

# Plasmídeos Derivados de Vírus para Conferir Resistência a Herbicidas em *Eucalyptus*

Isadora Bianchin & Giancalo Pasquali

Laboratório de Biologia Molecular Vegetal – Centro de Biotecnologia e Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia do Instituto de Biociências – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre RS, Brasil

## Introdução

O gênero *Eucalyptus* inclui diversas espécies de importância florestal e industrial que se destacam pelas excelentes características silviculturais e pela aplicação na produção de madeira maciça, celulose e papel. A geração de variantes geneticamente modificadas de eucalipto que possam conferir vantagens fenotípicas e atender à crescente demanda por produtos derivados da madeira é de grande importância. No entanto, a transgenia do eucalipto ainda apresenta grandes limitações técnicas. A tecnologia *TraitUP™*, desenvolvida pela empresa Morflora, é uma alternativa para a introdução de genes de interesse em plantas, tendo sido comprovadamente eficaz em diversas espécies. O método está fundamentado em vetores virais desarmados, denominados “IL-60”, contendo gene(s) de interesse. Tais vetores atuam como plasmídeos e são capazes de se propagar pela planta de forma assintomática e episomal, levando à expressão do(s) gene(s) de modo sistêmico e duradouro, sendo, assim, uma excelente alternativa aos métodos atuais de transgenia.

## Objetivo

Avaliar a aplicabilidade da tecnologia *TraitUP™* em *Eucalyptus*, gerando e testando versões dos vetores IL-60 contendo genes capazes de conferir resistência a herbicidas e a antibióticos.

## Metodologia

Inserção dos genes de interesse em vetor da série IL-60

Seleção dos genes *bar* e *nptII*, que conferem resistência ao glifosinato de amônio e à canamicina

Projeção de *primers* para as sequências codificadoras de BAR e NPTII e amplificação por PCR a partir de vetores de origem

Clonagem dos *amplicons* no vetor pENTR/D-TOPO

Recombinação com o vetor de destino p28\_35S\_Gateway, vetor da série IL-60 adaptado ao sistema Gateway

Confirmação da identidade e da sequência dos vetores finais, p28\_35S-*bar* e p28\_35S-*nptII*, via clivagem com enzimas de restrição e sequenciamento

Determinação da dose letal mínima de canamicina e glifosinato de amônio

Tratamento de plântulas de *Eucalyptus* com os vetores, via absorção direta pelas raízes

Exposição aos agentes de seleção, nas concentrações previamente estabelecidas

Avaliação fenotípica da resistência conferida pelos vetores

Detecção da presença sistêmica e duradoura dos vetores nas plantas

Figura 1. Fluxograma das etapas do projeto em desenvolvimento. A seta rosa indica a atual etapa do projeto.

## Resultados

As sequências codificadoras de BAR e NPTII foram amplificadas a partir dos vetores pWBVec4a e pCAMBIA2300, respectivamente, e clonadas direcionalmente no vetor pENTR/D-TOPO.

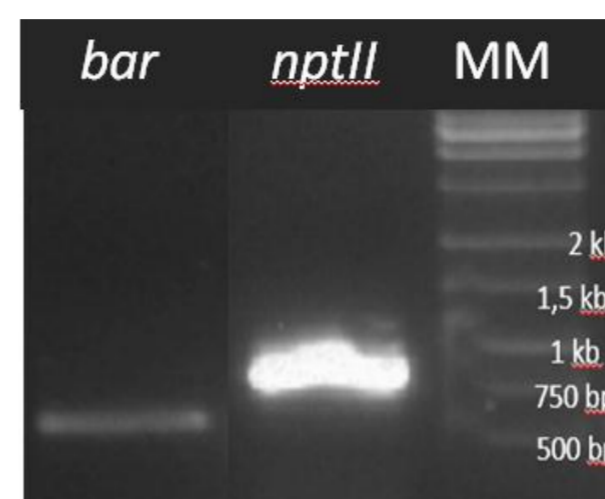


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % dos produtos de amplificação *bar* e *nptII*, cujos tamanhos esperados são de ~600 e 798 bp. MM, marcador 1 Kb DNA Ladder (Ludwig).

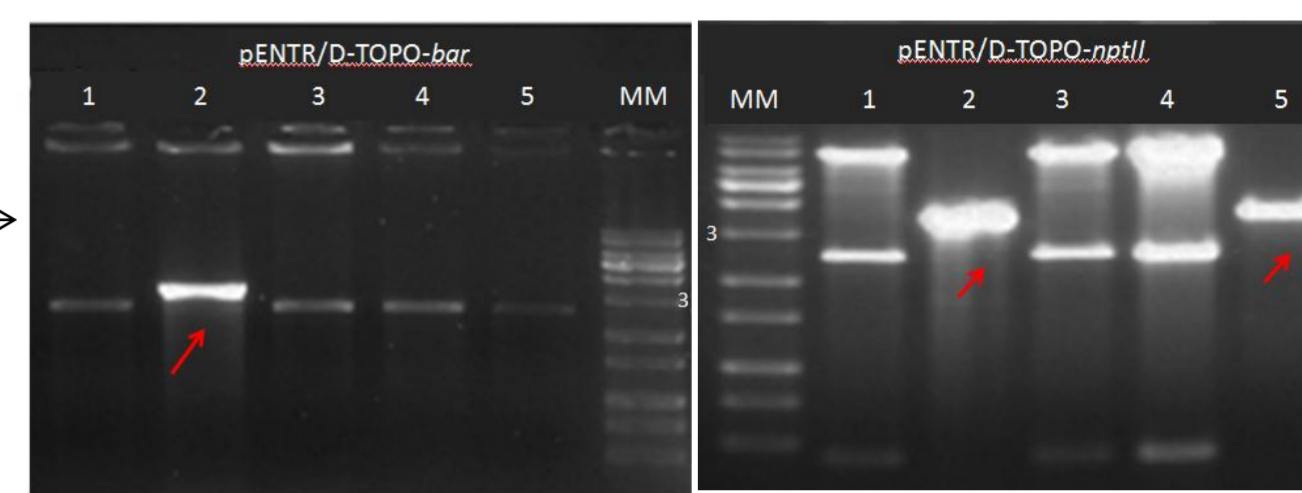


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % dos produtos de clonagem clivados com enzimas de restrição. As bandas indicadas por setas correspondem a versões recombinantes do vetor (contendo os genes *bar* ou *nptII*). MM, marcador 1 Kb DNA Ladder (Ludwig).

Os vetores pENTR/D-TOPO-*bar* e pENTR/D-TOPO-*nptII* foram recombinados com p28\_35S\_Gateway via LR Clonase, resultando nos vetores p28\_35S-*bar* e p28\_35S-*nptII*. A identidade dos vetores foi confirmada por clivagem com enzimas de restrição e sequenciamento de DNA.

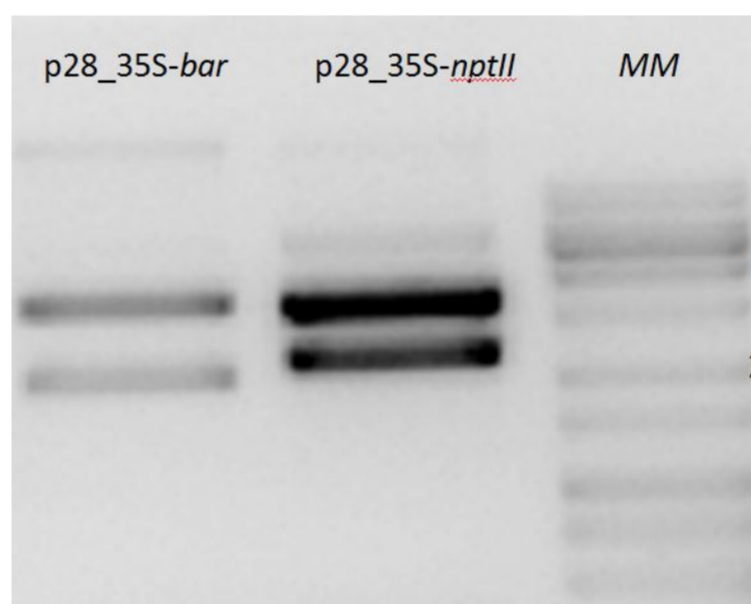


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % dos vetores p28\_35S-*bar* e p28\_35S-*nptII* clivados. MM, marcador 1 Kb DNA Ladder (Ludwig).

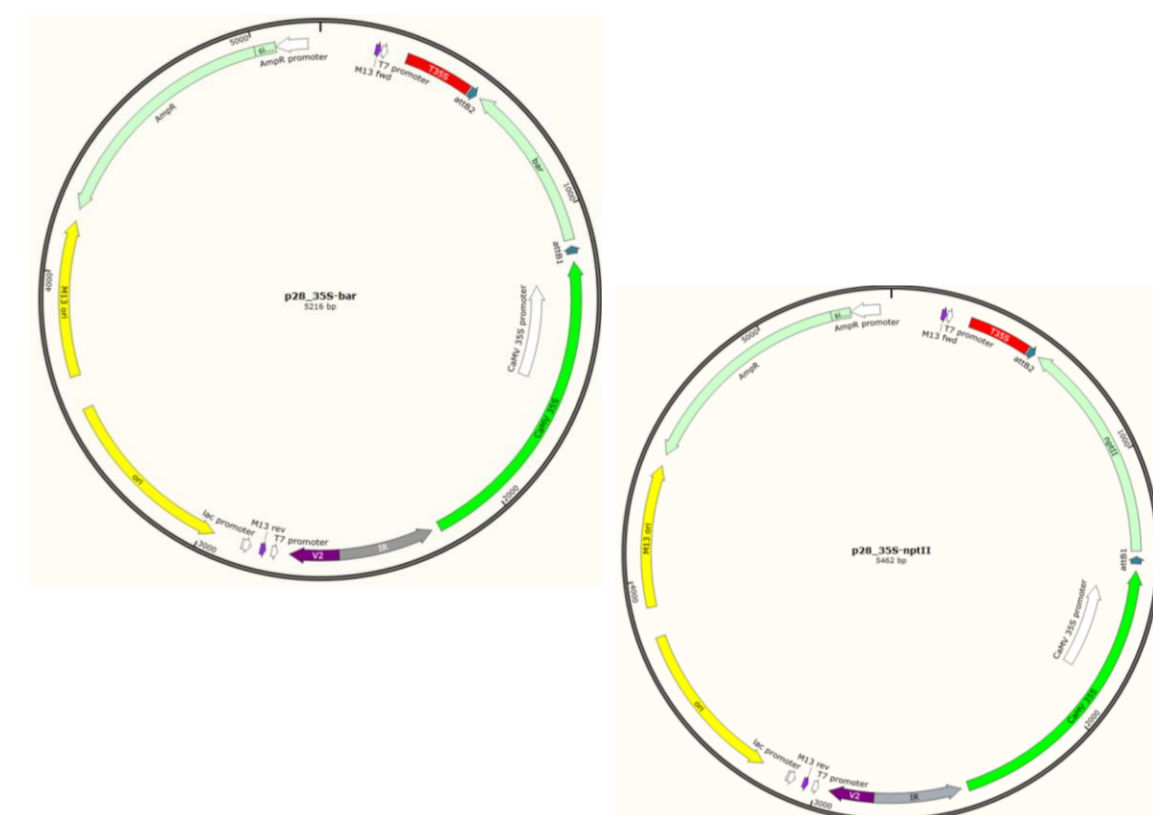


Figura 5. Mapa dos vetores p28\_35S-*bar* e p28\_35S-*nptII*.

Plântulas de *E. urophylla* foram submetidas à curva de seleção com glifosinato de amônio. A dose letal mínima de 10 mg/L foi determinada.

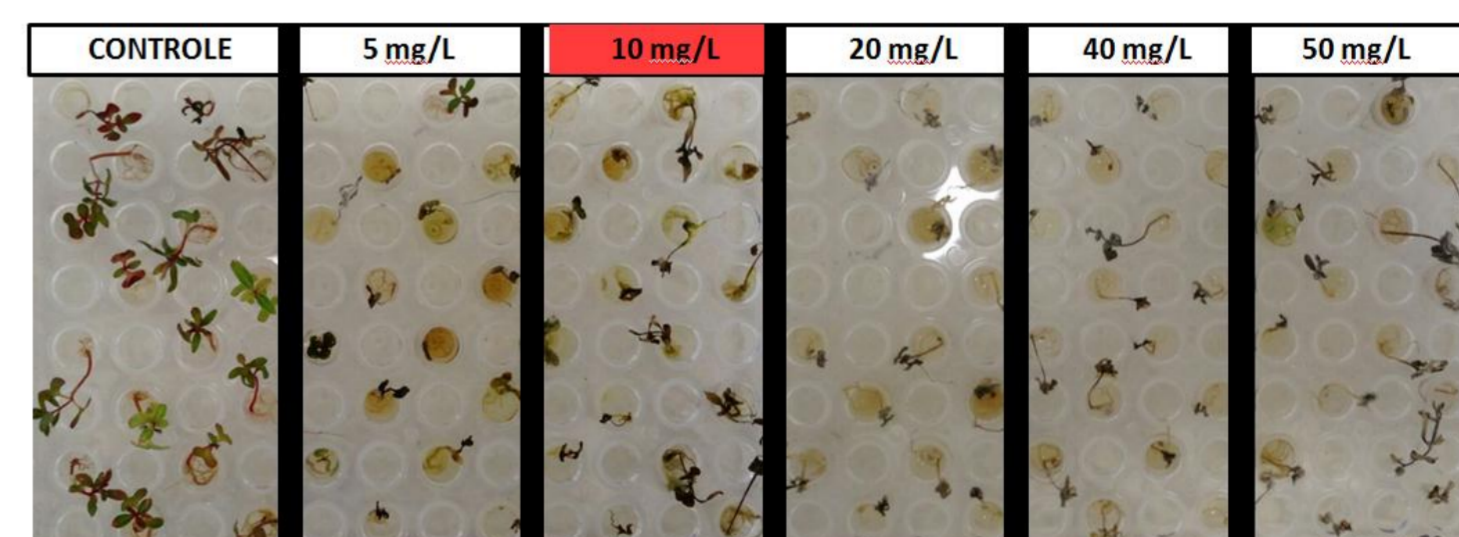


Figura 6. Resultado da curva de seleção para glifosinato de amônio, após 35 dias de imersão das raízes nas soluções do herbicida. A concentração mínima capaz de eliminar 100% das plantas foi de 10 mg/L (glifosinato de amônio em água).

## Perspectivas

- Determinação da dose letal mínima de Canamicina
- Tratamento de plantas de *Eucalyptus* com os vetores recombinantes “IL-60”, por contato com as raízes e/ou inoculação no caule
- Determinação fenotípica da resistência, pela observação da sobrevivência após tratamento com agentes seletivos
- Análises moleculares para a detecção da presença sistêmica e duradoura dos plasmídeos nas plantas

Apoio: