

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATRÍCIA REGINA DHEIN PICOLOTTO

EXPRESSÃO DE GENES CODIFICADORES DE VERSÕES TRUNCADAS DA UREASE
DE *Canavalia ensiformis* EM PLANTAS

Porto Alegre

2014

PATRÍCIA REGINA DHEIN PICOLOTTO

EXPRESSÃO DE GENES CODIFICADORES DE VERSÕES TRUNCADAS DA UREASE
DE *Canavalia ensiformis* EM PLANTAS

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.

Orientador: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

Porto Alegre

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço, sempre em primeiro lugar, aos meus pais, Ledovino e Sandra, e aos meus irmãos, Bernardo e Eduardo, por todo o apoio, seja ele emocional ou financeiro. Vocês são o alicerce de todas as minhas conquistas.

Ao meu namorado, Ben-Hur, por estar sempre ao meu lado, me apoiando, incentivando e ouvindo a todos os meus dramas.

Ao meu orientador, Giancarlo, por ter aberto as portas de seu laboratório e por todos os seus ensinamentos ao longo desses anos.

Aos colegas do LBMV por todos os cafés, risadas, conselhos e paciência. Vocês fizeram com que meus dias de trabalho fossem muito mais agradáveis.

Aos meus amigos Bianca, Carolina, Fábio, Gabriela Feix, Gabriela Paludo, Julio e Nicolau por todo o companheirismo. O que esses últimos anos me trouxeram de melhor foram vocês.

Ao meu trio, Bruna, Fabíola e Priscilla, por serem tão especiais há tanto tempo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos os outros que, de alguma forma contribuíram para este trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

A agricultura no Brasil cresce a cada ano juntamente à necessidade da produção de maiores quantidades de alimentos. Os danos causados por insetos e fungos nas plantações podem representar grandes perdas e prejuízo aos agricultores e, por isso, novas abordagens para o melhoramento destas culturas são necessárias. As ureases são enzimas níquel-dependentes que catalisam a reação de hidrólise da ureia para formar amônia e dióxido de carbono. As ureases são encontradas em plantas, fungos e bactérias, mas não em animais. A urease da semente de *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco ou *jack bean*) possui três isoformas cujas propriedades inseticida e antifúngica, em maior ou menor grau, já foram comprovadas. Tendo em vista que insetos e fungos são os principais agentes que causam danos às culturas agrícolas, as ureases representam um grande potencial biotecnológico para o melhoramento vegetal. Pelo presente trabalho, teve-se por objetivo transformar plantas-modelo de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) com um gene que codifica um peptídeo interno da urease de *C. ensiformis*, denominado *Jbtx*, e regenerar plantas transgênicas resistentes a determinados tipos de insetos e fungos. O plasmídeo contendo a sequência gênica codificadora de *Jbtx* foi transformado em células de *Escherichia coli* para clonagem. O plasmídeo e a sequência codificadora foram, então, confirmados por sequenciamento de DNA. Utilizando-se *primers* especialmente projetados, a região codificadora do peptídeo foi amplificada pela reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR) e o fragmento foi combinado ao plasmídeo pENTR/D-TOPO (Invitrogen), obtendo-se clones recombinantes. Por meio de recombinação, de acordo com o sistema Gateway (Invitrogen), o gene *Jbtx* foi transferido de pENTR/D-TOPO-*Jbtx* para o plasmídeo binário pK7WG2D (Universidade de Ghent). Em seguida, pK7WG2D-*Jbtx* foi introduzido em células de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 para a transformação genética de *N. tabacum* SR1. Prosseguiu-se, então, com a transformação de discos foliares de tabaco, na qual se obteve brotos de plantas possivelmente transgênicos. Uma planta foi regenerada a partir dos brotos e se confirmou por PCR que ela é positiva para *Jbtx*.

Palavras-chave: Urease; proteína recombinante; plantas transgênicas.

ABSTRACT

Agriculture in Brazil grows every year together with the need for production of larger quantities of food. Damage caused by insects and fungi in crops may represent great losses and injury to farmers and, therefore, new approaches to improve these crops are needed. Ureases are nickel-dependent enzymes that catalyze the hydrolysis reaction of urea to form ammonia and carbon dioxide. Ureases are found in plants, fungi and bacteria, but not in animals. The urease from *Canavalia ensiformis* seed (jack bean) has three isoforms whose insecticide and fungicide properties, in a greater or lesser degree, have been proven. Considering that insects and fungi are the main agents that cause damage to crops, the urease represents a great biotechnological potential for plant breeding. This work had the objective of transform tobacco model plants (*Nicotiana tabacum* SR1) with a gene encoding an internal peptide of urease of *C. ensiformis*, denominated Jbtx, and regenerate transgenic plants resistant to certain kinds of insects and fungi. The plasmid containing the coding gene sequence Jbtx was transformed into *Escherichia coli* cells for cloning. The plasmid and the coding sequence were confirmed by DNA sequencing. Using especially designed primers, the peptide coding sequence was amplified through polymerase chain reaction (PCR) and the amplified fragment was introduced into pENTR/D-TOPO plasmid (Invitrogen), getting recombinant clones. By recombination, according to Gateway System (Invitrogen), the *Jbtx* gene was transferred from pENTR/D-TOPO-*Jbtx* to the binary plasmid pK7WG2D (Ghent University). Then, pK7WG2D-*Jbtx* was introduced in *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 cells to the genetic transformation of *N. tabacum* SR1. So, it was continued with the transformation of tobacco leaf discs, which were obtained potentially transgenic shoots. One plant was regenerated from the shoots and it was confirmed by PCR that it is positive for Jbtx.

Keywords: Urease; recombinant protein; transgenic plants.

Lista de Figuras

Figura 1. (A) Representação esquemática da sequência de <i>Jbtx</i> -2Ec e a sua variante <i>Jbtx</i> , utilizada no presente trabalho. (B) Sequência nucleotídica e de aminoácidos do cDNA de <i>Jbtx</i> -2Ec	13
Figura 2. Resumo do processo de transformação genética de tabaco	17
Figura 3. Representação esquemática do processo de clonagem pENTR/D-TOPO	20
Figura 4. Mapa do vetor pENTR/D-TOPO	20
Figura 5. Mapa do plasmídeo binário pK7WG2D	21
Figura 6. Imagem do gel resultante da eletroforese do produto da PCR do plasmídeo pET23a(+)- <i>Jbtx</i> com vistas a gerar o amplicon de <i>Jbtx</i> (280 pb) para subclonagem em pENTR/D-TOPO	31
Figura 7. Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR com vistas a confirmar a ligação e clonagem de <i>Jbtx</i> no plasmídeo pENTR/D-TOPO.....	32
Figura 8. Alinhamento da sequência original do gene <i>Jbtx</i> (acima) e da sequência obtida por sequenciamento do inserto clonado em pENTR/D-TOPO utilizando o <i>primer forward</i> específico.....	33
Figura 9. Alinhamento da sequência original do gene <i>Jbtx</i> (acima) e da sequência complementar resultante do sequenciamento do inserto clonado em pENTR/D-TOPO utilizando o <i>primer</i> reverso específico.	33
Figura 10. Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR com vistas a confirmar a ligação e clonagem de <i>Jbtx</i> no plasmídeo pK7WG2D	34
Figura 11. Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR com vistas a confirmar a inserção de pK7WG2D- <i>Jbtx</i> em <i>A. tumefaciens</i> LBA4404.....	35
Figura 12. Brotos resultantes da transformação de discos foliares de <i>N. tabacum</i> com <i>A. tumefaciens</i> LBA4404::pK7WG2D- <i>Jbtx</i>	36
Figura 13. Planta regenerada resultante da transformação de discos foliares de <i>N. tabacum</i> com <i>A. tumefaciens</i> LBA4404::pK7WG2D- <i>Jbtx</i>	37
Figura 14. Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da extração de DNA de folhas de <i>N. tabacum</i>	37
Figura 15. Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR com vistas a confirmar a presença de <i>Jbtx</i> na planta regenerada	38
Figura 16. Formação de raízes após subcultivo da planta resultante da transformação de discos foliares de <i>N. tabacum</i> com <i>A. tumefaciens</i> LBA4404::pK7WG2D- <i>Jbtx</i>	39

Lista de tabelas

Tabela 1. Sequências dos <i>primers</i> projetados para <i>Jbtx</i>	23
Tabela 2. Componentes da PCR para um volume total de 50 μ L.	23
Tabela 3. Programa para amplificação de <i>Jbtx</i>	24
Tabela 4. Componentes das reações de ligação para o vetor pENTR/D-TOPO.	24
Tabela 5. Componentes da PCR para um volume total de 50 μ L.	25
Tabela 6. Componentes da reação de recombinação entre pENTR/D-TOPO- <i>Jbtx</i> e pK7WG2D.	26
Tabela 7. Componentes das placas de meio MS sólido utilizadas na transformação de discos foliares de tabaco.	29

Lista de Abreviaturas e Siglas

FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
CNTX	Canatoxina
Jbtx-2Ec	Jaburetox-2EC
Jbtx	Jaburetox
Ti	<i>Tumor inducing</i>
T-DNA	<i>Transferred DNA</i>
Vir	Região de virulência
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
MS	Meio Murashige & Skoog
ANA/NAA	Ácido Naftalenoacético/ <i>Naftaleneacetic Acid</i>
BAP	6-benzilaminopurina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
EtBr	Brometo de Etídio
h	hora
min	minuto
s	segundo
LB	Meio Luria-Bertani
CG	Meio Circlegrow
NaCl	Cloreto de Sódio
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Ureases.....	11
1.2 Melhoramento Vegetal	13
1.3 Transformação Genética de Plantas via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
1.4 Cultura de Células Vegetais <i>In Vitro</i>	18
1.5 Plantas-modelo.....	19
1.6 Sistema de Clonagem Gateway	19
1.7 Plasmídeo Binário pK7WG2D	21
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 MATERIAS E MÉTODOS	23
3.1 Obtenção de <i>Jbtx</i>	23
3.2 Clonagem no Sistema Gateway	23
3.3 Confirmação da presença de <i>Jbtx</i> em pENTR/D-TOPO	25
3.4 Recombinação com pK7WG2D	26
3.5 Confirmação da presença de <i>Jbtx</i> em pK7WG2D	27
3.6 Transformação de <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 com pK7WG2D- <i>Jbtx</i>	27
3.7 Confirmação da presença de pK7WG2D- <i>Jbtx</i> em <i>A. tumefaciens</i> LBA4404	27
3.8 Cultivo de <i>N. tabacum</i> SR1	27
3.9 Transformação de <i>N. tabacum</i> SR1	28
3.9.1 Cocultura	28
3.9.2 Indução de brotos de tabaco transformado.....	29
3.9.3 Alongamento e enraizamento.....	29
3.10 Detecção de GFP	29

3.11 Extração de DNA	30
3.12 Confirmação da presença de <i>Jbtx</i> em <i>N. tabacum</i> SR1	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Clonagem de <i>Jbtx</i> em pENTR/D-TOPO	31
4.2 Clonagem de <i>Jbtx</i> no plasmídeo binário pK7WG2D	34
4.3 Confirmação da transformação de <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 com pK7WG2D- <i>Jbtx</i>	34
4.4 Transformação de <i>N. tabacum</i> com <i>A. tumefaciens</i> LBA4404::pK7WG2D- <i>Jbtx</i>	35
4.5 Detecção de GFP em brotos de tabaco transformados	36
4.6 Extração de DNA	37
4.7 Confirmação da presença de <i>Jbtx</i> em <i>N. tabacum</i> SR1	38
4.8 Considerações Finais	39
4.9 Perspectivas	40
5 BIBLIOGRAFIA	42

1 INTRODUÇÃO

Nos próximos anos, a população mundial deverá crescer consideravelmente, embora em um ritmo mais lento do que no passado e com diferenças entre regiões. Estima-se que nas próximas décadas a população mundial terá um aumento de 2 bilhões de pessoas e que em 2050 ultrapasse o número de 9 bilhões de habitantes. Os grãos de vegetais – dentre eles destacando-se o trigo, o arroz, a soja e o milho – são a fonte de alimento mais importante para seres humanos e para a alimentação de rebanhos animais. Anualmente produz-se em torno de 2.3 bilhões de toneladas de grãos, sendo 1 bilhão de toneladas destinadas ao consumo humano e 750 milhões de toneladas ao animal. Estimativas recentes da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) indicam que a produção agrícola global deverá ser 60% maior para suprir as necessidades da população quando comparada com os níveis de 2005 a 2007 (FAO, 2013). Considerando-se que danos às plantações causados por insetos, fungos, bactérias e vírus podem representar até 35% das perdas totais, a necessidade de melhorias para o controle de pragas e doenças é urgente.

De modo geral, os defensivos químicos utilizados são tóxicos para organismos não alvo, inclusive humanos, além de não serem degradados facilmente, levando à contaminação do solo e leitos de água e acúmulo por períodos mais prolongados do que o necessário. A utilização de inseticidas microbianos é uma alternativa ao uso de agentes químicos para o controle de pragas. Um dos principais inseticidas biológicos utilizados é produzido a partir da bactéria *Bacillus thuringiensis* (PARDO-LÓPEZ *et al.*, 2013). Outra estratégia é a inserção de genes exógenos em plantas de interesse agrônomo por transgenia (FERRY *et al.*, 2006). Diversas proteínas tóxicas estão sendo estudadas com esse objetivo, sendo uma delas as ureases vegetais e bacterianas (MARTINELLI *et al.*, 2014; REAL-GUERRA *et al.*, 2013)..

1.1 Ureases

Ureases (E.C. 3.5.1.5, ureia amidoidrolases) são metaloenzimas níquel-dependentes que catalisam a hidrólise da ureia para formar amônia e dióxido de carbono. Podem ser encontradas amplamente em diferentes organismos como plantas, bactérias, fungos, algas e invertebrados e, apesar de estarem organizadas em diferentes estruturas proteicas, exercem a mesma função catalítica (KRAJEWSKA *et al.*, 2009). Tanto a ureia quanto a urease tiveram um papel importante no desenvolvimento das ciências naturais. A ureia foi descoberta pela primeira vez na urina humana por Hillaire M. Rouelle em 1773 e se tornou a primeira

molécula orgânica a ser sintetizada a partir de compostos inorgânicos (WOHLER *et al.*, 1828).

A urease de *Canavalia ensiformis* – popularmente conhecida como feijão-de porco ou, em inglês, *jack bean* – foi a primeira enzima a ser cristalizada (SUMNER *et al.*, 1926). Em 1981, a canatoxina (CNTX), uma proteína com propriedades tóxicas a insetos e fungos, foi isolada a partir de sementes de *C. ensiformis* (CARLINI *et al.*, 1981) e, anos mais tarde, ela foi caracterizada como uma isoforma de urease (FOLLMER *et al.*, 2001). A CNTX apresenta uma massa molecular de 184 kDa quando analisada por gel filtração sob pH 7,5. Por SDS-PAGE e em meio redutor, sua massa é de 95 kDa, sugerindo que a proteína em sua forma nativa seja um dímero mantido por ligações não covalentes. Além disso, a CNTX é uma metaloproteína contendo zinco e níquel (FOLLMER *et al.*, 2001).

A base molecular para o mecanismo inseticida da CNTX não foi completamente elucidado até o momento. Sabe-se, porém, que o seu efeito entomotóxico é devido a um peptídeo interno de 10 kDa (pepcanatox) que é liberado após a hidrólise da proteína por enzimas digestivas do tipo catepsinas como cisteíno e aspártico proteases (CARLINI *et al.*, 2002; STANISÇUASKI *et al.* 2005). O peptídeo pepcanatox foi produzido pela hidrólise *in vitro* da CNTX com enzimas digestivas de larvas de *Callosobruchus maculatus* e, então, foi purificado e caracterizado (FERREIRA-DASILVA *et al.*, 2000).

Jaburetox-2EC (Jbtx-2Ec) é um peptídeo recombinante análogo ao pepcanatox e produzido em *Escherichia coli*, o qual possui potente efeito inseticida contra *Spodoptera frugiperda* e *Dysdercus peruvianus*, pragas de culturas de milho e algodão, respectivamente (MULINARI *et al.*, 2007; STANISÇUASKI *et al.*, 2005). Jbtx-2Ec possui 93 aminoácidos e, devido ao vetor plasmidial de clonagem e expressão utilizado (pET101/D-TOPO, Invitrogen), possui um epítipo V5 com 26 aminoácidos para purificação seguido de uma cauda de histidina na região carboxi-terminal, (MULINARI *et al.*, 2007). Além disso, uma variante de Jbtx-2Ec, denominada Jaburetox (Jbtx), que não possui o antígeno V5 fusionado, foi gerada. Para isso, o gene codificador de Jbtx foi clonado e expresso em *E. coli* utilizando o vetor pET-23a da Novagen (Postal *et al.*, 2012), gerando um peptídeo de 93 aminoácidos, que possui uma cauda de histidina na reação carboxi-terminal (Figura 1).

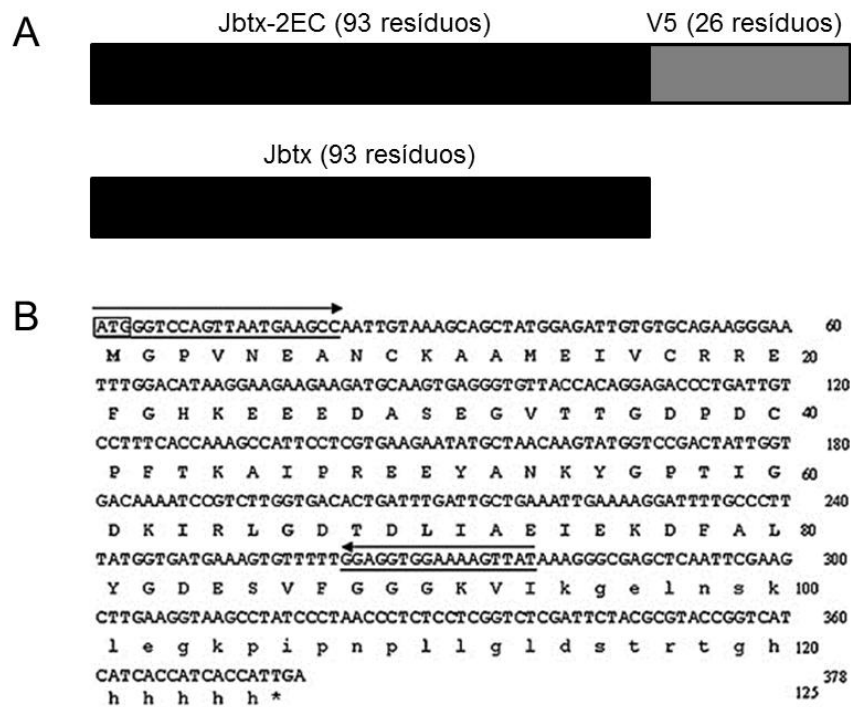


Figura 1 (A) Representação esquemática da sequência de Jbtx-2Ec e a sua variante Jbtx, utilizada no presente trabalho. (B) Sequência nucleotídica e de aminoácidos do cDNA de Jbtx-2Ec. A sequência deduzida de aminoácidos é mostrada abaixo de seus respectivos códons. Na direita estão indicados os números de nucleotídeos e aminoácidos da sequência de Jbtx. As regiões dos *primers* originais estão sublinhadas e o códon de início de tradução está representado dentro da caixa. A sequência de Jbtx está representada em letras maiúsculas enquanto as sequências do epítipo V-5 fusionado e da cauda de histidina do vetor está em letras minúsculas. (Fontes: alteradas de MARTINELLI *et al.*, 2013 e MULINARI *et al.*, 2007)

1.2 Melhoramento Vegetal

A agricultura surgiu séculos após o início da manipulação das plantas pelo homem por meio do processo de domesticação. O melhoramento genético surgiu concomitantemente com a domesticação de plantas selvagens para o consumo humano. Plantas com fenótipos desejáveis provenientes da seleção artificial foram desenvolvidas, mantidas e multiplicadas. No século XIX, com os avanços nos conhecimentos de genética, foi possível realizar cruzamentos genéticos e praticar seleção de forma consciente e com objetivos predeterminados (BERED, 2003). Assim, selecionaram-se plantas com características fenotípicas melhores como maior quantidade de sementes, tamanho das plantas e resistência a doenças. O melhoramento genético vegetal, no entanto, trouxe outras consequências limitantes como a redução do *pool* gênico, a incompatibilidade sexual e o tempo necessário

para se transferir características desejáveis em variedades vegetais com ciclos de vida longos (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998).

A busca de características em espécies vegetais selvagens, porém, nem sempre é viável devido a barreiras de isolamento reprodutivo que podem afetar o sucesso do cruzamento (PASQUALI & ZANETTINI, 2002). A cultura de tecidos é, dentre as diversas ferramentas biotecnológicas existentes, uma das que mais se tem obtido resultados práticos para o melhoramento vegetal. Essa técnica resume-se em retirar qualquer parte da planta – desde uma célula a um tecido ou órgão – e colocá-la em um meio nutritivo para que essa possa ter condições de regenerar outra planta ou estrutura (SANTOS, 2003). O surgimento da engenharia genética trouxe novas ferramentas para o melhoramento genético e possibilitou a transferência de informação genética de um organismo – seja ele um microrganismo, vegetal ou animal – para outro. Em plantas, tornou-se possível a inserção de um gene bem caracterizado em células vegetais e a obtenção de plantas transgênicas. Diversas metodologias foram criadas nas últimas décadas para a transformação genética vegetal, sendo que, dentre elas, a principal é a transformação mediada por agrobactérias (BAKSHSH *et al.*, 2014).

1.3 Transformação Genética de Plantas via *Agrobacterium tumefaciens*

Em 1907, a primeira descrição do agente etiológico da doença da galha-da-coroa – do inglês, *crown gall disease* – em plantas mostrou que as células vegetais eram infectadas por bactérias que se multiplicavam independentemente de estímulos externos. Já em outras galhas vegetais causadas por microrganismos e insetos, a proliferação do tecido vegetal era induzida por estímulos químicos ou mecânicos externos (BRASILEIRO *et al.*, 2012). Quando mantidas *in vitro*, as galhas-da-coroa são capazes de se dividir indefinidamente e, devido a essa semelhança com cânceres animais, a doença foi amplamente pesquisada para elucidar os seus mecanismos (DE ANDRADE *et al.*, 2003). Concluiu-se, então, que o surgimento da galha é resultado de um processo de transferência de genes da bactéria para as células vegetais que, por sua vez, passam a sintetizar substâncias que estimulam a divisão celular (BRASILEIRO *et al.*, 2012).

O agente causal da galha-da-coroa é a *Agrobacterium tumefaciens*, uma bactéria de solo gram-negativa. A formação dos tumores é o resultado da transferência de genes da bactéria para células da planta. Esses genes estão localizados em um plasmídeo denominado Ti – do inglês, *Tumor inducing* – em linhagens patogênicas de *A. tumefaciens*. Por meio de

uma região conservada, localizada entre extremidades repetitivas esquerda e direita, chamada T-DNA – do inglês, *transferred DNA* – há a transferência de oncogenes para a célula vegetal. Na região de virulência – região *vir* – do plasmídeo encontram-se genes envolvidos na síntese de proteínas responsáveis pelo processo de transferência do T-DNA. Os oncogenes presentes no T-DNA codificam enzimas responsáveis pela produção de auxinas e citocininas, as quais são reguladores de crescimento e responsáveis pelas divisões e expansões celulares que formam os tumores, e de opinas, que servem como fonte de nitrogênio para as bactérias (DE ANDRADE *et al.*, 2003).

O conhecimento das bases moleculares do processo de infecção da *A. tumefaciens* permitiu o desenvolvimento de técnicas que utilizam a bactéria como vetor natural de transformação genética. Determinou-se que apenas as regiões de 25 pb localizadas nas extremidades esquerda e direita do T-DNA são necessárias para a transferência deste para a célula vegetal (YADAV *et al.*, 1982). Assim, foi possível remover os oncogenes sem que houvesse interferência no processo de transferência (ZAMBRYSKI *et al.*, 1983). As denominadas linhagens desarmadas de agrobactérias não possuem os genes de síntese de auxinas e citocininas, as quais interferem no cultivo *in vitro* de tecidos e na regeneração de plantas transformadas. A região *vir*, por possuir genes indispensáveis para a transferência do T-DNA, foi mantida nessas linhagens (BRASILEIRO *et al.*, 2012). Além disso, descobriu-se que a transferência do T-DNA continuava a ser eficiente quando a região do T-DNA e a região *vir* eram separadas em plasmídeos distintos, criando-se um sistema binário. Dessa forma, concluiu-se que uma linhagem desarmada de *A. tumefaciens* é funcional graças à região *vir*, presente no plasmídeo Ti, e das extremidades direita e esquerda do T-DNA presentes em um segundo plasmídeo (binário), dentre das quais é possível inserir qualquer sequência de DNA que se deseja transferir para o genoma das plantas (BRASILEIRO *et al.*, 2012). Além disso, pode-se incluir no T-DNA genes marcadores para seleção e genes-repórteres (PASSAGLIA, 2003).

A transformação genética via *Agrobacterium* é a principal tecnologia usada para a produção de plantas geneticamente modificadas (TZFIRA *et al.*, 2006) e diversas linhagens desarmadas foram desenvolvidas para esse objetivo como, por exemplo, LBA4404 (OOMS *et al.*, 1982), EHA101 (HOOD *et al.*, 1986) e EHA105 (HOOD *et al.*, 1993). Devido ao tamanho do plasmídeo Ti, este não pode ser manipulado diretamente. Os plasmídeos binários – que possuem origens de replicação tanto para *E. coli* como para *A. tumefaciens* – por serem menores e de fácil manipulação (BRASILEIRO E CARNEIRO, 1998) são adequados em

tamanho e composição para as alterações necessárias às sequências. Esses vetores binários, portanto, devem possuir:

- a) Extremidades esquerda e direita, que definem e delimitam o T-DNA. São sequências repetidas de 25 pb, altamente conservadas entre plasmídeos Ti. Devido à perda natural de nucleotídeos próximos à borda esquerda do T-DNA, o gene de interesse deve estar localizado mais próximo à borda direita (LEE *et al.*, 2008).
- b) Um gene marcador para plantas, geralmente capaz de codificar enzima de resistência a um antibiótico – como canamicina ou higromicina – ou a um herbicida – como Basta, por exemplo (LEE *et al.*, 2008).
- c) Sítios de enzimas de restrição (LEE *et al.*, 2008) ou sítios de recombinação para a inserção do gene de interesse (KARIMI *et al.*, 2002).
- d) Uma ou mais origens de replicação, para permitir a utilização tanto em *E. coli* como em *A. tumefaciens* (LEE *et al.*, 2008).
- e) Genes de resistência a antibióticos para seleção do vetor binário em *E. coli* e *A. tumefaciens* (LEE *et al.*, 2008).

O método mais comum para a realização de transformação vegetal é derivado ou adaptado daquele descrito por Horsch *et al.*(1985) com a cocultura de tabaco com agrobactérias. Ele consiste basicamente no cultivo de um explante vegetal – mantido *in vitro*, em condições assépticas – em meio de cultura juntamente com uma linhagem desarmada de *A. tumefaciens* que contém o vetor binário com os genes a serem introduzidos na planta. O explante, então, é ferido antes do contato com a bactéria, para que haja a liberação de moléculas-sinal que irão induzir os genes de virulência de *Agrobacterium*. Durante a cocultura, irá ocorrer a ligação entre as bactérias e as células vegetais nos locais em que o explante está ferido, a indução dos genes *vir* e a transferência do T-DNA para o genoma vegetal (BRASILEIRO E CARNEIRO, 1998).

Após a cocultura, o explante ferido é transferido para um meio de cultura apropriado à sua regeneração, contendo reguladores de crescimento que promoverão a multiplicação das células vegetais e regeneração de plantas e antibióticos que irão eliminar as células de *Agrobacterium*, agora indesejáveis. Além disso, adiciona-se ao meio um agente de seleção que irá inibir a multiplicação de células vegetais não transformadas (BRASILEIRO E CARNEIRO, 1998). Os genes marcadores mais comumente utilizados na transformação genética de plantas são os que codificam proteínas que conferem resistência a antibióticos ou

cujos produtos conferem resistência/tolerância a herbicidas (PASQUALI & ZANETTINI, 2002). Esse agente de seleção não causará danos às células transformadas devido ao produto da expressão do gene marcador, presente no vetor binário. Assim, apenas células transformadas serão capazes de regenerar no meio seletivo. Durante todos os estádios posteriores à cocultura, deve-se manter a pressão seletiva sobre o tecido em regeneração para evitar o quimerismo – plantas formadas por células transformadas e não transformadas (BRASILEIRO E CARNEIRO, 1998).

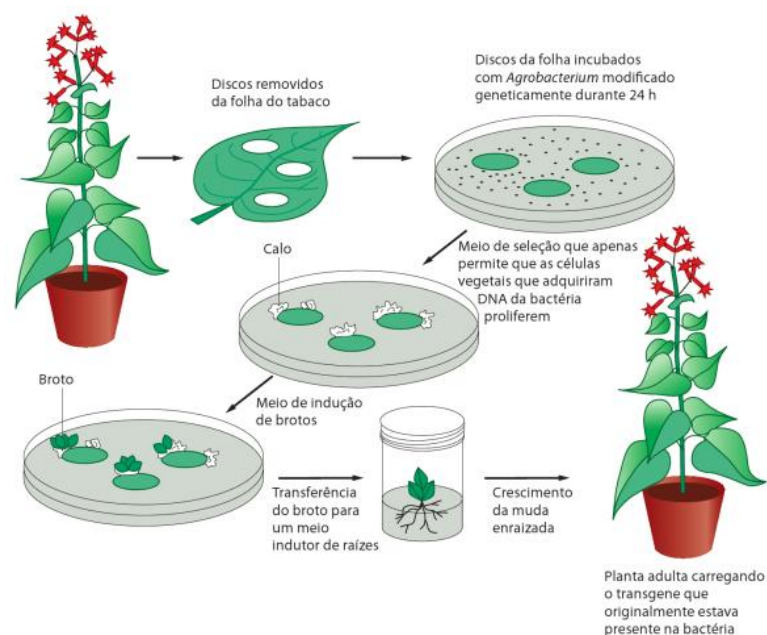


Figura 2 Resumo do processo de transformação genética de tabaco. Discos da folha são recortados e incubados com células de *A. tumefaciens* que carregam o T-DNA contendo o gene de interesse e marca de seleção. As células vegetais feridas nas bordas dos discos liberam substâncias que irão atrair as células de *Agrobacterium* e induzir transferência do T-DNA para o genoma da planta. Apenas as células vegetais que incorporam o DNA apropriado irão sobreviver ao meio seletivo. A manipulação dos reguladores de crescimento e nutrientes fornecidos irão induzir a formação de brotos, que subsequentemente formam raízes e crescem até plantas adultas carregando o transgene. (Fonte: ALBERTS *et al.*, 2010)

Entretanto, alguns escapes – plantas não transformadas que conseguem regenerar-se na presença do agente de seleção – podem ocorrer devido ao fato de que os sistemas de seleção não são totalmente eficientes (BRASILEIRO E CARNEIRO, 1998). Assim, uma segunda classe de genes, a dos genes repórteres, pode ser utilizada para o monitoramento da transformação. Um gene repórter deve codificar uma proteína cuja atividade não esteja presente na célula receptora e que possa ser facilmente evidenciada. É preferível utilizar uma abordagem não destrutiva como, por exemplo, os genes *luc* e *gfp*. O gene *luc* codifica a

enzima luciferase de *Photinus pyralis* (vagalume). A luciferase catalisa a reação de oxidação da luciferina na presença de ATP, produzindo uma luz verde-amarelada enquanto houver ATP disponível. Já o gene *gfp*, isolado da medusa *Aequorea victoria*, codifica a proteína de fluorescência verde – do inglês, *green fluorescent protein* ou GFP – que absorve luz azul ou ultravioleta e emite uma luz verde fluorescente (PASQUALI & ZANETTINI, 2002).

Conforme os brotos resistentes ao antibiótico regeneram-se, estes são isolados e transferidos para um meio de enraizamento. Após estarem enraizados, podem ser transferidos para casa de vegetação ou mantidos *in vitro*. Uma análise molecular detalhada dessas plantas possivelmente transformadas é necessária para confirmar a integração e a expressão dos genes exógenos no genoma da planta (BRASILEIRO E CARNEIRO, 1998).

1.4 Cultura de Células Vegetais *In Vitro*

O termo cultura de tecidos vegetais denota todas as culturas de células, tecidos e órgãos e emprega o princípio básico da totipotência. A técnica essencialmente envolve a separação de uma célula/órgão/tecido (explante) de uma planta doadora em condições assépticas e o seu crescimento em meio de cultura sintético em ambiente controlado (SAHIJRAM *et al.*, 1996).

O meio de cultura tem como função fornecer substâncias essenciais, com funções energéticas, metabólicas e estruturais das células *in vitro*. Assim, é de suma importância estabelecer um meio nutritivo adequado para o material vegetal que será utilizado. Com isso, desenvolveram-se diversos meios de cultura, os quais foram sendo aperfeiçoados e utilizados com bons resultados em inúmeras plantas (SANTOS, 2002). Destaca-se o meio MS, proposto por Murashige & Skoog em 1962, composto por macro e micronutrientes inorgânicos e acrescido de diversas substâncias propícias ao desenvolvimento vegetal como sacarose, vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Dentre os componentes do meio de cultura, a água é aquela usada em maior quantidade e, por isso, deve ser destilada e deionizada para que substâncias e impurezas que possam afetar o desenvolvimento do explante *in vitro* não estejam presentes (SANTOS, 2002).

Os reguladores de crescimento são componentes que devem ser adicionados conforme a necessidade da planta e do pesquisador. Os principais reguladores são as auxinas e as citocininas. As auxinas são comumente usadas para o desenvolvimento de nós, formação de calos e de raízes adventícias e as mais utilizadas são o ácido indol-3-acético (AIA ou IAA, do

inglês, indol-3-acetic acid), ácido indol-3-butírico (AIB ou IBA, do inglês, indol-3-butiric acid) e ácido naftalenoacético (ANA ou NAA, do inglês, naftaleneacetic acid). Já as citocininas tem papel fundamental na diferenciação e regeneração de plantas na maioria das espécies. Elas estimulam a divisão celular e induzem a morfogênese de partes aéreas e as mais usadas são a cinetina ou quinetina (KIN, do inglês, kinetin), a 6-benzilaminopurina (BAP) e o tidiazuron (TDZ). Os balanços de auxinas/citocininas favorecem o enraizamento ou a promoção da formação de parte aérea. Concentrações aproximadamente iguais promovem a produção de calos (GUERRA & NODARI, 2006).

1.5 Plantas-modelo

Nem todas as espécies vegetais são possíveis de serem transformadas. Por esta razão, plantas-modelo são amplamente utilizadas em pesquisas. Uma boa espécie de planta-modelo para estudos de transgenia é a que pode ser transformada com genes exógenos de maneira eficaz e simples. Além disso, as células ou tecidos transformados devem ser capazes de se regenerar e produzir plantas adultas férteis, que produzam sementes transgênicas (TOPPING, 1998).

Uma das plantas mais utilizadas como modelo para estudos de processos fisiológicos, desenvolvimento e genética é *Nicotiana tabacum* (tabaco), muitas vezes por meio da cultura de tecidos (TEIXEIRA, 2005). A cultura de tecidos de tabaco foi, historicamente, uma das primeiras a ser desenvolvida, com o estabelecimento de linhagens de calos por Murashige & Skoog (1962) e com o desenvolvimento do método de transformação por Horsch *et al.* (1985). A variedade de tabaco mais usada em laboratórios de pesquisa é a *N. tabacum* SR1, também conhecida como Petit Havana (TOPPING, 1998).

1.6 Sistema de Clonagem Gateway

O Sistema Gateway da Invitrogen consiste em um sistema de clonagem e sub-clonagem de sequências de DNA utilizando propriedades sítio-específicas de recombinação do bacteriófago Lambda, descritas em 1989. Uma vez inseridas nesse sistema, as sequências de DNA podem ser facilmente transferidas entre diferentes vetores utilizando os sítios específicos de recombinação *attL1/attL2* e *attR1/attR2* dos vetores de entrada e de destino, respectivamente. O vetor de entrada pENTR/D-TOPO possui um sítio de clonagem direcional que permite a ligação de produtos de PCR com extremidades cegas utilizando a enzima Topoisomerase I derivada do vírus *Vaccinia* (Figura 3), resistência à canamicina para seleção

em *E. coli* e uma origem pUC que propicia uma alta taxa de replicação e manutenção do plasmídeo em *E. coli* (Figura 4) (manual do fabricante).

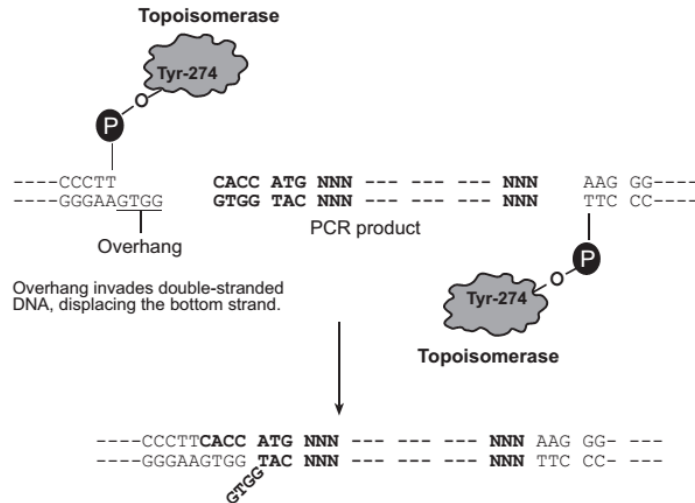


Figura 3 Representação esquemática do processo de clonagem pENTR/D-TOPO. Os produtos da PCR são direccionalmente clonados pela adição de quatro bases na sequência do *primer forward* (CACC). A sequência sobresalente (*overhang*) do vetor de clonagem (GTGG) anela com a região excedente do produto de PCR, proveniente da região extra do *primer forward*, e estabiliza o produto na orientação correta. Esta reação é possível devido à enzima Topoisomerase I, que cliva a ligação fosfodiéster de uma fita e conserva energia pela formação de uma ligação covalente entre o fosfato 3' da fita clivada e um resíduo tirosil da topoisomerase. (Fonte: www.invitrogen.com)

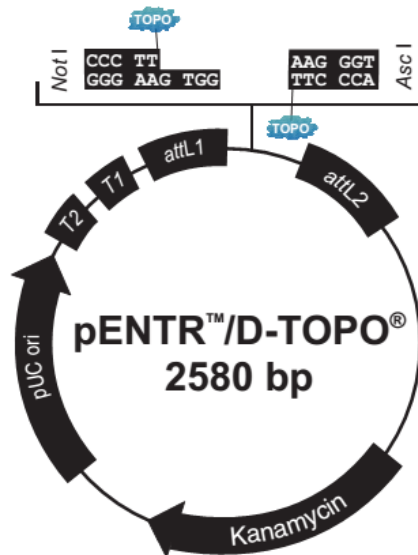


Figura 4 Mapa do vetor pENTR/D-TOPO. TOPO: enzima Topoisomerase I; *attL1* e *attL2*: sequências que permitem a recombinação específica do gene de interesse para o vetor de expressão do sistema Gateway; *Kanamycin*: gene de resistência ao antibiótico canamicina para seleção de transformantes em *E. coli*; pUC ori: origem para alta taxa de replicação e manutenção do plasmídeo em *E. coli*; T1 e T2: sequências de término de transcrição; *NotI* e *AscI*: sítios para endonucleases. (Fonte: www.invitrogen.com)

1.7 Plasmídeo Binário pK7WG2D

O plasmídeo de destino pK7WG2D da série Gateway possui as extremidades *attR1/attR2* que irão possibilitar a recombinação do gene de interesse utilizando o *mix* de enzimas LR Clonase II (Invitrogen). Esse plasmídeo possui o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV 35S), que é utilizado para superexpressar o gene em todos os tecidos da planta. Possui resistência à espectinomicina para seleção de positivos em *E. coli* e, no local onde o gene de interesse é inserido, possui o gene *ccdB*, que codifica uma proteína tóxica às bactérias, tornando-as inviáveis caso a reação de recombinação não funcionar. Dispõe, para seleção de plantas transformadas, resistência à canamicina e o gene repórter que codifica a GFP (KARIMI *et al.*, 2002) (Figura 4). (Manual do fabricante).

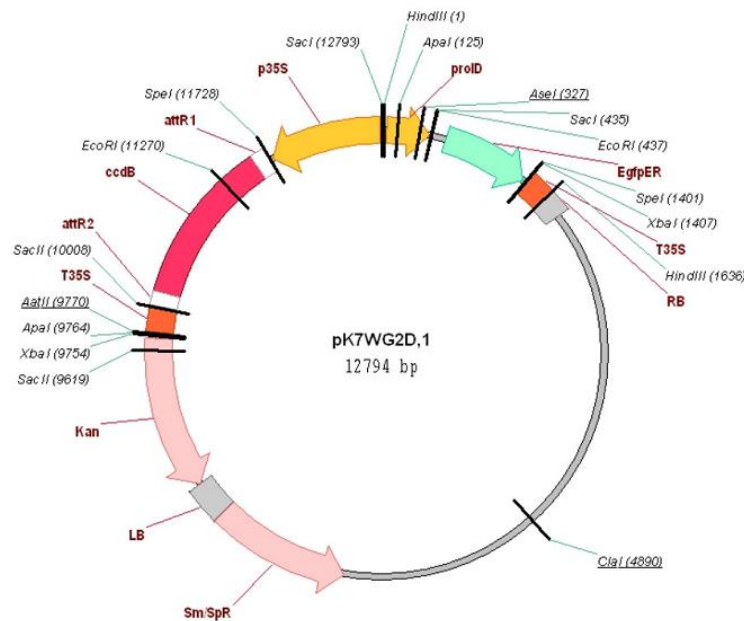


Figura 5 Mapa do plasmídeo binário pK7WG2D. *attR1* e *attR2*: sequências que permitem a recombinação específica do gene de interesse com o plasmídeo de entrada; Sm/SpR: gene de resistência ao antibiótico espectinomicina para seleção de transformantes em *E. coli*; Kan: gene de resistência ao antibiótico canamicina para seleção de transformantes em plantas; p35S e T35S: promotor e terminador 35S, respectivamente, que irão controlar a transcrição do gene de interesse; *ccdB*: gene que codifica uma proteína tóxica para bactérias e que é substituído pelo gene de interesse; EgfpER: gene que codifica GFP; proID e T35S: promotor e terminador, respectivamente, do gene que codifica a GFP; RB e LB: bordas esquerda e direita, respectivamente, do T-DNA. (Fonte: KARIMI *et al.*, 2002)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Transformar *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens* com gene codificador de versão truncada da urease de *Canavalia ensiformis* (gene *Jbtx*) visando avaliar a capacidade do peptídeo recombinante em conferir resistência vegetal a determinados tipos de insetos e fungos.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Transformar *A. tumefaciens* LBA4404 com o plasmídeo binário pK7WG2D contendo o gene de interesse *Jbtx*.

2.2.2 Transformar discos de *N. tabacum* SR1 via *A. tumefaciens* LBA4404 com *Jbtx* e regenerar plantas transgênicas.

2.2.3 Realizar análises moleculares para avaliar o estado transgênico das plantas e definir o número de cópias de *Jbtx* integradas no genoma via Southern *Blot*.

2.2.4 Analisar a expressão do transgene *Jbtx* em nível de mRNA por RT-qPCR.

2.2.5 Detectar o peptídeo recombinante *Jbtx* nas plantas transgênicas por *Western Blot*.

2.2.6 Realizar bioensaios com insetos e/ou fungos para verificar a capacidade de *Jbtx* conferir resistência às plantas.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Obtenção de *Jbtx*

Uma alíquota do plasmídeo pET23a(+) contendo a sequência gênica codificadora do peptídeo *Jbtx* foram gentilmente cedida pela Dra. Anne Helene Souza Martinelli (LAPROTOX, Centro de Biotecnologia, UFRGS). Os *primers* para *Jbtx* foram projetados baseados na sequência descrita por Mulinari *et al.*(2007) e depositada no GenBank – número de acesso EU938655 – e sintetizados pela Integrated DNA Technologies (IdT). Na região 5' da sequência do *primer forward* foi incluída a sequência CACC para ligação do inserto no plasmídeo pENTR/D-TOPO por ação da topoisomerase (Tabela 1).

Tabela 1 Sequências dos *primers* projetados para *Jbtx*. Em negrito estão indicados os códons de início e término e, sublinhado, o sítio de ligação.

<i>Primer</i>	Sequência	Temperatura de anelamento
<i>Primer Forward</i>	5' – <u>CAC</u> CAT GGG TCC AGT TAA TG – 3'	53,4 °C
<i>Primer Reverse</i>	5' – GGA GGT GGA AAA GTT ATA TGA ATT C – 3'	51,9 °C

3.2 Clonagem no Sistema Gateway

A sequência de *Jbtx* foi obtida por PCR (Tabelas 2 e 3) e o produto da reação foi utilizado para ligação ao plasmídeo de entrada pENTR/D-TOPO, seguindo as instruções do manual do fabricante (Tabela 4). A confirmação da integridade e da concentração do produto da PCR foi feita por eletroforese com gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (EtBr) a 0,05 µg/mL. O gel foi submetido à eletroforese em cuba horizontal (Bio-Rad) com tampão TBE 1X a 69 V e 130 mA durante 1,5 horas. A seguir, os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz UV utilizando e imagem digital foi gerada pelo emprego do sistema Gel-Doc (Bio-Rad).

Tabela 2 Componentes da PCR para um volume total de 50 µL.

Reagentes	Volume (µL) para 1 reação
Água ultrapura	36

10X <i>Pfx50</i> PCR Buffer	5
dNTP's 10 mM	2
<i>Primer forward</i> 10 μ M	2
<i>Primer reverse</i> 10 μ M	2
pET23a(+)- <i>Jbtx</i>	2
<i>Pfx50</i> DNA Pol 5 U/ μ L	1

Tabela 3 Programa para amplificação de *Jbtx*.

Processo	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Desnaturação inicial	95 °C	2 min	1
Desnaturação	95 °C	50 s	35
Anelamento	47 °C	50 s	35
Extensão	72 °C	50 s	35
Extensão final	72 °C	5 min	1

As reações de ligação constituídas pelos componentes indicados na Tabela 4 foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente e depois transferidas para o gelo. Após, foi feita a transformação por choque térmico de células de *E. coli* XL-1. As células de *E. coli* foram descongeladas no gelo e 2 μ L da reação de ligação foram adicionados. Estas foram incubadas no gelo por 20 min e, em seguida, prosseguiu-se com o choque térmico em banho-maria a 42 °C por 2 min. Adicionou-se 1 mL de meio Luria-Bertani (LB) e se incubou a 37 °C com agitação de 180 rpm durante 1 h.

Após a transformação, 100 μ L da suspensão bacteriana foram distribuídos, com alça de Drigalski, em placa de Petri com meio LB sólido contendo canamicina a 50 mg/mL. A placa foi mantida *overnight* (*o/n*) em estufa a 37 °C.

Tabela 4 Componentes das reações de ligação para o vetor pENTR/D-TOPO.

Componentes	Volume (μ L) recomendado por reação (6 μ L)	Volume utilizado (μ L)
Produto de PCR	0,5 – 4	1
Solução salina	1	1
Água ultrapura	Para um volume final de 5 μ L	3

Vetor pENTR/D-
TOPO

1

1

3.3 Confirmação da presença de *Jbtx* em pENTR/D-TOPO

Colônias resultantes da transformação foram inoculadas com palitos estéreis em 1,5 mL de meio LB contendo 50 mg/mL de canamicina. As culturas foram mantidas *o/n* a 37 °C e 180 rpm em agitador rotacional (New Brunswick Scientific). Minipreparação de plasmídeos utilizando o método de lise alcalina descrito por Bimboim *et al.*(1979) com alterações propostas por Jones *et al.*(1990) foram realizadas. A quantificação da concentração do DNA foi feita utilizando NanoDrop (Thermo Scientific).

Uma PCR foi feita conforme componentes e programa indicados nas Tabelas 5 e 3, respectivamente, para a confirmação da inserção do gene de interesse. O produto foi aplicado em gel de agarose a 1% e corado com EtBr a 0,05 µg/mL. O gel foi submetido à eletroforese e fotografado conforme descrito no item 3.2.

Tabela 5 Componentes da PCR para um volume total de 50 µL. Após a distribuição da mistura de reação, adicionou-se 0,5 µL de cada amostra plasmidial minipreparada.

Componentes	Volume (µL) para 1 reação
Água ultrapura	36,3
5x Green GoTaq Flexi Buffer	5
50 mM MgCl ₂	2
dNTP's 5 mM	2
<i>Primer forward</i> 10 µM	2
<i>Primer reverse</i> 10 µM	2
GoTaq Hot Start Polymerase (5 U/µL)	0,5
Amostra plasmidial	0,5

A confirmação da integridade do gene foi feita por sequenciamento de DNA plasmidial. O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *AB 3500 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes (250 ng) foram marcados utilizando-

se 2,5 pmol de cada *primer* específico (tabela 1) e 0,5 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standart* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador LGC XP *Cycler* com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection 2* (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set “Z”*; *Mobility File “KB_3500_POP7_BDTv3.mob”*; *BioLIMS Project “3500_Project1”*; *Run Module 1 “FastSeq50_POP7_50cm_cfv_100”*; e *Analysis Module 1 “BC-3500SR_Seq_FASTA.saz”*.

O alinhamento das sequências foi feito utilizando a ferramenta de alinhamento múltiplo Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

3.4 Recombinação com pK7WG2D

A reação de recombinação entre os plasmídeos pENTR/D-TOPO-Jbtx e pK7WG2D foi feita com o uso do *kit* LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) e conforme instruções do fabricante. Os componentes indicados na Tabela 6 foram adicionados a um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL sob temperatura ambiente. A mistura de enzimas LR Clonase II foi descongelada no gelo por 2 min e foram agitados duas vezes em *vortex* por 2 s cada. A seguir, 2 µL da mistura de enzimas LR Clonase II foram adicionados à reação. Após agitar em *vortex* e centrifugar, a reação foi incubada a 25 °C por 1 h. Finalmente, adicionou-se 1 µL da solução de Proteinase K para terminar a reação e a amostra foi incubada a 37 °C por 10 min.

Tabela 6 Componentes da reação de recombinação entre pENTR/D-TOPO-Jbtx e pK7WG2D.

Componentes	Quantidade Recomendada	Concentração do plasmídeo (ng/µL)	Volume utilizado (µL)
Clone de entrada (pENTR/D-TOPO- <i>Jbtx</i>)	50-150 ng	184,1	1
Vetor de destino (pK7WG2D)	150 ng/µL	68	2,5

Tampão TE pH 8,0	Volume final 8 µL	-	4,5
------------------	-------------------	---	-----

Seguiu-se com a transformação de células de *E. coli* OmniMAX, conforme descrito no item 3.2, utilizando-se 5 µL da reação de recombinação. Após a transformação, 100 µL da suspensão bacteriana foram distribuídos, com alça de Drigalski, em placa de Petri com meio LB sólido contendo espectinomicina a 100 mg/mL. A placa foi mantida *o/n* em estufa a 37 °C.

3.5 Confirmação da presença de *Jbtx* em pK7WG2D

Colônias resultantes da transformação de *E. coli* OmniMAX com os produtos da reação de recombinação foram inoculadas com palitos estéreis em 1,5 mL de meio LB contendo 100 mg/mL de espectinomicina. As culturas foram mantidas *o/n* a 37 °C e 180 rpm em agitador rotacional. Seguiu-se com o protocolo de minipreparação de plasmídeos conforme item 3.3 e PCR conforme componentes e programa indicados nas Tabelas 5 e 3, respectivamente. Os amplicons resultantes foram resolvidos em gel de agarose a 1% corado com EtBr a 0,05 µg/mL por eletroforese conforme descrito no item 3.2.

3.6 Transformação de *A. tumefaciens* LBA4404 com pK7WG2D-*Jbtx*

A inserção de pK7WG2D-*Jbtx* em *A. tumefaciens* foi realizada por técnica de choque térmico segundo protocolo presente em Brasileiro et al. (1998). Então, 100 µL da suspensão bacteriana foram distribuídos com alça de Drigalski em placa de Petri com meio Circlegrow (CG) sólido contendo rifampicina a 50 mg/mL e espectinomicina a 100 mg/mL. A placa foi mantida por 48 h a 28 °C para a formação de colônias.

3.7 Confirmação da presença de pK7WG2D-*Jbtx* em *A. tumefaciens* LBA4404

Colônias isoladas resultantes da transformação de *A. tumefaciens* LBA4404 com pK7WG2D-*Jbtx* foram selecionadas para PCR de colônia para confirmar a presença do gene *Jbtx* e, por conseguinte, do plasmídeo. A PCR foi feita conforme componentes indicados na Tabela 5 e programa representado na Tabela 3. Com o auxílio de palitos, cada uma das colônias resultantes foi tocada e colocada na mistura de reação, previamente aliquoteado em microtubos de 0,2 mL. Os produtos das PCRs foram aplicados em gel de agarose a 1% corado com EtBr a 0,05 µg/mL e resolvidos por eletroforese conforme descrito no item 3.2.

3.8 Cultivo de *N. tabacum* SR1

Todas as manipulações de meios de cultivo e materiais vegetais para cultura *in vitro* foram realizadas em cabine de fluxo laminar horizontal (PA 220, Pachane). Sementes de tabaco foram submetidas à assepsia superficial mergulhando-as em etanol 70% por 2 min, seguido de hipoclorito de sódio (Mazzarolo) a 1,5% por 20 min e de 4 lavagens em água destilada estéril.

As sementes foram dispostas na superfície de meio MS contendo metade da quantidade de sair (1/2 MS; Sigma) acrescido de ágar a 1,5% em placas de Petri. As placas contendo as sementes foram incubadas em câmara de cultivo tipo B.O.D. a 25 °C no escuro por 2 dias seguido de incubação sob fotoperíodo de 16 h luz e 8 h escuro na mesma B.O.D.

Após germinação, as plântulas foram transferidas para meio MS contendo sacarose a 3% e ágar a 0,6%. A cada 5 semanas, as culturas foram subcultivadas pela transferência de segmentos do caule com aproximadamente dois centímetros de comprimento e com no mínimo duas gemas axilares em novo meio MS nas mesmas condições.

3.9 Transformação de *N. tabacum* SR1

A transformação de discos foliares de tabaco foi baseada no protocolo presente em BRASILEIRO et al. (1998), com adaptações, conforme descrito abaixo.

3.9.1 Cocultura

Com uso de alça de platina, duas a quatro colônias isoladas de *A. tumefaciens* LBA4404::pK7WG2D-*Jbtx* foram inoculadas em 10 mL de meio CG contendo espectinomomicina a 100 mg/L e acetoseringona a 100 µM. O inóculo foi mantido a 28 °C com agitação de 150 rpm por aproximadamente 36 h. A seguir, o inóculo foi aliquoteado em microtubos de 1,5 mL estéreis e centrifugados por 5 min a 5.000 rpm. As células foram ressuspendidas em 10 mL de NaCl 0,85% e a suspensão bacteriana foi mantida em temperatura ambiente até o momento de cocultivo. Cem discos foliares de tabaco foram preparados e mantidos em meio MS líquido até o momento do co-cultivo. Toda a manipulação de *A. tumefaciens* e tecidos vegetais infectados foi realizada em cabine de fluxo laminar vertical (PA 320, Pachane,).

Os discos foliares foram transferidos para placa de Petri com 10 mL da suspensão bacteriana e mantidos por 15 min à temperatura ambiente com leve agitação e, então, secados em papel filtro para eliminação do excesso de *A. tumefaciens*. Em seguida, os discos foliares foram transferidos para a superfície de discos de papel de filtro dispostos nas placas de

cocultivo com a face adaxial voltada para o meio (Tabela 7) e as placas foram incubadas por aproximadamente 60 h a 25 °C no escuro. Os segmentos vegetais foram, então, lavados 3 vezes em água destilada estéril contendo 100 mg/L de cefotaxima e 100 mg/L de vancomicina para lavagem e inibição da *A. tumefaciens*. Na última lavagem, foram mantidos imersos por aproximadamente 15 min.

3.9.2 Indução de brotos de tabaco transformado

Após as lavagens, os discos foliares foram secados em papel filtro estéreis e transferidos para placas de Petri com meio MS para indução de calos (Tabela 7). As placas foram seladas e incubadas em sala de cultura com fotoperíodo de 16 h, a uma temperatura de 25 ± 2 °C. Para manter a eficiência dos antibióticos e dos fitorreguladores, os discos foliares foram transferidos de meio a cada 15 dias.

3.9.3 Alongamento e enraizamento

Os brotos regenerados após 7 semanas de cultura foram removidos com auxílio de pinças e lâminas de bisturi e transferidos para meio de enraizamento (Tabela 7). Estes brotos foram mantidos nas mesmas condições anteriores de cultura.

Tabela 7 Componentes das placas de meio MS sólido utilizadas na transformação de discos foliares de tabaco.

Componente	Meio de cocultura	Meio de regeneração	Meio de enraizamento
Cefotaxima (mg/L)	100	250	100
Vancomicina (mg/L)	100	100	100
Canamicina (mg/L)	100	100	100
NAA (mg/L)	0,1	0,1	-
BAP (mg/L)	1	1	-

3.10 Detecção de GFP

Para análise prévia do estado transgênico dos brotos regenerados, os mesmos foram iluminados com lanterna armada com lâmpada de luz azul (comprimento de onda de 488 nm) para excitar GFP. As fotos com câmera digital (Canon Sx50 HS) foram tiradas utilizando filtro laranja.

3.11 Extração de DNA

A extração de DNA de folhas jovens da planta regenerada e controle (*N. tabacum* SR1 selvagem) foi feita em duplicatas utilizando o método Brometo de Cetil-trimetilamônio ou CTAB (Doyle & Doyle, 1987). As extrações foram aplicadas em gel de agarose a 1% corado com EtBr a 0,05 µg/mL e resolvidos por eletroforese conforme descrito no item 3.2 para confirmação da integridade do DNA.

3.12 Confirmação da presença de *Jbtx* em *N. tabacum* SR1

A PCR para confirmação de *Jbtx* foi feita conforme componentes indicados na Tabela 5 e programa representado na Tabela 3, porém utilizando 2 µL de DNA-molde proveniente da extração de DNA. Os amplicons resultantes foram aplicados em gel de agarose a 1% corado com EtBr a 0,05 µg/mL e resolvidos por eletroforese conforme descrito no item 3.2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Clonagem de *Jbtx* em pENTR/D-TOPO

A primeira etapa do presente trabalho foi a amplificação do gene *Jbtx* por PCR a partir do plasmídeo pET23a(+) onde havia sido anteriormente clonado (Postal *et al.*, 2012). A PCR, utilizando *primers* especificamente projetados para a futura adaptação do amplicon no plasmídeo pENTR/D-TOPO, resultou em uma banda de aproximadamente 280 pb, conforme esperado (Figura 6). A clonagem do fragmento de PCR em pENTR/D-TOPO foi realizada conforme instruções do fabricante (Invitrogen) e a transformação de células de *E. coli* XL-1 resultou em aproximadamente 20 colônias selecionadas com o antibiótico canamicina a 50 mg/L. Dessas, 9 colônias foram inoculadas para a minipreparação de plasmídeos pelo método de lise alcalina para posterior confirmação da inserção do gene *Jbtx* por PCR (Figura 7).

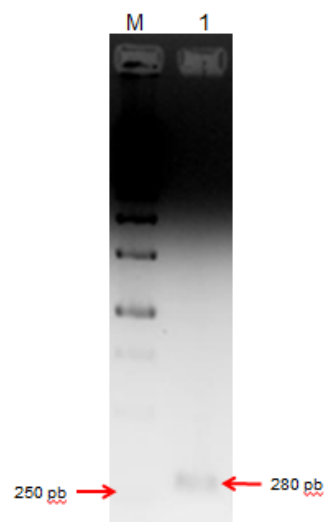


Figura 6 Imagem do gel resultante da eletroforese do produto da PCR do plasmídeo pET23a(+)- *Jbtx* com vistas a gerar o amplicon de *Jbtx* (280 pb) para subclonagem em pENTR/D-TOPO. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA *O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas); 1, amplicon de *Jbtx* resultante.

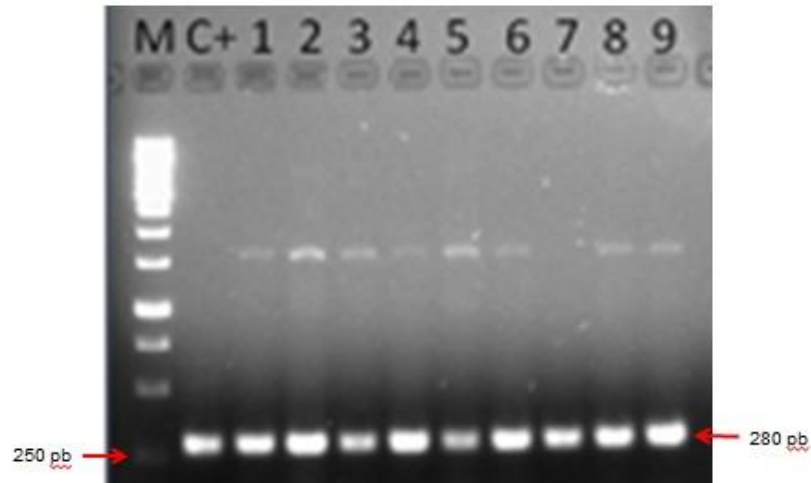


Figura 7 Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR com vistas a confirmar a ligação e clonagem de *Jbtx* no plasmídeo pENTR/D-TOPO. *Primers* específicos ao fragmento de 280 pb de *Jbtx* foram utilizados na reação. A presença de banda deste tamanho (seta) permitiu confirmar os clones positivos. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA *O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas); C+, controle positivo, ou seja, pET23a(+)-*Jbtx*; 1-9, plasmídeos pENTR/D-TOPO minipreparados a partir de colônias de *E. coli* XL-I transformadas com os produtos da ligação do amplicon de *Jbtx*.

A confirmação da integridade do gene *Jbtx* foi realizada pelo sequenciamento de DNA utilizando os *primers* específicos e flanqueadores do gene. O resultado permitiu concluir que, de fato, o gene *Jbtx* foi clonado no vetor pENTR/D-TOPO de forma correta e sem qualquer alteração de nucleotídeos, conforme alinhamento utilizando o programa *Clustal W* (Figuras 8 e 9).


```

JbtX      CACCATGGGTCCAGTTAATGAAGCCAATTGTAAAGCAGCTATGGAGATTGTGTGCAGAAG 60
SeqF      -----GTGCAGAAG 9
          *****

JbtX      GGAATTTGGACATAAGGAAGAAGAAGATGCAAGTGAGGGTGTACCACAGGAGACCCTGA 120
SeqF      GGAATTTGGACATAAGGAAGAAGAAGATGCAAGTGAGGGTGTACCACAGGAGACCCTGA 69
          *****

JbtX      TTGTCCTTTCACCAAAGCCATTCCCTCGTGAAGAATATGCTAACAAGTATGGTCCGACTAT 180
SeqF      TTGTCCTTTCACCAAAGCCATTCCCTCGTGAAGAATATGCTAACAAGTATGGTCCGACTAT 129
          *****

JbtX      TGGTGACAAAATCCGTCTTGGTGACACTGATTTGATTGCTGAAATTGAAAAGGATTTTGC 240
SeqF      TGGTGACAAAATCCGTCTTGGTGACACTGATTTGATTGCTGAAATTGAAAAGGATTTTGC 189
          *****

JbtX      CCTTTATGGTGATGAAAGTGTTTTTGGAGGTGGAAAAGTTATATGAATTC----- 290
SeqF      CCTTTATGGTGATGAAAGTGTTTTTGGAGGTGGAAAAGTTATATGAATTC AAGGGTGGGC 249
          *****

JbtX      -----
SeqF      GCGCCGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAA 292

```

Figura 8 Alinhamento da sequência original do gene *Jbtx* (acima) e da sequência obtida por sequenciamento do inserto clonado em pENTR/D-TOPO utilizando o *primer forward* específico. Em negrito está representada a sequência do gene; Sublinhado está a posição do *primer* reverso. Os asteriscos (*) representam posições de total identidade de bases.

```

JbtX      -----CACCATGGGTCCAGTTAATG 20
SeqR      CAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCTT CACCATGGGTCCAGTTAATG 60
          *****

JbtX      AAGCCAATTGTAAAGCAGCTATGGAGATTGTGTGCAGAAGGGAATTTGGACATAAGGAAG 80
SeqR      AAGCCAATTGTAAAGCAGCTATGGAGATTGTGTGCAGAAGGGAATTTGGACATAAGGAAG 120
          *****

JbtX      AAGAAGATGCAAGTGAGGGTGTACCACAGGAGACCCTGATTGTCCTTTCACCAAAGCCA 140
SeqR      AAGAAGATGCAAGTGAGGGTGTACCACAGGAGACCCTGATTGTCCTTTCACCAAAGCCA 180
          *****

JbtX      TTCCTCGTGAAGAATATGCTAACAAGTATGGTCCGACTATTGGTGACAAAATCCGTCTTG 200
SeqR      TTCCTCGTGAAGAATATGCTAACAAGTATGGTCCGACTATTGGTGACAAAATCCGTCTTG 240
          *****

JbtX      GTGACACTGATTTGATTGCTGAAATTGAAAAGGATTTGCCCTTTATGGTGATGAAAGTG 260
SeqR      GTGACACTGATTTGATTGCTGAAATTGAAAA----- 271
          *****

JbtX      TTTTTGGAGGTGGAAAAGTTATATGAATTC 290
SeqR      -----

```

Figura 9 Alinhamento da sequência original do gene *Jbtx* (acima) e da sequência complementar resultante do sequenciamento do inserto clonado em pENTR/D-TOPO utilizando o *primer* reverso específico. Em negrito está representada a sequência do gene; Sublinhado está a posição do *primer* forward. Os asteriscos (*) representam posições de total identidade de bases.

4.2 Clonagem de *Jbtx* no plasmídeo binário pK7WG2D

A transferência do gene *Jbtx* de pENTR/D-TOPO-*Jbtx* para o plasmídeo binário pK7WG2D foi feita por recombinação utilizando a estratégia Gateway (Invitrogen) com o uso de uma recombinase, conforme descrito no item 3.2. Células termocompetentes de *E. coli* OmniMAX foram transformadas com os produtos da reação de recombinação o que resultou em 10 colônias selecionadas com o antibiótico espectinomicina, específico para pK7WG2D. Dessas, 4 colônias foram inoculadas para minipreparação de plasmídeos pelo método de lise alcalina para posterior confirmação da inserção do gene por PCR (Figura 10). Apenas plasmídeos preparados a partir da colônia identificada pelo número 4 resultaram em amplificação do fragmento de tamanho esperado (aproximadamente 280 pb) e esta preparação foi utilizada para a transformação de *A. tumefaciens* LBA4404.

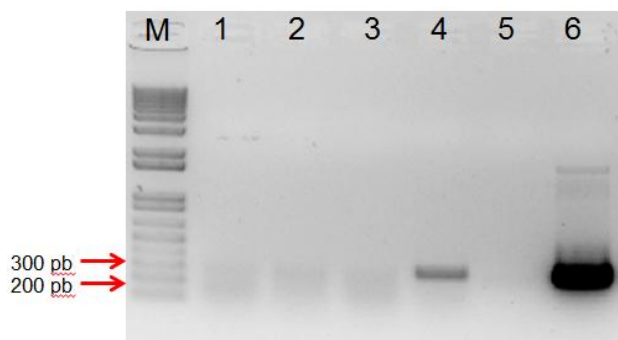


Figura 10 Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR com vistas a confirmar a ligação e clonagem de *Jbtx* no plasmídeo pK7WG2D. Primers específicos ao fragmento de 280 pb de *Jbtx* foram utilizados na reação. A presença de banda deste tamanho permitiu confirmar como clone positivo a preparação de número 4. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA *O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); 1-4, plasmídeos pENTR/D-TOPO minipreparados a partir de colônias de *E. coli* OmniMAX transformadas com os produtos da recombinação de pENTR/D-TOPO-*Jbtx* e pK7WG2D; 5, controle negativo, isto é, mistura de reação sem a adição de DNA-molde; 6, controle positivo, ou seja, pENTR/D-TOPO-*Jbtx*.

4.3 Confirmação da transformação de *A. tumefaciens* LBA4404 com pK7WG2D-*Jbtx*

A transformação do vetor binário pK7WG2D-*Jbtx* em *A. tumefaciens* LBA4404 pelo método de choque térmico resultou em 9 colônias selecionadas com o antibiótico espectinomicina. Dessas, 5 foram utilizadas em PCR de colônia com primers específicos a *Jbtx* para comprovar a presença do gene. Plasmídeos purificados de culturas derivadas de todas as 5 colônias utilizadas permitiram a amplificação por PCR de fragmento de aproximadamente 280 pb, de acordo com o esperado (Figura 11). Portanto, as 5 colônias

foram consideradas positivas para a presença do gene *Jbtx* e, por conseguinte, do plasmídeo binário pK7WG2D-*Jbtx*.

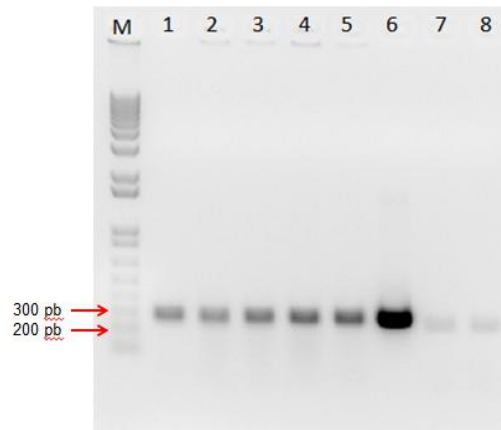


Figura 11 Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR com vistas a confirmar a inserção de pK7WG2D-*Jbtx* em *A. tumefaciens* LBA4404. Primers específicos ao fragmento de 280 pb de *Jbtx* foram utilizados na reação. A presença de banda deste tamanho permitiu confirmar como clone positivo todas as preparações. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA *O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); 1-5, colônias de *A. tumefaciens* LBA4404 utilizadas para PCR; 6, controle positivo, ou seja, pK7WG2D-*Jbtx*; 7- 8, sendo 7 o plasmídeo pK7WG2D e 8, a mistura de reação sem adição de DNA-molde.

4.4 Transformação de *N. tabacum* com *A. tumefaciens* LBA4404::pK7WG2D-*Jbtx*

A transformação de discos foliares de tabaco foi realizada conforme descrito no item 3.9. De acordo com as referências-base do protocolo utilizado, Horsch *et al.*(1985) e Brasileiro & Carneiro (1998), de 3 a 4 semanas após o cocultura há o surgimento dos primeiros brotos resistentes ao agente de seleção. Porém, durante este período, não houve qualquer alteração nos discos além da expansão de seus tamanhos possivelmente por hidratação pelo meio de cultivo. Assim, após as 4 primeiras semanas, os discos foram transferidos para novo meio, para manter a pressão seletiva do antibiótico canamicina.

Somente após 7 semanas em meio seletivo é que os primeiros brotos resistentes ao agente de seleção começaram a surgir e, em 9 semanas, estes foram transferidos para frascos individuais contendo meio para meio de enraizamento (Tabela 7), sem os reguladores de crescimento BAP e NAA. De um total de 100 discos foliares utilizados para a transformação, apenas 4 brotos foram recuperados (Figura 12A), sendo que um total de 20 discos tiveram de ser descartados devido à contaminação bacteriana ou fúngica no meio MS. A eficiência da transformação neste ensaio foi, portanto, de apenas 5%. Um valor considerado muito abaixo

do desejado, considerando-se resultados obtidos por Horsch *et al.*(1985) de aproximadamente 60% de eficiência na formação de brotos.

4.5 Detecção de GFP em brotos de tabaco transformados

O plasmídeo binário pK7WG2D utilizado no trabalho possui o gene repórter que codifica a proteína GFP, capaz de absorver luz azul ou ultravioleta e emitir luz verde fluorescente (PASQUALI & ZANETTINI, 2002). A análise prévia dos brotos regenerados com a iluminação direta com luz azul e observação através de filtro laranja permitiu detectar a fluorescência de GFP em apenas um deles (Figura 12, broto 1). Essa técnica, porém, não é a mais adequada para se avaliar o estado transgênico dos brotos e foi utilizada apenas preliminarmente. A ausência de fluorescência verde nos demais brotos, devido à possibilidade da não-integração ou integração parcial do T-DNA de pK7WG2D, deverá ainda ser confirmada. Portanto, análises moleculares das plantas serão fundamentais para confirmar a integração do gene de interesse no genoma das plantas (BRASILEIRO E CARNEIRO, 1998). Destes brotos, apenas o número 1 regenerou uma planta (Figura 13).

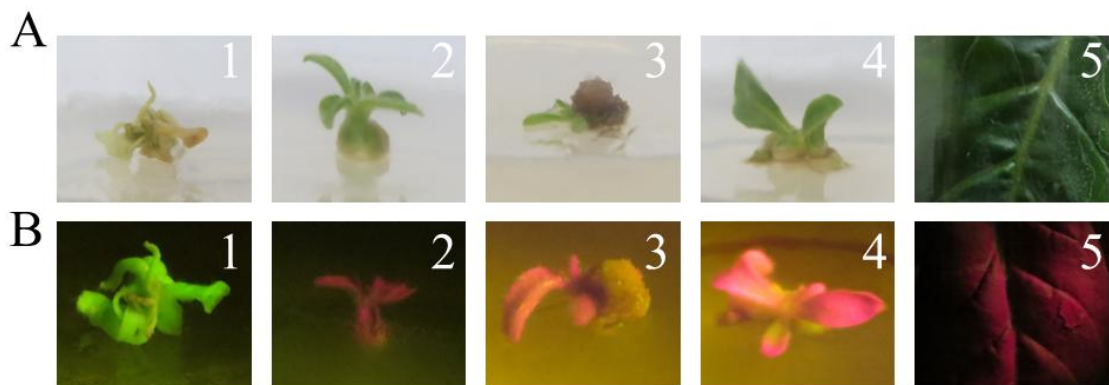


Figura 12 Brotos resultantes da transformação de discos foliares de *N. tabacum* com *A. tumefaciens* LBA4404::pK7WG2D-*Jbtx*. (A) Imagens fotográficas dos brotos obtidos na transformação genética de discos de tabaco (1-4) e de folha de *N. tabacum* SR1 não transformada (5); (B) Imagens fotográficas dos brotos (1-4) e de folha de tabaco não transformado (5) sob luz azul e filtro laranja, evidenciando a fluorescência verde de GFP apenas no broto número 1.

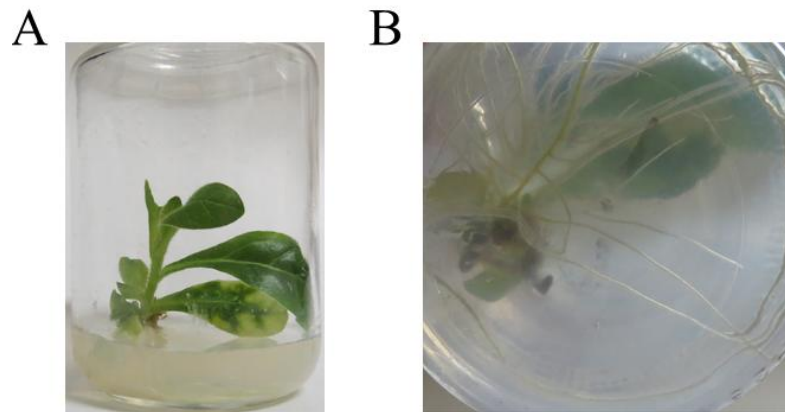


Figura 13 Planta regenerada resultante da transformação de discos foliares de *N. tabacum* com *A. tumefaciens* LBA4404::pK7WG2D-Jbtx. (A) Imagem fotográfica da planta obtida na transformação genética de discos de tabaco mantida *in vitro* em meio MS contendo canamicina. (B) Imagem fotográfica das raízes da planta.

4.6 Extração de DNA

A extração de DNA pelo método de Doyle & Doyle (1987) foi feita utilizando folhas jovens da planta regenerada (Figura 13), equivalente ao broto número 1 (Figura 12) e de folhas de *N. tabacum* selvagens, ou seja, não transformadas. O gel de agarose feito para avaliar a qualidade da extração mostrou que ela foi feita com sucesso, podendo-se observar DNA genômico íntegro (Figura 14).

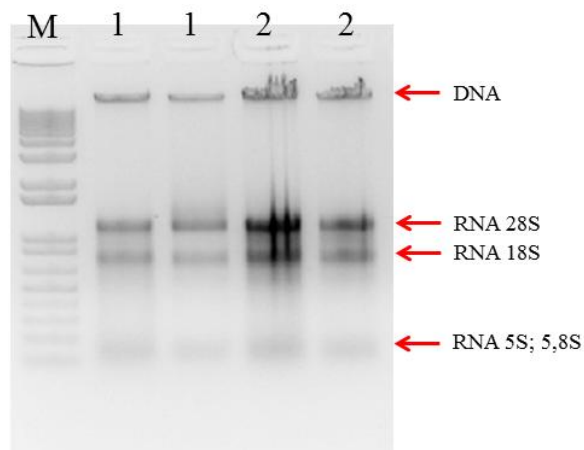


Figura 14 Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da extração de DNA de folhas de *N. tabacum*. A presença de 4 bandas mostrou que a extração foi bem sucedida. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA *O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); 1, duplicatas da extração de DNA de folhas de plantas controle, ou seja, SR1 não transformadas; 2, duplicatas da extração de DNA de folhas da planta transformada regenerada.

4.7 Confirmação da presença de *Jbtx* em *N. tabacum* SR1

A confirmação do gene *Jbtx* foi feita utilizando-se *primers* específicos para o gene. Houve a amplificação esperada (280 pb) na extração de DNA, feita em duplicata, de folhas da planta transformada regenerada. Este resultado mostra que a planta regenerada é positiva. A amplificação observada no controle não transformado pode ser devido à presença de urease endógena em tabaco.

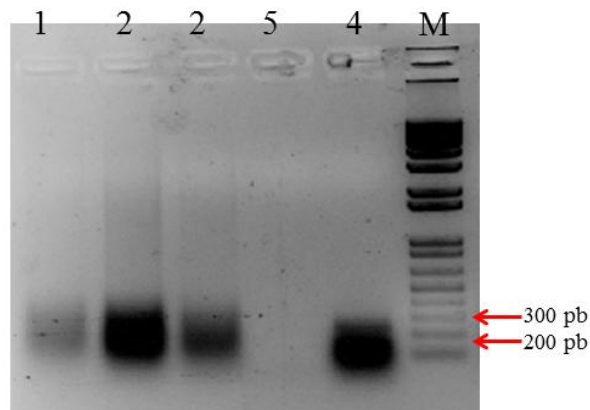


Figura 15 Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR com vistas a confirmar a presença de *Jbtx* na planta regenerada. *Primers* específicos ao fragmento de 280 pb de *Jbtx* foram utilizados na reação. A presença de banda deste tamanho permitiu confirmar como positiva a planta regenerada. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA *O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); 1, extração de DNA de folhas de plantas controle, ou seja, SR1 não transformadas; 2, duplicatas da extração de DNA de folhas da planta transformada regenerada; 4, controle positivo, ou seja, pK7WG2D-*Jbtx*; 5, controle negativo da PCR, ou seja, a mistura de reação.

4.8 Subcultivo da Planta Regenerada

Para verificar a resistência à canamicina da planta regenerada, esta foi subcultivada pela transferência de segmentos do caule em novo meio MS contendo o antibiótico, de acordo com protocolo padrão descrito no item 3.8. Uma semana após a transferência, observou-se a formação de novas raízes, comprovando a resistência à canamicina da planta regenerada (figura 16).

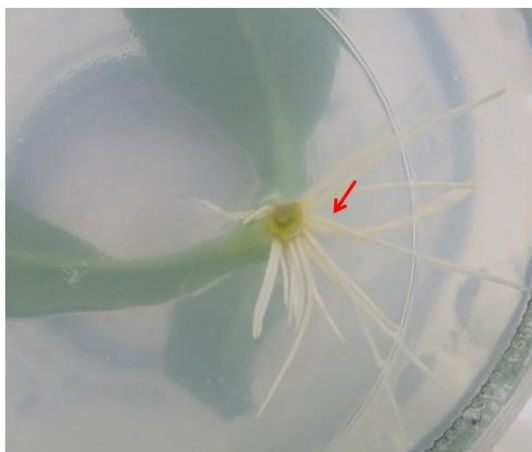


Figura 16 Formação de raízes após subcultivo da planta resultante da transformação de discos foliares de *N. tabacum* com *A. tumefaciens* LBA4404::pK7WG2D-*Jbtx*. Imagem fotográfica das raízes formadas (seta vermelha), mostrando que a planta regenerada é resistente ao antibiótico canamicina.

4.9 Considerações Finais

Além do experimento de transformação descrito no presente trabalho, um total de 3 tentativas de transformação de discos foliares de tabaco com o objetivo de expressar o gene *Jbtx* foram realizadas (resultados não apresentados). Em cada uma delas, utilizaram-se vetores binários distintos, com marcas de seleção diferentes. A transformação utilizando o vetor pEarleyGate 100 (EARLEY *et al.*, 2006) resultou na regeneração de aproximadamente 10 plantas, selecionadas com o herbicida Basta (fosfinotricina). Todos os discos foliares transformados também tiveram uma formação tardia de brotos, isto é, de em torno de 7 semanas após o cocultivo. Após extração de DNA genômico das plantas, não foi possível confirmar o estado transgênico das mesmas por PCR utilizando *primers* específicos para *Jbtx* (resultados não apresentados). Em virtude de tantos escapes, decidiu-se desafiar as plantas com maior concentração do herbicida Basta na tentativa de selecionar plantas transgênicas e eliminar as não-transgênicas. Como resultado, nenhuma das plantas sobreviveu, indicando que todas as plantas eram, de fato, escapes (falso-positivos de transformação) e que esta não era uma boa marca de seleção de plantas. Na transformação utilizando o vetor pH7WG2D (KARIMI *et al.*, 2002), cuja marca de seleção é o gene *hpt*, codificador da enzima higromicina fosfotransferase capaz de conferir resistência ao antibiótico higromicina, não se obteve a formação de brotos, o que demonstrou ineficiência da transformação também com este plasmídeo (resultados não apresentados).

Por fim, utilizou-se o vetor pK7WG2D, conforme descrito no presente trabalho. A seleção feita com o antibiótico canamicina foi eficiente para plantas de tabaco, pois inibiu naturalmente a formação de raízes não-transgênicas (HORSCH *et al.*, 1985; GALLOIS & PATRICK, 1995; BAKHSH *et al.*, 2014). A formação de brotos com expressão de GFP, apesar de tardia, mostrou a eficiência da transformação de discos foliares de tabaco. Porém, ainda é necessário corrigir tecnicamente a baixa eficiência da transformação e da regeneração de brotos para se dar prosseguimento ao trabalho. A baixa eficiência pode ter sido causada pelo protocolo utilizado. No protocolo descrito por Gallois & Patrick (1995), para a transformação de *N. tabacum* SR1 utilizando *A. tumefaciens* LBA4404, o meio de regeneração deve conter apenas citocinina (BAP) como regulador de crescimento, com uma concentração de 1 mg/L. A presença de citocinina e a ausência de auxina no meio nessa etapa estimula uma maior formação de brotos (ATTFIELD *et al.*, 1991). Já o meio de enraizamento deve conter auxina (NAA), em uma concentração de 0,1 mg/L, na qual irá induzir a formação de raízes (CID *et al.*, 2001). A eficiência na transformação, considerando-se plantas que desenvolveram raízes, é de aproximadamente 75% do número total de brotos formados (GALLOIS & PATRICK, 1995). No presente trabalho, utilizou-se BAP e NAA juntos, sempre com concentrações respectivas de 0,1 mg/L e 1 mg/L. Isso pode ter prejudicado tanto a formação dos brotos, cuja quantidade foi muito abaixo do esperado, quanto a regeneração de plantas.

4.10 Perspectivas

A resistência a insetos é o segundo traço genético mais comum dos vegetais transgênicos lançados comercialmente no mundo, perdendo apenas para a resistência ou a tolerância a herbicidas (O'CALLAGHAN *et al.*, 2005). A maioria das cultivares agrícolas transgênicas visa a expressão de proteínas Cry de *B. thuringiensis* – as chamadas plantas-Bt, que conferem às plantas a resistência a insetos (CRICKMORE *et al.*, 2006). Em 2011, culturas de plantas transgênicas alcançaram o número de 160 milhões de hectares no mundo, sendo que 15% dessas foram representadas por plantas-Bt (JAMES *et al.*, 2011), e a maioria destas plantas foram milho, soja e algodão Bt. Considerando que a redução na produção agrícola devido a ataques de insetos é um fator limitante na produção de alimentos (FERRY *et al.*, 2010), a necessidade de se desenvolver novas tecnologias e cultivares resistentes a diferentes pragas é premente. Ademais, o surgimento de insetos resistentes às plantas-Bt e o crescimento dos danos causados por estes é um novo problema encontrado pelos agricultores (BAKSHI *et al.*, 2013). O efeito inseticida de Jbtx em insetos, descrito por Martinelli *et al.*

(2014) mostra o potencial deste peptídeo no controle de pragas na agricultura e como alternativa a *Bt*.

Portanto, a continuação do presente trabalho é justificada por estes fatos. A planta possivelmente transgênica obtida após a transformação passará por outras análises, para que se possa avaliar a efetividade do peptídeo Jbtx como inseticida natural. Pretende-se cumprir, ainda, os objetivos propostos e que não foram atingidos até o presente momento, conforme indicados no item 2.2, ou seja:

- Realizar análises moleculares para avaliar o estado transgênico das plantas e definir o número de cópias de *Jbtx* integradas no genoma via Southern *Blot*.
- Analisar a expressão do transgene *Jbtx* em nível de mRNA por RT-qPCR.
- Detectar o peptídeo recombinante Jbtx nas plantas transgênicas por *Western Blot*.
- Realizar bioensaios com insetos e/ou fungos para verificar a capacidade de Jbtx conferir resistência às plantas.

5 BIBLIOGRAFIA

ATTFIELD, E.; EVANS, P. Developmental pattern of root and shoot organogenesis in cultured leaf explants of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, n. 1, p. 51-57, 1991.

BAKSHI, A.; ANAYOL, E.; OZCAN, S. Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana tabacum* L. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 26, n. 3, p. 259-264, 2014.

BAKSHI, S.; DEWAN, D. Status of Transgenic Cereal Crops: A Review. **Cloning & Transgenesis**, v. 3: 119, 2013.

BERED, F. Interação de plantas com microrganismos. In: FREITAS, L. B. D. e BERED, F. (Ed.). **Genética & Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. cap. 20,

BIMBOIM, H.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. D. C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. 1ª edição. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cernagen, 1998.

BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. *Agrobacterium*: Um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 12, 2012.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, v. 19, n. 5, p. 667-675, 1981.

CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília**, n. 19, p. 16-21, 2001.

CRICKMORE, N. Beyond the spore—past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 616-619, 2006.

DE ANDRADE, G. M.; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatol. bras**, v. 28, p. 5, 2003.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.; HORTORIUM, L.H.B. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p. 13-15, 1987.

FERREIRA-DASILVA, C. T.; GOMBAROVITS, M. E. C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, C. M.; CARLINI, C. R. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 44, n. 4, p. 162-171, 2000.

FERRY, N.; EDWARDS, M. G.; GATEHOUSE, J.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. A. M. R.; GATEHOUSE, A. M. R. Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. **Transgenic Research**, v. 15, n. 1, p. 13-19, 2006.

FOLLMER, C.; BARCELLOS, G.; ZINGALI, R.; MACHADO, O.; ALVES, E.; Barja-Fidalgo, C.; CARLINI, C. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5. 1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. **Biochem. J.**, 360, p. 217-224, 2001.

GALLOIS, P. A. M., PAULO. Leaf Disk Transformation Using *Agrobacterium tumefaciens* – Expression of Heterologous Genes in Tobacco. In: JONES, H. (Ed.). **Plant Gene Transfer and Expression Protocols**. Totowa, NJ, v.49, 1995. cap. 3,

GUERRA, M. A. N., RUBENS. **Apostila de Biotecnologia 1 - Cultura de tecidos vegetal**. Florianópolis: Steinmacher 2006.

HOOD, E. E.; GELVIN, S. B.; MELCHERS, L. S.; HOEKEMA, A. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Research**, v. 2, n. 4, p. 208-218, 1993.

HORSCH, R. B.; FRY, J. E.; HOFFMANN, N. L.; EICHHOLTZ, D.; ROGERS, S. A.; FRALEY, R. T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, v. 227, p. 1229-1231, 1985.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010**. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) Ithaca, NY, USA, 2011.

JONES, D.; SCHOFIELD, J. P. A rapid method for isolating high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 24, p. 7463, 1990.

KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 5, p. 193-195, 2002.

KRAJEWSKA, B. Ureasas I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1, p. 9-21, 2009.

LEE, L.-Y.; GELVIN, S. B. T-DNA binary vectors and systems. **Plant Physiology**, v. 146, n. 2, p. 325-332, 2008.

MARTINELLI, A. H. S.; KAPPAUN, K.; LIGABUE-BRAUN, R.; DEFFERRARI, M. S.; PIOVESAN, A. R.; STANISCUASKI, F.; DEMARTINI, D. R.; VERLI, H.; DAL BELO, C. A.; ALMEIDA, C. G. M.; FOLLMER, C.; CARLINI, C.R.; PASQUALI, G. Structure–function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. 3, p. 935-944, 2014.

MULINARI, F.; STANISCUASKI, F.; BERTHOLDO-VARGAS, L. R.; POSTAL, M.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; RIGDEN, D. J.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; CARLINI, C. R. Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, v. 28, n. 10, p. 2042-2050, 2007.

MURASHIGE, T. A. S., FOLKE. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962

O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T. R.; BURGESS, E. P.; MALONE, L. A. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 50, p. 271-292, 2005.

OOMS, G.; HOOYKAAS, P. J.; VAN VEEN, R. J.; VAN BEELEN, P.; REGENSBURGTUÏNK, T. J.; SCHILPEROORT, R. A. Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. **Plasmid**, v. 7, n. 1, p. 15-29, 1982.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERON, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. 3-22, 2013.

PASQUALI, G. A. Z., MARIA HELENA BODANASE. Transformação genética de plantas. In: FREITAS, L. B. e BERED, F. (Ed.). **Genética & Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. cap. 24,

POSTAL, M.; MARTINELLI, A. H.; BECKER-RITT, A. B.; LIGABUE-BRAUN, R.; DEMARTINI, D. R.; RIBEIRO, S. F.; PASQUALI, G.; GOMES V. M.; CARLINI, C. R. Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 22-32, 2012.

REAL-GUERRA, R.; CARLINI, C. R.; STANISÇUASKI, F. Role of lysine and acidic amino acid residues on the insecticidal activity of Jackbean urease. **Toxicon**, v. 71, p. 76-83, 2013.

REAL-GUERRA, R.; STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C. R. Soybean urease: Over a hundred years of knowledge. In: BOARD, J. E. A (Ed.). **A Comprehensive Survey of International Soybean Research—Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships**. 1ed. Rijeka: Intech, 2013, p. 317-339

RIBEIRO, J. M.; BASTOS, D. C.; DE OLIVEIRA, E. A. G.; DE SOUZA, J. A. M.; PINTO, M. D. S. T.; HANSEN, E. E. T. Transformação de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) com os genes recombinantes 35SHBsAg e 35SHBsAgER do vírus da hepatite B. **Revista Biotemas**, v. 23, p. 1, 2010.

SAHIJRAM, L.; RAJASEKHARAN, P. Tissue culture strategies applicable to in vitro conservation of tropical fruit crops. **Tropical fruits In Asia: Conservation and Use. IBPGR Progress Report. IBPGR Rome**, 1996.

SANTOS; DOS, E. K. Totipotência celular e cultura de tecidos. In: FREITAS, L. B. D. e BERED, F. (Ed.). **Genética & Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. cap. 23.

STANISCUASKI, F.; FERREIRA-DASILVA, C. T.; MULINARI, F.; PIRES-ALVES, M.; CARLINI, C. R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Toxicon**, v. 45, n. 6, p. 753-760, 2005.

SUMNER, J. B. The Isolation And Crystallization Of The Enzyme Urease Preliminary Paper. **Journal of Biological Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 435-441, 1926.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Simple multiplication and effective genetic transformation (four methods) of in vitro-grown tobacco by stem thin cell layers. **Plant Science**, v. 169, n. 6, p. 1046-1058, 2005.

TOPPING , J. F. Tobacco transformation. In: FOSTER, G. D. e TAYLOR, S. C. (Ed.). **Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance**. Totowa, NJ, v.81, 1998. cap. 38, (Methods in Molecular Biology).

TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 147-154, 2006.

WOHLER, F. **On the artificial production of urea**. Annalen der Physik und Chemie 88, (1828).

YADAV, N. S.; VANDERLEYDEN, J.; BENNETT, D. R.; BARNES, W. M.; CHILTON, M. D. Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 79, n. 20, p. 6322-6326, 1982.

ZAMBRYSKI, P.; JOOS, H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **The EMBO Journal**, v. 2, n. 12, p. 2143, 1983.