.8.	Análise da expressão de GFP por microscopia de fluorescência	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1.	Inserção dos genes <i>bar</i> e <i>nptII</i> em vetor da série IL-60.....	45
5.1.1.	Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) para as sequências codificadoras de BAR e de NPTII.....	45
5.1.2.	Obtenção das sequências codificadoras de BAR e NPTII.....	46
5.1.3.	Geração dos vetores pENTR/D-TOPO- <i>bar</i> e pENTR/D-TOPO- <i>nptII</i>	47
5.1.4.	Obtenção do vetor p28_35S-Gateway, da série IL-60, contendo as sequências de interesse.....	49
5.1.5.	Confirmação da sequência dos vetores finais p28_35S- <i>bar</i> e p28_35S- <i>nptII</i>	51
5.1.6.	Midi-preparação e purificação dos vetores p1470, p28_35S- <i>bar</i> e p28_35S- <i>nptII</i>	55
5.2.	Doses letais mínimas dos agentes de seleção para plântulas de <i>E. urophylla</i> cultivadas em placas de Petri.....	55
5.3.	Doses letais mínimas dos agentes de seleção para plântulas de <i>E. urophylla</i> cultivadas em hidroponia em poços de 200 µL.....	60
5.4.	Tratamentos com os agentes de seleção para plantas de <i>E. urophylla</i> cultivadas em solo.....	62
5.5.	Expressão de GFP nas plantas de <i>E. urophylla</i> tratadas com os vetores da série IL-60 via inoculação direta no caule ou absorção pelas raízes	64

6. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	68
7. REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

1.1. O *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* pertence à família *Myrtaceae* e possui cerca de 700 espécies e mais de 3.000 híbridos, os quais correspondem majoritariamente a arbóreas florestais. Nativo da Austrália, da Indonésia e do Timor Leste, atualmente é cultivado em mais de 90 países e distribuído por aproximadamente 22 milhões de hectares (POKE *et al.*, 2005). Dentre os principais países detentores de área plantada de eucalipto, destacam-se Brasil, Índia, África do Sul, Espanha, Portugal, Chile, Argentina e China (ENCE, 2009).

Os principais atributos que contribuem para a ampla distribuição geográfica do eucalipto são a sua adaptabilidade a solos e climas variados, rápido crescimento, alta produtividade e grande número de espécies e de híbridos naturais (KIRCH *et al.*, 2011). Além disso, suas excelentes características silviculturais - como o alto teor de celulose (43,8-54,4 %) e o relativo baixo teor de lignina (24,5-28,6 %) (MAGATON *et al.*, 2006) - e sua aplicação para a produção de madeira maciça, celulose e papel atentam para a sua importância econômica e industrial (CORDEIRO, 2003). As toras de eucalipto são empregadas principalmente na produção de celulose para a fabricação de variados tipos de papel, para o uso de madeira sólida na construção civil, na indústria moveleira, na produção de madeira industrializada (MDP, MDF, HDF, OSB, compensados e aglomerados) e na obtenção de lenha e de carvão vegetal para geração de energia térmica e elétrica (MORA & GARCIA, 2000). Não obstante, a partir do eucalipto podem ser obtidos óleos essenciais, com os quais são fabricados alimentos, produtos de limpeza, perfumes e remédios (CIBIO, 2008).

1.1.1. O *Eucalyptus* no Brasil

O cultivo de *Eucalyptus* no Brasil teve início no século XIX, com a introdução de mudas oriundas da Austrália nos estados do Rio Grande do Sul e do Rio de Janeiro. Porém, foi apenas na década de 1950 que o eucalipto passou a ser plantado com o objetivo de fornecer matéria-prima para o abastecimento das fábricas de papel e celulose (FOELKEL, 2006).

As condições climáticas favoráveis ao cultivo, aliadas às tecnologias desenvolvidas pelas empresas e instituições de pesquisa e aos incentivos fiscais para a prática do reflorestamento contribuíram para o sucesso e para a disseminação das práticas de eucaliptocultura no país (FOELKEL, 2006). Como reflexo desse cenário, o Brasil possui mais de 5 milhões de hectares plantados de *Eucalyptus*, o que corresponde a 76,6 % do total de área florestal cultivada no país (ABRAF, 2012 – dados disponíveis em <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/3910>). Os estados detentores das maiores áreas plantadas são Minas Gerais (28,2 %), São Paulo (20,4 %), Mato Grosso do Sul (11,9 %), Paraná (11,5 %), Espírito Santo (5,6 %), Bahia (3,9 %) e Rio Grande do Sul (2,1 %), conforme indicado na Figura 1. Já as principais espécies cultivadas no país são *Eucalyptus grandis*, *E. camaldulensis*, *E. saligna* e *E. urophylla*, além de híbridos destes (CIBIO, 2008).

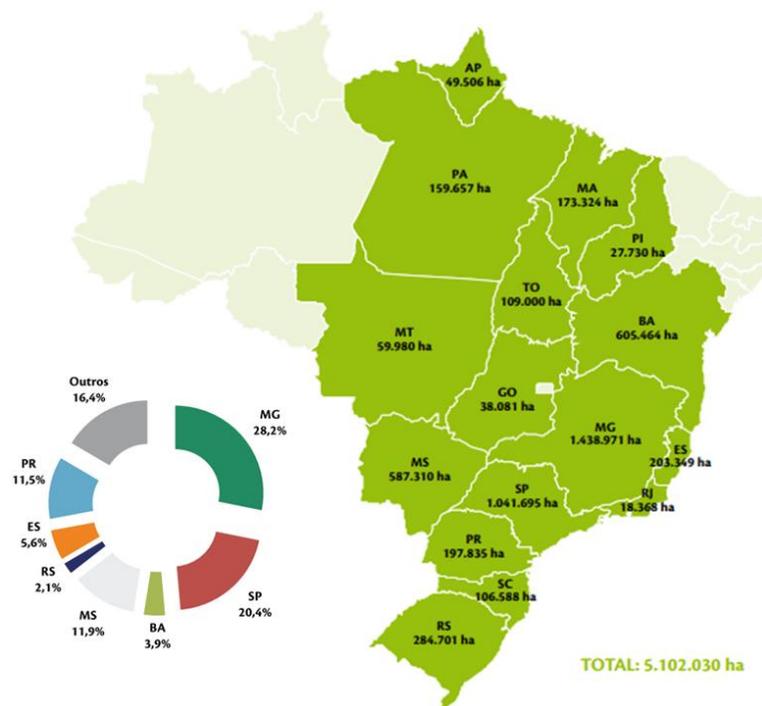


Figura 1. Distribuição de plantios florestais com *Eucalyptus* nos estados do Brasil, área e percentual de plantios por estado. Dados de 2012 da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF).

Em 2012, o Brasil encontrava-se na posição de quarto maior produtor de pastas de celulose e nono maior produtor de papel do mundo (BRACELPA, 2012 - dados disponíveis em

http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/bitstream/handle/123456789/7743/Bracelpa-Relatorio_Estatistico-2011.pdf?sequence=1). Ressaltando a importância econômica e social do setor no país, dados de 2008 apontam que a eucaliptocultura é responsável por 3,5 % do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro e pela geração de 4,6 milhões de empregos diretos e indiretos (CIBIO, 2008).

Além disso, o Brasil é detentor de um elevado nível técnico e científico no ramo da eucaliptocultura, sobretudo nas áreas de fisiologia e melhoramento vegetal. Tais aptidões possibilitaram o desenvolvimento de linhagens híbridas de espécies de *Eucalyptus* para diversos fins acadêmicos e industriais (ALZATE, 2004) e de linhagem transgênica com fenótipo de crescimento acelerado e produção aumentada de celulose, aprovada em 2015 pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para uso comercial.

Entretanto, apesar da liderança tecnológica do setor brasileiro, o segmento de árvores plantadas ainda enfrenta contrariedades. Na última década, houve um significativo aumento nos custos de produção de madeira no país, além da diminuição nas taxas de crescimento da produção de papel e de celulose e das ameaças impostas por fatores bióticos e abióticos (CAPO, 2015). Tais aspectos, somados à relevância econômica, social e industrial das árvores de eucalipto e à expressiva demanda pelos produtos derivados da sua madeira, atentam para a necessidade de buscar novas espécies, híbridos ou variedades geneticamente modificadas (GM) de *Eucalyptus* que apresentem características melhoradas e auxiliem no controle ou na reversão dos cenários desfavoráveis. Dentre os atributos desejáveis, estão melhores propriedades da madeira (como maior balanço entre o teor de celulose e de lignina), crescimento acelerado, tolerância a estresses abióticos, resistência a estresses bióticos e resistência a herbicidas.

1.2. Transformação genética do eucalipto e suas limitações

As estratégias comumente empregadas para a obtenção de plantas com características melhoradas correspondem ao melhoramento genético convencional e à transgenia (transgênese). No entanto, embora os programas de melhoramento convencional tenham contribuído para a obtenção de híbridos de eucalipto e para o

aumento da produtividade no setor florestal, estes ainda apresentam grandes limitações. Os entraves estão associados principalmente a características intrínsecas às espécies de *Eucalyptus* tais como o longo tempo necessário para que as plantas atinjam a estabilidade fenotípica e a maturidade reprodutiva, a dificuldade no controle de cruzamentos entre espécies, a baixa variabilidade genética e a incompatibilidade sexual. Assim, os processos de cruzamento e de seleção tornam-se bastante demorados (SARTORETTO *et al.*, 2008).

Nesse contexto, a transgenia configura-se como alternativa mais favorável para a obtenção de árvores de eucalipto com características de interesse pois amplia a disponibilidade de genes, ultrapassando as barreiras impostas pela incompatibilidade sexual, e permite a transferência gênica em uma única geração (GIRIJASHANKAR, 2011).

Métodos de transgenia como biobalística e transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* já foram explorados para a introdução de DNA exógeno em eucalipto, por meio dos quais eventos transgênicos de *E. grandis*, *E. globulus* e *E. urograndis* foram obtidos (GIRIJASHANKAR, 2011). No entanto, ambas as técnicas apresentam restrições. Pelo método de biobalística, há dificuldade na regeneração de plantas após a transformação, visto que as condições de cultura favoráveis à regeneração dificultam a geração de tecidos transgênicos e vice-versa (GIRIJASHANKAR, 2011). Já o método de transformação mediada por *A. tumefaciens* tem eficácia variável de acordo com a espécie no que diz respeito à taxa de transferência gênica e à integração e expressão do transgene. Desse modo, fatores como a cepa de *Agrobacterium*, o tipo e a fisiologia do explante a ser transformado, a concentração de reagentes e a duração do cultivo precisam ser otimizados de acordo com cada genótipo (CHAUHAN *et al.*, 2014).

Não obstante, embora existam diversos relatos da expressão estável dos genes exógenos ao longo dos anos, também existem evidências do contrário, como é o caso de plantas transgênicas de eucalipto que sofreram alteração na expressão do transgene quando transferidas de estufas para o cultivo a campo, e plantas com variação nos padrões de expressão do transgene em diferentes tecidos e idades (CHAUHAN *et al.*, 2014).

Assim, é notório que a transgenia do eucalipto, a exemplo de outras árvores florestais, ainda apresenta grandes desafios metodológicos. Além disso, a utilização comercial dessas plantas ainda está em estágio inicial devido ao alto custo para sua geração e à presença de patentes (GIRIJASHANKAR, 2011).

Desse modo, o melhoramento de plantas de eucalipto carece de um método que garanta a expressão de transgenes de modo rápido, simples, sistêmico e estável ao longo do ciclo de vida da planta, além de ser eficaz em todas as espécies e genótipos. Dessa forma, é de grande interesse o desenvolvimento e/ou o teste de metodologias alternativas para a introdução de genes de interesse em *Eucalyptus*.

1.3. Vetores virais

Uma das principais alternativas aos métodos de transgenia citados corresponde ao uso de vetores virais, sobretudo vírus naturalmente capazes de infectar plantas. Estes destacam-se pela sua versatilidade, ampla gama de hospedeiros, rápida entrega do DNA exógeno e capacidade de produção de proteínas recombinantes quando modificados para conter as sequências codificadoras de interesse. Diversos vírus de RNA e de DNA de diferentes famílias já foram empregados para este fim, como o vírus-do-mosaico-do-tabaco (TMV) e o vírus X da batata (PVX; YUSIBOV *et al.*, 2006). No entanto, tais vetores não permitem a inserção e a expressão de insertos grandes visto que esses precisam ser inseridos em detrimento dos genes virais, o que pode limitar a movimentação e restringir a expressão do gene exógeno apenas às células inicialmente infectadas. Além disso, em alguns casos, o transgene pode ser gradativamente deletado (ZAIDI & MANSOOR, 2017).

1.3.1. Tecnologia *TraitUp*TM

Em 2007, um grupo de pesquisadores da Universidade de Jerusalém, em Israel, relatou a construção de um vetor universal para o silenciamento e para a expressão de genes exógenos em diversas espécies de plantas (PERETZ *et al.*, 2007). Denominado “IL-60”, o vetor é derivado do vírus do frisado amarelo do tomateiro, ou TYLCV (do inglês *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*).

O TYLCV é um begomovírus da família dos geminivírus e pode ser transmitido pela mosca branca (*Bemisia tabaci*) a uma ampla gama de hospedeiros como tomate, batata, tabaco e feijão. Conforme ilustrado na Figura 2, a doença causada pelo vírus acarreta grandes perdas na produção devido à severa inibição do crescimento, à redução do tamanho foliar, ao enrolamento e à clorose das folhas e flores e à redução da produção de frutos (KIL *et al.*, 2016).



Figura 2. Comparação de sintomas em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) suscetíveis e tolerantes ao TYLCV. As plantas suscetíveis apresentam os sintomas típicos de amarelecimento e enrolamento das folhas e severa redução no crescimento, ao passo que as tolerantes permanecem saudáveis após a infecção viral. Fonte: KIL *et al.*, 2016.

O TYLCV apresenta genoma de ssDNA, monopartido, de 2.787 nucleotídeos. Conforme representado na Figura 3, o genoma é composto por 6 ORFs sobrepostas, sendo duas transcritas no sentido senso (V1 e V2) e quatro no sentido antisenso ou complementar (C1, C2, C3 e C4), a partir de uma região intergênica (IR) que funciona tanto como promotor bidirecional quanto como origem de replicação.

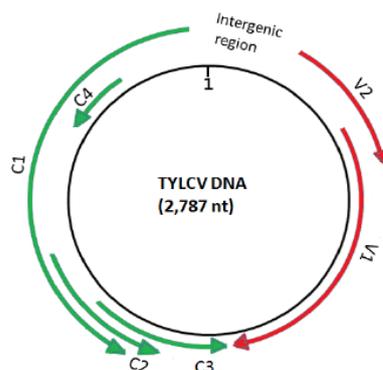


Figura 3. Organização genômica do TYLCV. As fitas senso (V1 e V2) estão representadas em vermelho e as fitas complementares (C1, C2, C3 e C4) em verde, sendo transcritas a partir da região intergênica (*intergenic region*).

Uma vez introduzidas nas células da planta, as moléculas de ssDNA são convertidas a dsDNA pela maquinaria do hospedeiro. Nessa versão, replicam-se e movimentam-se pela planta e, novamente com o auxílio de proteínas do hospedeiro, expressam seus RNAs e proteínas. Após a produção de várias cópias de dsDNA, ocorre a replicação círculo rolante e consequente geração da progênie de ssDNA, sendo essas partículas encapsuladas e transportadas para outros tecidos da planta ou para outras plantas por meio do inseto vetor (PERETZ *et al.*, 2007).

Estudos prévios permitiram caracterizar a participação da proteína C1, codificada pela ORF de mesmo nome, na iniciação da replicação círculo rolante (ARGÜELLO-ASTORGA *et al.*, 1994; HANLEY-BOWDOIN *et al.*, 2000). As proteínas V1, V2 e C4 tem papel dualístico, estando associadas ao aparecimento dos sintomas e à severidade da doença e, também, à movimentação do vírus pela planta (controle do tráfico do vírus para o núcleo, para fora do núcleo em direção à periferia das células e para as células vizinhas por meio dos plasmodesmos). Sabe-se que essas proteínas interagem umas com as outras e com proteínas do próprio hospedeiro e que diferentes complexos proteicos estão envolvidos nos vários estágios de mobilização. O TYLCV, assim como grande parte dos geminivírus, tem sua movimentação restrita ao floema, embora haja relatos da sua propagação para o mesófilo (ZAMIR & CZOSNEK, 1994). Acredita-se que as proteínas codificadas pelas ORFS V1, V2 e C2, bem como a IR, estejam associadas com esse tropismo.

No trabalho anteriormente citado a respeito da tecnologia IL-60 (PERETZ *et al.*, 2007), os autores prospectaram o potencial do TYLCV como ferramenta biotecnológica para a transformação de plantas devido à sua capacidade de infectá-las, propagar-se sistemicamente pelo floema e promover a expressão dos seus genes por meio de interação com as proteínas do hospedeiro. O objetivo dos pesquisadores era, portanto, desenvolver um vetor alternativo aos métodos comumente empregados de transgenia e otimizado em comparação aos vetores virais já existentes.

Para tal, foram feitas modificações no genoma viral de modo a torná-lo assintomático e incapaz de gerar progênie de ssDNA por meio da mutação ou remoção das ORFs associadas com essas características. Mais especificamente, a ORF V1 sofreu deleção de 60 nucleotídeos, ocasionando a eliminação de 20 aminoácidos na porção N-terminal da proteína, ao passo que a ORF C1 foi interrompida pela introdução de um plasmídeo. O vetor gerado após essas modificações foi então denominado “IL-60”. As regiões virais essenciais para a expressão gênica e movimentação célula-a-célula foram mantidas, dando origem a um vetor de dsDNA capaz de se replicar pela planta como um plasmídeo episossomal (PERETZ *et al.*, 2007). Quando introduzido mecanicamente em plantas de tomate via inoculação direta no caule, o vetor não levou ao desenvolvimento de sintomas, mas manteve sua capacidade de propagação pela planta, sendo detectado em pontos distantes do sítio de inoculação. Além disso, o vetor não se integrou ao genoma, não produziu progênie de ssDNA e não pode ser transportado a outras plantas pelo inseto transmissor (*B. tabaci*), provendo evidências da biossegurança do sistema. Quando genes exógenos (como os genes repórteres *gfp* e *gus*) foram inseridos no vetor e introduzidos em plantas, estes foram eficientemente expressos em todos os tecidos, sendo a expressão estável durante o ciclo completo de vida das mesmas (12 meses). Ainda, os níveis de expressão foram comparáveis aos promovidos pelo promotor constitutivo 35S do vírus-do-mosaico-da-couve-flor (do inglês, *Cauliflower Mosaic Virus* ou CaMV).

Com algumas modificações na sequência do vetor, o mesmo foi com êxito empregado no silenciamento de genes endógenos e exógenos, conforme verificado por análises moleculares e fenotípicas (PERETZ *et al.*, 2007). Recentemente, o

método foi empregado para a expressão de um *operon* bacteriano de 7 kb, levando à introdução de uma rota metabólica completa em plantas de tomate (*S. lycopersicum*) e à consequente produção do metabólito antifúngico pirrolnitrina (PRN), conferindo resistência fúngica às plantas inoculadas (MOZES-KOCH *et al.*, 2012) (Figura 4). Assim, comprovou-se a capacidade do vetor em conter e promover a expressão de cassetes gênicos grandes, sem prejuízos na sua movimentação e propagação pela planta, o que configura-se como uma grande vantagem em relação aos demais vetores virais. Ademais, foi demonstrado a capacidade do sistema em atribuir fenótipo de resistência a um estresse biótico, característica de grande interesse e com vasto potencial de aplicação.



Figura 4. Comparação da resistência a fungos em planta tratada com o vetor IL-60 contendo o operon *prn* versus planta controle. As plantas tratadas, à esquerda, expressam o *operon*, produzem o metabólito PRN e apresentam resistência à doença do “tombamento” (*damping off*) causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* quando plantadas em solo contaminado com o microrganismo. As plantas controle, à direita, são afetadas pela doença quando expostas às mesmas condições. Fonte: MOZES-KOCH *et al.*, 2012.

A tecnologia IL-60 foi empregada com sucesso em mais de 40 espécies de plantas pertencentes a 14 famílias botânicas diferentes incluindo plantas lenhosas e de difícil manipulação como videiras, laranjeiras e macieiras (PERETZ *et al.*, 2007; CUSIN *et al.*, 2017). Em todos os casos, o vetor foi introduzido nas plantas de forma simples, seja por absorção direta pelas raízes ou por injeção em tecidos vasculares utilizando seringa e agulha hipodérmicas, o que permite a aplicação do método em plantas já adultas. As quantidades de DNA utilizadas variaram de 200 ng a 1 ou 2 µg (MOZES-KOCH *et al.*, 2012; PERETZ *et al.*, 2007). Na maioria das espécies de

plantas, a expressão do(s) gene(s) heterólogo(s) inicia-se poucos dias após a aplicação; em plantas lenhosas, o tempo médio é de 3 semanas.

Desse modo, a tecnologia permite a obtenção de plantas modificadas em um período muito menor quando comparado aos métodos tradicionais de transformação, além de eliminar a necessidade de transformar e de regenerar plantas por cultura *in vitro* de tecidos. Adicionalmente, as plantas geradas são consideradas não transgênicas segundo decisões e legislações de alguns países, visto que os vetores propagam-se e replicam-se nas células vegetais sem integrar-se no genoma da planta. No entanto, é importante salientar que, no Brasil, a tecnologia envolve práticas de engenharia genética e, portanto, os produtos dela derivado deverão ser considerados, segundo a legislação vigente, organismos geneticamente modificados (OGMs), ou seja, transgênicos [Lei Federal Nº 11.105 de 24 de março 2005].

Em mais recente aperfeiçoamento do sistema IL-60, pesquisadores investigaram quais regiões do genoma do TYLCV são minimamente essenciais para a sua funcionalidade (GOVER *et al.*, 2014). O resultado da otimização foi o desenvolvimento de dois vetores que, juntos, constituem a plataforma IL-60. O primeiro vetor, intitulado p1470, funciona como auxiliar (*helper plasmid*) e é o responsável pela manutenção, replicação e movimentação do outro vetor, assim permitindo a expressão do(s) gene(s) de interesse em locais distantes do sítio de inoculação, ao passo que o segundo vetor, intitulado pIR, é o portador do(s) gene(s) de interesse.

O p1470 contém apenas a região IR, necessária para sua replicação, e as ORFs V1 e V2, cujas proteínas correspondentes são necessárias para a expressão dos genes de interesse e movimentação do vetor pIR, conforme comprovação experimental. O pIR, por sua vez, possui apenas a região IR, a jusante da qual é introduzido o gene de interesse (Figura 5). Por funcionar como promotor, a IR permite a expressão do transgene, mas essa ocorre apenas de modo basal, nas primeiras células na qual o vetor foi introduzido. Do mesmo modo, por sua ação como origem de replicação, permite o aumento do número de cópias do vetor, de modo local. Para que o pIR seja propagado para outras células e para que o gene de interesse seja expresso em locais distantes do sítio de inoculação, é necessária a presença das

proteínas V1 e V2, produzidas a partir do vetor auxiliar. Percebe-se então que todas as demais proteínas (C1, C2, C3 e C4) são dispensáveis e suas ORFs não estão contidas em quaisquer dos vetores.

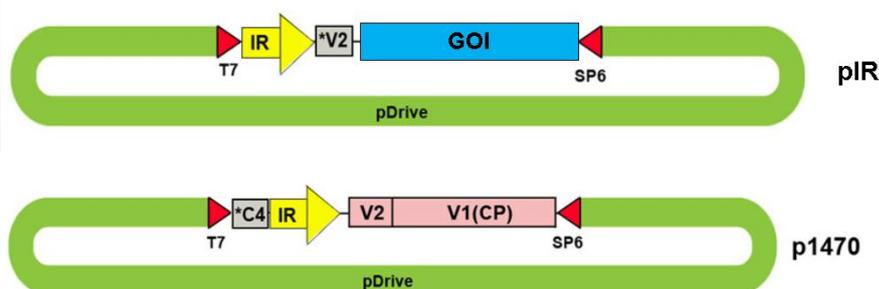


Figura 5. Vetores pIR e p1470 da plataforma IL-60. Os vetores apresentam apenas regiões do genoma do TYLCV que são necessárias para sua aplicação como ferramenta biotecnológica. GOI = gene de interesse, do inglês *gene of interest*. Fonte: GOVER *et al.*, 2014.

A tecnologia foi patenteada e é de propriedade da empresa israelense Morflora (<http://www.moreflora.com/>) sob o nome *TraitUp*TM. A empresa define a tecnologia como uma plataforma inovadora, rápida e não-transgênica para a introdução de características em sementes, expressão eficiente de genes exógenos, proteção de plantas contra agentes externos e produção de plantas melhoradas.

Apesar de já ter sido efetivamente utilizada em inúmeras espécies e famílias botânicas, não existem relatos do uso da metodologia em plantas de *Eucalyptus* ou em quaisquer outras da família das mirtáceas.

2. JUSTIFICATIVA

Espécies do gênero *Eucalyptus* apresentam excelentes características silviculturais que despertam o interesse para o plantio e exploração de sua madeira. O Brasil possui grande área plantada de *Eucalyptus* e figura entre os maiores produtores de pasta de celulose e de papel do mundo. No entanto, devido sobretudo às ameaças trazidas por fatores bióticos e abióticos, a busca por novas variedades de *Eucalyptus* é de grande importância. Neste âmbito, a transformação genética (transgenia) configura-se em ferramenta biotecnológica adicional aos programas clássicos de melhoramento genético e seleção. No caso do eucalipto, porém, a transgenia ainda é limitada devido ao número reduzido de protocolos para transformação e regeneração de plantas transgênicas, além da recalcitrância dos genótipos de interesse. A tecnologia de vetores do sistema IL-60, denominada *TraitUP™* (Morflora), é um método alternativo de introdução mecânica de genes em plantas. A tecnologia tem sido aplicada em plantas de diferentes espécies, as quais foram obtidas de maneira mais rápida e simples quando comparado aos métodos de transformação genética mediados por agrobactérias, biobalística, eletroporação e outros. Portanto, a validação da aplicação da tecnologia de vetores IL-60 para a introdução de genes de interesse em espécies de *Eucalyptus* é de grande valia.

2. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho é avaliar a aplicabilidade da tecnologia IL-60 (*TraitUp™*) para a transferência e expressão de genes em *Eucalyptus urophylla*, com vista à conferência da resistência a herbicidas ou a antibióticos.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Construir versões do vetor pIR, da plataforma IL-60, contendo separadamente os genes de interesse *bar* e *nptII*, capazes de conferir resistência a agentes seletivos;

3.2.2. Determinar as doses letais mínimas dos agentes de seleção para plantas de *E. urophylla* em condições experimentais de cultura vegetal em solo e em hidroponia;

3.2.3. Tratar plantas de *E. urophylla* com os vetores da plataforma IL-60 adaptados para a expressão dos genes de interesse, via absorção pelas raízes e/ou injeção no caule;

3.2.4. Expor as plantas aos agentes seletivos, nas doses e tempo determinados experimentalmente;

3.2.5. Avaliar a resistência conferida pelos vetores, por meio da avaliação e registro de fenótipos;

3.2.6. Detectar a presença sistêmica e duradoura dos plasmídeos nas plantas, por meio de análises moleculares;

3.2.7 Tratar plantas de *E. urophylla* com vetor da plataforma IL-60 adaptado para a expressão do gene repórter *gfp*, via absorção pelas raízes e/ou injeção no caule e verificar a expressão de GFP por microscopia de fluorescência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Inserção dos genes *bar* e *nptII* em vetor da série IL-60

4.1.1. Projeção e síntese de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para as sequências codificadoras de BAR e de NPTII

Os genes selecionados para o estudo são os codificadores das enzimas fosfinotricina acetiltransferase (do inglês, *phosphinothricin acetyltransferase* ou *pat*, também conhecido como *bialaphos resistance* ou *bar*) e neomicina fosfotransferase (do inglês, *neomycin phosphotransferase* ou *nptII*). O gene *bar* confere resistência aos herbicidas que possuem glifosinato de amônio como princípio ativo, como Basta e Finale, por exemplo, enquanto o gene *nptII* confere resistência a antibióticos da família dos aminoglicosídeos como neomicina, canamicina e gentamicina (THOMPSON *et al.*, 1987, RATHORE *et al.*, 1993, ROA-RODRIGUEZ & NOTTENBURG, 2002).

A região codificadora de *bar* foi isolada a partir do vetor pWBVec4a, gentilmente cedido pelo Dr. Ming-Bo Wang, enquanto a de *nptII* foi isolada a partir do vetor pCAMBIA2300 (Cambia), ambas por meio de amplificação via PCR. Para as reações, foram utilizados *primers forward* e *reverse* específicos, projetados com base nas sequências codificadoras de BAR e de NPTII obtidas dos vetores pCAMBIA3300 e pCAMBIA2300, respectivamente (Figura 6).

Para a projeção, foi utilizada a ferramenta *online OligoAnalyzer*, por meio da qual foram aferidas as temperaturas médias de desnaturação (T_m) e avaliados parâmetros como estabilidade de estruturas secundárias resultantes de autoanelamento, homo- e heterodimerização. Os *primers forward* foram projetados de modo a iniciar com a sequência CACC, para conseqüentemente gerar *amplicons* contendo essas bases na extremidade 5' e permitir a realização da etapa subsequente de clonagem. As sequências projetadas foram sintetizadas pela empresa IDT (*Integrated DNA Technologies*), representada no Brasil pela empresa Síntese Biotecnologia Ltda. (<http://www.sintesebiotecnologia.com.br/>).

de agarose a 0,8 % corado com EtBr a 0,01 µg/mL. O gel foi submetido à eletroforese por 1,5 h à 65 mA.

Tabela 1. Programa do termociclador para PCR de amplificação das regiões codificadoras dos genes de interesse *bar* e *nptII* a partir dos DNAs molde pWBVec4a e pCAMBIA2300

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	2 min	1
Desnaturação	95	30 s	30
Anelamento	50	30 s	30
Extensão	73	2 min	30
Extensão final	73	15 min	1
	4	∞	

4.1.3. Clonagem das sequências codificadoras de interesse no vetor pENTR/D-TOPO

As sequências obtidas após a PCR foram clonadas direcionalmente no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen) (Figura 7), seguindo as recomendações do protocolo “*pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits*”. Resumidamente, a clonagem é mediada pela enzima topoisomerase, que se encontra covalentemente ligada ao vetor e apresenta atividades de endonuclease de restrição e de ligase. A enzima cliva uma das fitas do vetor, gerando uma extremidade coesiva (*overhang*) GTGG no mesmo, a qual é complementar à sequência CACC da extremidade 5' do produto de PCR. Conforme representado na Figura 8, a sequência GTGG invade a extremidade em questão, anela com a sequência CACC e estabiliza o produto de PCR na orientação correta, permitindo assim a clonagem direcional.

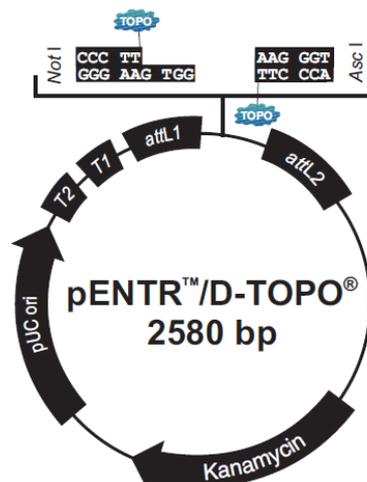


Figura 7. Representação do vetor de entrada pENTR/D-TOPO. É possível identificar os elementos: gene de resistência frente à canamicina em bactérias (*Kanamycin*); origem de replicação em bactérias (*pUC ori*); sequências para término de transcrição (T1 e T2), sequências para recombinação do gene de interesse a partir do vetor de entrada para vetores de destino Gateway® (*attL1* e *attL2*). No detalhe verifica-se a extremidade coesiva GTGG e a enzima topoisomerase (TOPO) ligada covalentemente aos seus sítios de reconhecimento.

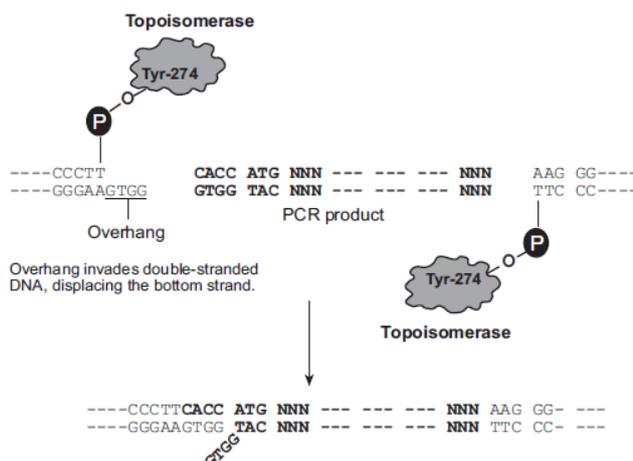


Figura 8. Representação da clonagem direcional TOPO®. Na imagem é possível visualizar o produto de PCR (*PCR product*) e segmento do vetor. Na extremidade 3' da fita clivada do vetor, a enzima topoisomerase encontra-se ligada covalentemente a um fosfato por meio de um resíduo de tirosina (Tyr-279).

Os componentes e quantidades empregados na reação para a clonagem do *amplicon* de *bar* foram: produto de PCR a aproximadamente 1,6 ng/ μ L (2,5 μ L), solução salina (1 μ L), água MiliQ autoclavada (1,5 μ L), pENTR/D-TOPO a 15-20 ng/ μ L (1 μ L), totalizando 6 μ L. A reação foi incubada à temperatura ambiente

(aproximadamente 20 °C) por 5 minutos e após armazenada à -20 °C. Já para a clonagem do *amplicon* de *nptII*, foram utilizados: produto de PCR a aproximadamente 3,5 ng/μL (1,5 μL), solução salina (1 μL), água MiliQ autoclavada (2,5 μL), pENTR/D-TOPO a 15-20 ng/μL (1 μL), totalizando 6 μL, e a reação foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Para ambas as reações, as quantidades utilizadas de vetor e de *amplicon* foram calculadas para totalizar proporção molar de 1:1, seguindo a

fórmula
$$\frac{\text{Quantidade de vetor (ng)} \times \text{tamanho do inserto (kb)}}{\text{tamanho do vetor (kb)}} \times \text{razão molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vetor}} = \text{quantidade de inserto (ng)} .$$

Dois μL da reação de clonagem para *bar* foram utilizados para a transformação genética de células termocompetentes de *Escherichia coli OmniMax 2*, seguindo protocolo conforme descrito em Ausubel *et al.* (2002), enquanto 2 μL da reação de clonagem para *nptII* foram utilizados para transformação de *One Shot Mach1- T1 Chemically Competent E. coli*, da Invitrogen, seguindo protocolo “*Transforming One Shot® Competent E. coli*”. Após a transformação, 20 μL e 200 μL das suspensões bacterianas foram distribuídos com alça de Drigalski em placas de Petri com meio de cultura de Luria-Bertani (LB) sólido contendo 50 mg/L de canamicina. As placas permaneceram em estufa à 37 °C *o/n*.

As colônias resultantes das transformações foram inoculadas com palitos estéreis em tubos de ensaio com 1,5 mL de meio LB líquido contendo 50 mg/L de canamicina. As culturas foram mantidas *o/n* à 37 °C e a 180 rotações por minuto (rpm) em agitador rotacional (New Brunswick Scientific). Em seguida, as minipreparações de plasmídeos foram realizadas segundo Ausubel *et al.* (2002). Os ácidos nucleicos foram ressuspensos em 20 μL de T.E. e posteriormente quantificados em Nanodrop (Thermo Scientific) segundo orientações do fabricante.

As versões parental e recombinante do plasmídeo (sem e com os *amplicons* de interesse, respectivamente) foram confirmadas por meio de clivagem com enzimas de restrição e de eletroforese em gel de agarose. Os componentes e quantidades empregados para a clivagem foram: 2 μL de plasmídeo minipreparado, 1,5 μL da enzima EcoRV (10 U/μL, Promega), 2 μL de *Buffer D 10x* (Promega), 2 μL de RNase A (250 ng/μL) e 12,5 μL de água MiliQ autoclavada, totalizando 20 μL. A reação foi

incubada à 37 °C por 1,5 h e, após, os 20 µL resultantes foram aplicados em gel de agarose a 0,8%, corado com EtBr a 0,01 µg/mL. O gel foi submetido à eletroforese por 1,5 h à 65 mA.

Versões recombinantes dos plasmídeos, denominadas “pENTR/D-TOPO-*bar*” e “pENTR/D-TOPO-*nptII*”, foram selecionadas para a etapa subsequente, em detrimento de versões parentais.

4.1.4. Reação de recombinação entre os vetores pENTR/D-TOPO-*bar* e pENTR/D-TOPO-*nptII* e o vetor de destino p28_35S_Gateway

As sequências codificadoras de *bar* e *nptII* foram transferidas dos vetores pENTR/D-TOPO-*bar* ou pENTR/D-TOPO-*nptII*, respectivamente, para o vetor de destino p28_35S_Gateway por meio de reação de recombinação mediada pela enzima LR Clonase (Invitrogen), de acordo com o protocolo descrito em “*Gateway® Technology with Clonase® II*”.

O vetor p28_35S_Gateway é uma versão do vetor pIR (da série IL-60) adaptado à tecnologia Gateway (Invitrogen) por pesquisadores da Embrapa Uva & Vinho de Bento Gonçalves, RS (Dr. Luís Fernando Revers, comunicação pessoal). Assim como o pIR, apresenta os elementos IR (origem de replicação) e Amp^R (gene marcador) que garantem a multiplicação do plasmídeo e resistência ao antibiótico ampicilina, respectivamente. Além disto, conta com o gene *ccdB* flanqueado pelas sequências *attR1* e *attR2* sob controle do promotor e do terminador 35S CaMV. Deste modo, os fragmentos de interesse são recombinados por intermédio das sequências *attR1* e *attR2*, substituem o gene *ccdB* letal às bactérias e são expressos de maneira constitutiva.

Resumidamente, para as reações foi respeitada a proporção de 1:1 de concentração de vetor de entrada:vetor de destino. Os componentes e quantidades utilizadas foram: 2 µL dos vetores pENTR-D-TOPO-*bar* ou pENTR/D-TOPO-*nptII* a 75 ng/µL, 1 µL do vetor p28_35S_Gateway a 150 ng/µL, 5 µL de TE *Buffer* e 2 µL de Gateway® LR Clonase® II *enzyme mix*. Após uma hora de incubação à 25°C, foi adicionado 1 µL de Proteinase K a 2 µg/µL e realizada incubação a 37°C por 10 minutos.

Após, 2 μL das reações de recombinação foram utilizados para a transformação genética de células termocompetentes de *E. coli OmniMax 2*, seguindo protocolo conforme descrito em Ausubel *et al.* (2002). Após a transformação, 20 μL e 200 μL das suspensões bacterianas foram distribuídos com alça de Drigalski em placas de Petri com meio de cultura LB sólido contendo 100 mg/L de ampicilina. As placas permaneceram em estufa à 37 °C *o/n*.

As colônias resultantes das transformações foram inoculadas com palitos estéreis em tubos de ensaio com 1,5 mL de meio LB líquido contendo 100 mg/L de ampicilina. As culturas foram mantidas *o/n* à 37 °C e a 180 rpm em agitador rotacional (New Brunswick Scientific). A seguir, as minipreparações de plasmídeos foram realizadas segundo Ausubel *et al.* (2002). Os ácidos nucleicos foram ressuspensos em 20 μL de T.E. e posteriormente quantificados em Nanodrop (Thermo Scientific) segundo orientações do fabricante.

As versões parental e recombinante do plasmídeo foram confirmadas por meio de clivagem com enzimas de restrição e de eletroforese em gel de agarose. Os componentes e quantidades empregados para a clivagem foram: 1 μL de plasmídeo minipreparado, 1 μL da enzima *SacI* (10 U/ μL , Sigma), 1 μL de *Buffer SA 10x* (Sigma), 2 μL de RNase A (250 ng/ μL) e 5 μL de água MiliQ autoclavada, totalizando 10 μL . A reação foi incubada à 37 °C por 1,5 h e, após, os 10 μL resultantes foram aplicados em gel de agarose a 0,8%, corado com EtBr a 0,01 $\mu\text{g/mL}$. O gel foi submetido à eletroforese por 1,5 h à 65 mA.

Versões recombinantes dos plasmídeos foram selecionadas e denominadas “p28_35S-*bar*” e “p28_35S-*nptII*”.

4.1.5. Sequenciamento dos vetores finais p28_35S-*bar* e p28_35S-*nptII*

Em complementação à confirmação da identidade via clivagem com endonucleases de restrição, uma amostra de p28_35S-*bar* e uma de p28_35S-*nptII* foram sequenciadas. Especificamente, foram sequenciados *amplicons* correspondentes às regiões de junção entre o arcabouço original do vetor p28_35S-Gateway e as sequências codificadoras dos genes de interesse, demonstrando assim

a correta inserção das mesmas no vetor. Os *amplicons* foram gerados via PCRs com diferentes combinações de *primers*, resultando em um total de 4 reações distintas para cada um dos vetores. Os *primers forward* e *reverse* utilizados para cada uma das reações (1 a 4), bem como suas respectivas temperaturas médias de desnaturação e tamanhos estão representados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Primers utilizados para a amplificação de regiões de junção entre o vetor de destino p28_35S-Gateway e a sequência codificadora de *bar*

PCR (nº)	Nome	Sequência (5' – 3')	Tamanho (bp)	T _m (°C)
1	pCAMBIA3300- <i>bar</i> -For	CACCATGAGCCCAGAACGAC	20	58,3
	pCAMBIA3300- <i>bar</i> -Rev	TCAAATCTCGGTGACGGGCA	20	59
2	M13- <i>For</i>	GTAAAACGACGGCCAGT	17	52,6
	pCAMBIA3300- <i>bar</i> -For	CACCATGAGCCCAGAACGAC	20	58,3
3	M13- <i>Rev</i>	CAGGAAACAGCTATGAC	17	47
	pCAMBIA3300- <i>bar</i> -Rev	TCAAATCTCGGTGACGGGCA	20	59
4	M13- <i>For</i>	GTAAAACGACGGCCAGT	17	52,6
	M13- <i>Rev</i>	CAGGAAACAGCTATGAC	17	47

Tabela 3. Primers utilizados para a amplificação de regiões de junção entre o vetor de destino p28_35S-Gateway e a sequência codificadora de *nptII*

PCR (nº)	Nome	Sequência (5' – 3')	Tamanho (bp)	T _m (°C)
1'	pCAMBIA2300- <i>nptII</i> -For	CACCATGGGGATTGAACAAGAT	22	55,3
	pCAMBIA2300- <i>nptII</i> -Rev	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGG	22	54,2
2'	M13-For	GTAAAACGACGGCCAGT	17	52,6
	pCAMBIA2300- <i>nptII</i> -For	CACCATGGGGATTGAACAAGAT	22	55,3
3'	M13-Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	17	47
	pCAMBIA2300- <i>nptII</i> -Rev	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGG	22	54,2
4'	M13-For	GTAAAACGACGGCCAGT	17	52,6
	M13-Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	17	47

As PCRs foram realizadas utilizando termociclador TC-XP-G (*Boyer Technology*). O programa para as reações 1, 1', 2 e 2' está representado na Tabela 4, enquanto o programa para as reações 3, 3', 4 e 4' está representado na Tabela 5. A distinção de programas fez-se necessária visto que alguns conjuntos de *primers* requerem temperaturas de anelamento e tempos de extensão diferentes em comparação a outros. Os componentes e quantidades da PCR foram: água MiliQ autoclavada (36,5 µL), dNTP a 5 mM (2 µL), 10x *Pfu Buffer* com MgSO₄ (5 µL), *Primer Forward* e *Reverse* a 10 mM (2,5 µL), *Pfu DNA Polymerase* a 2,5 U/µL (0,5 µL), DNA molde a aproximadamente 35 ng/µL (1 µL), totalizando 50 µL. Para as reações 1, 2, 3 e 4, o DNA molde foi o vetor p28_35S-*bar* e para as reações 1', 2', 3' e 4', o vetor p28_35S-*nptII*.

Foram aplicados 5 µL dos *amplicons* resultantes em gel de agarose a 0,8 % corado com EtBr a 0,01 µg/mL. O gel foi submetido à eletroforese por 1,5 h à 65 mA.

Tabela 4. Programa do termociclador para PCR de amplificação de regiões de junção entre o vetor p28_35S-Gateway e a sequência codificadora de *bar* ou *nptII*

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	2 min	1
Desnaturação	95	30 s	30
Anelamento	50	30 s	30
Extensão	73	2 min	30
Extensão final	73	15 min	1
	4	∞	

Tabela 5. Programa do termociclador para PCR de amplificação de regiões de junção entre o vetor p28_35S-Gateway e a sequência codificadora de *bar* ou *nptII* - condição 2

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	2 min	1
Desnaturação	95	30 s	30
Anelamento	45	30 s	30
Extensão	73	4 min	30
Extensão final	73	15 min	1
	4	∞	

Os *amplicons* obtidos foram enviados para sequenciamento, realizado pelo método de Sanger no Laboratório ACTGene Análises Moleculares Ltda. utilizando o sequenciador automático *ABI3500 GeneticAnalyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (AppliedBiosystems). As amostras foram preparadas em tubos de 0,5 mL, totalizando volume final de 6 µL. Foram adicionados 4,5 µL de água MilliQ

autoclavada, 1 μL de DNA molde (*amplicons*) em quantidade de aproximadamente 20 ng e 0,5 μL de *primer* a 10 μM . Cada *amplicon* foi sequenciado duas vezes, cada uma delas utilizando um dos *primers* empregados na PCR.

O resultado foi analisado pelo programa SnapGene, em que o alinhamento de bases entre o DNA molde a sequência gerada pelo sequenciamento foi verificado. O eletroferograma foi analisado para conferir a atribuição de bases e, no caso de erros ou não atribuição, a correção ou adição foi feita manualmente.

4.1.6. Midipreparação e purificação dos vetores p1470, p28_35S-*bar* e p28_35S-*nptII*.

Após a confirmação das suas identidade e sequência, os vetores p28_35S-*bar* e p28_35S-*nptII* foram midipreparados e descontaminados para que atingissem as concentrações e pureza adequadas para sua futura aplicação nas plantas. Foram submetidos aos mesmos procedimentos os vetores p28_35S-Gateway, que será futuramente utilizado como controle para aplicação nas plantas e o vetor p1470 da série IL-60, cedido pelo Prof. Dr. Felipe dos Santos Maraschin (Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UFRGS, comunicação pessoal). Primeiramente, 1 μL de cada vetor foi utilizado para a transformação genética de células termocompetentes de *E. coli OmniMax 2*, seguindo protocolo descrito em Ausubel *et al.* (2002). Após a transformação, 20 μL e 200 μL das suspensões bacterianas foram distribuídos com alça de Drigalski em placas de Petri com meio LB sólido contendo 100 mg/L de ampicilina, e as placas permaneceram em estufa à 37 °C *o/n*. Colônias resultantes das transformações foram inoculadas com palitos estéreis em tubos de ensaio com 1,5 mL de meio LB líquido contendo 100 mg/L de ampicilina. As culturas foram mantidas *o/n* à 37 °C e a 180 rpm em agitador rotacional (New Brunswick Scientific). Em seguida, 1 mL dos pré-inóculos foi transferido para 100 mL de meio de cultura SM/SMPB contendo 100 mg/L de ampicilina e este foi cultivado *o/n* nas mesmas condições anteriores. As midipreparações foram realizadas pelo método de “Multi-Miniprep” descrito pelo Prof. Dr. Jeverson Frazzon (Instituto da Ciência Tecnologia e Alimentos da UFRGS). Ao final do procedimento, foram obtidos dois tubos com plasmídeos ressuspensos em 600 μL de T.E. Os plasmídeos foram quantificados em Nanodrop (Thermo Scientific) segundo orientações do fabricante e

em seguida submetidos à purificação para a eliminação de proteínas, RNAs ou demais contaminantes. Resumidamente, aos 600 µL de cada amostra eluída, foram adicionados 70 µL de *Buffer E* 10X (Promega), 30 µL de água MiliQ e 200 µL de RNase A a 250 ng/µL. A mistura foi incubada à 37°C por 1 h e em seguida o volume total, ou seja, aproximadamente 900 µL, foi distribuído em 9 tubos. A cada tubo foram adicionados 100 µL de água MiliQ, totalizando volume final de 200 µL, e realizada extração com fenol:clorofórmio, seguindo protocolo descrito por Ausubel *et al.* (2002). Ao final do procedimento, cada tubo foi eluído em 50µL de T.E. 1X e os volumes dos tubos foram unidos, totalizando 450 µL para cada amostra.

4.2. Cultivo de *E. urophylla*

A espécie *E. urophylla* foi selecionada dentre as demais espécies de *Eucalyptus* para a realização do estudo. A escolha baseou-se no interesse por parte de empresas do ramo de papel e celulose em validar a metodologia *TraitUp*TM nessa espécie e na facilidade para o cultivo *in vitro* da mesma. Todas as sementes utilizadas foram cedidas pela empresa Klabin S.A. (Telêmaco Borba, PR).

Antes da realização de quaisquer experimentos, as sementes foram superficialmente descontaminadas, seguindo o protocolo: imersão no fungicida Dithane a 5 mg/mL durante 20 minutos, álcool a 70 % por 1 minuto e hipoclorito de sódio a 2,5 % por 10 minutos. Por fim, as sementes foram lavadas diversas vezes com água destilada autoclavada até a completa eliminação do hipoclorito e secas sobre papel filtro na presença de chama.

Para os cultivos *in vitro*, as sementes foram germinadas em placas de Petri contendo dois discos de papel filtro umedecidos com 3 mL de água destilada, sendo todos os materiais autoclavados. As placas foram seladas com parafilme, mantidas no escuro por 4 dias para atender ao pré-requisito de estratificação e após transferidas para regime de 18 horas de luz/6 horas de escuro. O tempo necessário para que as sementes germinassem e atingissem tamanho adequado para os tratamentos manteve-se em torno de 20 a 30 dias, sendo a eficiência de germinação das sementes em torno de 50 % e o número de sementes usualmente distribuído por placa igual a 30 (Figura 9).



Figura 9. Representação da germinação de *E. urophylla* em placas de Petri. As imagens representam a germinação 7 (à esquerda) e 21 dias (à direita) após a disposição das sementes nas placas. Neste caso, a eficiência de germinação foi de aproximadamente 63 % (19 das 30 sementes).

Para os cultivos em solo, as sementes foram depositadas em copos contendo terra e vermiculita autoclavadas na proporção de 2:1 e mantidas no mesmo regime de luz/escuro empregado para o sistema *in vitro*. A terra foi molhada com água destilada para manter a umidade, sempre que necessário. Alternativamente, foram também transferidas para solo plântulas germinadas em papel filtro, nas condições acima mencionadas. As plantas atingiram tamanho adulto, adequado para os tratamentos de inoculação no caule, após cerca de 4 a 5 meses de cultivo.

4.3. Determinação das doses letais mínimas dos agentes de seleção para plântulas de *E. urophylla* cultivadas em placas de Petri

Os compostos glifosinato de amônio (Basta) e canamicina foram utilizados para selecionar as plantas que não expressam os genes *bar* e *nptII*, respectivamente. As plântulas germinadas em placa de Petri foram submetidas à seleção assim que atingiram tamanho e crescimento de raízes adequados (como representado na Figura 9).

Para a curva de seleção, foram utilizadas cinco concentrações diferentes de cada agente seletivo, além do controle. Para o glifosinato de amônio, as concentrações-teste foram: 0 (controle), 5, 10, 20, 40 e 50 mg/L, enquanto as concentrações de canamicina foram 0 (controle), 10, 25, 50, 75 e 100 mg/L. Cada

diferente dose foi aplicada nas placas em triplicata, totalizando cerca de 45 plântulas por concentração, como representado na Figura 10. Os agentes seletivos foram diluídos em água destilada autoclavada, sendo esta utilizada como controle. Os efeitos de seleção sobre as plântulas foram acompanhados por até 45 dias, sendo considerada como dose letal mínima a menor concentração do agente seletivo capaz de impedir, com 100% de efetividade, o crescimento das plantas, levando-as à morte.

Antes das aplicações, as placas de Petri foram abertas em câmara de fluxo laminar e posicionadas próximas à chama até completa evaporação da água e desumidificação dos papéis-filtro.

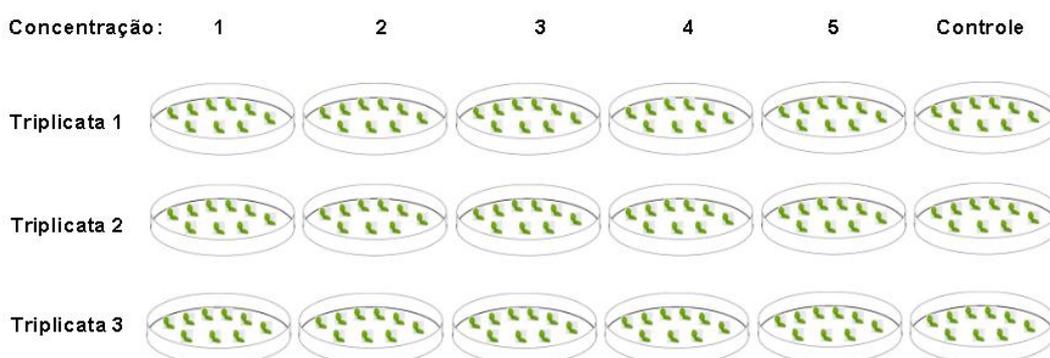


Figura 10. Representação da curva de concentrações para cada um dos agentes seletivos, para plantas de *E. urophylla* cultivadas em placas de Petri.

4.4. Determinação das doses letais mínimas dos agentes de seleção para plântulas de *E. urophylla* cultivadas em hidroponia em poços de 200 μ L

A determinação da dose letal mínima de glifosinato de amônio e de canamicina também foi realizada para plântulas de *E. urophylla* cultivadas em sistema de hidroponia. Neste modelo, as plântulas previamente germinadas em papel filtro foram transferidas para placas de RT-qPCR de 96 poços, de modo que cada plântula fosse inserida em um dos poços com capacidade de 200 μ L.

As concentrações teste de glifosinato de amônio foram: 0 (controle), 5, 10, 20, 40 e 50 mg/L, enquanto as concentrações de canamicina foram 0 (controle), 50, 75, 100, 125 e 150 mg/L. Os agentes seletivos foram novamente preparados em água destilada autoclavada, e a mesma utilizada como controle. Desta vez, 16 plântulas

foram submetidas à seleção para cada concentração, conforme esquematizado na Figura 11. As plântulas foram imersas em 100 μ L de cada solução, e permaneceram em seleção por até 35 dias.

As placas de RT-qPCR utilizadas foram previamente descontaminadas por meio de exposição à luz UV por 30 minutos e, após a passagem das plantas, tapadas e seladas com parafilme.

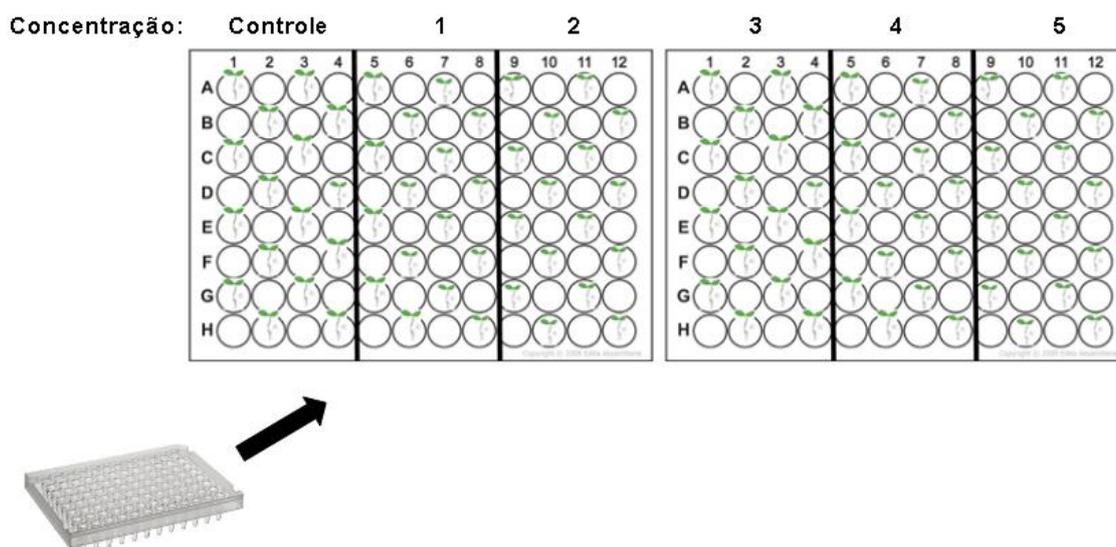


Figura 11. Representação da curva de concentrações para cada um dos agentes seletivos, para plantas de *E. urophylla* cultivadas em placas de RT-qPCR.

4.5. Determinação de concentração letal dos agentes de seleção para plantas de *E. urophylla* cultivadas em solo

O glifosinato de amônio e a canamicina foram aplicados na forma de *spray* em plantas de *E. urophylla* cultivadas em solo, em doses e tempos experimentais, a fim de determinar os parâmetros adequados para seleção.

Para o glifosinato de amônio, foram empregadas doses de 120 mg/L, nos dias 1, 2, 5 e 7, sendo o dia 1 o primeiro dia de aplicação. Para a canamicina, foram aplicadas doses de 100 mg/L nos dias 1 e 2, 200 mg/L no dia 3 e 500 mg/L nos dias 4 e 5.

Para o preparo das soluções de *spray*, foram testados diversos solventes, como água destilada e surfactantes como Triton X-100 a 0,1 %, e a 0,01 %, Silwet L-77 a

0,02% e SLS (*sodium laureth sulfate*) a 0,01%, os quais foram avaliados em critérios como dano causado à planta e capacidade de aumentar a superfície de contato entre o agente seletivo e as folhas.

Foram utilizadas 3 plantas por agente seletivo, além de 3 plantas controle (borrifadas apenas com o solvente). Ambos agentes seletivos foram aplicados em quantidade suficiente para molhar as superfícies foliares e, após cada aplicação, as plantas foram tapadas com filme plástico por 16 h para prevenir a desidratação excessiva. Todas foram acompanhadas por até 1 mês e avaliadas em critérios como sobrevivência, necrose ou amarelecimento das folhas.

4. 6. Tratamento de plântulas de *E. urophylla* com vetor da plataforma IL-60 adaptado para a expressão do gene repórter *gfp*, via absorção pelas raízes

O vetor p28_35S-*gfp*, uma versão do vetor p28_35S-Gateway, da série IL-60, contendo o gene *gfp*, foi construído e disponibilizado para uso neste estudo pelo aluno de mestrado Daniel Barletta Sulis (PPGBCM/CBiot/UFRGS). O vetor foi midipreparado e purificado por meio da mesma metodologia descrita no item 4.1.6.

Para o teste de aplicação dos vetores via absorção pelas raízes, foi utilizado o sistema de cultivo hidropônico em placas de RT-qPCR, descrito no item 4.4. Plantas de *E. urophylla*, previamente germinadas em placas de Petri, foram transferidas individualmente para poços da placa contendo 100 µL de solução dos vetores ou solução controle. Antes de serem imersas nas soluções, as raízes das plantas foram cortadas para facilitar a absorção e acomodação das mesmas nos poços.

O experimento foi constituído por 3 grupos, sendo um tratado e dois controles. O grupo tratado, composto por 20 plantas, foi imerso em solução contendo 1 µg do vetor p1470 e 1 µg de p28_35S-*gfp*. O grupo controle 1, composto por 10 plantas, foi imerso em solução contendo 1 µg de p1470 e 1 µg de p28_35S-Gateway (vetor vazio), enquanto o controle 2 constituiu-se de 10 plantas imersas em água destilada autoclavada.

As plantas ficaram imersas nas soluções por 3 dias e, em seguida, foram mantidas imersas apenas em água destilada, pelo maior intervalo de tempo possível.

4. 7. Tratamento de plântulas de *E. urophylla* com vetor da plataforma IL-60 adaptado para a expressão do gene repórter *gfp*, via injeção no caule

Para a inoculação de vetores diretamente no caule, foram utilizadas plantas de *E. urophylla* cultivadas em terra, com comprimento aproximado de 20 cm. Para a aplicação, foram empregadas seringas com agulhas hipodérmicas, com capacidade máxima de 1 mL.

Em todos os casos, foram inoculados 100 μ L de solução de vetores, distribuídos por mais de um local da planta, com preferência para pontos do caule distantes uns dos outros (Figura 12).

O experimento foi composto por um grupo tratado, com 6 plantas, e dois grupos controle com 2 plantas cada. Cada planta do grupo tratado foi inoculada com solução contendo 1 μ g de p1470 e 1 μ g de p28_35S-*gfp*. As plantas do grupo controle 1 receberam solução contendo 1 μ g de p1470 e 1 μ g de p28_35S-Gateway (vetor vazio), enquanto as plantas do grupo controle 2 não foram inoculadas. As diluições dos vetores foram preparadas em água MiliQ autoclavada.

Após 45 dias da primeira aplicação, as plantas receberam inoculação adicional de 100 μ L com 2 μ g de cada vetor previamente utilizado.



Figura 12. Demonstração da inoculação mecânica dos vetores p1470 e p28_35S-*gfp* ou p28_35S-Gateway no caule de plantas de *E. urophylla*.

4. 8. Análise da expressão de GFP por microscopia de fluorescência

As plantas de *E. urophylla* tratadas com os vetores contendo o gene *gfp* (tanto pelo método de absorção pelas raízes quanto pela inoculação mecânica no caule) foram observadas em microscópio de fluorescência (Leica) para verificação da expressão de GFP, em intervalos de 3, 9, 20, 30, 50 e 65 dias após a primeira inoculação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Inserção dos genes *bar* e *nptII* em vetor da série IL-60

5.1.1. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para as sequências codificadoras de BAR e de NPTII

Na Tabela 6 estão representados os *primers forward* e *reverse* projetados para a amplificação de sequências de *bar* e *nptII* com base nos vetores pCAMBIA3300 e pCAMBIA2300, bem como seus respectivos tamanhos e temperaturas média de desnaturação. Na Figura 13 está ilustrada a região de anelamento dos *primers* nos vetores, no início e final das sequências codificadoras e o tamanho esperado para cada um dos *amplicons*.

Tabela 6. *Primers* utilizados neste trabalho para a amplificação de sequências dos genes de interesse a partir de vetores de origem.

Nome	Sequência (5' – 3')	Tamanho (bp)	T _m (°C)
pCAMBIA3300- <i>bar</i> -For	CACCATGAGCCCAGAACGAC	20	58,3
pCAMBIA3300- <i>bar</i> -Rev	TCAAATCTCGGTGACGGGCA	20	59
pCAMBIA2300- <i>nptII</i> -For	CACCATGGGGATTGAACAAGAT	22	55,3
pCAMBIA2300- <i>nptII</i> -Rev	TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGG	22	54,2

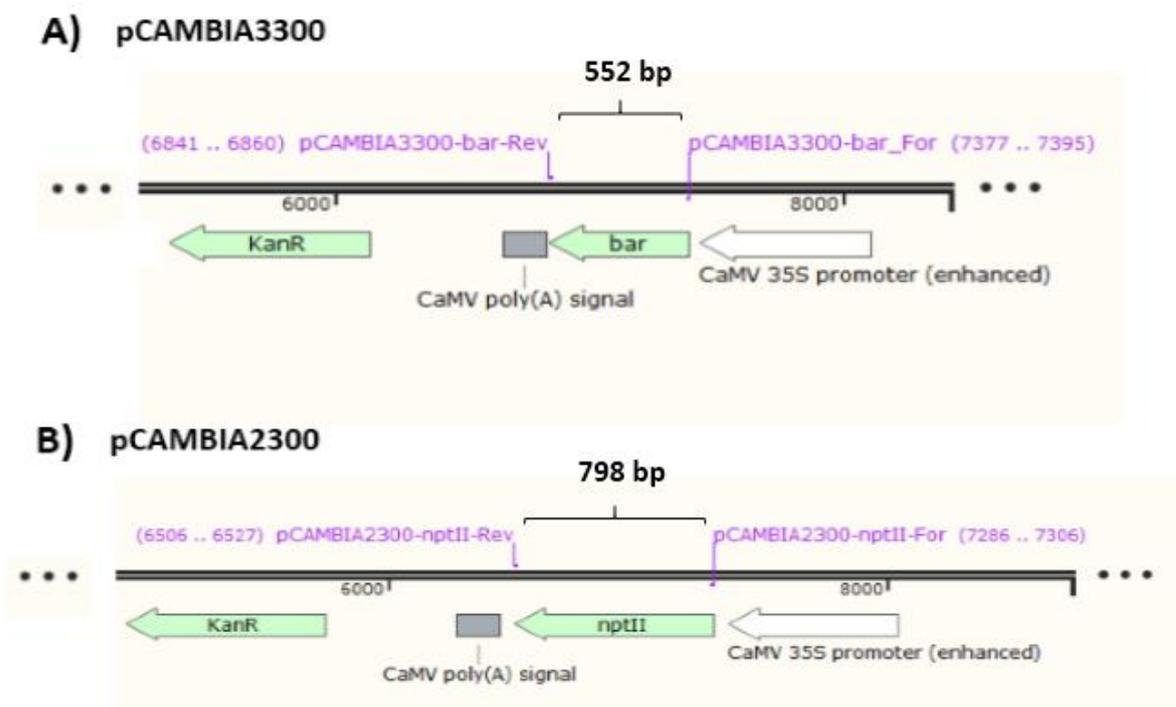


Figura 13. Região de anelamento dos *primers forward* e *reverse* nas sequências de *bar* e de *nptII*.
 A, anelamento dos *primers* pCAMBIA3300-*bar-For* e pCAMBIA3300-*bar-Rev* na sequência codificadora de *bar*. B, Anelamento dos *primers* pCAMBIA2300-*nptII-For* e pCAMBIA2300-*nptII-Rev* na sequência codificadora de *nptII*.

5.1.2. Obtenção das sequências codificadoras de BAR e NPTII

As sequências codificadoras de *bar* e de *nptII* foram obtidas a partir dos vetores de origem por meio de PCRs, cujos parâmetros estão descritos no item 4.1.2. Os *amplicons* gerados estão representados no gel de agarose da Figura 14. Conforme ilustrado na imagem 13, os tamanhos esperados para os *amplicons* correspondem a 552 bp para *bar* e 789 bp para *nptII*. Para *bar*, a reação feita com 25 ng de DNA molde apresentou maior rendimento, mas gerou bandas de amplificação inespecíficas. Deste modo, o *amplicon* obtido pela PCR feita com 200 ng de DNA molde (destacado na figura) foi selecionado para uso nas etapas subsequentes. No caso de *nptII*, o *amplicon* obtido a partir da reação com 25 ng de DNA molde (em destaque) foi selecionado em detrimento do outro, por apresentar maior rendimento e inexistência de bandas inespecíficas.

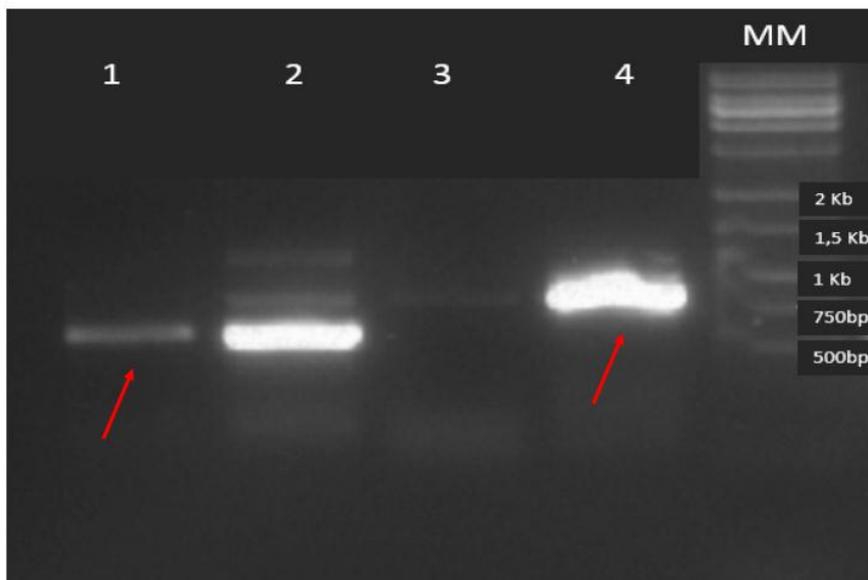


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% das regiões codificadoras de *bar* e *nptII* amplificadas a partir dos DNAs molde pWBVec4a e pCAMBIA2300 nas concentrações de 25 ou 200ng. 1-2, *amplicons* de *bar* obtidos a partir de 200 (1) e 25 ng (2) de DNA molde. 3-4, *amplicons* de *nptII* obtidos a partir de 200 (3) e 25 ng (4) de DNA molde. MM, marcador 1 Kb DNA Ladder (Ludwig).

5.1.3 Geração dos vetores pENTR/D-TOPO-*bar* e pENTR/D-TOPO-*nptII*

Os *amplicons* de *bar* e de *nptII* foram clonados separadamente no vetor de entrada pENTR/D-TOPO e as reações de clonagem foram utilizadas na transformação de bactérias competentes, conforme descrito no item 4.1.3. Após a seleção das mesmas em meio contendo canamicina a 50 mg/L, foram observadas 13 colônias para a reação de *bar* e 12 para a reação de *nptII*, indicativas da presença do vetor. Todas as colônias foram inoculadas em meio, minipreparadas e os DNAs plasmidiais obtidos foram clivados com a enzima de restrição EcoRV nas condições previamente citadas, para verificação da natureza parental ou recombinante do vetor. Conforme representado na Figura 15, a enzima EcoRV possui sítio único de clivagem no vetor pENTR/D-TOPO e nas versões pENTR/D-TOPO-*bar* e pENTR/D-TOPO-*nptII*. Desse modo, a clivagem lineariza os mesmos, resultando em tamanhos esperados de 2.580, 3.132 e 3.378 bp, respectivamente.

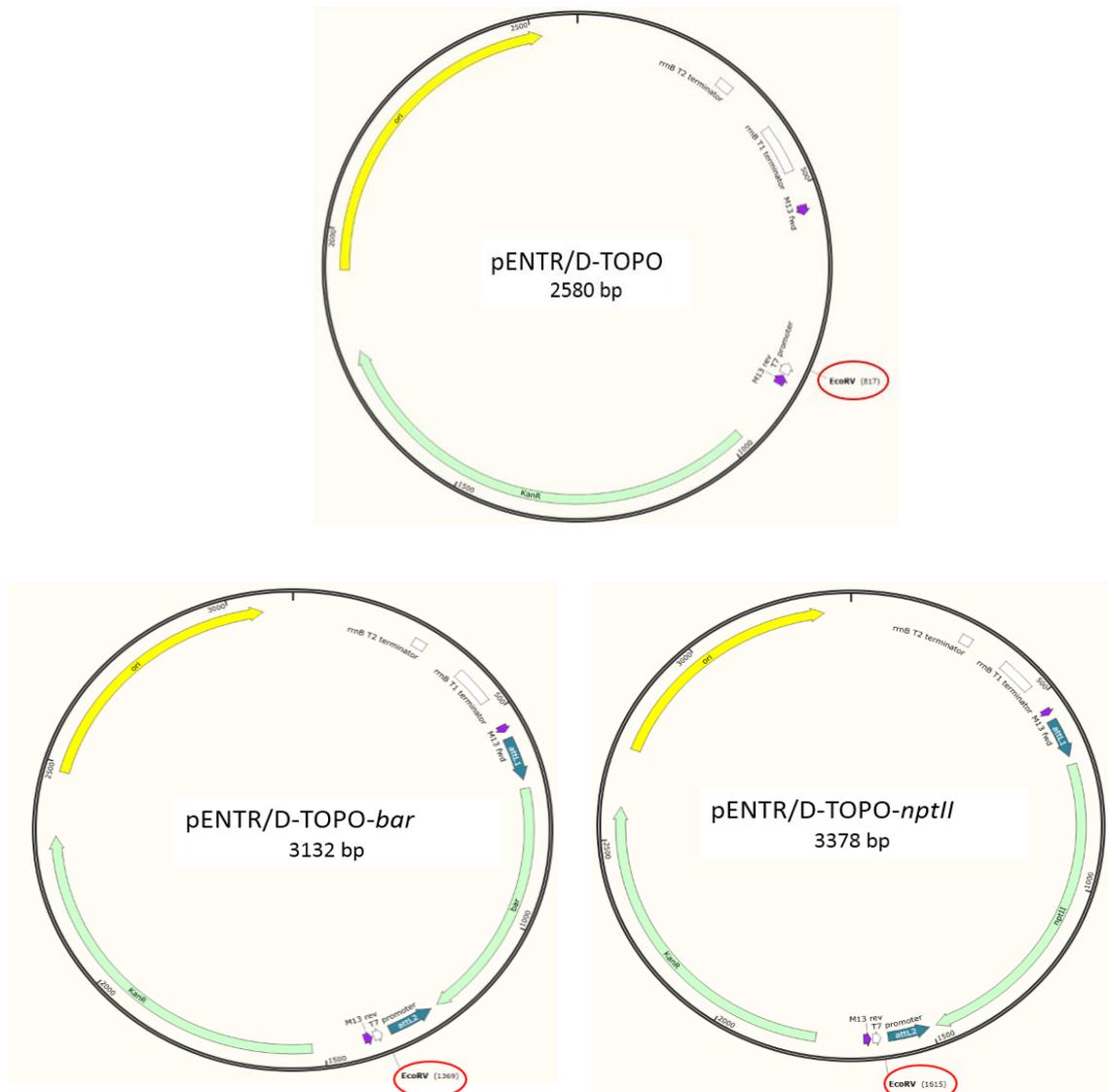


Figura 15. Mapa dos vetores pENTR/D-TOPO (parental), pENTR/D-TOPO-*bar* e pENTR/D-TOPO-*nptII* (recombinantes), com destaque para o sítio de clivagem da endonuclease EcoRV.

Analisando o gel de agarose para o resultado das clivagens, representado na Figura 16, podemos verificar que para o caso de *bar*, apenas a amostra de número 10 corresponde à versão recombinante do vetor (banda de aproximadamente 3 kb). Já para o caso de *nptII*, ilustrado na Figura 17, as amostras 1, 5, 8, 10 e 12 apresentam tamanho de banda correspondente ao vetor recombinante (aproximadamente 3,4 kb). Assim, a amostra pENTR/D-TOPO-*bar* de número 10 e a amostra pENTR/D-TOPO-*nptII* de número 8 foram selecionadas para a etapa seguinte.

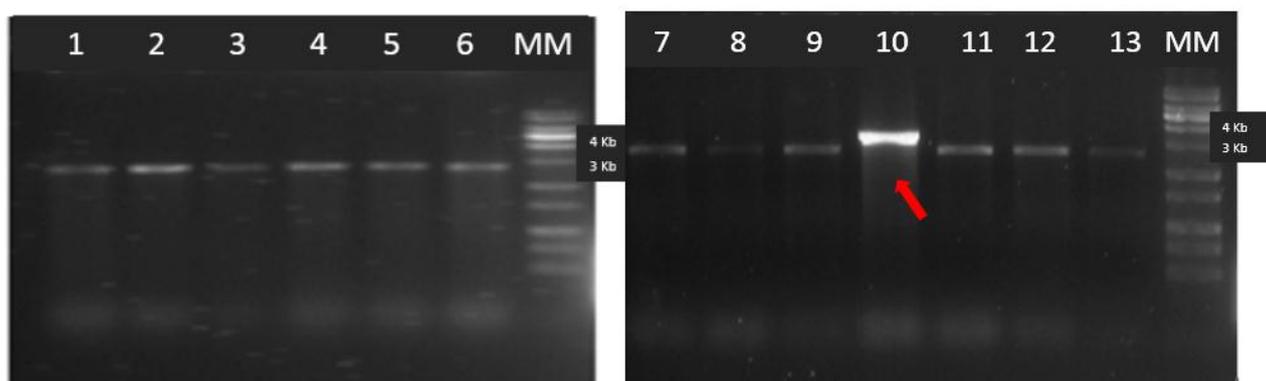


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 0.8% dos produtos da clonagem TOPO para o gene *bar*, clivados com enzima de restrição *EcoRV*. À esquerda, amostras 1 a 6. À direita, amostras 7 a 13. MM, marcador 1 Kb DNA Ladder (Ludwig). A banda indicada pela seta apresenta tamanho correspondente à versão recombinante do vetor (contendo o *amplicon* de *bar*).

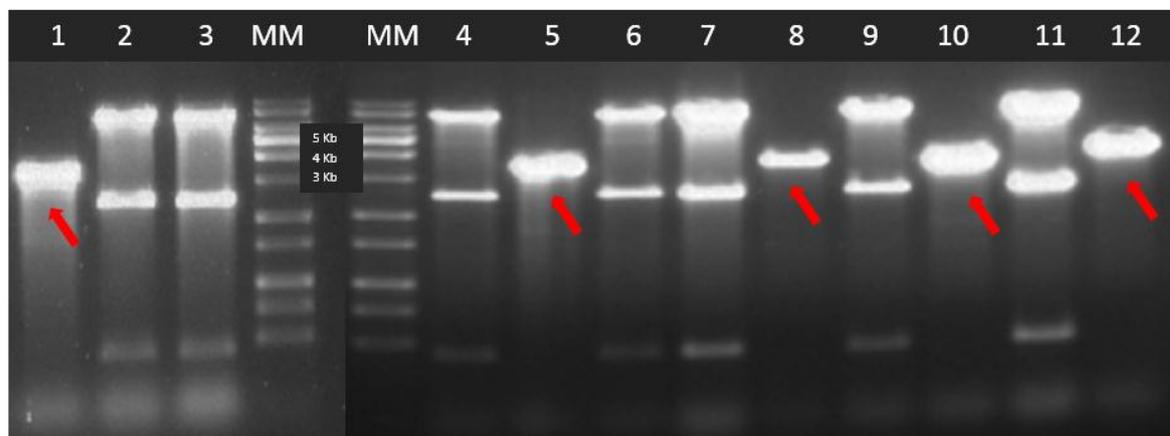


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 0.8% dos produtos da clonagem TOPO para o gene *nptII*, clivados com enzima de restrição *EcoRV*. MM, marcador 1 Kb DNA Ladder (Ludwig). As bandas indicadas por setas apresentam tamanho correspondente à versão recombinante do vetor (contendo o *amplicon* de *bar*).

5.1.4 Obtenção do vetor p28_35S-Gateway, da série IL-60, contendo as sequências de interesse

As sequências de *bar* e de *nptII* foram transferidas dos vetores de entrada para o vetor de destino p28_35S_Gateway por meio de reação de recombinação mediada pela enzima LR Clonase, seguindo as condições relatadas no item 4.1.4. As reações de recombinação foram utilizadas na transformação de bactérias competentes, as quais foram selecionadas em meio contendo ampicilina a 100 mg/L. Após a seleção,

foram observadas diversas colônias para as recombinações envolvendo ambos os genes. Seis colônias de cada reação de recombinação foram inoculadas em meio LB, minipreparadas e os DNAs plasmidiais obtidos foram clivados com a enzima de restrição *SacI*, nas condições citadas no item 4.1.4. para verificação da natureza parental ou recombinante do vetor. Conforme representado na Figura 18, a enzima *SacI* possui dois sítios de clivagem no vetor parental *p28_35S_Gateway* e nas versões *p28_35S-bar* e *p28_35S-nptII*, os quais flanqueiam o gene *ccdB* ou os genes de interesse. Desse modo, após a clivagem, dois fragmentos de tamanhos diferentes são gerados para os plasmídeos *versus* recombinante, visto que o gene *ccdB* e os genes *bar* e *nptII* tem tamanhos distintos: para *p28_35S_Gateway*, são esperadas bandas de aproximadamente 3 e 3,2 kb (indistinguíveis na eletroforese em gel de agarose); para *p28_35S-bar*, aproximadamente 2 e 3,2 kb e para *p28_35S-nptII*, aproximadamente 2,2 e 3,2 kb.

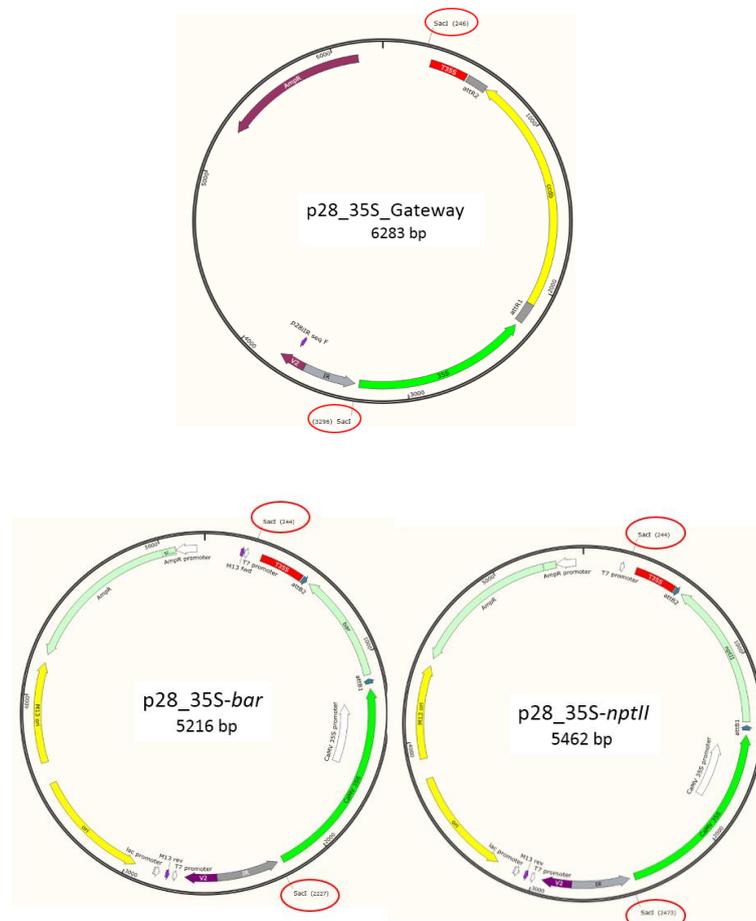


Figura 18. Mapa dos vetores *p28_35S-Gateway* (parental), *p28_35S-bar* e *p28_35S-nptII* (recombinantes), com destaque para os sítios de clivagem da endonuclease *SacI*.

Analisando o gel de agarose para o resultado das clivagens, representado na Figura 19, podemos verificar que para o caso de *bar*, as amostras de número 1, 2, 5 e 6 correspondem à versão recombinante do vetor, enquanto que para o caso de *nptII*, são recombinantes as amostras 3, 4, 5 e 6. Assim, a amostra p28_35S-*bar* de número 6 e a amostra pENTR/D-TOPO-*nptII* de número 5 foram selecionadas para uso em todas as etapas posteriores.

Para todas as clivagens, além das duas bandas esperadas, foi visualizada uma banda adicional de maior tamanho, que provavelmente corresponde ao vetor na sua forma não-clivada, devido à digestão parcial.

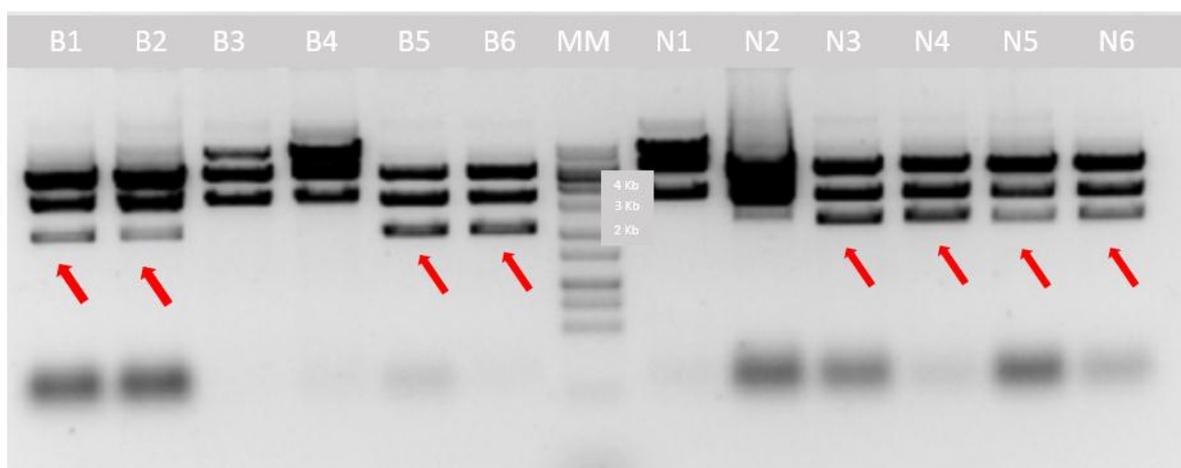


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose a 0.8% dos produtos de recombinação para os genes *bar* e *nptII*, clivados com enzima de restrição *SacI*. B1-B6, amostras 1 a 6 da recombinação para o gene *bar*. N1-N6, amostras 1 a 6 da recombinação para o gene *nptII*. MM, marcador 1 Kb DNA Ladder (Ludwig). As bandas indicadas por setas apresentam tamanho correspondente à versão recombinante do vetor.

5.1.5. Confirmação da sequência dos vetores finais p28_35S-*bar* e p28_35S-*nptII*

Regiões de junção entre as sequências codificadoras de *bar* e de *nptII* e o arcabouço do vetor p28_35S-Gateway foram amplificadas por PCR e os *amplicons* resultantes foram sequenciados. Esse método foi escolhido em detrimento do sequenciamento direto dos vetores p28_35S-*bar* e p28_35S-*nptII* pois as PCRs aumentam a quantidade de DNA correspondente às regiões de interesse.

Na Figura 20 estão ilustrados os vetores *p28_35S-bar* e *p28_35S-nptII*, a região de anelamento dos *primers* utilizados nas PCRs e os tamanhos esperados para as 4 reações utilizando diferentes combinações dos mesmos. A Figura 21 corresponde ao resultado da eletroforese em gel de agarose para os *amplicons* obtidos após as PCRs, cujos parâmetros de reação estão descritos no item 4.1.4.

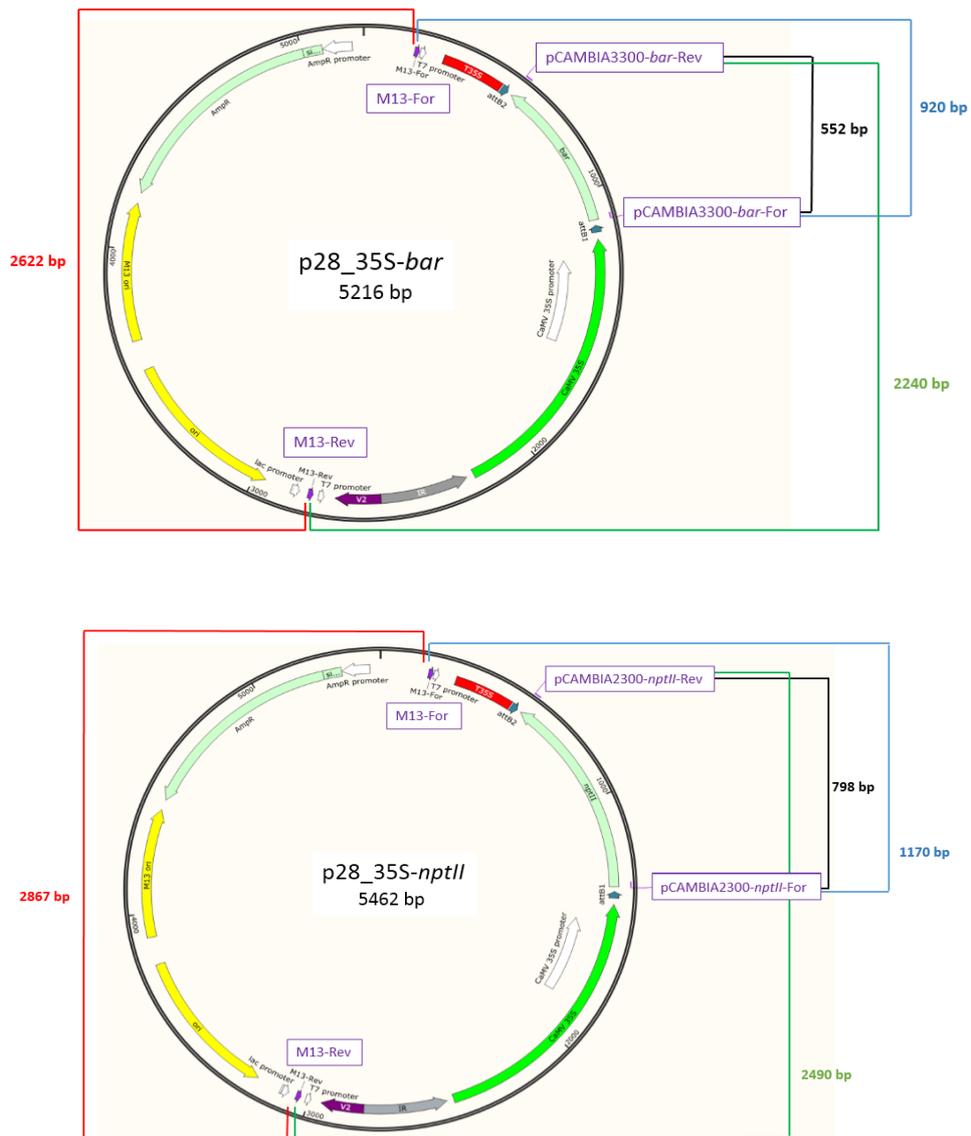


Figura 20. Mapas dos vetores *p28_35S-bar* e *p28_35S-nptII*, e representação do sítio de anelamento de diferentes *primers*. Os *primers* pCAMBIA3300-*bar*-For, pCAMBIA3300-*bar*-Rev, pCAMBIA2300-*nptII*-For e pCAMBIA2300-*nptII*-Rev são específicos para as sequências codificadoras de interesse, enquanto os *primers* M13-For e M13-Rev anelam no arcabouço do vetor. Os tamanhos esperados para os *amplicons*, em bp, são: 552 (1), 920 (2), 2.240 (3), 2.622 (4), 798 (1'), 1.170 (2'), 2.490 (3') e 2.867 (4').

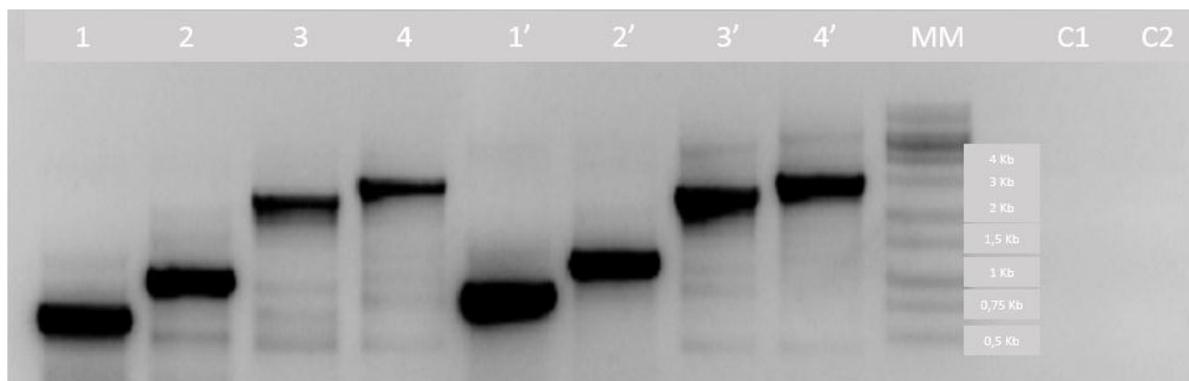


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose a 0.8% dos produtos de PCR para regiões dos vetores p28_35S-*bar* e p28_35S-*nptII*. 1- 4, *amplicons* de regiões do vetor p28_35S-*bar*, com tamanhos esperados de 552 (1), 920 (2), 2.240 (3) e 2.622 bp (4). 1' - 4', *amplicons* de regiões do vetor p28_35S-*nptII*, com tamanhos esperados de 798 (1'), 1.170 (2'), 2.490 (3') e 2.867 bp (4'). MM, marcador 1 Kb DNA Ladder (Ludwig). C1, controle negativo para a reação de PCR descrita na Tabela 4. C2, controle negativo para a reação de PCR descrita na Tabela 5.

A eficácia das reações e a obtenção dos fragmentos de tamanho esperado foi confirmada, possibilitando o envio dos mesmos para sequenciamento. Cada *amplicon* foi sequenciado duas vezes, cada qual em orientações distintas e utilizando um dos *primers* empregados na PCR. Na Figura 22 estão representadas as regiões cobertas pelos sequenciamentos de DNA. Os alinhamentos utilizando a ferramenta SnapGene permitiram demonstrar um alto grau de identidade em comparação às sequências originais de ambos os cassetes gênicos, confirmando a integridade das sequências e a correta inserção das sequências de *bar* e *nptII* entre o promotor e o terminador 35S do CaMV. As linhas contínuas em vermelho e azul representam regiões de perfeito alinhamento, enquanto as porções em branco correspondem à incompatibilidade de bases. No entanto, foi possível perceber que, na maioria dos casos, as incompatibilidades devem-se à baixa qualidade do sequenciamento e à consequente impossibilidade de atribuir corretamente as bases. Ainda, o sequenciamento de uma mesma região, na orientação contrária, resolveu o problema de cobertura na maioria dos casos.

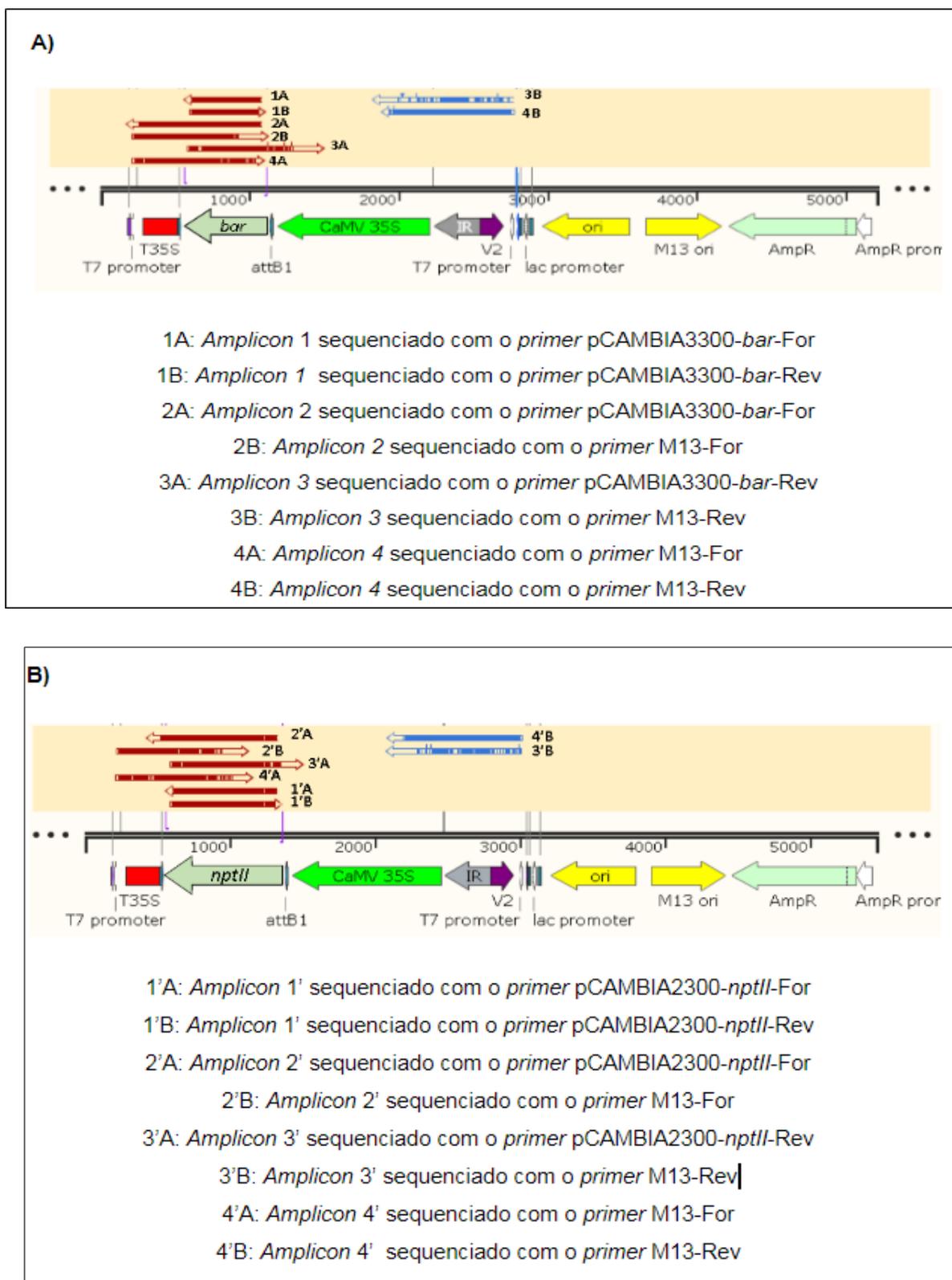


Figura 22. Representação da cobertura dos sequenciamentos de DNA ao longo dos cassetes gênicos de p28_35S-*bar* (A) e p28_35S-*nptII* (B).

Em um caso pontual, a sobreposição de várias sequências confirmou troca de bases de G para A no gene *nptII*, na posição 114 (Figura 23). No entanto, tal mudança não impacta em troca de aminoácido na proteína, que permanece sendo a fenilalanina (UUC → UUU). Assim, essa mutação no gene provavelmente não afetará a função da proteína codificada por ele.

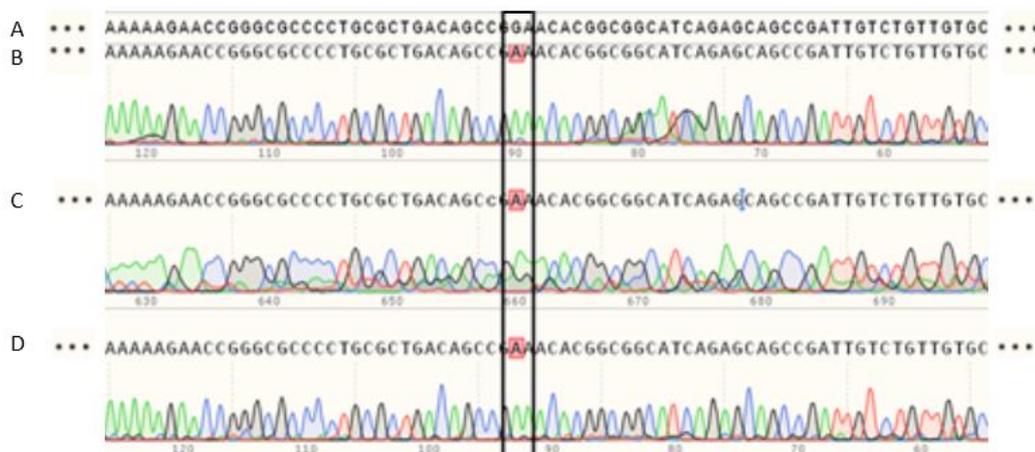


Figura 23. Troca de bases na OFR de *nptII*, revelada pelo sequenciamento. A, sequência referência de porção *nptII* em que a base ocupada na posição 114 (em destaque) é uma guanina (G). B, C e D, sequências 1'A, 1'B e 2'A obtidas pelo sequenciamento, revelando troca de base para adenina (A).

5.1.6. Midipreparação e purificação dos vetores p1470, p28_35S-*bar* e p28_35S-*nptII*.

Após a confirmação das suas identidade e sequências, os vetores p28_35S-*bar* e p28_35S-*nptII*, juntamente com os vetores p1470 e p28_35S-Gateway, foram midipreparados e descontaminados para que atingissem as concentrações e purezas adequadas para sua futura aplicação nas plantas. Ao final dos procedimentos, todos os vetores apresentaram concentração igual ou superior a 1 µg/µL, estando assim prontos para futura aplicação nas plantas.

5.2. Doses letais mínimas dos agentes de seleção para plântulas de *E. urophylla* cultivadas em placas de Petri

Os compostos glifosinato de amônio (Basta) e canamicina foram utilizados para selecionar as plantas que não expressam os genes *bar* e *nptII*, respectivamente.

O herbicida glifosinato de amônio inibe a ação da enzima glutamina sintetase, responsável pela síntese de glutamina a partir da amônia e do ácido glutâmico. Desse modo, leva ao acúmulo de amônia nas células vegetais e esta, por ser fortemente fitotóxica, leva as células à morte. Macroscopicamente, os efeitos são manifestados por manchas necróticas e, finalmente, murchamento da planta. A enzima fosfinotricina acetiltransferase, codificada pelo gene *bar*, catalisa a conversão do glifosinato de amônio em produtos não tóxicos por meio da transferência de um grupamento acetila, conferindo à planta a característica de resistência ao herbicida.

O mecanismo de ação da canamicina consiste na inibição da síntese proteica no cloroplasto, assim impedindo o crescimento celular (PADILLA & BURGOS, 2010). A enzima neomicina fosfotransferase, codificada pelo gene *nptII*, fosforila e inativa a canamicina, conferindo resistência ao antibiótico.

Plântulas de *E. urophylla* cultivadas em placas de Petri foram submetidas à seleção com diferentes concentrações de glifosinato de amônio e canamicina, conforme descrito no item 4.3. O efeito dos agentes seletivos foi observado durante 45 dias. Nas Tabelas 7 e 8 são informados o número total de plântulas (considerando-se as 3 triplicatas) em cada um dos grupos, ao início e final da seleção com glifosinato de amônio e canamicina, respectivamente, bem como a porcentagem de plantas eliminadas. As Figuras 24 e 25 ilustram o resultado da seleção para as diferentes concentrações de glifosinato de amônio e canamicina, respectivamente, nos dias 1 (aplicação inicial) e 45.

Tabela 7. Sobrevivência de plantas de *E. urophylla* cultivadas em placas de Petri ao tratamento com diferentes concentrações de glifosinato de amônio.

Concentração (mg/L)	0 (controle)	5	10	20	40	50
Nº de plantas Dia 1	28	34	46	39	52	41
Nº de plantas Dia 45	28	15	13	11	12	9
Porcentagem de plantas eliminadas	0	56	72	72	77	78

Tabela 8. Sobrevivência de plantas de *E. urophylla* cultivadas em placas de Petri ao tratamento com diferentes concentrações de canamicina.

Concentração (mg/L)	0 (controle)	10	25	50	75	100
Nº de plantas Dia 1	23	35	49	35	48	34
Nº de plantas Dia 45	23	35	49	35	48	34
Porcentagem de plantas eliminadas	0	0	0	0	0	0

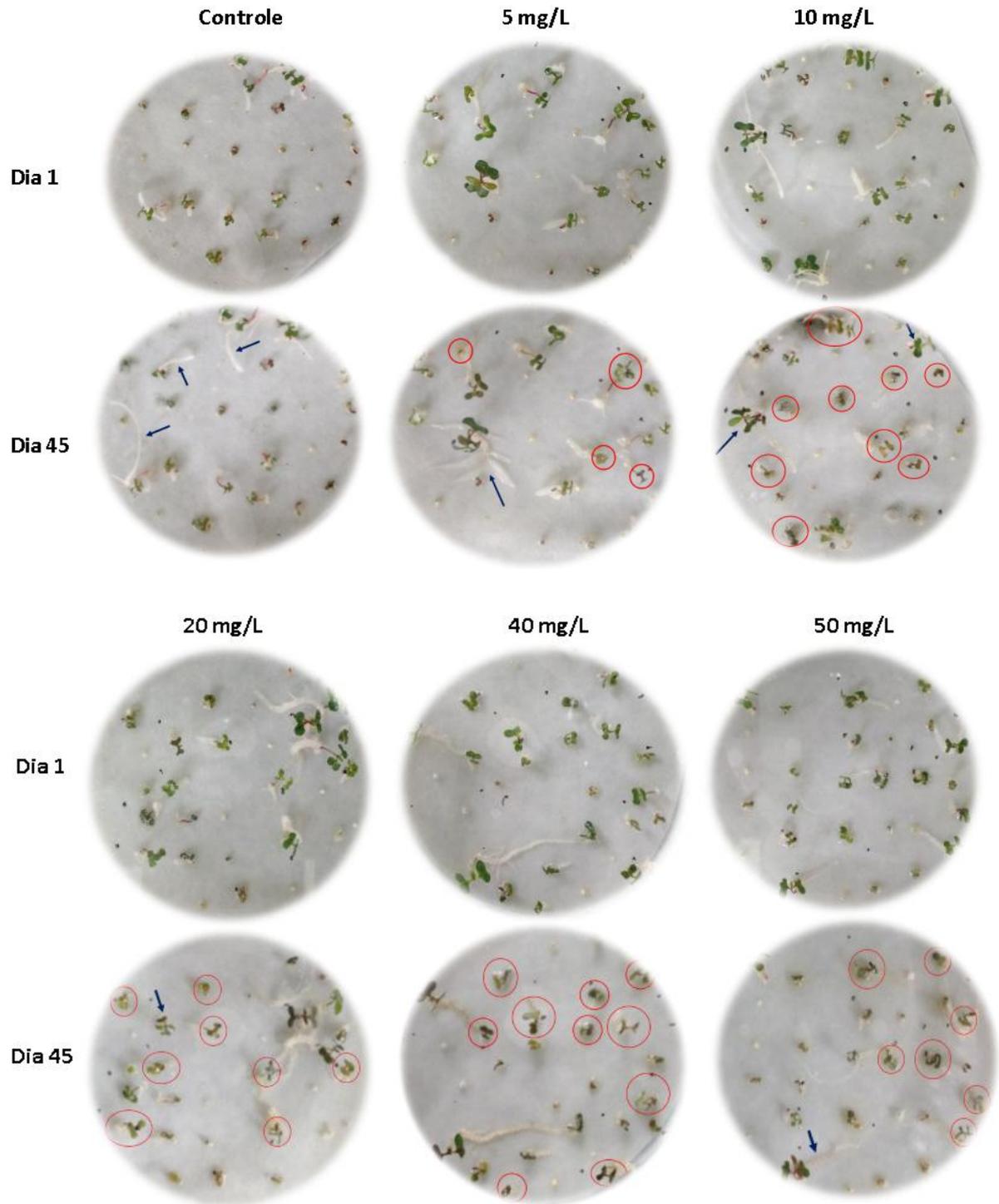


Figura 24. Curva de seleção do herbicida glifosinato de amônio para plantas de *E. urophylla* cultivadas em placas de Petri. As imagens representam as plantas de uma das placas de cada concentração nos dias inicial e final do tratamento. Nas imagens do dia final, estão destacadas em vermelho as plântulas mortas. As setas azuis, por sua vez, indicam plantas que não somente resistiram à seleção, mas apresentaram crescimento foliar e/ou radicular.

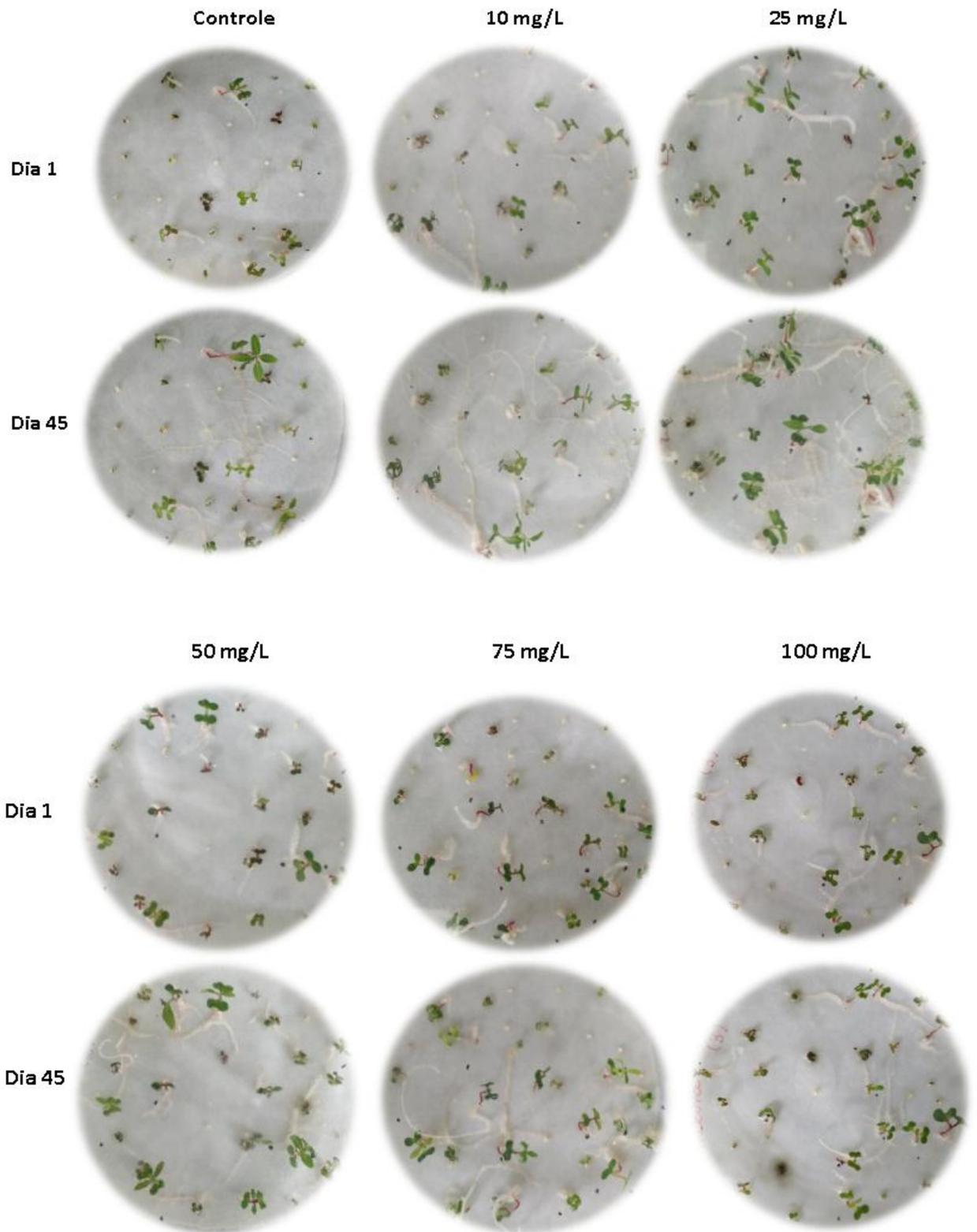


Figura 25. Curva de seleção do antibiótico canamicina para plantas de *E. urophylla* cultivadas em placas de Petri. As imagens representam as plantas de uma das placas de cada concentração nos dias inicial e final do tratamento.

A concentração ideal de glifosinato de amônio para a seleção de plantas varia de 5 a 10 mg/L dependendo da espécie, o que motivou a escolha de concentrações teste abrangendo valores iguais e maiores do que estes. Para a canamicina, valores de 12,5 e 25 mg/L foram considerados ideias para selecionar explantes transgênicos de *E. urograndis* (ZANELLA *et al.*, 2013). Já para *E. saligna*, a concentração mínima foi de 50 mg/L (DA SILVA *et al.*, 2010), enquanto outras plantas, como tabaco, necessitaram de concentrações de 100 mg/L para seleção.

O tempo esperado para a ação de ambos os agentes seletivos para plantas cultivadas em meio MS *in vitro* é de aproximadamente 4 semanas. No entanto, após tempo superior a 4 semanas, nenhuma das concentrações testadas para ambos os agentes seletivos foi capaz de selecionar as plantas com 100% de efetividade (Tabelas 7 e 8). No caso do glifosinato de amônio (Figura 24), diversas plântulas foram selecionadas, visto que o crescimento foi restringido e a morte observada. Porém, contraditoriamente, várias demonstraram resistência, pois permaneceram apresentando crescimento foliar e/ou radicular. Já para o antibiótico canamicina (Figura 25), todas as plantas permaneceram saudáveis e com crescimento expressivo independentemente da concentração empregada. Foram realizados testes com doses iguais a 200 e 400 mg/L, nas mesmas condições de cultivo e experimentação, mas as plantas permaneceram sadias (resultados não apresentados).

A principal hipótese levantada para justificar a ineficácia dos tratamentos foi a de que as raízes das plantas não foram capazes de absorver os agentes seletivos ou de permanecer efetivamente em contato com os mesmos. Desse modo, foi testado um sistema alternativo de cultivo em hidroponia, descrito no item 4.4., em que as raízes das plantas foram imersas nas soluções de agentes seletivos. O objetivo do novo método foi possibilitar uma seleção eficiente, nas menores concentrações possíveis e em menor intervalo de tempo.

5.3. Doses letais mínimas dos agentes de seleção para plântulas de *E. urophylla* cultivadas em hidroponia em poços de 200 µL

A curva de seleção para glifosinato de amônio e canamicina também foi realizada para plântulas de *E. urophylla* cultivadas em um sistema de hidroponia, em

que cada plântula foi individualmente transferida para um poço em placa de RT-qPCR e imersa em 100 µL de solução seletiva. As plântulas foram mantidas em seleção por 35 dias, nas concentrações descritas no item 4.4. Os resultados da seleção para as diferentes concentrações de glifosinato de amônio e de canamicina estão representados nas Figuras 26 e 27 respectivamente.

Na curva de seleção do glifosinato de amônio, todas as plantas do grupo controle permaneceram vivas ao final dos 35 dias, embora não apresentassem aspecto completamente saudável, provavelmente em função da ausência de nutrientes no meio. No grupo cuja concentração de herbicida foi de 5 mg/L, ainda verificou-se uma planta sobrevivente, ao passo que a partir da concentração de 10 mg/L, todas foram efetivamente eliminadas. Desse modo, a dose letal mínima de glifosinato de amônio inferida pelo experimento foi de 10 mg/L. Esta dose deve ser futuramente utilizada para selecionar plantas que não contenham ou não expressem o gene de resistência *bar*.

A eficácia deste sistema na determinação da dose letal mínima do herbicida demonstrou que a imersão das raízes nas soluções pode ser um fator determinante para a ação dos agentes seletivos. No entanto, os resultados para a seleção com canamicina (Figura 27) contradizem essa conclusão. Após 35 dias de exposição, todas as plantas permaneceram saudáveis, independentemente da concentração utilizada.

A inefetividade da seleção com canamicina pode ser tentativamente explicada pela variação nos efeitos desse antibiótico dependendo da espécie e do genótipo (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Embora existam informações consistentes sobre a ação da canamicina em brotos e sementes não transgênicas, impedindo a formação de raízes a proliferação de células, não existem relatos da ação da canamicina sobre plantas e raízes já formadas. Finalmente, embora o mecanismo de absorção da canamicina e de outros antibióticos da família dos aminoglicosídeos já esteja descrito para células procarióticas e de mamíferos, o mecanismo de assimilação por parte de células vegetais ainda não é conhecido, de modo que não foi possível assegurar que a absorção do antibiótico pelas raízes tenha ocorrido efetivamente (PADILLA & BURGOS, 2010).

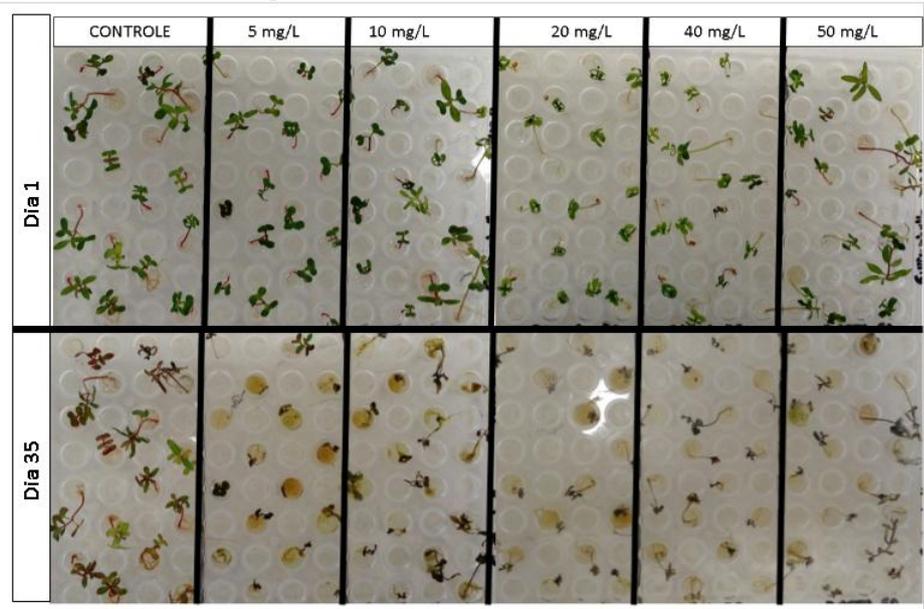


Figura 26. Curva de seleção do herbicida glifosinato de amônio para plantas de *E. urophylla* cultivadas em placas de RT-qPCR.

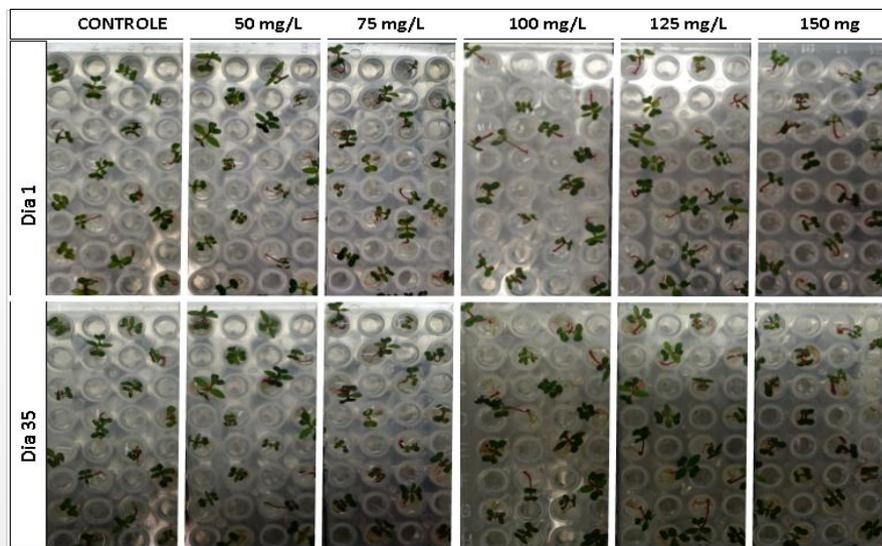


Figura 27. Curva de seleção do antibiótico canamicina para plantas de *E. urophylla* cultivadas em placas de RT-qPCR.

5.4. Tratamentos com os agentes de seleção para plantas de *E. urophylla* cultivadas em solo

Diversos trabalhos demonstram a possibilidade de aplicar o glifosinato de amônio na forma de *spray* para selecionar plantas cultivadas em solo, como evidenciado para *Arabidopsis thaliana*, *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Nicotiana tabacum*

e *Solanum tuberosum* (batata) (DE GREEF *et al.*, 1989; ARAGÃO *et al.*, 2002; HADI *et al.*, 2002). Ademais, esse herbicida já é registrado e pulverizado em diversas plantações para o controle de plantas invasoras.

Quando aplicada na forma de *spray*, a canamicina também demonstrou-se eficiente na seleção de plantas de *A. thaliana* cultivadas em solo (XIANG *et al.*, 1999), embora as concentrações empregadas nesse caso tenham sido muito mais elevadas em comparação às doses utilizadas para seleção *in vitro* em meio de cultura.

No entanto, não foram encontrados trabalhos descrevendo as condições e concentrações adequadas das preparações de *spray* para o uso destes agentes seletivos em plantas de eucalipto. Deste modo, tais parâmetros foram determinados experimentalmente, valendo-se das informações descritas para outras plantas.

Para tal, os agentes seletivos foram preparados em solução e borrifados sobre as plantas nas concentrações e condições descritas no item 4.5. Para o preparo das soluções, o surfactante Triton X-100 a 0,01 % foi utilizado em detrimento da água destilada pois, em função da espessa cutícula hidrofóbica que recobre as folhas de *E. urophylla*, a água não foi capaz de promover o contato das soluções com as plantas e o umedecimento da superfície foliar. Ademais, este surfactante foi escolhido em detrimento de outros citados no item 4.5. pois não causou efeito nocivo às plantas.

Na Figura 28 estão representados os resultados da seleção, comparando as plantas antes dos tratamentos e 15 dias após a primeira aplicação. Para o glifosinato de amônio, os efeitos da seleção foram notados no dia seguinte a cada uma das aplicações: as folhas secaram e ao final do tratamento as plantas estavam mortas, mostrando que as concentrações e condições utilizadas foram efetivas para selecionar plantas não resistentes.

Para a canamicina, os primeiros efeitos nocivos nas plantas foram notados cerca de uma semana após a última aplicação. No entanto, diferentemente do tratamento com o herbicida, as plantas não morreram, apresentando apenas amarelecimento e pontos pretos nas folhas, indicativos de necrose. As plantas foram

acompanhadas por até um mês, ao final do qual o fenótipo permaneceu inalterado, sem aumento de severidade (resultados não apresentados).

Embora haja indícios do efeito do antibiótico, este não ocorreu de forma sistêmica e não foi capaz de ocasionar morte. Frente à dificuldade de selecionar as plantas mesmo com concentrações bastante elevadas de canamicina, e considerando-se os resultados negativos para a seleção feita no sistema de hidroponia, não foi dada continuidade ao uso deste antibiótico, bem como dos vetores contendo o gene *nptII* nos próximos experimentos.

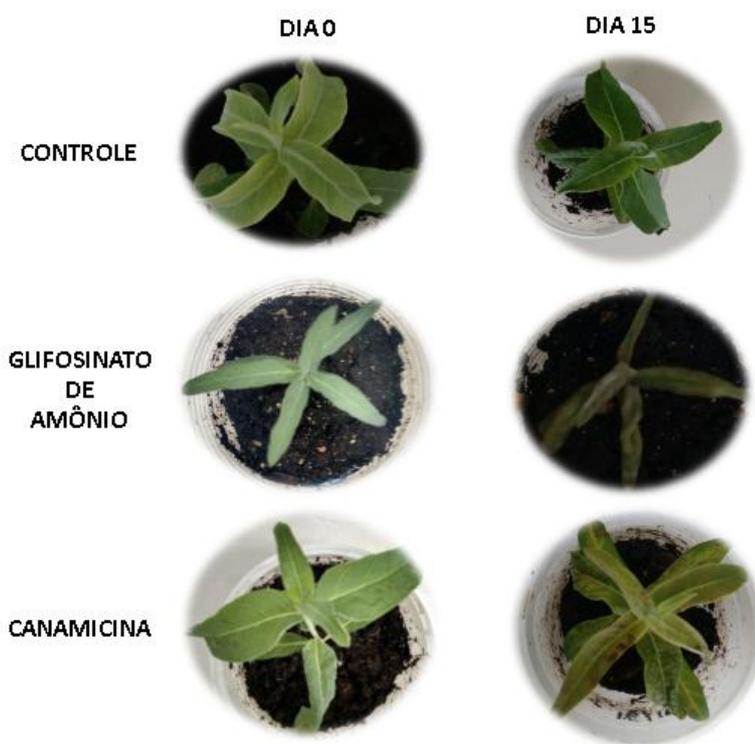


Figura 28. Resultado da seleção com glifosinato de amônio e canamicina para plantas de *E. urophylla* cultivadas em solo.

5.5. Expressão de GFP nas plantas de *E. urophylla* tratadas com os vetores da série IL-60 via inoculação direta no caule ou absorção pelas raízes

Conforme citado nos itens 4.6. e 4.7., plântulas de *E. urophylla* cultivadas em sistema hidropônico foram tratadas com os vetores p1470 e p28_35S-*gfp* via imersão nas soluções plasmidiais e absorção pelas raízes, enquanto plantas adultas foram inoculadas com os vetores diretamente no caule. Para ambos os casos, as plantas

foram observadas em microscópio de fluorescência em diferentes intervalos de tempo, para verificar a expressão de *gfp* em pontos próximos e distantes dos sítios de inoculação.

O objetivo dos experimentos foi fornecer uma validação mais rápida da eficácia dos métodos empregados para a administração dos vetores *TraitUp*TM nas plantas de *E. urophylla* e da efetividade dos mesmos em promover a expressão de genes exógenos. Além disso, objetivava-se estimar com mais facilidade e precisão o tempo necessário para o início da expressão do gene exógeno nas plantas. Esse resultado poderia então ser extrapolado para estimar o tempo necessário para a expressão dos genes *bar* e *nptII* e, conseqüentemente, para determinar o momento adequado para realizar a aplicação dos agentes seletivos após tratamento com os vetores.

No entanto, em nenhuma das observações realizadas foi possível detectar diferença nos níveis de fluorescência entre as plantas tratadas com os vetores e as plantas controle, tanto para as plântulas cultivadas em hidroponia quanto para as mantidas em solo. No caso daquelas, foram analisadas as raízes e a parte aérea, e no caso destas, a parte aérea como um todo e folhas individuais coletadas próximas e distantes aos sítios de inoculação.

Para exemplificar, na Figura 29 estão representadas, lado a lado, folhas provenientes de uma planta do grupo controle (não inoculada), à esquerda, e de uma planta do grupo tratado (inoculada com os vetores p1470 + p28_35S-*gfp*), à direita, ambas cultivadas em solo. Já na Figura 30 estão representadas folhas de planta do outro grupo controle (inoculada com os vetores p1470 e p28_35S-Gateway), à esquerda, e de planta do grupo tratada, à direita. Em ambos os casos, as imagens foram registradas no 65º dia após a primeira aplicação e foi possível perceber uma grande semelhança no nível de fluorescência entre as folhas tratada e controle, que corresponde à fluorescência basal.

Na Figura 31 estão retratadas imagens para as plântulas cultivadas em hidroponia, registradas no 50º após o início do tratamento: à esquerda, planta controle (mantida apenas em água), e à direita, planta tratada. Novamente, os níveis de fluorescência das plantas controle se igualam aos da tratada.

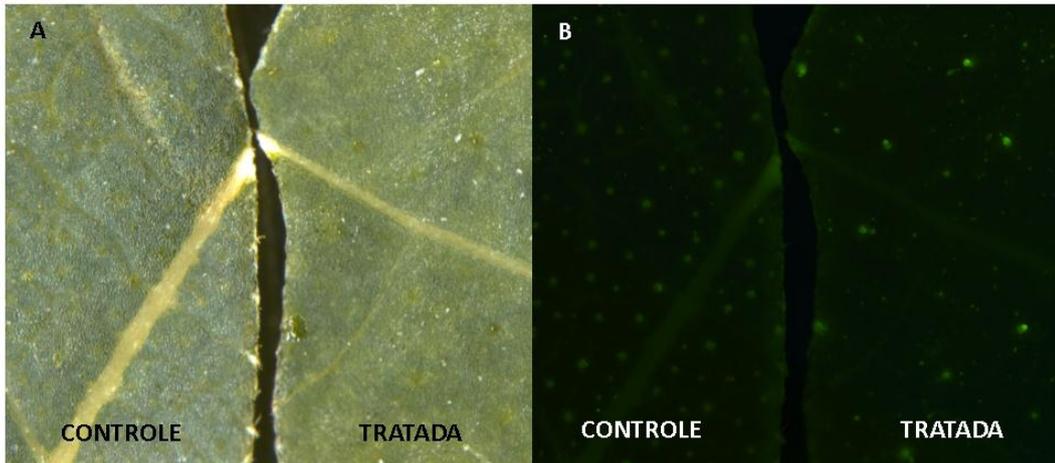


Figura 29. Comparação da expressão de GFP em folhas de planta controle (não inoculada) e tratada com os vetores p1470 e p28_35S-*gfp*, via inoculação mecânica no caule. A, imagens em campo claro, aumento de 2X. B, imagens com filtro eGFP, aumento de 2X e exposição à 720 ms. As imagens foram registradas em microscópio de fluorescência (Leica).

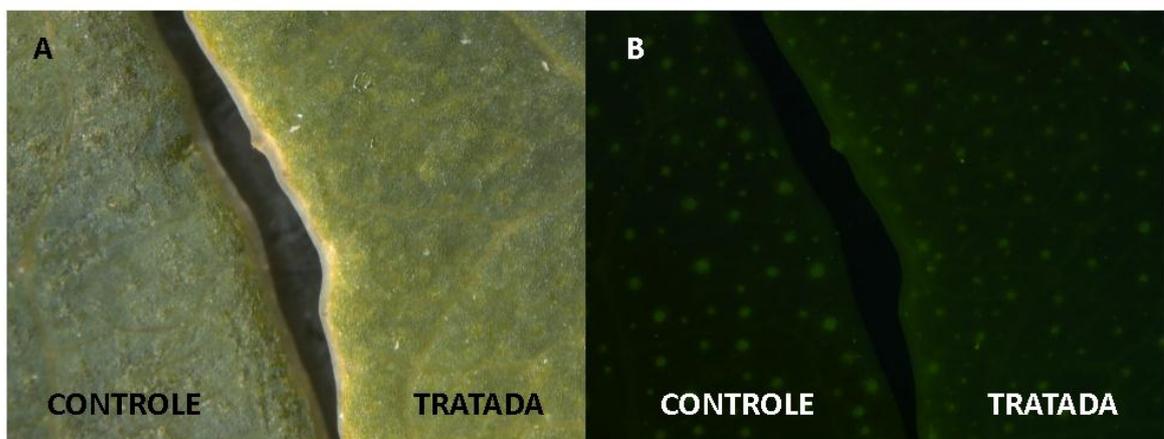


Figura 30. Comparação da expressão de GFP em folhas de planta controle (inoculada com os vetores p1470 + p28_35S-Gateway (vazio)) e tratada com os vetores p1470 + p28_35S-*gfp*, via inoculação mecânica no caule. A, imagens em campo claro, aumento de 2X. B, imagens com filtro eGFP, aumento de 2X e exposição à 720 ms. As imagens foram registradas em microscópio de fluorescência (Leica).

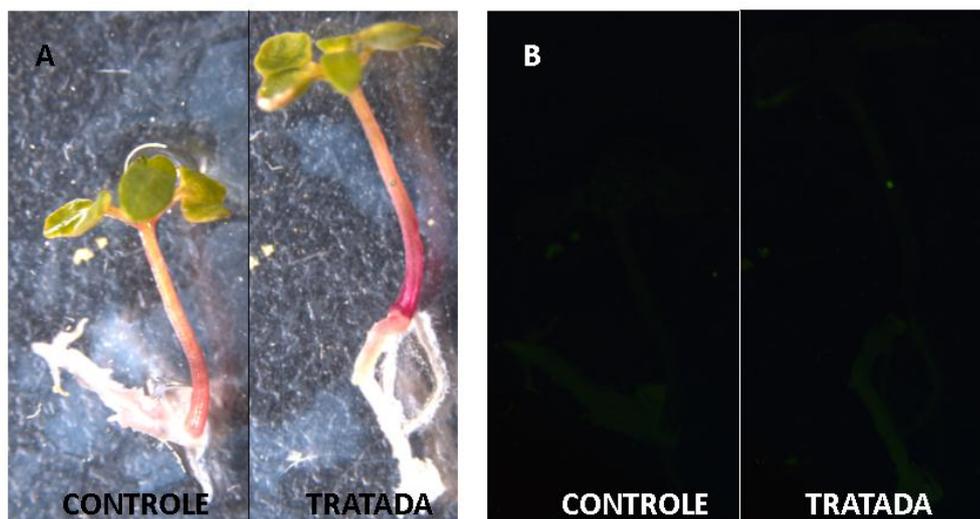


Figura 31. Comparação da expressão de GFP em plântulas controle (exposta aos vetores p1470 + p28_35S-Gateway (vazio)) e tratada com os vetores p1470 + p28_35S-*gfp*, via absorção pelas raízes. A, imagens em campo claro, com aumento de 0,73X. B, imagens com filtro eGFP, aumento de 0,73X e exposição à 720 ms. As imagens foram registradas em microscópio de fluorescência (Leica).

Segundo os autores do método TraitUP™ (PERETZ *et al.*, 2007), após a inoculação dos vetores IL-60 nas plantas, a expressão dos genes exógenos de interesse deve ocorrer em apenas alguns dias, ou em intervalo de duas a três semanas no caso de plantas lenhosas. Por meio das condições utilizadas neste estudo, os resultados são contrastantes: após mais de dois meses, não foi detectada expressão de GFP nas plantas de *E. urophylla* tratadas.

É possível que a quantidade de vetor inoculada (1 µg de cada) tenha sido insuficiente, embora esta tenha sido a quantidade descrita para uso em trabalhos prévios (MOZES-KOCH *et al.*, 2012). Novas aplicações deverão ser feitas com quantidades maiores. Ainda, objetiva-se realizar análises moleculares para detectar a presença de *gfp* nas folhas das plantas inoculadas, a nível de DNA, para verificar se o gene de fato foi entregue às plantas e se propagou de forma sistêmica. Por fim, é possível que o resultado negativo justifique-se por uma limitação intrínseca à espécie escolhida. Testes para a inoculação dos vetores em outras espécies de *Eucalyptus* deverão ser conduzidos.

6. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O gênero *Eucalyptus* inclui diversas espécies de importância florestal e industrial que se destacam pelas suas excelentes características silviculturais e sua aplicação na produção de madeira maciça, celulose e papel. A geração de variantes GM de eucalipto que possam conferir vantagens fenotípicas e atender à crescente demanda por produtos derivados da madeira é de grande importância. Considerando-se as limitações técnicas na transgenia do eucalipto, a tecnologia *TraitUP*TM, baseada em vetores virais desarmados, é uma excelente alternativa para a introdução de genes de interesse em *Eucalyptus*, sendo assim de grande importância a validação da aplicabilidade dessa tecnologia nesse gênero.

No presente trabalho, foram geradas versões dos vetores IL-60, da tecnologia *TraitUP*TM, contendo os genes *bar* e *nptII*, capazes de conferir resistência ao antibiótico canamicina e ao herbicida glifosinato de amônio. Além disso, foram determinadas as doses letais mínimas do herbicida para seleção de plantas de *E. urophylla* cultivadas em sistema de hidroponia e em cultivo em solo. Tais dados forneceram as informações e condições necessárias para o tratamento de plantas de *E. urophylla* com os vetores e futura avaliação da capacidade dos mesmos em atribuir os fenótipos de resistência. Desse modo, pretende-se cumprir os objetivos propostos e os que não foram atingidos até o presente momento, conforme indicados no item 3.2, ou seja:

1. Tratar plantas de *E. urophylla* com os vetores da plataforma IL-60 adaptados para a expressão dos genes de interesse, via absorção pelas raízes e/ou injeção no caule;
- 2.. Expor as plantas aos agentes seletivos, nas doses e tempo determinados experimentalmente;
3. Avaliar a resistência conferida pelos vetores, por meio da avaliação e registro de fenótipos;
4. Detectar a presença sistêmica e duradoura dos plasmídeos nas plantas, por meio de análises moleculares.

7. REFERÊNCIAS

- Aragão, F. J., Vianna, G. R., Albino, M., & Rech, E. L. (2002). Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. *Crop Science*, 42(4), 1298-1302.
- Arango Alzate, S. B. *Caracterização da madeira de árvores de clones de Eucalyptus grandis, E. saligna e E. grandis x E. urophylla* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Argüello-Astorga, G. R., Guevara-Gonzalez, R. G., Herrera-Estrella, L. R., & Rivera-Bustamante, R. F. (1994). Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology*, 203(1), 90-100.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J.A., & Struhl, K. (2002). *Short Protocols in Molecular Biology*, 5th Ed., 2 Volumes, John Wiley & Sons, 1.504 pp.
- Capo, P. (2015). A indústria de papel e celulose no Brasil: A silvicultura no Brasil. *Guia ABTCP de Fornecedores & Fabricantes de Celulose e Papel*, 17, 22-23.
- Chauhan, R. D., Veale, A., Strauss, S. H., Myburg, A. A., Ramawat, K. G., Mérillon, J. M., & Ahuja, M. R. (2014). Genetic transformation of *Eucalyptus* — challenges and future prospects. *Tree Biotechnology Ramawat, KG, Merillon, JM, Ahuja, MR*, 392-445.
- Cordeiro, G. M. (2013). *Otimização da propagação clonal de Eucalyptus globulus Labill* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Disponível em: www.ctnbio.gov.br. Acesso em: Outubro de 2015.
- Cusin, R., Revers, L. F., & Maraschin, F. dos S. (2017). New biotechnological tools to accelerate scab-resistance trait transfer to apple. *Genetics and Molecular Biology*, 40 (1 Suppl 1), 305–311.
- da Silva, A. L. L., de Oliveira, Y., da Luz Costa, J., Masetto, E., Erasmo, E. A. L. & Scheidt, G. N. (2010). Shoot tip and cotyledon explants of *Eucalyptus saligna* Sm. cultivated on different kanamycin levels. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 1(1), 1-5.
- De Greef, W., Delon, R., De Block, M., Leemans, J. & Botterman, J. (1989). Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions. *Nature Biotechnology*, 7(1), 61-64.
- Foelkel, C. E. B. (2005). Eucalipto no Brasil, história de pioneirismo. *Revista Visão Agrícola*, 4(4), 65-69.
- Girijashankar, V. (2011). Genetic transformation of *Eucalyptus*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(1), 9-23.

Gover, O., Peretz, Y., Mozes-Koch, R., Maori, E., Rabinowitch, H. D. & Sela, I. (2014). Only minimal regions of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) are required for replication, expression and movement. *Archives of Virology*, 159(9), 2263-2274.

Grupo Empresarial ENCE, S.A. (2009). Sustainable forest management and *Eucalyptus*.

Hadi, M., Kemper, E., Wendeler, E., & Reiss, B. (2002). Simple and versatile selection of Arabidopsis transformants. *Plant Cell Reports*, 21(2), 130-135.

Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S. B., Orozco, B. M., Nagar, S., & Robertson, D. (1999). Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(1), 71-106.

Kil, E. J., Kim, S., Lee, Y. J., Byun, H. S., Park, J., Seo, H., & Lee, K. Y. (2016). Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Scientific Reports*, 6, 19013.

Kirch, R., Astarita, L. V., Santarém, E. R. & Pasquali, G. (2011). *Eucalyptus* transgenic plants: from genetic transformation protocols to biosafety analysis. *BMC Proceedings*, 5, 179.

Magaton, A. S., Oliveira, R., Lopes, O. R., Milagres, F. R., Piló-Veloso, D., & Colodette, J. L. (2006). Composição química da madeira de espécies de Eucalipto. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Mora, A., & Garcia, C. (2001). A cultura do eucalipto no Brasil (Eucalypt cultivation in Brazil). São Paulo: SBS–Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000, 112 p.

Mozes-Koch, R., Gover, O., Tanne, E., Peretz, Y., Maori, E., Chernin, L. & Sela, I. (2012). Expression of an entire bacterial operon in plants. *Plant physiology*, 158(4), 1883-1892.

Oliveira, Y., Adamuchio, L., Degenhardt-Goldbach, J., Gerhardt, I., Besspalhok, J., Dibax, R. & Quoirin, M. (2011). Use of kanamycin for selection of *Eucalyptus saligna* genetically transformed plants. *BMC Proceedings*, 5, 147.

Padilla, I. M. G., & Burgos, L. (2010). Aminoglycoside antibiotics: structure, functions and effects on in vitro plant culture and genetic transformation protocols. *Plant Cell Reports*, 29(11), 1203-1213.

Peretz, Y., Mozes-Koch, R., Akad, F., Tanne, E., Czosnek, H., & Sela, I. (2007). A universal expression/silencing vector in plants. *Plant Physiology*, 145(4), 1251-1263.

Poke, F. S., Vaillancourt, R. E., Potts, B. M. & Reid, J. B. (2005). Genomic research in *Eucalyptus*. *Genetica*, 125(1), 79-101.

Rathore, K. S., Chowdhury, V. K., & Hodges, T. K. (1993). Use of bar as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplasts. *Plant Molecular Biology*, 21(5), 871-884.

Roa-Rodriguez, C. (2003). *Antibiotic Resistance Genes and Their Uses in Genetic Transformation: Especially in Plants*. CAMBIA Intellectual Property Resource.

Sartoretto, L. M., Saldanha, C. W., & Corder, M. P. M. (2008). Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. *Ciência Rural*, 38(3), 861-871.

sobre Biotecnologia, C. D. I. (2008). Guia do Eucalipto: oportunidades para um desenvolvimento sustentável.

Thompson, C. J., Movva, N. R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J. E., Lauwereys, M. & Botterman, J. (1987). Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal*, 6(9), 2519.

Xiang, C., Han, P., & Oliver, D. J. (1999). In solium selection for *Arabidopsis* transformants resistant to kanamycin. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17(1), 59-65.

Yusibov, V., Rabindran, S., Commandeur, U., Twyman, R. M. & Fischer, R. (2006). The potential of plant virus vectors for vaccine production. *Drugs in R & D*, 7(4), 203-217.

Zaidi, S. S. E. A. & Mansoor, S. (2017). Viral Vectors for Plant Genome Engineering. *Frontiers in Plant Science*, 8, 539.

Zamir, I. D., & Czosnek, H. (1994). Accumulation and translocation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the L. chilense TYLCV tolerance gene Ty-1. *Phytopathology*, 84, 928-933.

Zanella, L. B., Marssaro, A. L. & Degenhardt-Goldbach, J. Determinação da concentração de canamicina na seleção de plantas transgênicas do clone 3336 de *Eucalyptus urograndis*. In *Embrapa Florestas-Resumo em anais de congresso (ALICE)*. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 12., 2013, Colombo. Anais. Colombo: Embrapa Florestas, 2013.(Embrapa Florestas. Documentos, 253). Editores técnicos: Marcílio José Thomazini, Elenice Fritsons, Patrícia Raquel Silva, Guilherme Schnell e Schuhli, Denise Jeton Cardoso, Luziane Franciscon. EVINCI. Resumos.